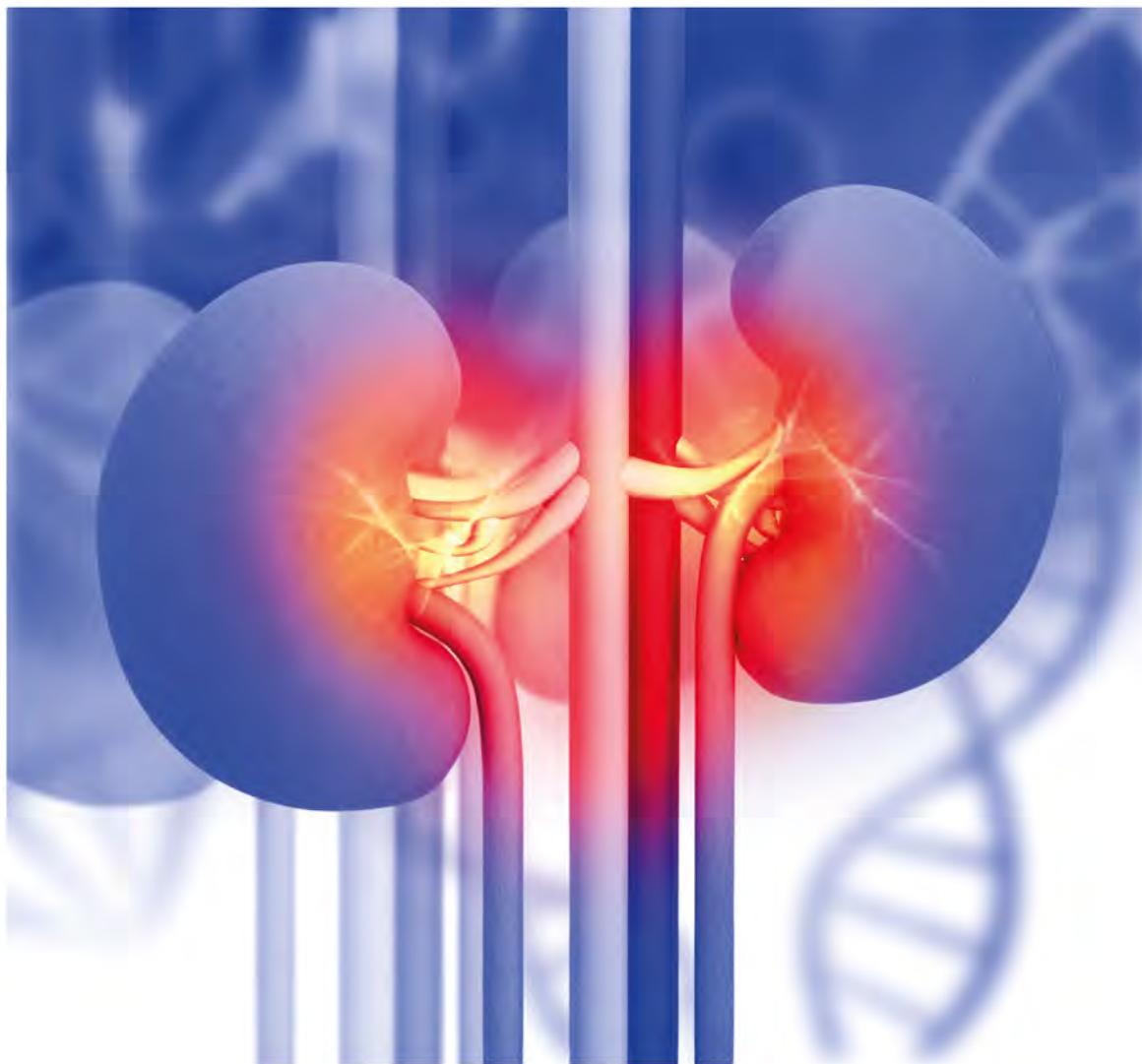


Bionatura

Ibero-American journal of Biotechnology and Life Sciences



Risk factors associated with high blood pressure and chronic kidney disease

publons Scopus®

X CTIE CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA, INNOVACIÓN Y EMPRENDIMIENTO

UEB
UNIVERSIDAD
ESTATAL DE BOLIVAR

ICIVS CONGRESO INTERNACIONAL DE VINCULACIÓN CON LA SOCIEDAD Y LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

UCO
Universidad Católica de Oriente



UNAH
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE HONDURAS



جامعة كربلاء
University of Kerbala

clinicalbiotec.com



Es el momento de los que se atreven a
soñar y luchan por alcanzar sus metas.
En la UCO te acompañamos



Vigilada Mineducación

Pregrados

> Tecnología en Operaciones Financieras

SNIES 104841 Registro Calificado - Res. 12903 del 21-06-2015 M.E.N.
95 créditos - A distancia tradicional - Fionegro Ant.

> Contaduría Pública

SNIES 13018 Registro Calificado - Res. 9256 del 07-06-2018
Acreditación de Alta Calidad 4610 del 21-03-2018 M.E.N.
166 créditos - Presencial - Fionegro

> Comercio Exterior

SNIES 1854 Registro Calificado - Res. 14314 del 11-12-2019 M.E.N.
159 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Administración de Empresas

SNIES 55096 Registro Calificado - Res. 7658 del 18-04-2017 M.E.N.
152 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Tecnología Agropecuaria

SNIES 1850 Registro Calificado - Res. 8884 del 10-07-2013 M.E.N.
113 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Agronomía

SNIES 4443 Registro Calificado - Res. 8067 del 17-05-2018
Acreditación de Alta Calidad N° 29149 del 26-12-2017
157 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Zootecnia

SNIES 53037 Registro Calificado - Res. 14466 del 04-09-2014 M.E.N.
156 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Psicología

SNIES 8562 Registro Calificado - Res. 9902 del 31-07-2013 M.E.N.
Acreditación de Alta Calidad N° 17227 del 24-10-2018
175 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Comunicación Social

SNIES 53045 Registro Calificado - Res. 14892 del 11-09-2014 M.E.N.
146 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Trabajo Social

SNIES 106586 Registro Calificado - Res. 26741 del 29-11-2017 M.E.N.
141 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Derecho

SNIES 53639 Registro Calificado - Res. 10542 del 14-07-2015 M.E.N.
168 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Nutrición y Dietética

SNIES 104901 Registro Calificado - Res. 7923 del 01-06-2015 M.E.N.
166 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Gerontología

SNIES 1853 Registro Calificado - Res. 14839 del 22-10-2013 M.E.N.
139 créditos - A distancia con apoyo Virtual - Fionegro Ant.

> Enfermería

SNIES 91027 Registro Calificado - Res. 12600 del 03-08-2018 M.E.N.
166 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Licenciatura en Filosofía

SNIES 106542 Registro Calificado - Res. 22108 del 24-10-2017 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Licenciatura en Lenguas Extranjeras con énfasis en Inglés

SNIES 106647 Registro Calificado - Res. 29529 del 29-12-2017 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Licenciatura en Educación Física, Recreación y Deportes

SNIES 106436 Registro Calificado - Res. 17481 del 31-08-2017 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Licenciatura en Educación para la Primera Infancia

SNIES 105359 Registro Calificado - Res. 02848 del 16-02-2016 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Licenciatura en Ciencias Naturales

SNIES 106896 Registro Calificado - Res. 19869 del 18-10-2016 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Licenciatura en Educación Religiosa

SNIES 106705 Registro Calificado - Res. 2084 del 13-02-2018 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Técnico Profesional en Programación Web

SNIES 103704 Registro Calificado - Res. 14454 del 04-09-2014 M.E.N.
67 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Ingeniería Ambiental

SNIES 4361 Registro Calificado - Res. 3654 del 02-03-2018 M.E.N.
Acreditación de Alta Calidad No. 6543 del 18-04-2018
173 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Ingeniería de Sistemas

SNIES 1855 Registro Calificado - Res. 0178 del 05-01-2019 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Ingeniería Industrial

SNIES 1856 Registro Calificado - Res. 1293 del 04-02-2019 M.E.N.
160 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Ingeniería Electrónica

SNIES 20271 Registro Calificado - Res. 24646 del 14-11-2017 M.E.N.
178 créditos - Presencial - Fionegro Ant.

> Teología

SNIES 103450 Registro Calificado - Res. 10638 del 09-07-2014 M.E.N.
130 créditos - A distancia - Fionegro Ant.

¡HAGAMOS QUE PASE!





SOMOS UNA **MACROUNIVERSIDAD**

RECTORA DEL NIVEL DE EDUCACIÓN SUPERIOR EN HONDURAS

APROXIMADAMENTE:

100,000 Estudiantes

4,000 Docentes

10 Facultades

9 Centros regionales



DICIHT
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA,
HUMANÍSTICA Y TECNOLÓGICA



UNAH
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE HONDURAS

Bionatura



La Revista Bionatura publica trimestral en español o inglés trabajos inéditos de investigaciones básicas y aplicadas en el campo de la Biotecnología, la Inmunología, la Bioquímica, Ensayos Clínicos y otras disciplinas afines a las ciencias biológicas, dirigidas a la obtención de nuevos conocimientos, evaluación y desarrollo de nuevas tecnologías, productos y procedimientos de trabajo con un impacto a nivel mundial.

Equipo editorial

Editor Jefe / Chief Editor

Dr. Nelson Santiago Vispo, Ph.D. Research / Full Professor. Yachay Tech University, Ecuador. Member of the European Association of Science Editors (EASE) and Council of Science Editors (USA).

Principal Editorial Board / Consejo Editorial Principal

Dr. Fernando Albericio, Ph.D. Full Professor. University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa.

Dr. Spiros N. Agathos, Ph.D. Full Professor. Université Catholique de Louvain - UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgium.

Dra. Hortensia María Rodríguez Cabrera, Ph.D. Full Professor and Dean, School of Chemical Sciences and Engineering Yachay Tech University, Ecuador.

Dr. Frank Alexis, Research / Full Professor. Vice Chancellor Of Research and Innovation. Yachay Tech University, Ecuador.

Consejo Editorial / Editorial Board

Dr. Gerardo Ferbeyre, Full Professor. Département de biochimie. Faculté de Médecine. Université de Montréal, Canadá.

Dr Frank Camacho Casanova, Ph.D., Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción, Chile.

Dr. Eduardo López Collazo, Director IdiPAZ Institute of Biomedical Research, La Paz Hospital, España.

Dr. Yovani Marrero-Ponce, Ph.D. Full Professor. Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Ecuador.

Dr. Manuel Limonta, Prof. PhD. Director: Regional Office for Latin American and the Caribbean International Council for Science (ICSU). Doctor honoris causa Autonomous Metropolitan University of México City (UAM), Dr. Honoris Causa - Universidad Central Ecuador.

Dr. Dagoberto Castro - Restrepo, Prof. PhD. Research and Development Director. Universidad Católica del Oriente, Rio Negro, Colombia

Dr. Michael Szardenings, Ph.D. Ligand Development Unit. Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Germany.

Dra. Luciana Dente, Research Professor University of Pisa, Italy.

Dr. Costantino Vetriani, Research / Full Professor. Rutgers, The State University of New Jersey, USA.

Dr. Si Amar Dahoumane, Ph.D. Research / Professor. Yachay Tech University, Ecuador.

Dr. Amit Chandra, MD, MSc, FACEP Global Health Specialist, Emergency Physician Millennium Challenge Corporation, London School of Economics and Political Science.

Dr. Silvio e. Perea, Ph.D. Head of the Molecular Oncology Laboratory, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.

Dra. Daynet Sosa del Castillo, Ph.D. Directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. CIBE-ESPOL.

Dra. Consuelo Macías Abraham, Especialista de II Grado en Inmunología, Investigadora y Profesora Titular, Doctora en Ciencias Médicas y Miembro Titular de la Academia de Ciencias de Cuba. Directora del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), de La Habana, Cuba.

Dr. René Delgado, Ph.D. IFAL / Presidente Sociedad Cubana de Farmacología, Cuba.

Dr. Ramón Guimil, Senior Director. Oligonucleotide Chemistry bei Synthetic Genomics, Estados Unidos.

Dr. Eduardo Penton, MD, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.

Dr. Julio Raúl Fernández Massó, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba

Dra. Lisset Hermida, Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.

Dr. Tirso Pons, Staff Scientist. Structural Biology and Biocomputing Programme (CNIO), España.

Dr. Che Serguera, French Institute of Health and Medical Research, MIRCen, CEA, Fontenay-aux-Roses Paris, France.

Dr. Jorge Roberto Toledo, Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.

Dr. Oliberto Sánchez, Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.
Dr. Aminael Sánchez Rodríguez, PhD. Director del departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
Dra. Maritza Pupo, Profesora investigadora. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.

Dr. Fidel Ovidio Castro, Founder, Profesor investigador. Tecelvet, Chile.
Dra. Olga Moreno, Partner, Head Patent Division. Jarry IP SpA, Chile.

Dr. Carlos Borroto, Asesor de Transferencia de Tecnología. Dirección General at Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), México.
Dr. Javier Menéndez, Manager Specialist Process and Product 5cP. Sanofti Pasteur, Canadá.

Dr. Pedro Valiente, Profesor investigador. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.

Dr. Diógenes Infante, Prometeo / SENESCYT. Especialista de primer nivel en Biotecnología. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.

Dra. Georgina Michelena, Profesora Investigador. Organización de las Naciones Unidas. (ONU), Suiza.

Dr. Francisco Barona, Profesor Asociado. Langebio Institute, México
Dr. Gustavo de la Riva, Profesor Investigador Titular. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, México.

Dr. Manuel Mansur, New Product Introduction Scientist (NPI) at Elanco Animal Health Ireland, Irlanda.

Dr. Rolando Pajón, Associate Scientist, Meningococcal Pathogenesis and Vaccine Researc. Center for Immunobiology and Vaccine Development, UCSF Benioff Children's Hospital Oakland", Estados Unidos.

Dra. Ileana Rosado Ruiz-Apodaca, Profesor / Investigador. Universidad de Guayaquil, Ecuador.

Dr. Carlos Eduardo Giraldo Sánchez, PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.

Dr. Mario Alberto Quijano Abril, PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.

Dr. Felipe Rojas Rodas, PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.

Dra. Isabel Cristina Zapata Vahos, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.

Dr. Felipe Rafael Garcés Fiallos, PhD, Profesor / Investigador. Vicerrectorado de Investigación, Gestión Social del Conocimiento y Posgrado Universidad de Guayaquil (UG), Ecuador.

Dra. Celia Fernandez Ortega, PhD. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Editora ejecutiva Biotecnología Aplicada, Cuba.

Dra. Ligia Isabel Ayala Navarrete, PhD. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Ecuador.

Dr. Nalini kanta Sahoo, PhD. Professor & Head Department Marri Laxman Reddy Institute of Pharmacy, Hyderabad, Andhra Pradesh, India.

Dr. Saman Esmailnejad, Ph.D. Department of medical sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Dr. Olukayode Karunwi, Ph.D. Research / Professor. Clemson University, Clemson, United States.

Associate Editor / Editor Asociado

Victor Santiago Padilla.

Redacción y Edición / Copyediting and corrections

Mg. Frey A. Narváez-Villa, Jefe del Fondo Editorial Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.

MSc. José Enrique Alfonso Manzanet.

Diseño y Realización gráfica / Graphic design and production

DI. José Manuel Oubiña González.

Relaciones Públicas / Public relations

Camila Barranco Rodriguez.

Asistente de publicación / Publication assistant

Evelyn Padilla Rodriguez.

Instrucciones para los Autores

Los Trabajos serán Inéditos: Una vez aprobados, no podrán someterse a la consideración de otra revista, con vistas a una publicación múltiple, sin la debida autorización del Comité Editorial de la Revista. La extensión máxima será 8 cuartillas para los trabajos originales, 12 las revisiones y 4 las comunicaciones breves e informes de casos, incluidas las tablas y figuras. Los artículos se presentarán impresos (dos ejemplares). Todas las páginas se numerarán con arábigos y consecutivamente a partir de la primera. Estos deben acompañarse de una versión digital (correo electrónico o CD) en lenguaje Microsoft Word, sin sangrías, tabuladores o cualquier otro atributo de diseño (títulos centrados, justificaciones, espacios entre párrafos, etc.). Siempre se ha de adjuntar la carta del consejo científico que avala la publicación y una declaración jurada de los autores.

Referencias Bibliográficas. Se numerarán según el orden de mención en el texto y deberán identificarse mediante arábigos en forma exponencial. Los trabajos originales no sobrepasarán las 20 citas; las revisiones, de 25 a 50 y las comunicaciones breves e informes de casos.

En las Referencias en caso de que las publicaciones revisadas esten online se debe proveer un enlace consistente para su localización en Internet. Actualmente, no todos los documentos tienen DOI, pero si lo tienen se debe incluir como parte de la referencias. Si no tuviese DOI, incluir la URL.

Tablas, modelos y anexos: Se presentarán en hojas aparte (no se intercalarán en el artículo) y en forma vertical numeradas consecutivamente y mencionadas en el texto. Las tablas se ajustarán al formato de la publicación se podrán modificar si presentan dificultades técnicas.

Figuras: Las fotografías, gráficos, dibujos, esquemas, mapas, salidas de computadora, otras representaciones gráficas y fórmulas no lineales, se denominarán figuras y tendrán numeración arábica consecutiva. Se presentarán impresas en el artículo en páginas independientes y en formato digital con una resolución de 300 dpi. Todas se mencionarán en el texto. Los pies de figuras se colocarán en página aparte. El total de las figuras y tablas ascenderá a 5 para los trabajos originales y de revisión y 3 para las comunicaciones breves e informes de casos.

Abreviaturas y siglas: Las precederá su nombre completo la primera vez que aparezcan en el texto. No figurarán en títulos ni resúmenes. Se emplearán las de uso internacional.

Sistema Internacional de Unidades (SI): Todos los resultados de laboratorio clínico se informarán en unidades del SI o permitidas por este. Si se desea añadir las unidades tradicionales, se escribirán entre paréntesis. Ejemplo: glicemia: 5,55 mmol/L (100 mg/100 mL).

Para facilitar la elaboración de los originales, se orienta a los autores consultar los requisitos uniformes antes señalados disponibles en: [http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvancouver.htm#ilustraciones%20\(figura\)](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvancouver.htm#ilustraciones%20(figura))

Los trabajos que no se ajusten a estas instrucciones, se devolverán a los autores. Los aceptados se procesarán según las normas establecidas por el Comité Editorial. El arbitraje se realizará por pares y a doble ciego en un período no mayor de 60 días. Los autores podrán disponer de no más de 45 días para enviar el artículo con correcciones, se aceptan hasta tres reenvíos. El Consejo de Redacción se reserva el derecho de introducir modificaciones de estilo y/o acotar los textos que lo precisen, comprometiéndose a respetar el contenido original.

El Comité Editorial de la Revista se reserva todos los derechos sobre los trabajos originales publicados en esta.

Bionatura

La **Revista Bionatura** es un medio especializado, interinstitucional e interdisciplinario, para la divulgación de desarrollos científicos y técnicos, innovaciones tecnológicas, y en general, los diversos tópicos relativos a los sectores involucrados en la biotecnología, tanto en Ecuador como en el exterior; así mismo, la revista se constituye en un mecanismo eficaz de comunicación entre los diferentes profesionales de la biotecnología.

Es una publicación sin ánimo de lucro. Los ingresos obtenidos por publicidad o servicios prestados serán destinados para su funcionamiento y desarrollo de su calidad de edición. (<http://revistabionatura.com/media-kit.html>)

Es una revista trimestral, especializada en temas concernientes al desarrollo teórico, aplicado y de mercado en la biotecnología.

Publica artículos originales de investigación y otros tipos de artículos científicos a consideración de su consejo editorial, previo proceso de evaluación por pares (peer review) sin tener en cuenta el país de origen.

Los idiomas de publicación son el Español e Inglés.

Los autores mantienen sus derechos sobre los artículos sin restricciones y opera bajo la política de Acceso Abierto a la Información, bajo la licencia de Creative Commons 4.0 CC BY-NC-SA (Reconocimiento-No Comercial-Compartir igual).

Esta revista utiliza Open Journal Systems, que es un gestor de revistas de acceso abierto y un software desarrollado, financiado y distribuido de forma gratuita por el proyecto Public Knowledge Project sujeto a la Licencia General Pública de GNU.

Nuestros contactos deben ser dirigidos a:
Revista Bionatura: editor@revistabionatura.com

ISSN: 1390-9347 (Versión impresa)

Formato: 21 x 29,7 cm

ISSN: 1390-9355 (Versión electrónica)

Sitio web: <http://www.revistabionatura.com>

Publicación periódica trimestral

Esta revista utiliza el sistema peer review para la evaluación de los manuscritos enviados.

Instrucciones a los autores en:

<http://revistabionatura.com/instrucciones.html>

Asistente de publicación / Publication assistant
Evelyn Padilla Rodriguez (sales@revistabionatura.com)

La Innovación Tecnológica y su impacto en la Educación Superior Technological Innovation and its impact on Higher Education

Hernán Arturo Rojas Sánchez¹; Silvia Rosa Pacheco Mendoza¹; Carlos Ribadeneira Zapata¹; Isidro Favián Bayas Morejón^{1*}; Jorge Alexander Briceño Carrasquel¹; José Luis Gaibor Becerra¹; Michael Xavier Hachi Pazmiño¹; Jhoselyn Deyalit Guarnizo Ordóñez¹; Gustavo Javier Vega Romero¹.

¹ Universidad Estatal de Bolívar, Vicerrectorado de Investigación y Vinculación, Campus Académico “Laguacoto 2” Guaranda, Ecuador

*Correspondence: fbayas@ueb.edu.ec

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.1>

Los tiempos postpandémicos han demostrado que la investigación científica es el método que permite generar soluciones eficaces a problemas urgentes y complejos. La ciencia tiene el poder de mostrar el camino hacia un futuro sostenible, saludable y equitativo.

En este sentido, es importante la organización de eventos de difusión científica, puesto que son escenarios destinados al intercambio de ideas, presentación de avances y colaboración entre expertos de renombre de las diferentes disciplinas del conocimiento¹.

La Universidad Estatal de Bolívar (UEB) desempeña un papel importante como ente generador de espacios de articulación entre las funciones sustantivas de docencia, investigación y vinculación. Todo ello, enfocado en presentar alternativas para la resolución de los problemas que aquejan a la sociedad en el marco de la pertinencia y los fines institucionales.

El Congreso Internacional de Ciencia, Tecnología, Innovación y Emprendimiento organizado por la Universidad Estatal de Bolívar, ha forjado su propia historia desde su primera edición, que fue ideado, organizado y llevado a cabo los días 10 y 11 de julio de 2013. Este acontecimiento se ha convertido en un hito dentro de la historia institucional y ha ido evolucionando conforme a la realidad dinámica del entorno social, académico y científico.

Desde la segunda edición que se desarrolló en el año 2014, con base a la cooperación con la Fundación Maquita Cushunchic se incorporó el emprendimiento entre sus ejes temáticos, pasando así a denominarse: Congreso Internacional de Ciencia, Tecnología, Innovación y Emprendimiento, CTIE. En la edición de 2023, se incluye el Congreso Internacional de Vinculación con la Sociedad, CIVS, como un espacio autónomo de difusión.

La continuidad a lo largo de una década en la organización de eventos de divulgación demuestra el compromiso constante de la UEB con la investigación científica, fortalecido con la inclusión de la Vinculación con la Sociedad.

El X CTIE y I CIVS-UEB como eventos multidisciplinarios cuentan con 15 ejes temáticos que abordan los dominios institucionales:

1. **Biotecnología, biomedicina y bioética:** Es un conjunto de técnicas que aborda dilemas vinculados a la manipulación genética, la investigación médica y el tratamiento de enfermedades. Su objetivo radica en alcanzar un equilibrio ético entre los progresos científicos y las consideraciones morales de la búsqueda de soluciones médicas².
2. **Digitalización educativa y nuevos modelos de aprendizajes:** Implica la integración de tecnologías en procesos de enseñanza y de aprendizaje. Se centra en el desarrollo de nuevos modelos educativos que aprovechen la tecnología para mejorar la accesibilidad, personalización y eficacia del aprendizaje, dirigiendo la experiencia educativa hacia enfoques más dinámicos y adaptativos³.
3. **Economía naranja:** Abarca sectores creativos y culturales, propiciando condiciones adecuadas para generar empleos de calidad en el sector cultural. Incluye áreas como el diseño, la publicidad, el entretenimiento y la moda. Este enfoque busca impulsar la innovación y fomentar el desarrollo económico-financiero de las industrias culturales y creativas⁴.
4. **Emprendimiento y comercio justo:** El emprendimiento promueve la creación de modelos de negocios éticos y sostenibles, basado en la innovación de procesos y en la masificación de las pequeñas y medianas empresas. Mientras que el comercio justo se enfoca en garantizar las condiciones justas en el proceso productivo, estandarizando los costos de producción y normalizando la comercialización. El correcto desarrollo de los dos conceptos en el campo acción, permite alcanzar la equidad social, ambiental y financiera en la cadena de suministro.⁵
5. **Finanzas y marketing digital:** Constituyen herramientas digitales que desempeñan un papel fundamental en la gestión de recursos económicos y en el proceso de comercialización de productos y servicios, impulsando la maximización de las ganancias. La sinergia entre finanzas y marketing digital optimiza la toma de decisiones financieras y fortalece la presencia en línea⁶.
6. **Gestión y cooperación internacional:** Se definen como ejes fundamentales para abordar desafíos globales. Una efectiva gestión, implica la coordinación entre la óptima utilización de recursos y el desarrollo de procesos a escala mundial. Por su parte, el objetivo de la cooperación internacional se enfoca en establecer alianzas estratégicas entre países, organizaciones y empresas para enfrentar problemas comunes, promoviendo el desarrollo sostenible y la paz⁷.
7. **Industria 4.0:** Representa la cuarta revolución industrial, caracterizada por la digitalización y la integración de tecnologías avanzadas en el proceso productivo de bienes y servicios. Utiliza la inteligencia artificial, el internet de las cosas y la automatización de procesos para implementar sistemas de producción más flexibles y conectados⁸.
8. **Innovación agroindustrial, producción pecuaria y agricultura de precisión:** Se basa en la implementación de tecnologías avanzadas que permiten alcanzar una gestión eficiente de recursos y una producción agrícola sostenible. Estos avances generan un incremento en la productividad y mejoran la calidad en los productos resultantes de la cadena agroalimentaria⁹. (Figura 1)
9. **Interculturalidad:** Constituye un modelo social que promueve la coexistencia respetuosa entre diversas culturas en un determinado contexto. Facilita la interacción, el diálogo y la comprensión mutua de

expresiones culturales entre comunidades con identidades diferentes. Fomenta el reconocimiento y la valoración cultural para facilitar y enriquecer la convivencia y la cohesión social¹⁰.

- 10. Legislación y políticas públicas:** La formulación, promulgación y aplicación efectiva de las normas establecidas en la legislación y en las políticas públicas se constituyen en ejes fundamentales que garantizan el orden, la igualdad, la equidad, el bienestar general y la paz, generando un impacto significativo en la estructura y el funcionamiento de la sociedad.¹¹



Figura 1. Innovación en el campo: Agricultura sostenible y productos agroindustriales de calidad para una producción más natural y resistente.

- 11. Responsabilidad social:** Implica el compromiso por parte de las empresas y organizaciones en integrar en sus políticas de funcionamiento y operaciones, prácticas éticas, sostenibles y responsables para de esta manera contribuir positivamente en el bienestar social y ambiental¹¹.
- 12. Riesgos de desastres:** Se define como el proceso de identificar, analizar y cuantificar las probabilidades de riesgo ante determinado fenómeno natural o social. La adecuada gestión de riesgos representa un aspecto esencial para reducir la vulnerabilidad ante el impacto en la vida y en la propiedad. La prevención y preparación son aspectos fundamentales en el objetivo de mejorar la capacidad de respuesta ante situaciones de emergencia¹².
- 13. Salud, nutrición y bienestar:** Una alimentación balanceada y saludable representa un aspecto esencial en la prevención de enfermedades. La incorporación en la rutina diaria de hábitos saludables como la actividad física y la nutrición adecuada son pilares fundamentales para conseguir niveles de salud óptimos y bienestar integral constante¹³.



Figura 2. Felicidad en movimiento: Capturando la esencia de la salud y bienestar que inspira una vida activa y equilibrada

14. **Tecnologías de la Información y Comunicación (TIC's):** Se definen como elementos impulsores clave dentro la transformación digital. Su correcta aplicación facilita el proceso de conectividad global, mejorando la eficiencia operativa y permitiendo la rápida transmisión de información. La constante evolución de estas herramientas influye en diversos sectores, desde la educación hasta la economía, definiendo la forma en que interactuamos con el mundo y accedemos a la información⁸.
15. **Turismo sostenible y desarrollo local:** Es un modelo que busca equilibrar el crecimiento turístico con la preservación del medio ambiente y el bienestar de las comunidades. Las iniciativas de turismo sostenible promueven prácticas responsables, minimizan el impacto ambiental y fomentan la participación comunitaria, contribuyendo al desarrollo económico y cultural de las regiones intervenidas⁵.

En este contexto, Biotecnología, Biomedicina, Bioética, y Salud, Nutrición, Agroindustria y Bienestar se enfocan en aplicar conocimientos biotecnológicos para mejorar la salud humana y abordar cuestiones éticas. La conexión con la interculturalidad implica consideraciones éticas y culturales en la aplicación global de avances en ciencias de la vida.

En las 40 horas de duración de la edición de 2023 del X CTIE y I CIVS-UEB, se contó con la participación de investigadores de España, Ecuador, Argentina y Venezuela. Se presentaron 12 conferencias magistrales, 38 ponencias y 2 posters. Al cierre de las actividades y tomando en cuenta las jornadas presenciales, virtuales y retransmisión por redes sociales, se estima que el alcance del evento fue de 1.500 interacciones.

CONCLUSIONES

Se destaca la importancia de la investigación científica en la era postpandémica, resaltando el papel fundamental que cumple la Universidad Estatal de Bolívar (UEB) en la organización de eventos de divulgación científica como el CTIE.

Los constantes cambios que afectan a la sociedad han determinado que el congreso CTIE haya evolucionado a lo largo de una década, evidenciando el compromiso continuo de la UEB con el desarrollo mediante la incorporación de la dimensión Vinculación con la Sociedad entre sus ejes fundamentales.

La diversidad de temas tratados, la participación internacional y los diferentes formatos de presentación evidencian el impacto global conseguido. Al concluir los eventos de difusión, se estimó que se alcanzaron 1.500

interacciones vía redes sociales, consolidando de esta forma a la UEB como promotora de soluciones innovadoras a desafíos contemporáneos.

REFERENCIAS

1. Weezevent. Ventajas y desventajas de los eventos virtuales [Internet]. Weezevent. 2022. p. 1. Available from: <https://weezevent.com/es/blog/ventajas-desventajas-eventos-virtuales/>
2. Rodríguez Yunta E. Desafíos éticos en investigación genómica y biotecnología. Veinte años de acta bioethica originales. Vol. 26, Acta Bioethica. 2020.
3. Granados Maguiño M, Romero Vela S, Rengifo Lozano RA, Garcia Mendocilla G. Technology in the educational process: new scenario. Rev Venez Gerenc [Internet]. 2020;25(92):1809–23. Available from: <https://www.redalyc.org/journal/290/29065286032/html/>
4. Annayeskha, G., González B. Economy of the 21st century: Orange economy. Rev Ciencias Soc [Internet]. 2020;XXVI(4):450–64. Available from: <https://www.redalyc.org/journal/280/28065077033/html/>
5. Moreno Aguilar, L., Sani Paguay A. El comercio justo como alternativa para el desarrollo socio económico de la ciudad de riobamba en el periodo 2019 - 2021 [Internet]. ESPOL. 2022. Available from: [https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/53553/1/T-111634 MORENO-SANI.pdf](https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/53553/1/T-111634%20MORENO-SANI.pdf)
6. Vega Arellano, J., Romero Rubio, S.A., Guzmán Lares G. Marketing digital y las finanzas de las PY-MES. RITI J [Internet]. 2018;6(12):100–6. Available from: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Dialnet-MarketingDigitalYLasFinanzasDeLasPymes-7107413.pdf>
7. Oviedo E. Reingeniería de la gestión de la cooperación internacional en el Ecuador [Internet]. CEPAL. 2023. p. 19. Available from: <https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/bd987076-0316-4d9d-80de-cf7f3cf9ae58/content>
8. Cabrera H, Rodríguez Pérez B, Luis León González J, Medina León A, de Cienfuegos U, Rafael Rodríguez C, et al. Ideas y Conceptos básicos para la comprensión de las Industrias 4.0. Rev Univ y Soc. 2020;12(4):8–15.
9. Arce Quesada S. La innovación agroindustrial: componentes, tendencias y acciones. Agronegocios [Internet]. 2020;6(1):1–12. Available from: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/jpbarrantes,+Artículo+Innovación.pdf>
10. Osorio Corrales, S., Serna Rivas O. Promoción de la sana convivencia e interculturalidad a través de la literatura y pedagogía [Internet]. Fundación Universitaria los Libertadores. 2023. Available from: https://repositorio.libertadores.edu.co/bitstream/handle/11371/6302/Osorio_Serna_2023.pdf?sequence=1&isAllowed=y
11. Ormaza Andrade, J., Ochoa Crespo, J., Ramírez Valarezo, F., Quevedo J. Corporate social responsibility in Ecuador: Approach from the 2030 Agenda. Rev Ciencias Soc [Internet]. 2020;XXVI(3):12. Available from: <https://www.redalyc.org/journal/280/28063519009/html/>
12. Vázquez Lugo, M., Rodríguez González I, Ortíz Sánchez NI, Urbano Olivera MI, Grillo Pérez, I J, Matanzas I et al. La prevención del riesgo de desastres en la comunidad Disasters risk prevention in the community. Rev Médica Electrónica. 2017;39(5).
13. García G. Desarrollo de alimentos con beneficios para la salud y bienestar, una tendencia que crecerá [Internet]. The Food Tech. 2023. p. 1. Available from: <https://thefoodtech.com/tendencias-de-consumo/desarrollo-de-alimentos-con-beneficios-para-la-salud-y-bienestar-una-tendencia-que-crecera/>

Received: 28 September 2023/ **Accepted:** 15 November 2023 / **Published:**15 December 2023

Citation: Rojas Sánchez H A; Pacheco Mendoza S R; Ribadeneira Zapata C; Bayas Morejón I F; Briceño Carrasquel J A; Gaibor Becerra J L; Hachi Pazmiño M X; Guarnizo Ordóñez J D; Vega Romero G J. La Innovación Tecnológica y su Impacto en la Educación Superior Technological Innovation and its Impact on Higher Education. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 1. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.1>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Implementación de un sistema ISO 9001:2015 para la producción de chocolates artesanales en Asociación "Planta de elaborados de cacao", Echeandía.

Implementation of an ISO 9001:2015 system for artisanal chocolate production at "Planta de elaborados de cacao" Association, Echeandía.

Angélica Tigre León ^{1,2*}, María Belén Bravo ², Arturo Rojas Sánchez ¹,
Lourdes Pazmiño Mantilla ³, Favian Bayas Morejón ¹,

⁽¹⁾Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Dirección de Investigación y Vinculación, CP: 20150. Guaranda, Ecuador.

⁽²⁾Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Instituto de Posgrado y Educación Continua, CP: 060104. Riobamba, Ecuador.

⁽³⁾Fundación Maquita Cusunchic, Área Social y Cooperación, CP: 20150. Guaranda, Ecuador.

*Correspondencia: rtigre@ueb.edu.ec

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.3>

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue implementar un sistema de gestión para una línea de bombones basado en la normativa ISO 9001:2015 en la "PLANTA DE ELABORADOS DE CACAO" perteneciente a la Asociación de Grupo de Productoras de San Gerardo en Echeandía, El estudio involucró analizar el diagnóstico del estado actual de la asociación mediante el uso de técnicas de análisis como PEST; También se aplicó el análisis FODA, identificando indicadores positivos como oportunidades y fortalezas, así como indicadores negativos como debilidades y amenazas. Los puntos críticos de control se identificaron mediante el Diagrama de Pareto donde se obtuvo que la insuficiente línea de frío es la principal causa de los problemas en el producto, seguido por el temperador pequeño, en la producción de bombones al 60% de cacao se identificó que estas causas se ubican en la etapa de producción y distribución del producto, a su vez usando el árbol de decisiones se obtuvo que los puntos críticos de control que deben ser monitoreados y tratados son en las etapas de almacenado y distribución dado a que después de cada una de estas etapas no existe ningún otro proceso que permita el arreglo del producto final. En conclusión, el análisis revela la existencia de factores que deben ser atendidos. Los problemas significativos identificados están relacionados específicamente con el marketing y la conservación de la cadena de frío, así como los riesgos biológicos dentro de los procesos de almacenamiento y distribución, los cuales pueden mitigarse mediante la corrección de errores.

Palabras clave: Gestión de calidad; norma ISO 9001:2015; Chocolate artesanal; planta de elaborados de cacao.

ABSTRACT

The objective of this research was to implement a management system for a confectionery line based on ISO 9001:2015 standards at the "PLANTA DE ELABORADOS DE CACAO" belonging to the Association of San Gerardo Producers Group in Echeandía. The study involved analyzing the diagnosis of the association's current state using analysis techniques such as PEST. SWOT analysis was also applied, identifying positive indicators such as opportunities and strengths and negative indicators such as weaknesses and threats. The critical control points were identified through the Pareto Diagram, which revealed that insufficient cooling infrastructure is the leading cause of problems in the product, followed by a small tempering machine. In the production of 60% cocoa chocolates, it was identified that these causes are located in the production and distribution stages of the product.

Additionally, decision tree analysis determined that the critical control points that need to be monitored and addressed are in the storage and distribution stages, as there are no other processes after these stages that allow for the correction of the final product. In conclusion, the analysis reveals the factors that need to be addressed. The significant problems identified are related to marketing and cold chain preservation and biological risks within the storage and distribution processes, which can be mitigated through error correction.

Keywords: Quality management; ISO 9001: 2015 standard; Artisan chocolate; cocoa processing plant.

INTRODUCCIÓN

Origen del cacao y producción

Las almendras de cacao son el fruto del árbol del cacao que crece mayoritariamente en América Central y Sudamérica, desde donde es originario, crece mejor en climas ecuatoriales donde existe una abundante precipitación anual y donde hay temperaturas relativamente estables, de entre 25 y 28 °C. También, se cultiva actualmente en África Occidental, donde fue transportado por los propios europeos. El primer nombre del árbol del cacao fue "*Amygdalae pecuniariae*" y que significa "dinero-almendra" luego, fue Carl Von Linne quien lo denominó "*Theobroma cacao*", y que significa "cacao, alimento de los dioses"^{1,2}.

El fruto o baya del cacao puede ser de tres tipos: Criollo, Forastero o Amazónico y Trinitario³. En el Ecuador existe un tipo de cacao único en el mundo conocido con el nombre de "Nacional", fino de aroma o criollo, el cual se lo reconoce por presentar una fermentación muy corta y dar un chocolate suave de buen sabor y aroma, por lo que es reconocido a nivel internacional⁴.

El cacao fino de aroma en el mercado mundial del cacao reconoce dos grandes categorías de cacao en grano: cacao "fino o de aroma" y el cacao "al granel" o "común". El 95% de la producción mundial anual es cacao al granel, el cual se produce mayormente en el África, Asia y América Latina, en Ecuador, el sector cacaotero contribuye con el 5% de la población económicamente activa nacional (PEA)^{5; 6}.

La producción de cacao es la base fundamental de la economía de 150,000 familias de la costa, la sierra y de la amazonia del Ecuador, donde el 70% son pequeños agricultores, el 20% son medianos productores y un 10% representan a grandes productores⁷.

Chocolate

Con respecto al origen del chocolate, este se deriva de la palabra azteca "xocolatl", cuyo significado es "agua espumosa", para identificar una bebida amarga, de fuerte sabor, y de gran valor energético¹. La historia relata que en 1520 el emperador azteca Moctezuma agasajó a Hernán Cortés y a sus hombres con xocolatl, pues el

emperador azteca creía que los españoles eran la reencarnación de los dioses, y así surgió las primeras formas de cómo los europeos conquistadores aprovechándose de eso comenzaron a despojar de sus riquezas a los habitantes del nuevo mundo^{8, 1}. Se considera que la primera infusión de cacao fue obtenida en España mediante prensado de las almendras del cacao, ganando España un gran estatus a nivel occidental⁹.

El consumo de la bebida de chocolate se extendió por toda Europa surgiendo, así, diferentes formas para su preparación¹⁰. Fue así que el fabricante suizo de leche evaporada, Henry Nestlé tuvo la idea de mezclar la pasta de cacao con leche evaporada y azúcar, dando origen así a la fama del chocolate suizo, extendiéndose luego por todo el mundo, surgió con ello una variedad de subproductos a base de chocolate^{11, 12}.

Beneficios del chocolate

El consumo de chocolate es asociado con una serie de beneficios para la salud, entre los que se destaca ayuda a disminuir la presión arterial y previene enfermedades cardíacas debidas especialmente a su contenido de flavonoides (antioxidantes). Así mismo, tiene otros beneficios como: anticanceroso, estimulador cerebral, antitúxico, antidiarreico, e incluso se lo asocia con efectos afrodisíacos^{13, 14}.

Gestión de calidad

A nivel empresarial, el uso de un sistema de gestión de calidad es una herramienta que conlleva a un incremento en eficiencia y mejor productividad en diferentes organizaciones, obteniendo mayor credibilidad y rentabilidad entendiéndose de esta manera que implementando un modelo de gestión de calidad se obtiene mayor satisfacción de los clientes¹⁵. Sin embargo, existe una gran falta de apoyo al pequeño productor por parte de las entidades gubernamentales para que desarrollen un producto de calidad, mediante la ausencia de paquetes tecnológicos, esto en cuanto a la diversidad de tipos de cacao que existe en el Ecuador y su manejo; pese que el ámbito agrícola es de tendencia central en el país¹⁶.

Considerando lo descrito previamente, el uso de normas de calidad como la ISO 9001:2015 permiten a las entidades mejorar sus producciones y condiciones bajo parámetros controlados, evaluando escenarios futuros que les permitan cumplir con sus objetivos planteados¹⁷. En tal sentido, la asociación “PLANTA DE ELABORADOS DE CACAO” desea implementar mejoras en su emprendimiento bajo normas internacionales de calidad. Para lo cual, resultan importantes los siguientes análisis: **PEST**, que es un instrumento muy esencial para realizar una planeación previa, con el fin de recopilar información del macro y microentorno, influyendo en la demanda, oferta, costos y otros¹⁸; **Análisis SWOT**, conocido también como FODA (fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas); es una técnica usada para identificar oportunidades que permitan una competencia y sus futuras mejoras orientadas al mercado¹⁹; **Diagrama de Pareto**, que es un método gráfico de análisis que determina las causas más importantes dentro de un problema denominados los pocos vitales y las que lo son menos denominadas los muchos triviales, destacando así la relación 80/20²⁰. y el **Árbol de decisiones**, conforme la normativa HACCP, mediante el análisis que determina los puntos críticos de control PCC²¹.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo y diseño de la investigación

La presente investigación es descriptiva, bibliográfica y al mismo tiempo es experimental.

Método de la investigación

El método de investigación es Exploratorio, Descriptivo, Explicativo, Observacional, Experimental.

Enfoque de la investigación

En este estudio se dio un enfoque cualitativo basado en los análisis PEST y FODA, diagrama de Pareto y árbol de decisiones, recopilando la información necesaria, asociando las técnicas usadas con la norma ISO 9001:2015.

En el **análisis PEST** se consideraron cuatro niveles como:

1. **Identificación de Factores Políticos:** Identificar y analizar factores relacionados con el entorno político que pueden afectar a la organización (planta de procesados de cacao), como leyes, regulaciones, políticas gubernamentales y estabilidad política.
2. **Identificación de Factores Económicos:** Evaluar factores económicos que podrían tener un impacto, como tasas de crecimiento económico, inflación, tasas de interés y condiciones del mercado laboral.
3. **Identificación de Factores Sociales:** Analizar factores socioculturales, como demografía, tendencias de consumo, valores culturales y cambios en el comportamiento del consumidor.
4. **Identificación de Factores Tecnológicos:** Evaluar avances tecnológicos, innovaciones y cambios en la tecnología que puedan influir en la organización, especialmente en el aspecto de generar una nueva línea de producción de chocolate.

En el **análisis FODA** se evaluaron aspectos negativos y positivos de la empresa considerando análisis interno y externo como se aprecia en la tabla 1.

Análisis interno		Análisis externo
Debilidades ¿Existe falta de capacitación al personal? ¿Hay Problemas financieros? ¿Los salarios son deficientes? ¿Se presentan bajos niveles de ventas? ¿Existe planificación? ¿Hay falta de conocimiento en marketing? ¿Existe desconocimiento en redes sociales?	Aspectos negativos	Amenazas ¿Existe mayor competencia? ¿Hubo aumento de precios en materia prima e insumos? ¿Falta mano de obra ocasionalmente? ¿El crecimiento de la asociación es lento?
Fortalezas ¿Existe un ambiente laboral agradable? ¿Se cuenta con materia prima óptima? ¿Se cuenta con instalaciones propias? ¿El producto final es de calidad? ¿Se cuenta con procesos administrativos adecuados?	Aspectos	Oportunidades ¿Existe crecimiento en ventas? ¿Se cuenta con maquinaria adecuada? ¿Se cuenta con materia prima propia? ¿Se tienen apoyo de fundaciones?

Tabla 1. Matriz foda aplicado a la asociación “Planta de elaborados de cacao”-Maquita.

En el **Diagrama de Pareto** implicó la recopilación de datos, la clasificación de categorías, el cálculo de frecuencias o impacto, finalmente la creación de un gráfico de barras ordenado y el análisis de los resultados para la toma de decisiones.

Para el desarrollo del **árbol de decisiones** se aplicó algunas directrices como: Análisis de Materia Prima; Análisis durante el proceso; Análisis durante el envasado y almacenado; Análisis del personal; Análisis de distribución del producto y Análisis del consumidor.

Alcance investigativo

La presente investigación tiene un alcance descriptivo, correlacional y explicativo:

Población de estudio

La población en estudio estuvo comprendida por 20 socias activas de la organización “PLANTA DE ELABORADOS DE CACAO”, cuyo mercado es el público en general que gusta del chocolate, asentados específicamente en los cantones: Echeandía, Guaranda, Ventanas y Caluma.

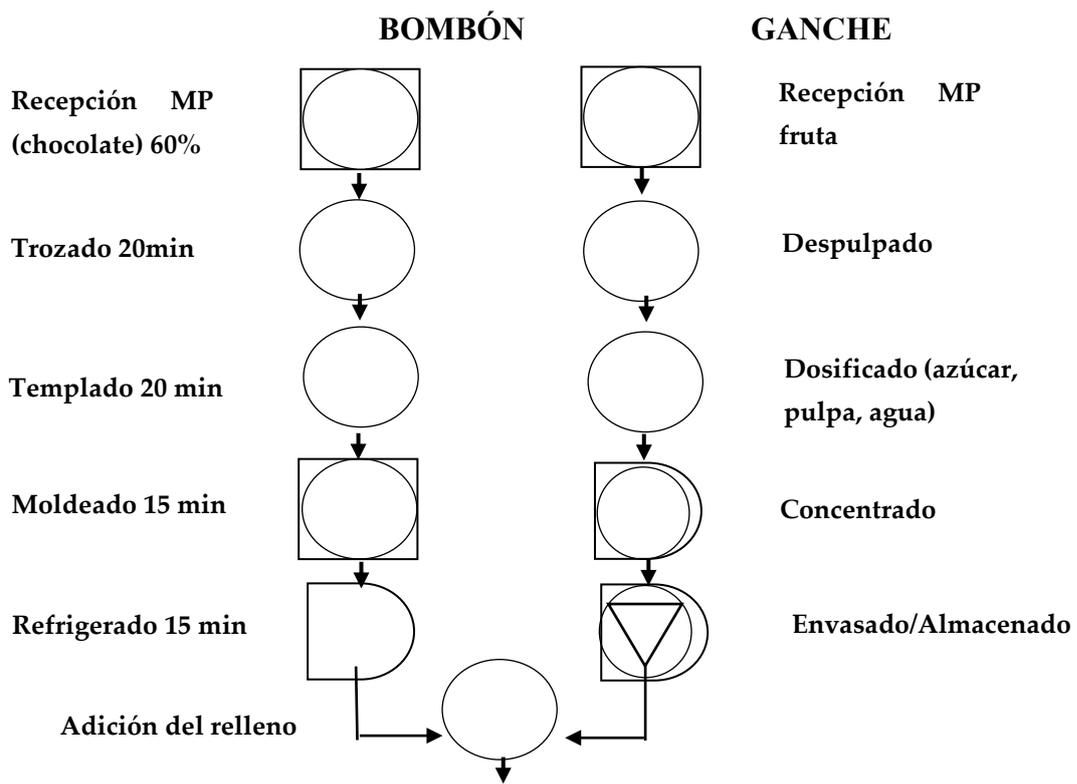
Se aplicó también técnicas de recolección de datos primarios y secundarios como son:

PEST (factores Políticos, Económicos, Sociales y Tecnológicos); SWOT / FODA (Strengths, Weaknesses, Oportunities, Threats); Diagrama de Pareto y **Árbol de decisiones**.

Esquema del experimento

Para la obtención del bombón se partió desde la pasta de cacao (chocolate con leche), previamente formulada bajo los estándares del CODEX STAN 141-2014 y de la norma INEN 623 1988-06; donde la concentración de licor ó liquor de cacao es del 65%, la cual se procedió a cortar en trozos pequeños facilitando el fundido y el templado, inmediatamente se formaron las coquillas para ser rellenas con un ganache o relleno de una mezcla de crema de leche y reducción de arazá, jirón o banana, todo esto bajo la norma NTE INEN 2825/2013 y el Codex alimentario CODEX STAN296-2009; tras este paso los bombones son sellados y llevados a reposo a una temperatura de 5°C para su posterior empaclado, etiquetado, enfundado y comercialización.

Dentro del esquema del experimento en el diagrama de la figura 1 a continuación se detalla cada una de las etapas en la obtención del producto dentro de la nueva línea de producción propuesta:



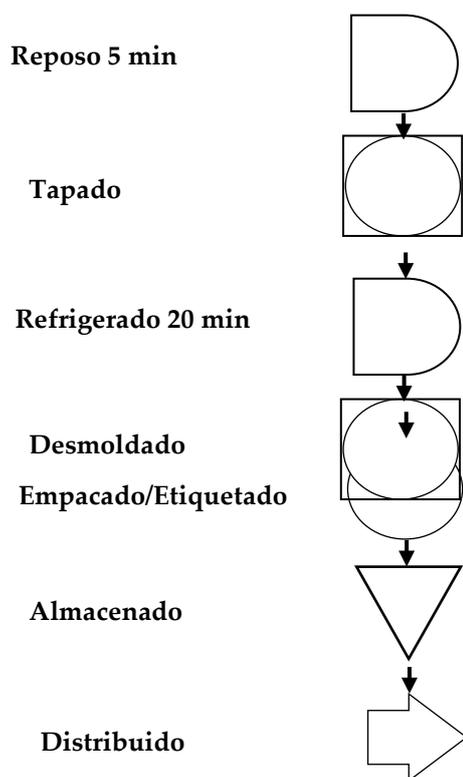


Figura 1. Diagrama de elaboración de bombones.

Estudio organizacional

- Asociación** (Asociación de grupo de productoras de San Gerardo Echeandía)
- Tipo de asociación** (grupos étnicos y minoritarios)
- Directiva de la asociación** (Presidente, Vicepresidente, Secretaria, Tesorera, Síndico, Administradora)
- Antecedentes** (Apertura de la planta de procesos denominada Planta de Elaborados de CACAO).
- Marca** (Choco Warmi)
- Eslogan de la asociación** (Con la dulzura de Echeandía)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los datos obtenidos se aplicaron a la asociación “PLANTA DE ELABORADOS DE CACAO”, y a sus 20 socias activas que lo conforman; siendo la muestra seleccionada la línea bombonera como unidad de análisis.

Análisis PEST (factores Políticos, Económicos, Sociales y Tecnológicos).

Políticos	Económicos	Socioculturales	Tecnológicos
¿De qué manera influye la situación política actual en la asociación?	¿Conoce la situación económica local?	¿Analizaron el ambiente social que rodea la asociación?	¿La asociación cuenta con recursos tecnológicos actuales?
Las actuales políticas permiten o facilitan que toda asociación o emprendimiento ingrese al mercado laboral.	La situación económica local de la asociación ha permanecido estable durante 5 años, dado a que su sustento económico se basa a la venta de sus cultivos, pero se vieron afectadas por la COVID-19	El análisis lo realizaron de manera ambigua en un 50%, lo hicieron en base a conocimientos propios que tiene los obtienen de la convivencia	Los recursos tecnológicos que maneja la asociación se encuentran entre los básicos, además cuentan con el apoyo de la fundación que los patrocina para ello.
¿Existen factores políticos que influyen en el marketing?	¿Identificaron la estabilidad económica del consumidor actual?	¿Se identificó el público objetivo?	¿Los integrantes de la asociación conocen sobre el uso de deferentes software y hardware
Por el momento las entidades gubernamentales han permitido el ingreso al mercado de los emprendimientos	Dentro de la estabilidad económica de su público consumidor, se identificó q se han visto afectados por la llegada del COVID 19	No realizaron un sondeo de público consumidor, pero se basaron en ofertar de forma libre el producto y esperar pedidos	Solo algunos integrantes de la asociación conocen sobre recursos informáticos, pero se apoyan en la ayuda que les presta la fundación
¿Existen legislaciones que afecten a futuro al emprendimiento?	¿La asociación conoce qué nivel socioeconómico tiene el consumidor del producto?	¿Conocen si el producto ofertado es conocido o forma parte de la cultura local?	¿Hay predisposición para cambiar o innovar la forma de hacer el marketing?
La asociación desconoce de la existencia de legislaciones que le afecte a futuro su desarrollo	La asociación no ha realizado un estudio de su consumidor objetivo	La asociación desarrollo el proyecto en base a conocimientos ambiguos del consumo de este producto	La asociación presta colaboración para promover cambios positivos
¿La asociación tiene regulaciones de responsabilidad social?	¿El incremento de costo de vida o impuestos afecta el costo del producto ofertado?	¿Se conoce las diferentes reacciones de los consumidores a la evolución de la asociación?	¿Identificaron las desventajas que trae la tecnología en la promoción?
Los integrantes desconocen sobre estas acciones	El costo del producto si se ha visto afectado en un 50% por el incremento y costo de vida	La asociación no realiza seguimiento de vinculación a la sociedad y sus relaciones con ella	No han realizado una identificación de las desventajas de la tecnología, pero por el momento no han tenido inconvenientes
		¿Existen entidades sociales que pueden afectar a la entidad?	

		Por el momento la asociación no tiene indicadores de afectación a futuro por entidades particulares	
--	--	---	--

Tabla 2. Matriz PEST aplicado a la asociación “Planta de elaborados de cacao”-Maquita.

Al igual que en este trabajo, el desarrollado por **Pérez-Tabernero**²², considera que el análisis PEST ha permitido detectar oportunidades y amenazas, que a su vez permiten desarrollar estrategias para que la empresa maximice los recursos y logre superar la competencia.

Análisis FODA aplicado a la asociación “Planta de Elaborados de Cacao”- Maquita.

Análisis interno		Resultados obtenidos
Debilidades		
¿Existe falta de capacitación al personal? ¿Hay Problemas financieros? ¿Los salarios son deficientes? ¿Se presentan bajos niveles de ventas? ¿Existe planificación? ¿Hay falta de conocimiento en marketing? ¿Existe desconocimiento en redes sociales?	Aspectos negativos	No falta capacitación al personal por parte de la fundación que los patrocina, pero es limitada. Los recursos son limitados y las socias necesitan ayuda por parte de la fundación para el manejo Se realiza una distribución de la remuneración económica de manera equitativa de acuerdo a los ingresos y utilidades obtenidos, siendo esta flexible de acuerdo a la cantidad vendida de producto Las ventas se han visto afectadas por la pandemia COVID19, que influyo directamente en producción y venta. Se realizan planificaciones de manera eventuales previos a invitaciones a ferias o aun evento Los conocimientos en marketing son limitados El manejo de redes es limitado
Fortalezas		
¿Existe un ambiente laboral agradable? ¿Se cuenta con materia prima óptima? ¿Se cuenta con instalaciones propias? ¿El producto final es de calidad? ¿Se cuenta con procesos administrativos adecuados?	Aspectos positivos	Si tiene una convivencia positiva Entre las fortalezas más grandes tenemos que las mismas socias proveen de la materia prima bajo factores adecuados establecidos por las mismas socias. Gracias al apoyo de la fundación MAQUITA, la asociación cuenta con su propia instalación para el procesamiento del cacao. El manejo que realizan en el cultivo y al ser un producto sin mayor aditivo permite obtener un producto de calidad en cuanto a valor nutricional. Los procesos administrativos tienen variabilidad de acuerdo a cada actividad que se presenta y a la vez la complejidad de la actividad.
Análisis externo		
Amenazas		

<p>¿Existe mayor competencia? ¿Hubo aumento de precios en materia prima e insumos? ¿Falta mano de obra ocasionalmente? ¿El crecimiento de la asociación es lento?</p>	<p>Aspectos negativos</p>	<p>La competencia es un factor innegable se incrementa en el mercado con más frecuencia El aumento de precio fluctúa de acuerdo a ordenanzas públicas Eventualmente las socias no cuentan con tiempo para procesar y distribuir el producto. El crecimiento es pausado pero constante</p>
<p>Oportunidades</p>		
<p>¿Existe crecimiento en ventas? ¿Se cuenta con maquinaria adecuada? ¿Se cuenta con materia prima propia? ¿Se tienen apoyo de fundaciones?</p>	<p>Aspectos positivos</p>	<p>Las ventas crecen paulatinamente de acuerdo al consumo del producto. La asociación cuenta con los equipos básicos para la elaboración de sus productos. Las socias cuentan con sus cultivos lo que le permite a la asociación proveerse de su materia prima.</p>

Tabla 3. Matriz foda aplicado a la asociación “planta de elaborados de cacao”-Maquita.

¿Se cuenta con el apoyo de fundaciones? La gran ventaja de la asociación que cuenta con el apoyo de la fundación MAQUITA, lo que les ha permitido crear este emprendimiento.

Diagrama de Pareto.

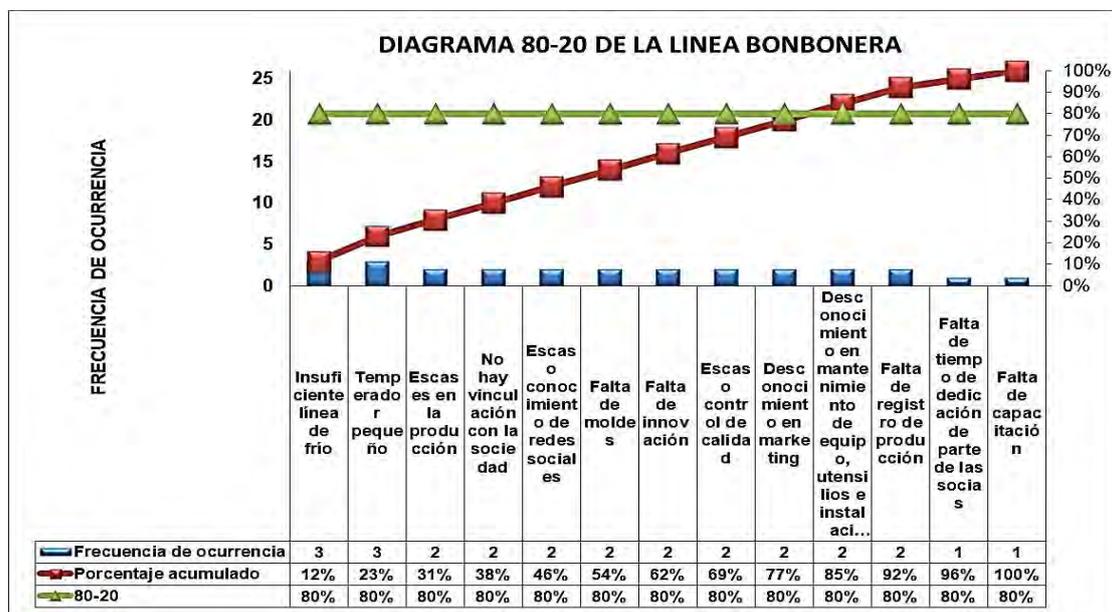


Figura. 2. Diagrama 80-20 de la línea bombonera

Analizando la gráfica de Pareto de la figura 2, el 30% de las inconsistencias provienen de dos categorías; insuficiente línea de frío y Temperador pequeño, en definitiva 9 categorías representan el 80% de los defectos a ser corregidos en la planta de procesados en análisis, siendo las 7 categorías continuas identificadas las siguientes (Escasa producción, falta de vinculación con la sociedad, falta de moldes adecuados, falta de innovación, Escaso control de calidad Desconocimiento de marketing).

Etapa del proceso	Peligro	Punto crítico de control PCC
Procesamiento del bombón	Riesgo biológico	NO
	crecimiento de microorganismos patógenos en la manipulación	
	Riesgo químico	NO
	contaminación por detergentes en la limpieza de moldes, maquinaria, utensilios	
	Riesgo físico	NO
	aparición de objetos extraños durante el proceso de elaboración del bombón	
Almacenado	riesgo biológico	SI es un PCC
	crecimiento de microorganismos patógenos por malas condiciones de almacenamiento	
Distribución	riesgo biológico	SI es un PCC
	crecimiento de microorganismos patógenos por malas condiciones de transporte	

Tabla 4. Resultados de la aplicación del árbol de decisiones

Trabajos previos sobre la acumulación de defectos/quejas en la producción sobre una línea chocolatera realizado por **Rodríguez Ramírez**²³, aplico un check list a todos los participantes de la organización con la finalidad de priorizar las causas haciendo uso del diagrama de Pareto 80-20, concluyéndose que 4 causas raíces que están originando el 80% de los sobre costos operativos en la planta. Por otro lado, **Plúas Ríos et al.**²⁴, infirieron a la necesidad de diseñar protocolos estandarizados para reducir 3 categorías defectuosas: los empaques vacíos, incompletos y mal sellados, ya que estos tres factores suman el 84% de no conformidades.

Desarrollo del árbol de decisiones.

Aplicando el árbol de decisiones determinamos los puntos críticos de control en el proceso de elaboración de bombones en las fases identificadas; asociando cada programa establecido y cada método a emplear con la norma de calidad ISO 9001:2015.

CONCLUSIONES

Durante la recopilación de datos a través de PEST, FODA y el Diagrama de Pareto, así como mediante la revisión documental, se ha confirmado la influencia de factores externos en la demanda del producto. También se ha identificado la existencia de indicadores positivos en la organización que no se están aprovechando al máximo, así como la falta de atención a factores negativos.

Los desafíos predominantes están relacionados con el marketing y la gestión de la cadena de frío, y se han identificado riesgos biológicos en los procesos de almacenamiento y distribución dentro de los puntos críticos de control (PCC).

No obstante, es alentador observar que, a través de la implementación de correcciones de errores dirigidas a abordar estas causas fundamentales, es posible reducir estos efectos adversos y optimizar el uso de los indicadores positivos. Esto representa una valiosa oportunidad para mejorar la eficacia y la competitividad de la organización en el mercado.

Agradecimientos: Los autores extienden el agradecimiento a la Asociación de productoras de procesados de cacao del recinto San Gerardo, cantón Echeandía, También a la Universidad Estatal de Bolívar y a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por el apoyo recibido en el desarrollo del presente trabajo.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés

REFERENCIAS

1. Díaz-Valderrama JR, Leiva-Espinoza ST, Aime MC. The History of Cacao and Its Diseases in the Americas. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>
2. Quezada et al. Economic analysis of the export of cocoa in Ecuador during the period 2014 – 2019. Polo del Conoc [Internet]. 2021;6(3):2430–44. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7926903>
3. Montes M. “Efectos del fosforo y azufre sobre el rendimiento de mazorcas, en una plantación de cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51, en la zona de Babahoyo. Univ Tec Babahoyo Fac Ciencias Agropecu Carrera Ing Agropecu Trab [Internet]. 2016;46. Available from: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/3358/E-UTB-FACIAG-ING AGROP-000009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Zambrano Jaramillo G. Evaluación de la influencia del proceso de beneficio del cacao (*Theobroma cacao* L) CCN-51 de altura en su calidad final, mediante el análisis físico, físico-químico y sensorial. 2018. 430–439 p.
5. Ginatta, G., Vignati, F., & Rodríguez M. Observatorio del Cacao Fino de Aroma para América Latina. Iniciat Latinoam del Cacao [Internet]. 2020;8:8–10. Available from: http://scioteca.caf.com/handle/123456789/1530%0Ahttps://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1530/Iniciativa_Latinoamericana_del_Cacao_Boletín_No.8.pdf?sequence=1
6. ANECACAO. El cacao es más que un grano, es tradición ecuatoriana, felicidad y bienestar [Internet]. ANECACAO. 2019. p. 1. Available from: <https://anecacao.com/>
7. ANECACAO. Avanzamos juntos hacia la excelencia en la exportación de cacao: Taller de

- Homologación de Norma INEN 176 Sexta Revisión [Internet]. ANECACAO. 2020. Available from: <https://anecacao.com/avanzamos-juntos-hacia-la-excelencia-en-la-exportacion-de-cacao-taller-de-homologacion-de-norma-inen-176-sexta-revision/>
8. Grind PD. Breve Historia del Consumo de Chocolate en el Mundo [Internet]. Grind. 2018. p. 1. Available from: <https://perfectdailygrind.com/es/2018/08/01/breve-historia-del-consumo-de-chocolate-en-el-mundo/>
 9. Camacho Gómez M. Chocolate Museums in Europe: history, marketing and tourism.
 10. Castro Santana A. Exóticos, ilustrados y polémicos placeres del Imperio: el chocolate, el té y el café en la literatura inglesa. *Acta poética*,. 2019;119–45.
 11. PanArte. Historia del chocolate [Internet]. PanArte. 2021. p. 1. Available from: <https://www.panarte.cl/post/la-historia-del-chocolate>
 12. Sol Sánchez Á, Naranjo González JA, Córdova Avalos V, Ávalos de la Cruz DA, Zaldívar Cruz JM. Caracterización bromatológica de los productos derivados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Chontalpa, Tabasco, México. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2017;(14):2817–30.
 13. Andrade JA, Rivera-García J, Chire-Fajardo GC, Ureña-Peralta MO. Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE*. 2019;10(4):1–12.
 14. Tafurt G, Suarez O, Lares M del C, Álvarez C, Liconte N. Capacidad antioxidante de un chocolate oscuro de granos cacao orgánico sin fermentar. *Rev Digit Postgrado*. 2020;10(1).
 15. Lisbeth Gorotiza-Vélez GI, Marisol Romero-Vélez EI. El sistema de gestión de calidad con ISO 9001:2015 como estrategia para el mejoramiento de los procesos de la Comercializadora ITM. Polo del Conoc [Internet]. 2021;6:270–94. Available from: <http://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es>
 16. Peñaherrera-cruz A, Ramón-curay R, Fierro-borja S, Ramírez-arteaga L. Marketing Channels of Aroma Cocoa (*Theobroma cacao* L .) for the Association “ ASOPROAVAL ” (Ecuador) as an Axis of Social Development and Solidarity Economy.
 17. ISO. ISO 9001:2015(es) Sistemas de gestión de la calidad [Internet]. ISO. 2015. p. 1. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9001:ed-5:v1:es>
 18. Pretelt-Medina M. Creación de empresa de servicios de agro informática. Univ EAN [Internet]. 2017;01:127. Available from: <http://www.albayan.ae>
 19. Shelley Pursell. Análisis FODA: Qué es y cómo usarlo (con ejemplos). [Internet]. Hubpost. 2021. p. 1. Available from: <https://blog.hubspot.es/marketing/analisis-foda>
 20. Villar-Ledo L, Ledo-Ferre MC. Aplicación de herramientas estadísticas para el análisis de indicadores Application of statistical tools for indicators analysis.
 21. OIRSA (Organismo Internacional de Sanida Agropecuario. Manual de análisis de peligros y puntos

- críticos de control - HACCP.pdf [Internet]. 2016. Available from:
file:///C:/Users/Administrator/Desktop/Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP.pdf
22. Taberero PÁP. Estudio de los análisis del entorno en el modelo de emprendimiento disciplinado. Aplicación al caso de la creación de la startup Blodel. Univ Politécnica Madrid [Internet]. 2019;1–108. Available from: https://oa.upm.es/54122/1/TFG_ANGEL_PEREZ_TABERERO_POLO.pdf
23. Rodríguez Ramírez JE. Propuesta de implementación de un modelo de gestión por procesos en el área de producción para incrementar la rentabilidad de la fábrica de chocolates La Española S.R.L Trujillo. Univ Priv del Norte [Internet]. 2017;280. Available from:
https://repositorio.upn.edu.pe/bitstream/handle/11537/12346/Rodríguez_Ramírez_José_Enrique.pdf?sequence=1&isAllowed=y
24. Plúas M, Méndez M, Plúas D, Huayamave Á. Improvement of the Continuous Process Through the Application of the Dmaic Methodology in the Chocolatera Production Line of a Food Company. *Cienc y Tecnol.* 2017;21:14–22.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: A Tigre León, Bravo M B, Rojas Sánchez A, Pazmiño Mantilla L, Bayas Morejón F. Implementacion de un sistema ISO 9001:2015 para la producción de chocolates artesanales en Asociación “Planta de elaborados de cacao”, Echeandía. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.3>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Implementación de un sistema ISO 9001:2015 para la producción de chocolates artesanales en Asociación "Planta de elaborados de cacao", Echeandía.

Implementation of an ISO 9001:2015 system for artisanal chocolate production at "Planta de elaborados de cacao" Association, Echeandía.

Angélica Tigre León ^{1,2*}, María Belén Bravo ², Arturo Rojas Sánchez ¹,
Lourdes Pazmiño Mantilla ³, Favian Bayas Morejón ¹,

⁽¹⁾Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Dirección de Investigación y Vinculación, CP: 20150. Guaranda, Ecuador.

⁽²⁾Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Instituto de Posgrado y Educación Continua, CP: 060104. Riobamba, Ecuador.

⁽³⁾Fundación Maquita Cusunchic, Área Social y Cooperación, CP: 20150. Guaranda, Ecuador.

*Correspondencia: rtigre@ueb.edu.ec

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.3>

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue implementar un sistema de gestión para una línea de bombones basado en la normativa ISO 9001:2015 en la "PLANTA DE ELABORADOS DE CACAO" perteneciente a la Asociación de Grupo de Productoras de San Gerardo en Echeandía, El estudio involucró analizar el diagnóstico del estado actual de la asociación mediante el uso de técnicas de análisis como PEST; También se aplicó el análisis FODA, identificando indicadores positivos como oportunidades y fortalezas, así como indicadores negativos como debilidades y amenazas. Los puntos críticos de control se identificaron mediante el Diagrama de Pareto donde se obtuvo que la insuficiente línea de frío es la principal causa de los problemas en el producto, seguido por el temperador pequeño, en la producción de bombones al 60% de cacao se identificó que estas causas se ubican en la etapa de producción y distribución del producto, a su vez usando el árbol de decisiones se obtuvo que los puntos críticos de control que deben ser monitoreados y tratados son en las etapas de almacenado y distribución dado a que después de cada una de estas etapas no existe ningún otro proceso que permita el arreglo del producto final. En conclusión, el análisis revela la existencia de factores que deben ser atendidos. Los problemas significativos identificados están relacionados específicamente con el marketing y la conservación de la cadena de frío, así como los riesgos biológicos dentro de los procesos de almacenamiento y distribución, los cuales pueden mitigarse mediante la corrección de errores.

Palabras clave: Gestión de calidad; norma ISO 9001:2015; Chocolate artesanal; planta de elaborados de cacao.

ABSTRACT

The objective of this research was to implement a management system for a confectionery line based on ISO 9001:2015 standards at the "PLANTA DE ELABORADOS DE CACAO" belonging to the Association of San Gerardo Producers Group in Echeandía. The study involved analyzing the diagnosis of the association's current state using analysis techniques such as PEST. SWOT analysis was also applied, identifying positive indicators such as opportunities and strengths and negative indicators such as weaknesses and threats. The critical control points were identified through the Pareto Diagram, which revealed that insufficient cooling infrastructure is the leading cause of problems in the product, followed by a small tempering machine. In the production of 60% cocoa chocolates, it was identified that these causes are located in the production and distribution stages of the product.

Additionally, decision tree analysis determined that the critical control points that need to be monitored and addressed are in the storage and distribution stages, as there are no other processes after these stages that allow for the correction of the final product. In conclusion, the analysis reveals the factors that need to be addressed. The significant problems identified are related to marketing and cold chain preservation and biological risks within the storage and distribution processes, which can be mitigated through error correction.

Keywords: Quality management; ISO 9001: 2015 standard; Artisan chocolate; cocoa processing plant.

INTRODUCCIÓN

Origen del cacao y producción

Las almendras de cacao son el fruto del árbol del cacao que crece mayoritariamente en América Central y Sudamérica, desde donde es originario, crece mejor en climas ecuatoriales donde existe una abundante precipitación anual y donde hay temperaturas relativamente estables, de entre 25 y 28 °C. También, se cultiva actualmente en África Occidental, donde fue transportado por los propios europeos. El primer nombre del árbol del cacao fue "*Amygdalae pecuniariae*" y que significa "dinero-almendra" luego, fue Carl Von Linne quien lo denominó "*Theobroma cacao*", y que significa "cacao, alimento de los dioses"^{1,2}.

El fruto o baya del cacao puede ser de tres tipos: Criollo, Forastero o Amazónico y Trinitario³. En el Ecuador existe un tipo de cacao único en el mundo conocido con el nombre de "Nacional", fino de aroma o criollo, el cual se lo reconoce por presentar una fermentación muy corta y dar un chocolate suave de buen sabor y aroma, por lo que es reconocido a nivel internacional⁴.

El cacao fino de aroma en el mercado mundial del cacao reconoce dos grandes categorías de cacao en grano: cacao "fino o de aroma" y el cacao "al granel" o "común". El 95% de la producción mundial anual es cacao al granel, el cual se produce mayormente en el África, Asia y América Latina, en Ecuador, el sector cacaotero contribuye con el 5% de la población económicamente activa nacional (PEA)^{5; 6}.

La producción de cacao es la base fundamental de la economía de 150,000 familias de la costa, la sierra y de la amazonia del Ecuador, donde el 70% son pequeños agricultores, el 20% son medianos productores y un 10% representan a grandes productores⁷.

Chocolate

Con respecto al origen del chocolate, este se deriva de la palabra azteca "xocolatl", cuyo significado es "agua espumosa", para identificar una bebida amarga, de fuerte sabor, y de gran valor energético¹. La historia relata que en 1520 el emperador azteca Moctezuma agasajó a Hernán Cortés y a sus hombres con xocolatl, pues el

emperador azteca creía que los españoles eran la reencarnación de los dioses, y así surgió las primeras formas de cómo los europeos conquistadores aprovechándose de eso comenzaron a despojar de sus riquezas a los habitantes del nuevo mundo^{8, 1}. Se considera que la primera infusión de cacao fue obtenida en España mediante prensado de las almendras del cacao, ganando España un gran estatus a nivel occidental⁹.

El consumo de la bebida de chocolate se extendió por toda Europa surgiendo, así, diferentes formas para su preparación¹⁰. Fue así que el fabricante suizo de leche evaporada, Henry Nestlé tuvo la idea de mezclar la pasta de cacao con leche evaporada y azúcar, dando origen así a la fama del chocolate suizo, extendiéndose luego por todo el mundo, surgió con ello una variedad de subproductos a base de chocolate^{11, 12}.

Beneficios del chocolate

El consumo de chocolate es asociado con una serie de beneficios para la salud, entre los que se destaca ayuda a disminuir la presión arterial y previene enfermedades cardíacas debidas especialmente a su contenido de flavonoides (antioxidantes). Así mismo, tiene otros beneficios como: anticanceroso, estimulador cerebral, antitúxico, antidiarreico, e incluso se lo asocia con efectos afrodisiacos^{13, 14}.

Gestión de calidad

A nivel empresarial, el uso de un sistema de gestión de calidad es una herramienta que conlleva a un incremento en eficiencia y mejor productividad en diferentes organizaciones, obteniendo mayor credibilidad y rentabilidad entendiéndose de esta manera que implementando un modelo de gestión de calidad se obtiene mayor satisfacción de los clientes¹⁵. Sin embargo, existe una gran falta de apoyo al pequeño productor por parte de las entidades gubernamentales para que desarrollen un producto de calidad, mediante la ausencia de paquetes tecnológicos, esto en cuanto a la diversidad de tipos de cacao que existe en el Ecuador y su manejo; pese que el ámbito agrícola es de tendencia central en el país¹⁶.

Considerando lo descrito previamente, el uso de normas de calidad como la ISO 9001:2015 permiten a las entidades mejorar sus producciones y condiciones bajo parámetros controlados, evaluando escenarios futuros que les permitan cumplir con sus objetivos planteados¹⁷. En tal sentido, la asociación “PLANTA DE ELABORADOS DE CACAO” desea implementar mejoras en su emprendimiento bajo normas internacionales de calidad. Para lo cual, resultan importantes los siguientes análisis: **PEST**, que es un instrumento muy esencial para realizar una planeación previa, con el fin de recopilar información del macro y microentorno, influyendo en la demanda, oferta, costos y otros¹⁸; **Análisis SWOT**, conocido también como FODA (fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas); es una técnica usada para identificar oportunidades que permitan una competencia y sus futuras mejoras orientadas al mercado¹⁹; **Diagrama de Pareto**, que es un método gráfico de análisis que determina las causas más importantes dentro de un problema denominados los pocos vitales y las que lo son menos denominadas los muchos triviales, destacando así la relación 80/20²⁰. y el **Árbol de decisiones**, conforme la normativa HACCP, mediante el análisis que determina los puntos críticos de control PCC²¹.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo y diseño de la investigación

La presente investigación es descriptiva, bibliográfica y al mismo tiempo es experimental.

Método de la investigación

El método de investigación es Exploratorio, Descriptivo, Explicativo, Observacional, Experimental.

Enfoque de la investigación

En este estudio se dio un enfoque cualitativo basado en los análisis PEST y FODA, diagrama de Pareto y árbol de decisiones, recopilando la información necesaria, asociando las técnicas usadas con la norma ISO 9001:2015.

En el **análisis PEST** se consideraron cuatro niveles como:

1. **Identificación de Factores Políticos:** Identificar y analizar factores relacionados con el entorno político que pueden afectar a la organización (planta de procesados de cacao), como leyes, regulaciones, políticas gubernamentales y estabilidad política.
2. **Identificación de Factores Económicos:** Evaluar factores económicos que podrían tener un impacto, como tasas de crecimiento económico, inflación, tasas de interés y condiciones del mercado laboral.
3. **Identificación de Factores Sociales:** Analizar factores socioculturales, como demografía, tendencias de consumo, valores culturales y cambios en el comportamiento del consumidor.
4. **Identificación de Factores Tecnológicos:** Evaluar avances tecnológicos, innovaciones y cambios en la tecnología que puedan influir en la organización, especialmente en el aspecto de generar una nueva línea de producción de chocolate.

En el **análisis FODA** se evaluaron aspectos negativos y positivos de la empresa considerando análisis interno y externo como se aprecia en la tabla 1.

Análisis interno		Análisis externo
Debilidades ¿Existe falta de capacitación al personal? ¿Hay Problemas financieros? ¿Los salarios son deficientes? ¿Se presentan bajos niveles de ventas? ¿Existe planificación? ¿Hay falta de conocimiento en marketing? ¿Existe desconocimiento en redes sociales?	Aspectos negativos	Amenazas ¿Existe mayor competencia? ¿Hubo aumento de precios en materia prima e insumos? ¿Falta mano de obra ocasionalmente? ¿El crecimiento de la asociación es lento?
Fortalezas ¿Existe un ambiente laboral agradable? ¿Se cuenta con materia prima óptima? ¿Se cuenta con instalaciones propias? ¿El producto final es de calidad? ¿Se cuenta con procesos administrativos adecuados?	Aspectos positivos	Oportunidades ¿Existe crecimiento en ventas? ¿Se cuenta con maquinaria adecuada? ¿Se cuenta con materia prima propia? ¿Se tienen apoyo de fundaciones?

Tabla 1. Matriz foda aplicado a la asociación “Planta de elaborados de cacao”-Maquita.

En el **Diagrama de Pareto** implicó la recopilación de datos, la clasificación de categorías, el cálculo de frecuencias o impacto, finalmente la creación de un gráfico de barras ordenado y el análisis de los resultados para la toma de decisiones.

Para el desarrollo del **árbol de decisiones** se aplicó algunas directrices como: Análisis de Materia Prima; Análisis durante el proceso; Análisis durante el envasado y almacenado; Análisis del personal; Análisis de distribución del producto y Análisis del consumidor.

Alcance investigativo

La presente investigación tiene un alcance descriptivo, correlacional y explicativo:

Población de estudio

La población en estudio estuvo comprendida por 20 socias activas de la organización “PLANTA DE ELABORADOS DE CACAO”, cuyo mercado es el público en general que gusta del chocolate, asentados específicamente en los cantones: Echeandía, Guaranda, Ventanas y Caluma.

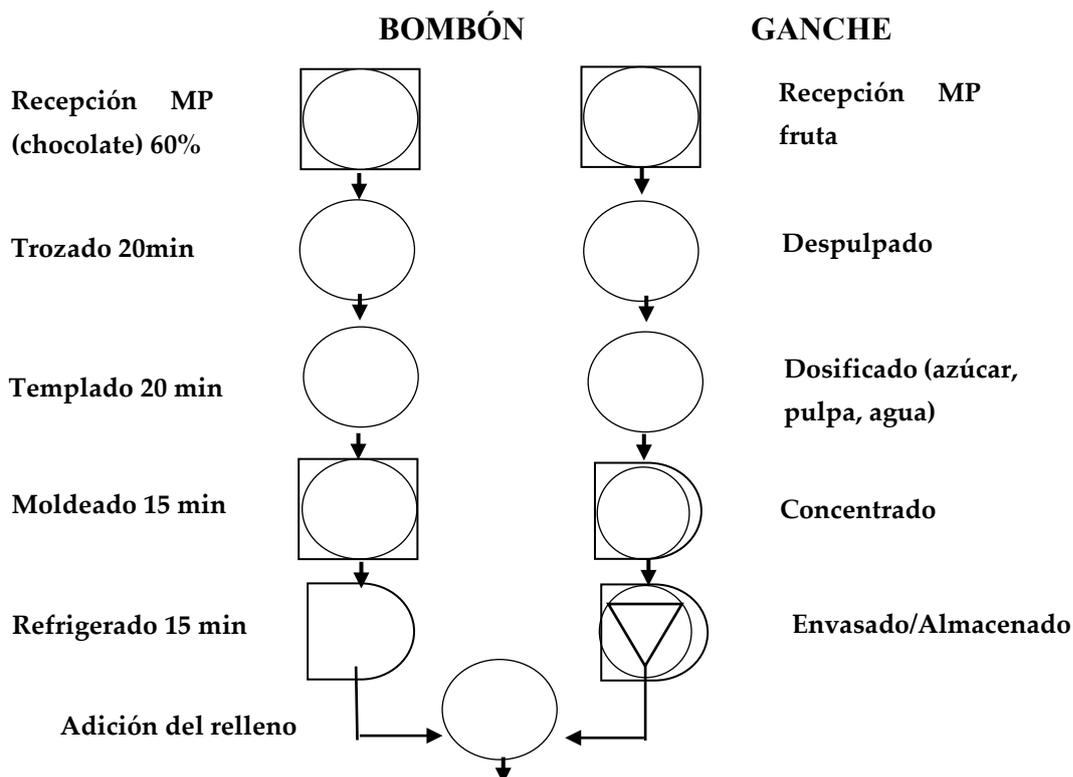
Se aplicó también técnicas de recolección de datos primarios y secundarios como son:

PEST (factores Políticos, Económicos, Sociales y Tecnológicos); SWOT / FODA (Strengths, Weaknesses, Oportunities, Threats); Diagrama de Pareto y Árbol de decisiones.

Esquema del experimento

Para la obtención del bombón se partió desde la pasta de cacao (chocolate con leche), previamente formulada bajo los estándares del CODEX STAN 141-2014 y de la norma INEN 623 1988-06; donde la concentración de licor ó liquor de cacao es del 65%, la cual se procedió a cortar en trozos pequeños facilitando el fundido y el templado, inmediatamente se formaron las coquillas para ser rellenas con un ganache o relleno de una mezcla de crema de leche y reducción de arazá, jirón o banana, todo esto bajo la norma NTE INEN 2825/2013 y el Codex alimentario CODEX STAN296-2009; tras este paso los bombones son sellados y llevados a reposo a una temperatura de 5°C para su posterior empaclado, etiquetado, enfundado y comercialización.

Dentro del esquema del experimento en el diagrama de la figura 1 a continuación se detalla cada una de las etapas en la obtención del producto dentro de la nueva línea de producción propuesta:



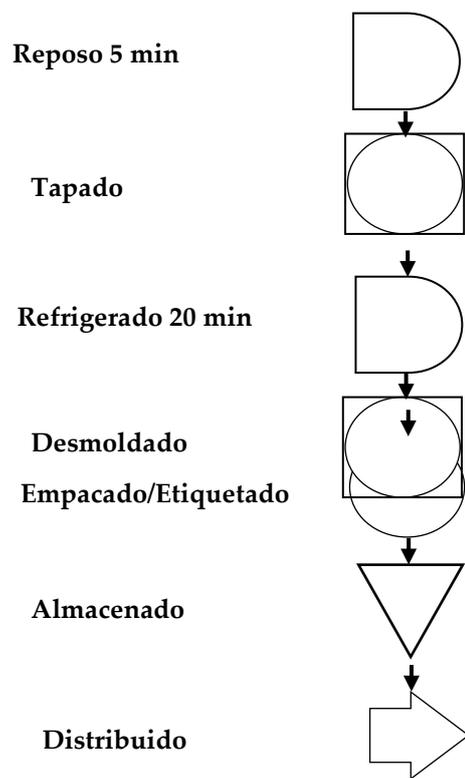


Figura 1. Diagrama de elaboración de bombones.

Estudio organizacional

- a. **Asociación** (Asociación de grupo de productoras de San Gerardo Echeandía)
- b. **Tipo de asociación** (grupos étnicos y minoritarios)
- c. **Directiva de la asociación** (Presidente, Vicepresidente, Secretaria, Tesorera, Síndico, Administradora)
- d. **Antecedentes** (Apertura de la planta de procesos denominada Planta de Elaborados de CACAO).
- e. **Marca** (Choco Warmi)
- f. **Eslogan de la asociación** (Con la dulzura de Echeandía)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los datos obtenidos se aplicaron a la asociación “PLANTA DE ELABORADOS DE CACAO”, y a sus 20 socias activas que lo conforman; siendo la muestra seleccionada la línea bombonera como unidad de análisis.

Análisis PEST (factores Políticos, Económicos, Sociales y Tecnológicos).

Políticos	Económicos	Socioculturales	Tecnológicos
¿De qué manera influye la situación política actual en la asociación?	¿Conoce la situación económica local?	¿Analizaron el ambiente social que rodea la asociación?	¿La asociación cuenta con recursos tecnológicos actuales?
Las actuales políticas permiten o facilitan que toda asociación o emprendimiento ingrese al mercado laboral.	La situación económica local de la asociación ha permanecido estable durante 5 años, dado a que su sustento económico se basa a la venta de sus cultivos, pero se vieron afectadas por la COVID-19	El análisis lo realizaron de manera ambigua en un 50%, lo hicieron en base a conocimientos propios que tiene los obtienen de la convivencia	Los recursos tecnológicos que maneja la asociación se encuentran entre los básicos, además cuentan con el apoyo de la fundación que los patrocina para ello.
¿Existen factores políticos que influyen en el marketing?	¿Identificaron la estabilidad económica del consumidor actual?	¿Se identificó el público objetivo?	¿Los integrantes de la asociación conocen sobre el uso de deferentes software y hardware
Por el momento las entidades gubernamentales han permitido el ingreso al mercado de los emprendimientos	Dentro de la estabilidad económica de su público consumidor, se identificó q se han visto afectados por la llegada del COVID 19	No realizaron un sondeo de público consumidor, pero se basaron en ofertar de forma libre el producto y esperar pedidos	Solo algunos integrantes de la asociación conocen sobre recursos informáticos, pero se apoyan en la ayuda que les presta la fundación
¿Existen legislaciones que afecten a futuro al emprendimiento?	¿La asociación conoce qué nivel socioeconómico tiene el consumidor del producto?	¿Conocen si el producto ofertado es conocido o forma parte de la cultura local?	¿Hay predisposición para cambiar o innovar la forma de hacer el marketing?
La asociación desconoce de la existencia de legislaciones que le afecte a futuro su desarrollo	La asociación no ha realizado un estudio de su consumidor objetivo	La asociación desarrollo el proyecto en base a conocimientos ambiguos del consumo de este producto	La asociación presta colaboración para promover cambios positivos
¿La asociación tiene regulaciones de responsabilidad social?	¿El incremento de costo de vida o impuestos afecta el costo del producto ofertado?	¿Se conoce las diferentes reacciones de los consumidores a la evolución de la asociación?	¿Identificaron las desventajas que trae la tecnología en la promoción?
Los integrantes desconocen sobre estas acciones	El costo del producto si se ha visto afectado en un 50% por el incremento y costo de vida	La asociación no realiza seguimiento de vinculación a la sociedad y sus relaciones con ella	No han realizado una identificación de las desventajas de la tecnología, pero por el momento no han tenido inconvenientes
		¿Existen entidades sociales que pueden afectar a la entidad?	

		Por el momento la asociación no tiene indicadores de afectación a futuro por entidades particulares	
--	--	---	--

Tabla 2. Matriz PEST aplicado a la asociación “Planta de elaborados de cacao”-Maquita.

Al igual que en este trabajo, el desarrollado por **Pérez-Tabernero**²², considera que el análisis PEST ha permitido detectar oportunidades y amenazas, que a su vez permiten desarrollar estrategias para que la empresa maximice los recursos y logre superar la competencia.

Análisis FODA aplicado a la asociación “Planta de Elaborados de Cacao”- Maquita.

Análisis interno		Resultados obtenidos
Debilidades		
¿Existe falta de capacitación al personal? ¿Hay Problemas financieros? ¿Los salarios son deficientes? ¿Se presentan bajos niveles de ventas? ¿Existe planificación? ¿Hay falta de conocimiento en marketing? ¿Existe desconocimiento en redes sociales?	Aspectos negativos	No falta capacitación al personal por parte de la fundación que los patrocina, pero es limitada. Los recursos son limitados y las socias necesitan ayuda por parte de la fundación para el manejo Se realiza una distribución de la remuneración económica de manera equitativa de acuerdo a los ingresos y utilidades obtenidos, siendo esta flexible de acuerdo a la cantidad vendida de producto Las ventas se han visto afectadas por la pandemia COVID19, que influyo directamente en producción y venta. Se realizan planificaciones de manera eventuales previos a invitaciones a ferias o aun evento Los conocimientos en marketing son limitados El manejo de redes es limitado
Fortalezas		
¿Existe un ambiente laboral agradable? ¿Se cuenta con materia prima óptima? ¿Se cuenta con instalaciones propias? ¿El producto final es de calidad? ¿Se cuenta con procesos administrativos adecuados?	Aspectos positivos	Si tiene una convivencia positiva Entre las fortalezas más grandes tenemos que las mismas socias proveen de la materia prima bajo factores adecuados establecidos por las mismas socias. Gracias al apoyo de la fundación MAQUITA, la asociación cuenta con su propia instalación para el procesamiento del cacao. El manejo que realizan en el cultivo y al ser un producto sin mayor aditivo permite obtener un producto de calidad en cuanto a valor nutricional. Los procesos administrativos tienen variabilidad de acuerdo a cada actividad que se presenta y a la vez la complejidad de la actividad.
Análisis externo		
Amenazas		

<p>¿Existe mayor competencia? ¿Hubo aumento de precios en materia prima e insumos? ¿Falta mano de obra ocasionalmente? ¿El crecimiento de la asociación es lento?</p>	<p>Aspectos negativos</p>	<p>La competencia es un factor innegable se incrementa en el mercado con más frecuencia El aumento de precio fluctúa de acuerdo a ordenanzas públicas Eventualmente las socias no cuentan con tiempo para procesar y distribuir el producto. El crecimiento es pausado pero constante</p>
<p>Oportunidades</p>		
<p>¿Existe crecimiento en ventas? ¿Se cuenta con maquinaria adecuada? ¿Se cuenta con materia prima propia? ¿Se tienen apoyo de fundaciones?</p>	<p>Aspectos positivos</p>	<p>Las ventas crecen paulatinamente de acuerdo al consumo del producto. La asociación cuenta con los equipos básicos para la elaboración de sus productos. Las socias cuentan con sus cultivos lo que le permite a la asociación proveerse de su materia prima.</p>

Tabla 3. Matriz foda aplicado a la asociación “planta de elaborados de cacao”-Maquita.

¿Se cuenta con el apoyo de fundaciones? La gran ventaja de la asociación que cuenta con el apoyo de la fundación MAQUITA, lo que les ha permitido crear este emprendimiento.

Diagrama de Pareto.

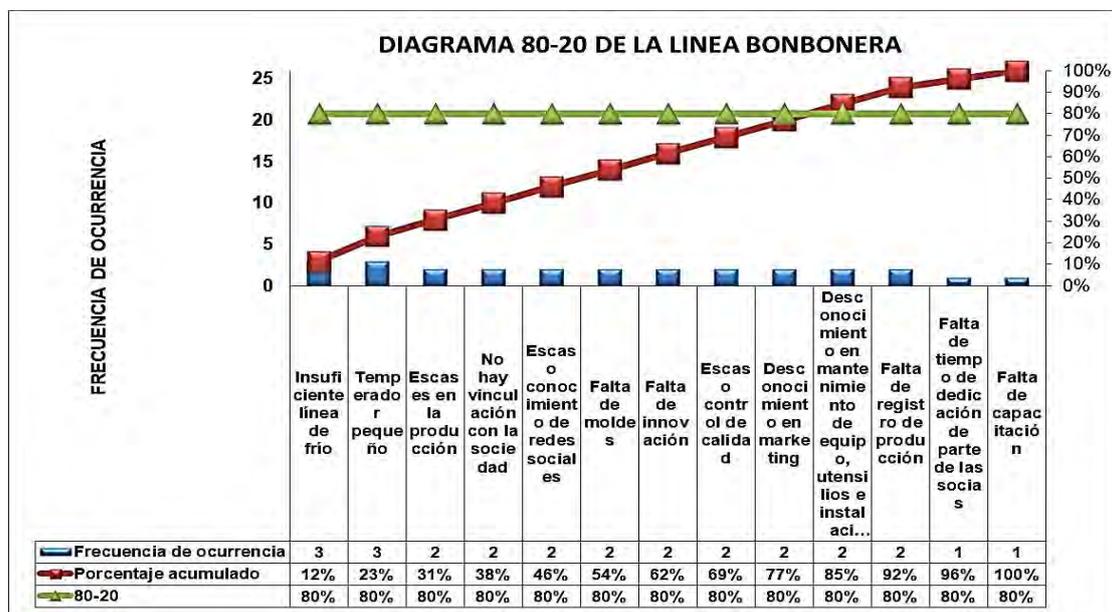


Figura. 2. Diagrama 80-20 de la línea bombonera

Analizando la gráfica de Pareto de la figura 2, el 30% de las inconsistencias provienen de dos categorías; insuficiente línea de frío y Temperador pequeño, en definitiva 9 categorías representan el 80% de los defectos a ser corregidos en la planta de procesados en análisis, siendo las 7 categorías continuas identificadas las siguientes (Escasa producción, falta de vinculación con la sociedad, falta de moldes adecuados, falta de innovación, Escaso control de calidad Desconocimiento de marketing).

Etapa del proceso	Peligro	Punto crítico de control PCC
Procesamiento del bombón	Riesgo biológico	NO
	crecimiento de microorganismos patógenos en la manipulación	
	Riesgo químico	NO
	contaminación por detergentes en la limpieza de moldes, maquinaria, utensilios	
	Riesgo físico	NO
	aparición de objetos extraños durante el proceso de elaboración del bombón	
Almacenado	riesgo biológico	SI es un PCC
	crecimiento de microorganismos patógenos por malas condiciones de almacenamiento	
Distribución	riesgo biológico	SI es un PCC
	crecimiento de microorganismos patógenos por malas condiciones de transporte	

Tabla 4. Resultados de la aplicación del árbol de decisiones

Trabajos previos sobre la acumulación de defectos/quejas en la producción sobre una línea chocolatera realizado por **Rodríguez Ramírez**²³, aplico un check list a todos los participantes de la organización con la finalidad de priorizar las causas haciendo uso del diagrama de Pareto 80-20, concluyéndose que 4 causas raíces que están originando el 80% de los sobre costos operativos en la planta. Por otro lado, **Plúas Ríos et al.**²⁴, infirieron a la necesidad de diseñar protocolos estandarizados para reducir 3 categorías defectuosas: los empaques vacíos, incompletos y mal sellados, ya que estos tres factores suman el 84% de no conformidades.

Desarrollo del árbol de decisiones.

Aplicando el árbol de decisiones determinamos los puntos críticos de control en el proceso de elaboración de bombones en las fases identificadas; asociando cada programa establecido y cada método a emplear con la norma de calidad ISO 9001:2015.

CONCLUSIONES

Durante la recopilación de datos a través de PEST, FODA y el Diagrama de Pareto, así como mediante la revisión documental, se ha confirmado la influencia de factores externos en la demanda del producto. También se ha identificado la existencia de indicadores positivos en la organización que no se están aprovechando al máximo, así como la falta de atención a factores negativos.

Los desafíos predominantes están relacionados con el marketing y la gestión de la cadena de frío, y se han identificado riesgos biológicos en los procesos de almacenamiento y distribución dentro de los puntos críticos de control (PCC).

No obstante, es alentador observar que, a través de la implementación de correcciones de errores dirigidas a abordar estas causas fundamentales, es posible reducir estos efectos adversos y optimizar el uso de los indicadores positivos. Esto representa una valiosa oportunidad para mejorar la eficacia y la competitividad de la organización en el mercado.

Agradecimientos: Los autores extienden el agradecimiento a la Asociación de productoras de procesados de cacao del recinto San Gerardo, cantón Echeandía, También a la Universidad Estatal de Bolívar y a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por el apoyo recibido en el desarrollo del presente trabajo.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés

REFERENCIAS

1. Díaz-Valderrama JR, Leiva-Espinoza ST, Aime MC. The History of Cacao and Its Diseases in the Americas. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>
2. Quezada et al. Economic analysis of the export of cocoa in Ecuador during the period 2014 – 2019. Polo del Conoc [Internet]. 2021;6(3):2430–44. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7926903>
3. Montes M. “Efectos del fosforo y azufre sobre el rendimiento de mazorcas, en una plantación de cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51, en la zona de Babahoyo. Univ Tec Babahoyo Fac Ciencias Agropecu Carrera Ing Agropecu Trab [Internet]. 2016;46. Available from: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/3358/E-UTB-FACIAG-ING AGROP-000009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Zambrano Jaramillo G. Evaluación de la influencia del proceso de beneficio del cacao (*Theobroma cacao* L) CCN-51 de altura en su calidad final, mediante el análisis físico, físico-químico y sensorial. 2018. 430–439 p.
5. Ginatta, G., Vignati, F., & Rodríguez M. Observatorio del Cacao Fino de Aroma para América Latina. Iniciat Latinoam del Cacao [Internet]. 2020;8:8–10. Available from: http://scioteca.caf.com/handle/123456789/1530%0Ahttps://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1530/Iniciativa_Latinoamericana_del_Cacao_Boletín_No.8.pdf?sequence=1
6. ANECACAO. El cacao es más que un grano, es tradición ecuatoriana, felicidad y bienestar [Internet]. ANECACAO. 2019. p. 1. Available from: <https://anecacao.com/>
7. ANECACAO. Avanzamos juntos hacia la excelencia en la exportación de cacao: Taller de

- Homologación de Norma INEN 176 Sexta Revisión [Internet]. ANECACAO. 2020. Available from: <https://anecacao.com/avanzamos-juntos-hacia-la-excelencia-en-la-exportacion-de-cacao-taller-de-homologacion-de-norma-inen-176-sexta-revision/>
8. Grind PD. Breve Historia del Consumo de Chocolate en el Mundo [Internet]. Grind. 2018. p. 1. Available from: <https://perfectdailygrind.com/es/2018/08/01/breve-historia-del-consumo-de-chocolate-en-el-mundo/>
 9. Camacho Gómez M. Chocolate Museums in Europe: history, marketing and tourism.
 10. Castro Santana A. Exóticos, ilustrados y polémicos placeres del Imperio: el chocolate, el té y el café en la literatura inglesa. *Acta poética*,. 2019;119–45.
 11. PanArte. Historia del chocolate [Internet]. PanArte. 2021. p. 1. Available from: <https://www.panarte.cl/post/la-historia-del-chocolate>
 12. Sol Sánchez Á, Naranjo González JA, Córdova Avalos V, Ávalos de la Cruz DA, Zaldívar Cruz JM. Caracterización bromatológica de los productos derivados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Chontalpa, Tabasco, México. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2017;(14):2817–30.
 13. Andrade JA, Rivera-García J, Chire-Fajardo GC, Ureña-Peralta MO. Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE*. 2019;10(4):1–12.
 14. Tafurt G, Suarez O, Lares M del C, Álvarez C, Liconte N. Capacidad antioxidante de un chocolate oscuro de granos cacao orgánico sin fermentar. *Rev Digit Postgrado*. 2020;10(1).
 15. Lisbeth Gorotiza-Vélez GI, Marisol Romero-Vélez EI. El sistema de gestión de calidad con ISO 9001:2015 como estrategia para el mejoramiento de los procesos de la Comercializadora ITM. Polo del Conoc [Internet]. 2021;6:270–94. Available from: <http://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es>
 16. Peñaherrera-cruz A, Ramón-curay R, Fierro-borja S, Ramírez-arteaga L. Marketing Channels of Aroma Cocoa (*Theobroma cacao* L .) for the Association “ ASOPROAVAL ” (Ecuador) as an Axis of Social Development and Solidarity Economy.
 17. ISO. ISO 9001:2015(es) Sistemas de gestión de la calidad [Internet]. ISO. 2015. p. 1. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9001:ed-5:v1:es>
 18. Pretelt-Medina M. Creación de empresa de servicios de agro informática. Univ EAN [Internet]. 2017;01:127. Available from: <http://www.albayan.ae>
 19. Shelley Pursell. Análisis FODA: Qué es y cómo usarlo (con ejemplos). [Internet]. Hubpost. 2021. p. 1. Available from: <https://blog.hubspot.es/marketing/analisis-foda>
 20. Villar-Ledo L, Ledo-Ferre MC. Aplicación de herramientas estadísticas para el análisis de indicadores Application of statistical tools for indicators analysis.
 21. OIRSA (Organismo Internacional de Sanida Agropecuario. Manual de análisis de peligros y puntos

- críticos de control - HACCP.pdf [Internet]. 2016. Available from:
file:///C:/Users/Administrator/Desktop/Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP.pdf
22. Taberero PÁP. Estudio de los análisis del entorno en el modelo de emprendimiento disciplinado. Aplicación al caso de la creación de la startup Blodel. Univ Politécnica Madrid [Internet]. 2019;1–108. Available from: https://oa.upm.es/54122/1/TFG_ANGEL_PEREZ_TABERERO_POLO.pdf
23. Rodríguez Ramírez JE. Propuesta de implementación de un modelo de gestión por procesos en el área de producción para incrementar la rentabilidad de la fábrica de chocolates La Española S.R.L Trujillo. Univ Priv del Norte [Internet]. 2017;280. Available from:
https://repositorio.upn.edu.pe/bitstream/handle/11537/12346/Rodríguez_Ramírez_José_Enrique.pdf?sequence=1&isAllowed=y
24. Plúas M, Méndez M, Plúas D, Huayamave Á. Improvement of the Continuous Process Through the Application of the Dmaic Methodology in the Chocolatera Production Line of a Food Company. *Cienc y Tecnol.* 2017;21:14–22.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: A Tigre León, Bravo M B, Rojas Sánchez A, Pazmiño Mantilla L, Bayas Morejón F. Implementacion de un sistema ISO 9001:2015 para la producción de chocolates artesanales en Asociación “Planta de elaborados de cacao”, Echeandía. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.3>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Conocimiento en salud sexual y reproductiva en estudiantes de la Unidad Educativa “Roberto Arriegui” Guaranda. 2023.

Knowledge about sexual and reproductive health in the "Roberto Arriegui" Educational Unit Guaranda students. 2023.

María Rosa Mas Camacho^{ID}^{1*}; Silvana Ximena López Paredes^{ID}²; Marcelo Sebastián Camacho Suárez^{ID}³
Bryan Joel Galarza Lara^{ID}⁴

¹ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador.

² Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador. slopez@ueb.edu.ec

³ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador. marccamacho@mailes.ueb.edu.ec

⁴ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador. bgalarza@mailes.ueb.edu.ec

*Corresponding author. mmas@ueb.edu.ec

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.2>

RESUMEN

La educación sexual es de vital importancia como prevención a conductas de riesgo, siendo la adolescencia una etapa crucial de la vida respecto al conocimiento de enfermedades por transmisión sexual y planificación familiar, que le aporta madurez y responsabilidad como ser social. Se expone en la presente el Proyecto de Vinculación efectuado en una Unidad Educativa de Guaranda, Bolívar, la cual tuvo por objetivo desarrollar acciones educativas sobre salud sexual y reproductiva con los estudiantes. Es un estudio cuantitativo trasversal, con una muestra intencionada de 140 alumnos de 14 años de edad, o superior. Se identifica a partir de la encuesta aplicada, el predominio en el criterio de la preferencia a la familia como fuente para la orientación e información sobre la sexualidad y la existencia de un conocimiento medio sobre métodos anticonceptivos y de infecciones de transmisión sexual. Los proyectos educacionales que promuevan estilos de vida saludables sobre la educación sexual y reproductiva, se fortalecen con la integración del personal docente, profesionales de la salud y las familias.

Palabras clave: adolescente; comportamiento sexual; educación sexual; salud sexual

ABSTRACT

Sexual education is of vital importance in the prevention of risk behaviors, with adolescence being a crucial stage of life regarding knowledge of sexually transmitted diseases and family planning, which provides maturity and responsibility as a social being. The Linkage Project in an Educational Unit of Guaranda, Bolívar, which aimed to develop educational actions on sexual and reproductive health with students, is presented herein. It is a cross-sectional quantitative study with an intentional sample of 140 students aged 14 years or older. From the survey applied, the predominance in the criterion of preference for the family as a source for guidance and information on sexuality and the existence of average knowledge about contraceptive methods and sexually transmitted infections is identified. Educational projects that promote healthy lifestyles in sexual and reproductive education are strengthened by integrating teaching staff, health professionals and families.

Keywords: Adolescent; sexual behavior; sexual education; sexual health.

INTRODUCCIÓN

La sexualidad es un aspecto complejo de la vida para todo adolescente, etapa de vida en que se reafirma la identidad sexual y personal de los individuos. Hoy día se dispone de información diversa, distorsionada e inadecuada adquirida de diversas fuentes, incluyendo su propio grupo, de adultos influyentes para ellos, así como medios de comunicación masiva, siendo Internet un espacio de preferencia, a nivel mundial se registra un incremento de la actividad sexual en los jóvenes y una disminución en la edad de inicio de relaciones sexuales provocando con esto la incidencia de partos en mujeres menores de 18 años, con mayor presencia en países en desarrollo¹.

La educación sexual es un tema que contribuye a los jóvenes a desarrollar sexo seguro y a tomar decisiones acertadas para su vida sexual, tomando en cuenta es un período de la vida con modificaciones físicas, emocionales y sociales. Sin embargo, en el Ecuador, la educación sexual no ha sido abordada de manera adecuada ni sistemática en el sistema educativo, lo que ha generado problemas como el embarazo adolescente, las infecciones de transmisión sexual, la violencia de género y la discriminación por orientación sexual o identidad de género².

Se tiene como antecedentes estudios realizados al respecto, como es en particular el de Rodríguez³ donde se identifica en que el 43,1% de los embarazos adolescentes de la provincia de Bolívar fueron prematuros, siendo las posibles causas la falta de conocimiento acerca de planificación familiar y la falta de apoyo de los padres, derivando como consecuencia el abandono escolar. Estadísticas del Ministerio de Salud Pública⁴ confirman que a nivel nacional el 89,9% de adolescentes de 12 a 15 años han mantenido relaciones sexuales con personas mayores, y el 44,3 % de las adolescentes entre 15 a 18 años quedaron embarazadas.

Uno de los principales obstáculos para la educación sexual en el Ecuador es la falta de una política pública clara y coherente que garantice su inclusión curricular en todos los niveles educativos. A pesar de que existe un Plan Nacional de Educación para la Sexualidad y el Amor (PLANESA) desde 1998, el mismo no se aplica de manera uniforme ni se exige su cumplimiento en las instituciones educativas⁵. Además, el Código Orgánico de Salud, que ratifica la garantía de la educación sexual integral, ha sido objeto de fuertes resistencias y

cuestionamientos por parte de sectores conservadores y religiosos que lo consideran una amenaza para la familia y los valores morales⁶. Estas presiones han influido en las decisiones políticas y han limitado el avance de la educación sexual en el país.

Al respecto, los autores Camacho y Jordán⁷ afirman que la educación sexual no ha tenido una sistematicidad en el sistema educativo ecuatoriano, con una presencia modesta en los primeros años de educación básica, siendo experiencias parciales sin continuidad entre sí, no exitosas por no contar con apoyo en los contextos familiares.

Se considera como otro obstáculo para la educación sexual en el Ecuador a la falta de formación y capacitación sistemática de las y los docentes que deben impartirla. Esto implica que muchos docentes no cuentan con los conocimientos, las habilidades y las actitudes necesarias para abordar este tema con sus estudiantes, lo que puede generar desinformación, prejuicios, tabúes y miedos.

Para que la educación sexual y reproductiva sea efectiva, se requiere de una adecuada formación y capacitación de los docentes que la imparten, ya que son ellos los encargados de transmitir los contenidos y orientar a los estudiantes en este ámbito. Según la UNESCO⁸, muchos docentes no cuentan con la preparación necesaria para abordar la educación sexual y reproductiva de manera integral, científica, positiva y basada en los derechos humanos. Esto puede generar desinformación, prejuicios, tabúes y miedos entre los estudiantes, así como dificultades para adaptar los contenidos a las características y necesidades de cada grupo. Por lo tanto, se hace necesario capacitar a los docentes en educación sexual y reproductiva, tanto en el aspecto conceptual como en el metodológico y actitudinal, para que puedan cumplir con su rol de manera eficiente y satisfactoria.

En consonancia en el país hoy día se aplican estrategias regionales y locales, se pueden señalar las acciones que desarrolla el Ministerio de Educación a través de talleres en las coordinaciones zonales para la institucionalización de la Educación Sexual Integral en la comunidad educativa⁹; y el “Taller de Sexualidad y Prevención en Violencia de Género” que impulsa el Ministerio de Educación¹⁰ en Ibarra, dentro del Programa de “Estrategia Nacional Intersectorial de Planificación Familiar y Prevención del Embarazo Adolescente”, donde se desarrollan actividades de orientación para estudiantes y docentes por separado, adecuándose acorde a los objetivos de cada grupo social, y en consideración a que muchos docentes no cuentan con los conocimientos, las habilidades y las actitudes necesarias para abordar este tema con sus estudiantes, lo que puede generar desinformación, prejuicios, tabúes y miedos.

Un tercer obstáculo para la educación sexual en el Ecuador es la falta de participación e involucramiento de las familias y las comunidades en este proceso. La educación sexual no puede ser responsabilidad exclusiva del sistema educativo, sino que debe ser complementada con el apoyo y la orientación de las familias y las comunidades, que son los primeros agentes socializadores de las y los jóvenes. Sin embargo, muchas familias y comunidades desconocen o rechazan la importancia de la educación sexual, debido a factores culturales,

religiosos o ideológicos¹¹. Esto dificulta la comunicación y la confianza entre padres e hijos sobre temas relacionados con la sexualidad, así como la coordinación y el trabajo conjunto entre la escuela y el hogar.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, la educación sexual en el Ecuador enfrenta varios obstáculos que impiden su desarrollo e implementación efectiva. Estos obstáculos tienen que ver con aspectos políticos, pedagógicos y sociales que requieren ser abordados desde una perspectiva integral, participativa e intersectorial. La educación sexual es un derecho humano fundamental que contribuye al bienestar, la salud y la ciudadanía de las personas. Por lo tanto, se debe garantizar la correcta orientación para una salud sexual sana, siendo un tema de interés desde edades tempranas, donde la planificación familiar y prevención de enfermedades por transmisión sexual en adolescentes son considerados un problema social y sanitario de relevancia.

Se expone en el presente trabajo el desarrollo del Proyecto de Vinculación llevado a efecto en la Unidad Educativa Roberto Alfredo Arregui Chauvin de Guaranda, provincia Bolívar, que tuvo por objetivo desarrollar acciones educativas con los estudiantes de primero de bachillerato, sobre salud sexual y reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realiza un estudio descriptivo, cuantitativo trasversal, siendo el universo los alumnos de la Unidad Educativa Roberto Alfredo Arregui Chauvin de la ciudad de Guaranda, durante el período de noviembre de 2022 a marzo de 2023. Se toma una muestra intencional conformada por los estudiantes de décimo grado y los de bachillerato atendiendo a la edad (a partir de 14 años), lo que determinó la misma fuese de 140 alumnos, 54 del sexo masculino y 86 féminas.

Se aplica una encuesta diseñada al efecto conformada por 10 preguntas con escalas de Likert, validada por expertos en salud sexual y reproductiva, con la intención de identificar las falencias en el conocimiento del tema por los estudiantes de la institución educativa. Las preguntas se estructuran referentes a las fuentes de información para el conocimiento en el tema de la sexualidad y la satisfacción en la forma de comunicación con la familia en el diálogo para tratar este tema, precisándose además en particular del conocimiento individual sobre métodos anticonceptivos, embarazo adolescente y sus implicaciones, métodos de barrera o medidas de protección, infecciones de transmisión sexual y formas de contagio. Todas las variables de la encuesta fueron de tipo cualitativas, a excepción de la edad de los participantes.

A partir de los resultados obtenidos en la encuesta aplicada se diseña un “Programa de capacitación sobre sexualidad responsable” el cual tuvo la siguiente planificación:

Actividades desarrolladas en el “Programa de capacitación sobre sexualidad responsable”:

- Elaboración de guías sobre las estrategias de salud sexual y reproductiva, sobre el embarazo en adolescentes, y sobre enfermedades de transmisión sexual
- Ejecución de charlas y talleres en temáticas acorde a las edades de los estudiantes, que se expone a continuación:

Grupo 1: Décimo Grado y Primero de Bachillerato BGU (dos talleres en tres paralelos):

- El desarrollo humano (incluye reproducción, pubertad, orientación sexual, e identidad de género).
- Las relaciones (incluye la familia, las amistades, las relaciones amorosas y relaciones informales).

Grupo 2: Segundo de Bachillerato BGU (dos talleres en dos paralelos):

- Las habilidades personales (incluye la comunicación, negociación y toma de decisiones).
- El comportamiento sexual (incluye la abstinencia y sexualidad a lo largo de la vida).

Grupo 3: Tercero de Bachillerato BGU (dos talleres en dos paralelos):

- La salud sexual (incluye las enfermedades de transmisión sexual (ETS), los anticonceptivos y el embarazo, tema este último que incluyó de forma detallada sobre: conceptos básicos anatómicos, consecuencias del embarazo adolescente, prevención del embarazo adolescente y planificación familiar).
- La sociedad y la cultura (incluye los roles de género, la diversidad y la sexualidad en los medios de comunicación).
- Casa abierta expositiva donde los estudiantes exponen sobre las temáticas respectivas, acorde los niveles de enseñanza a que corresponde, lo que se desarrolla el día de cierre del proyecto.

Las charlas y talleres se desarrollaron en encuentros semanales, con el uso de maquetas confeccionadas al afecto y presentaciones digitales, material que fue donado a la institución educativa al cierre del proyecto para su reutilización por el personal docente en la réplica de este tipo de actividades. En todas las sesiones del programa se aplicaron técnicas participativas con preguntas dinámicas para mantener la atención, el uso de material didáctico (maquetas y presentaciones digitales) mantuvo la comunicación con los estudiantes y facilitó su participación, se alcanzó un ambiente motivacional y de confianza que hizo una aproximación a los ponentes con el esclarecimiento de dudas e interrogantes de los adolescentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A la pregunta de: ¿En qué medida es satisfactoria la comunicación con sus padres acerca de temas sexuales?, el 45 % afirma ser “satisfactoria”, siendo esta la categoría intermedia de la escala de la pregunta, mientras que un 10,7% de los estudiantes confirman que “no tienen comunicación alguna” con sus padres en el tema.

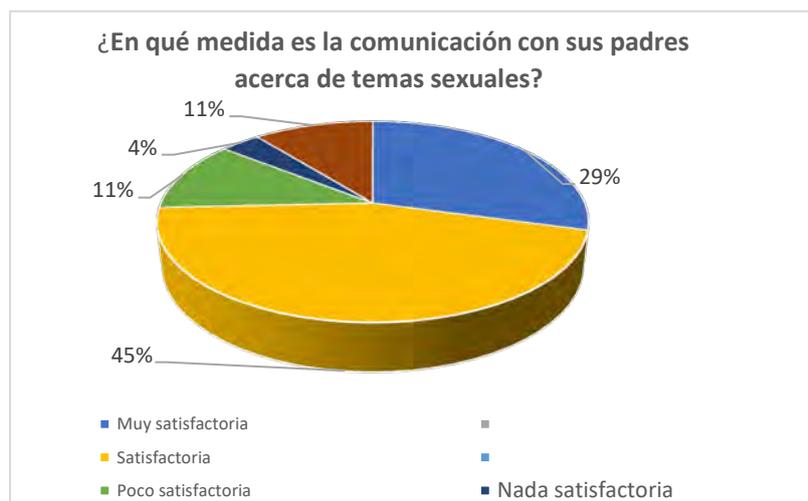


Figura 1. Comunicación con los padres acerca de temas sexuales.

Sin embargo, a la pregunta de: ¿A su preferencia de qué fuente de información (persona o medio) desearía aprender acerca de temas sexuales?, que se muestra en la Tabla 1, se manifiesta sean fuentes familiares las proveedoras de este tipo de información, el 50% elige a la madre, el 17,1% al padre y el 7,1% que fuesen los hermanos los comunicadores al respecto, aunque hay un 9% que considera son las Redes sociales/ internet su fuente para este conocimiento.

Fuente de información (persona o medio) para aprender de temas sexuales.	Frecuencia	%
Madre	70	50%
Padre	24	17%
Hermanos	10	7%
Redes sociales/ internet	12	9%
Otro familiar o familiares	5	4%
Profesorado en el colegio	7	5%
Amigos de la misma edad	5	4%
Médico	7	5%
Totales	140	100%

Tabla 1. ¿A su preferencia de qué fuente de información (persona o medio) desearía aprender acerca de temas sexuales?

Fuente: Encuesta del estudio realizado por los autores.

Analizando las interrogantes descritas, se identifica coincidencia en la preferencia a la familia como fuente para el aprendizaje de los métodos anticonceptivos (Fig. 2): el 45 % elige a la madre, el 11,4 % al padre y el 10 % que fuesen los hermanos, aunque destaca la consideración de que fuese una fuente profesional como lo es el médico, para este particular del conocimiento en el uso de anticonceptivos, dado por la afirmación del 15% de los encuestados. A este respecto Amayuela-Mora et al¹² destaca las limitaciones que los adolescentes ecuatorianos tienen en la comprensión de aspectos relacionados con la educación de la sexualidad, y sus actitudes al respecto, lo que es similar a lo identificado en el estudio que se expone, si se toma en consideración de la existencia de un porcentaje que afirma no tener comunicación de la sexualidad en la familia; las autoras

identifican la presencia de mitos y prejuicios sociales, sugiriendo la necesidad de nuevas concepciones para la educación en la sexualidad.

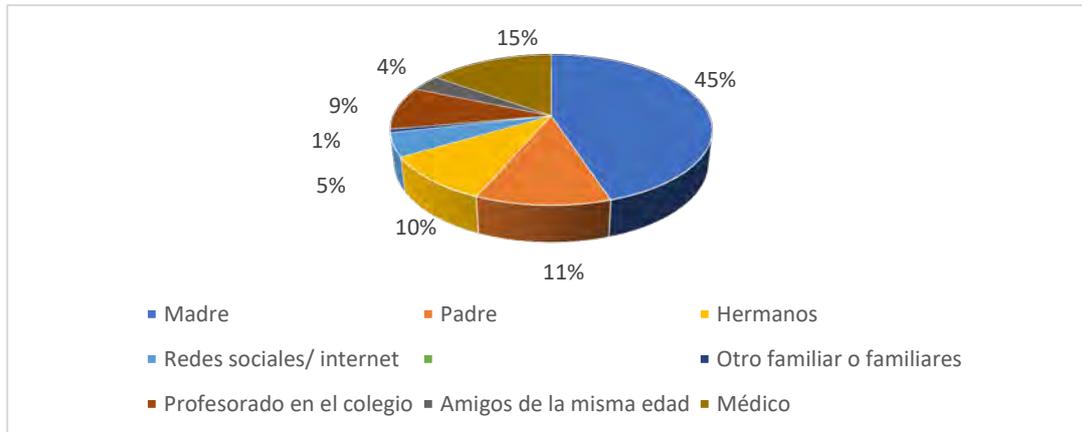


Figura 2. De las siguientes fuentes de información sobre métodos anticonceptivos ¿Cuál considera la más importante para usted?

Fuente: Encuesta del estudio realizado por los autores.

En la Fig. 3 se identifica que el 51% de adolescentes afirman saber las formas de adquisición de infecciones de transmisión sexual. Se hace coincidente este resultado con lo identificado por Guerra Ramírez et al¹³ quienes afirman el conocimiento de los adolescentes sobre infecciones de transmisión sexual es de medio, y aseveran de la importancia que tiene la educación a la población joven vulnerable en aras de la prevención en salud y mejorar la calidad de vida.

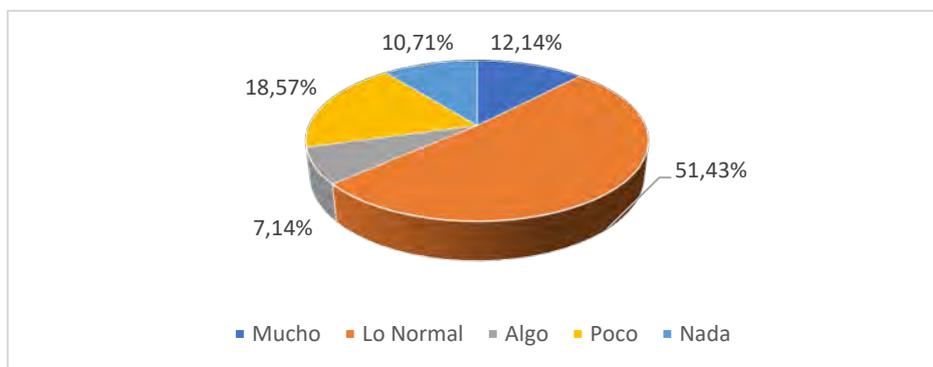


Figura 3. ¿Sabe las formas de adquirir una infección sexual?

Fuente: Encuesta del estudio realizado por los autores.

A la interrogante de si: ¿Consideras importante informarte sobre sexualidad antes de tener relación sexual? Se identifica al 68% de estudiantes estar Muy de acuerdo, que sumado a los De acuerdo hace un 84% que consideran lo significativo que es tener información respecto a la sexualidad previo a la relación física personal (Fig. 4), existiendo en contraposición un 16 % que no lo asume como de relevancia.

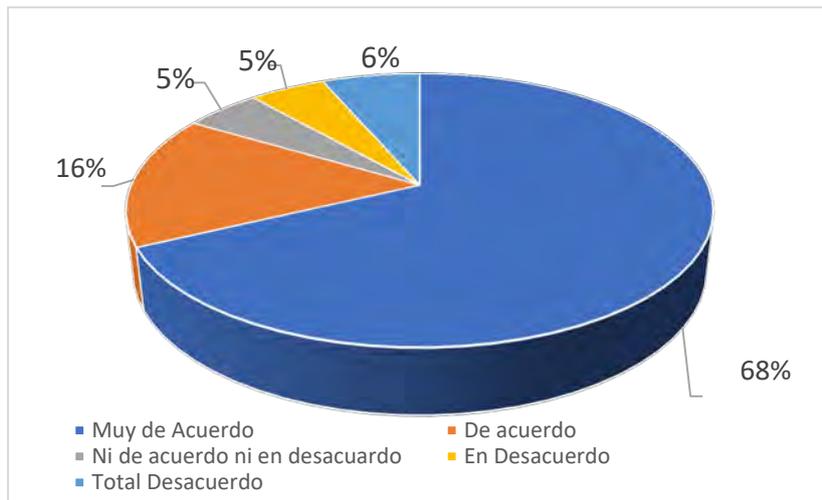


Figura 4. ¿Consideras importante informarte sobre sexualidad antes de tener relación sexual?

Fuente: Encuesta del estudio realizado por los autores.

En la encuesta aplicada el 80% de los estudiantes afirma haber recibido capacitación en salud sexual y reproductiva, siendo en particular el criterio de si “las orientaciones que recibe en la unidad educativa en que usted estudia con respecto a la salud sexual y reproductiva es considerada en la escala de satisfactoria a no satisfactoria”, como se describe en la Fig. 5, donde se aprecia que el 58% si considera es satisfactoria las orientaciones y educación que reciben del tema sexualidad en la unidad educativa en que estudian, que sumado al 32% que lo considera mu satisfactorio permite afirmar que el90% de los adolescentes manifiesta conformidad con el programa que se desarrolla en la institución.

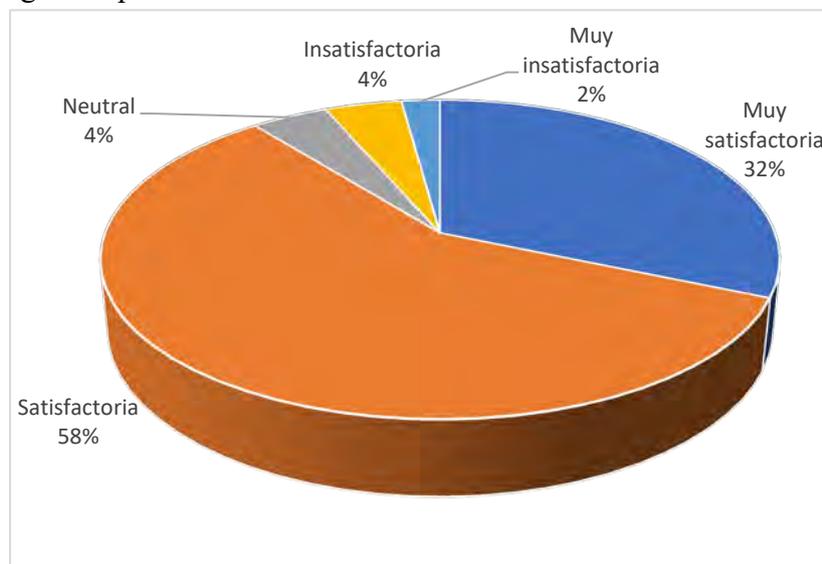


Figura 5. Las orientaciones que recibe en la unidad educativa en que usted estudia con respecto a la salud sexual y reproductiva es considerada...

Fuente: Encuesta del estudio realizado por los autores

Preguntas de la encuesta:	SI		NO	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
¿Conoce usted las implicaciones que es tener un embarazo adolescente?	119	85,00	21	15,00
¿Conoce los métodos de barrera o medidas de protección para tener relaciones sexuales?	122	87,14	18	12,86

Tabla 2. Conocimiento sobre embarazo adolescente y métodos de barreras. Fuente: Encuesta del estudio realizado por los autores.

Por otra parte, se observa en la Tabla 2 que, el 85% afirma conocer las implicaciones que tiene tener un embarazo adolescente, y el 87% refiere que sabe de los métodos de barrera o medidas de protección para tener relaciones sexuales. Al respecto, es importante destacar que la educación sexual es un proceso continuo y que el acceso a la información por sí solo no siempre es suficiente para prevenir embarazos en adolescentes. Los autores son coincidentes en el criterio del Fondo de Población de las Naciones Unidas¹⁴, cuando afirma que se hace necesario tener, además de la información sobre los derechos sexuales y reproductivos, acceso a servicios de salud de calidad lo que contribuirá a la toma de decisiones informadas sobre su salud sexual, el acceso a los servicios de salud sexual y reproductiva de calidad.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una participación activa por docentes y estudiantes lo que favoreció en el cumplimiento de los objetivos del proyecto y su impacto en la adquisición de conocimientos por parte de los adolescentes en la adquisición de hábitos que repercuten en una forma positiva para su salud por su comportamiento y actitudes cotidianas aprendidas.

El desarrollo de proyectos educacionales que promuevan estilos de vida saludables sobre la educación sexual y reproductiva, en edades tempranas de la vida, conlleva a la formación de actitudes y valores que se retribuirá en una vida digna, responsable y saludable, lo cual se hace exitoso con la integración de personal docente, profesionales de la salud y las familias.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interes

REFERENCIAS

1. OMS. (15 de 09 de 2022). *Embarazo en la adolescencia*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/adolescent-pregnancy>
2. MinEdu. (2019). *Guía Metodológica Prevención del Embarazo en niñas y adolescentes*. Obtenido de Ministerio de Educación: <https://educacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/06/Guia-Prevencion-Embarazo.pdf>
3. Rodríguez Yáñez, R. (2019). *Análisis de resultados de las estrategias relacionadas con el Embarazo Adolescente*. Obtenido de Repositorio Universidad Central del Ecuador: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/17664/1/T-UCE-0005-CEC-161.pdf>
4. MSP. (06 de 2018). *Política Intersectorial de prevención del embarazo en niñas y adolescentes. Ecuador 2018 - 2025*. Obtenido de Ministerio de Salud Pública: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2018/07/POL%C3%8DTICA-INTERSECTORIAL-DE-PREVENCI%C3%93N-DEL-EMBARAZO-EN-NI%C3%91AS-Y-ADOLESCENTES-para-registro-oficial.pdf>
5. WAMBRA Medio Comunitario. (18 de 09 de 2020). *Educación sexual en el sistema educativo ecuatoriano*. Obtenido de WAMBRA Medio Comunitario: <https://wambra.ec/educacion-sexual-en-el-sistema-educativo-ecuatoriano/>
6. Ubillús Saltos, S. (24 de 04 de 2017). *La Educación para la sexualidad en la Educación Básica Ecuatoriana*. Obtenido de Revista Científica Sinapsis: <https://revistas.itsup.edu.ec/index.php/sinapsis/article/view/8>
7. Camacho, M., & Jordán, J. (12 de 2022). *La Educación Sexual: Como Método para la prevención de embarazos no deseados en el bachillerato*. Obtenido de Revista de Investigación Enlace Universitario: <https://enlace.ueb.edu.ec/index.php/enlaceuniversitario/article/view/46/90>
8. UNESCO. (2022). *El camino hacia la educación integral en sexualidad: informe sobre la situación en el mundo*. Obtenido de UNESCO Biblioteca Digital: https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000377963_spa
9. MinEdu. (2023). *Técnicos de las coordinaciones zonales se capacitan para implementar la Política de Educación Sexual y Prevención de violencia de género*. Obtenido de Minsuterio de Educación: <https://educacion.gob.ec/tecnicos-de-las-coordinaciones-zonales-se-capacitan-para-implementar-la-politica-de-educacion-sexual-y-prevencion-de-violencia-de-genero/>
10. MinEdu. (2023). *Estudiantes y profesores son capacitados en temas de sexualidad y prevención en violencia de genero*. Obtenido de Ministerio de Educación: <https://educacion.gob.ec/estudiantes-y-profesores-son-capacitados-en-temas-de-sexualidad-y-prevencion-en-violencia-de-genero/>
11. Galarza Salazar, D. (09 de 2020). *Sexualidad e Interculturalidad: Una crítica a la Educación Sexual en el Ecuador*. Obtenido de Repositorio PUCE : <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18498/Sexualidad%20E%20Interculturalidad%20Una%20Cr%C3%ADtica%20A%20La%20Educaci%C3%B3n%20Sexual%20En%20El%20Ecuador.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
12. Amayuela-Mora, G., & Ubillus-Saltos, S. (2019). *Educación sexual: reto actual de todos los educadores*. Obtenido de Revista Luz: <https://www.redalyc.org/journal/5891/589163662004/589163662004.pdf>
13. Guerra Ramírez, M., Aldana Rivera, E., & Rojas Torres, I. (07 de 2020). *Conocimiento sobre prevención de infecciones de transmisión sexual en adolescentes inmigrantes habitantes en Soledad-Atlántico 2018-2019*. Obtenido de Revista Identidad Bolivariana: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2a>

hUKEwiC6ImtlZSAAxVqfDABHVWwClo4FBAWegQIERAB&url=https%3A%2F%2Fidentidadbolivariana.itb.edu.ec%2Findex.php%2Fidentidadbolivariana%2Farticle%2Fdownload%2F81%2F145%2F&usg=AOv

14. UNFPA. (04 de 04 de 2022). *Salud sexual y reproductiva*. Obtenido de Fondo de Población de las Naciones Unidas: <https://www.unfpa.org/es/salud-sexual-y-reproductiva#readmore-expand>

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Mas Camacho M R; López Paredes S X; Camacho Suárez M S, Galarza Lara B J. Conocimiento en salud sexual y reproductiva en estudiantes de la Unidad Educativa “Roberto Arregui” Guarananda. 2023. Revis Bionatura 2023;8 (4) 4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.2>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Deshidratación de diferentes variedades de ají para la obtención de polvo

Dehydration of different varieties of chili to obtain powder

Darwin Núñez¹, Sandy Agualongo Sinchipa¹, Carmen Callan Chela¹, Juan Gaibor Chávez^{1*}

¹Universidad Estatal de Bolívar. Carrera Ingeniera Agroindustrial. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente – Provincia Bolívar, Guaranda – Ecuador

*Correspondence: rtigre@ueb.edu.ec

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.4>

RESUMEN

Se realizó la cinética de secado de tres variedades de ají, Habanero (*Capsicum chinense*), Jalapeño (*Capsicum annum*) y Amarillo (*Capsicum baccatum*), donde se logró obtener experimentalmente la cinética del secado, fue realizado utilizándose un secador laboratorial de bandejas, a temperatura constante de 70 °C. El tiempo requerido para secar el producto hasta una humedad aproximada del 34 % fue de 10 horas. Las curvas experimentales del secado fueron ajustados al modelo difusional de Lewis, Pague y Henderson & Pabis. Se determina que la velocidad de secado a una temperatura constante favorece a la transferencia de masa y energía. En la que estableció que el modelo que tuvo mayor ajuste tanto para la cinética de secado y deshidratación fue de Henderson & Pabis dando como resultado $R^2 = 73,130$ % para el secado y $R^2 = 71,631$ para la deshidratación, obteniendo al final un producto con una humedad relativamente nula y de fácil trituración, logrando obtener un polvo homogéneo y conservando sus características multifuncionales tanto en su uso gastronómico como también en el uso de prevención de enfermedades.

Palabras Claves: *Capsicum annum*; *Capsicum chinense*; *Capsicum baccatum*; Cinética; Deshidratación; Velocidad de flujo; Temperatura; Humedad.

ABSTRACT

In this work, the kinetics of drying three varieties of chili peppers, Habanero (*Capsicum chinense*), Jalapeño (*Capsicum annum*) and Amarillo (*Capsicum baccatum*), was obtained experimentally using a laboratory tray dryer at a constant temperature of 70 °C. The time required to dry the product to a moisture content of approximately 34 % was 10 hours. The time needed to dry the product to an approximate humidity of 34% was 10 hours. The experimental drying curves were adjusted to the diffusional model of Lewis, Pague and Henderson & Pabis. It is determined that the drying rate at a constant temperature favors the transfer of mass and energy. It was established that the model that had the best fit for both drying and dehydration kinetics was Henderson & Pabis, resulting in $R^2 = 73.130$ % for drying and $R^2 = 71.631$ for dehydration, obtaining at the end a product with relatively zero moisture and easy crushing, acquiring a homogeneous powder and preserving its multifunctional characteristics both in its gastronomic use as well as in the use of disease prevention.

Keywords: *Capsicum annum*; *Capsicum chinense*; *Capsicum baccatum*; Kinetics; Dehydration; Flow rate; Temperature; Humidity.

INTRODUCCIÓN

El ají es utilizado normalmente en la cocina por su capacidad en mejorar el sabor de los alimentos, añadir un toque picante y proporcionar beneficios para la salud. Según Ramos & Insolina¹, el ají (*Capsicum*) es considerado como una materia prima agroindustrial en potencia, se caracteriza por ser altamente oxidante de bajo aporte calórico. Ayuda a mejorar las inflamaciones y permite la prevención de enfermedades como el cáncer². El ají ha sido un ingrediente fundamental en la cultura culinaria de comunidades alrededor del

mundo por su capacidad para dar sabor y picor a los alimentos. Ha sido utilizado en prácticas religiosas y ceremonias culturales, brindando una tradición cultural transmitida de generación en generación, por lo que se puede decir que el ají tiene un uso significativo en el aspecto formativo de muchas comunidades³. En el ají el principal componente químico se llama (*Capsicum*) es la capsaicina la cual genera irritación en el paladar y es responsable de darle ese sabor particular, tiene propiedades como analgésico y antiinflamatorio, este componente podemos encontrar en distintas proporciones, dado que esta suele variar entre 0,1 hasta 1% en peso⁴. El ají tiene varias características organolépticas, incluyendo su sabor picante y su aroma característico, en términos de apariencia el ají puede tener diferentes colores dependiendo de la variedad, desde el rojo hasta el amarillo o verde, su forma y tamaño también pueden variar, por lo tanto, para potenciar las características organolépticas del ají (*Capsicum*) es necesaria la aplicación de técnicas como es el secado⁵. Entre las técnicas de conservación de alimentos, el proceso de secado representa una alternativa tecnológica para la reducción de las pérdidas postcosecha. Pues el secado es un método simple y relativamente barato, cuyo principio básico es el de reducir el contenido de agua del alimento, ocasionando una reducción drástica de la actividad de agua de los productos alimenticios, aumentando el tiempo de conservación y la vida de anaquel del producto, facilitando su transporte y almacenamiento⁶. Los modelos matemáticos que mejor se ajustan a la curva y cinética de secado son: Henderson & Pabis siendo las siguientes expresiones.

Curva de Secado:

$$MR = ae^{(-kt)}$$

Cinética de Secado:

$$Y = \frac{X_{wt} - X_{we}}{X_{wo} - X_{we}}$$

En este sentido, el presente trabajo tiene por objetivo obtener datos de la cinética del secado del ají, a temperatura constante y modelar las curvas del secado a través de los modelos de Henderson & Pabis.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado en el complejo agroindustrial de la Universidad Estatal de Bolívar - Ecuador. El ají se recolectó en el barrio la Joya perteneciente a Ambato. Se recolectó datos por el lapso de 10 horas. Se utilizó un deshidratador de bandejas donde al inicio del proceso de deshidratado se determinó la humedad inicial de las diferentes muestras de la materia prima, cada 30 min se tomó datos donde se comprobó la pérdida de humedad, esto se lo ejecuta hasta obtener valores de peso constante, lo que significa que el producto llegó a su humedad mínima y se continúa con su procedimiento.

Descripción del proceso

Para el proceso de la cinética de secado se tomó una muestra por cada variedad de ají (Jalapeño, habanero y amarillo) cada una con su réplica, el material vegetal fue lavadas, pesadas, troceadas y depositadas en bandejas de aluminio de 10 cm de radio en un deshidratador de bandejas en estado estacionario a 70 ° C, dicho materia vegetal presento una humedad inicial de 92.01 % para cada variedad. El peso inicial de cada muestra fue de 20,359 g; 20,324 g y 20,142 g. Antes del secado, se genera un precalentamiento al deshidratador por un tiempo de 30 min para estabilizar la temperatura a la cual será secada la muestra. Una vez estabilizada la temperatura, las muestras fueron rebanadas para posterior ser colocadas en las bandejas e introducir en la cámara del secado, momento que se inicia el proceso⁷.

Para el proceso de secado en el deshidratador de bandejas se toma en cuenta el flujo de aire constante de 1,28 L/s. Las muestras periódicamente fueron pesadas en una balanza termo gravimétrica por periodos de 30 min hasta obtener un peso constante. Se peso con la finalidad de verificar su regularidad en el secado,

brindado dato sin variación en la última lectura, las muestras se expusieron a temperatura ambiente por 5 min para que logre enfriarse adecuadamente, posteriormente a esto procedemos a triturar en un molino eléctrico con un aproximado de 2,0 micras con la finalidad de obtener un polvo homogéneo, a continuación se procede a envasar y etiquetar en frascos de vidrio previamente esterilizados, para luego poder llevarlos a su respectivo almacenamiento en un lugar libre de humedad a temperatura ambiente para conservar sus beneficios, aporte y demás componentes del ají⁵.

Modelos matemáticos

Para el estudio de la curva de secado, se aplicó los modelos de Leguis, Page. Las curvas de secado obtenidas experimentalmente fueron modeladas utilizándose los modelos de Page y Henderson & Pabis. Este último modelo es ampliamente usado por muchos investigadores en el estudio de secado de alimentos⁸.

No. Modelo	Modelo	Ecuación del Modelo
1	Lewis	$MR = e^{(-kt)}$
2	Page	$MR = \exp(-kt)^n$
3	Henderson & Pabis	$MR = ae^{(-kt)}$

Nota: MR: Razón de Humedad; t: tiempo de secado (h); k: constante de secado; n es coeficiente de ajuste⁸. Adicionalmente se utilizaron expresiones matemáticas como: la humedad en base seca, velocidad de secado y la humedad media.

Tabla 1. Modelos matemáticos empleados para la curva de secado

Variable	Modelos matemáticos
Humedad en base seca	$X_1 = \frac{m_H - m_{Ss}}{m_{Ss}}$
Velocidad de secado	$N_A = \left(\frac{m_{Ss}}{A} \left(\frac{X_1 - X_2}{t_2 - t_1} \right) / 1000 \right)$
Humedad media	$\bar{X} = \frac{X_i + X_f}{2}$
Modelo matemático de Henderson y Pabis	$Y = \frac{X_{wt} - X_{we}}{X_{wo} - X_{we}}$

Nota: Ecuaciones que son importantes para determinar la cinética de secado, tomado de Dávila, Marín, & Franco⁹

Tabla 2. Ecuaciones matemáticas utilizadas en la cinética de secado

Se midió el contenido de humedad en base seca (X_1) de las tres muestras de ají (Jalapeño, Habanero y Amarillo), en relación con la masa húmeda (m_H) y masa del sólido seco (m_{Ss}) de la materia, mediante la siguiente ecuación.

$$X_1 = \frac{m_H - m_{Ss}}{m_{Ss}} \tag{1}$$

Se calculó N_A (velocidad de secado) que relaciona la masa del sólido seco (m_{Ss}) con el área de secado (A) así como también con la humedad inicial (X_1) y final (X_2) en base seca con relación a la temperatura final (t_2) e inicial (t_1).

$$N_A = \left(\frac{m_{Ss}}{A} \left(\frac{X_1 - X_2}{t_2 - t_1} \right) / 1000 \right) \tag{2}$$

Para establecer la humedad media (\bar{X}) se utilizó la siguiente ecuación, en donde se relaciona la humedad inicial en base seca (X_i) con la humedad final en base seca (X_f).

$$\bar{X} = \frac{X_i + X_f}{2} \tag{3}$$

Para determinar la humedad (C) se utiliza la siguiente ecuación en donde se relaciona la cantidad de ceniza de las muestras de ají después de la incineración (m_1) con la masa de la cápsula con el producto antes de la incineración en g (m_2) sobre masa de la cápsula vacía en g (m).

$$C = \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \times 100 \quad (4)$$

Deshidratado

El equipo utilizado para este proceso fue un deshidratador semiindustrial, de forma rectangular y consta de bandejas con un área de 10 cm², con un sistema de calentamiento de aire por medio de un ventilador eléctrico de 110 voltios de resistencia. Para obtener la lectura de la temperatura se usó el termómetro propio del deshidratador, el proceso duro aproximadamente 10 horas a una temperatura constante de 70 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Repeticiones	Tiempo	Jalapeño	Amarillo	Habanero
1	0	20,359	20,142	20,324
2	0:30	14,852	15,014	15,364
3	1:00	12,119	11,585	11,722
4	1:30	9,032	9,223	9,034
5	2:00	7,125	7,521	7,323
6	2:30	6,008	6,102	6,022
7	3:00	4,875	5,452	5,001
8	3:30	4,701	4,742	4,501
9	4:00	3,738	4,312	3,968
10	4:30	3,573	4,175	3,787
11	5:00	3,523	4,096	3,712
12	5:30	3,431	4,021	3,621
13	6:00	3,476	3,745	3,589
14	6:30	3,427	3,652	3,513
15	7:00	3,58	3,559	3,437
16	7:30	3,491	3,466	3,361
17	8:00	3,421	3,373	3,285
18	8:30	3,421	3,28	3,209
19	9:00	3,421	3,187	3,133
20	9:30	3,421	3,094	3,057
21	10:00	3,421	3,094	3,057

Tabla 3. Datos de la cinética de secado de 10 h en las tres variedades de ají

Resultados de la cinética de secado

El efecto del análisis de varianza para la actividad humedad en las muestras de ají son desecadas a una temperatura constante de 70 °C, en la cual se demuestra una diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0,05$), lo que refleja efecto de la temperatura sobre las muestras de ají procesadas en función del tiempo. El porcentaje de humedad inicial para la cinética de secado de las tres variedades de ají (Jalapeño, habanero y amarillo) fue de 92.01 % para cada variedad, la humedad final de cada muestra por cada variedad de ají fue de 36,14 % ají jalapeño, 32,03 % ají habanero y 36,16 % ají amarillo.

Las figuras 1 muestra la variación del contenido de peso de las tres variedades de ají en función del tiempo de secado a temperatura constante de 70 °C.

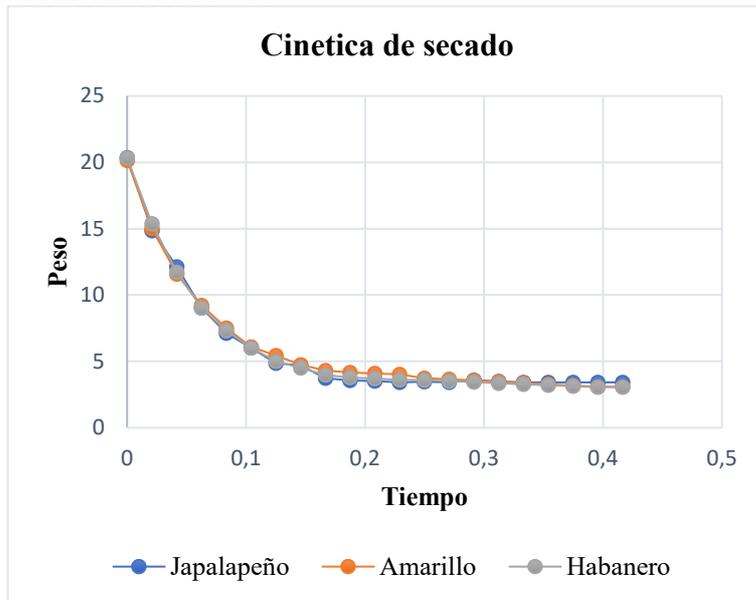


Figura 1. Cinética de secado a 70 °C en modelo Henderson y Pabis

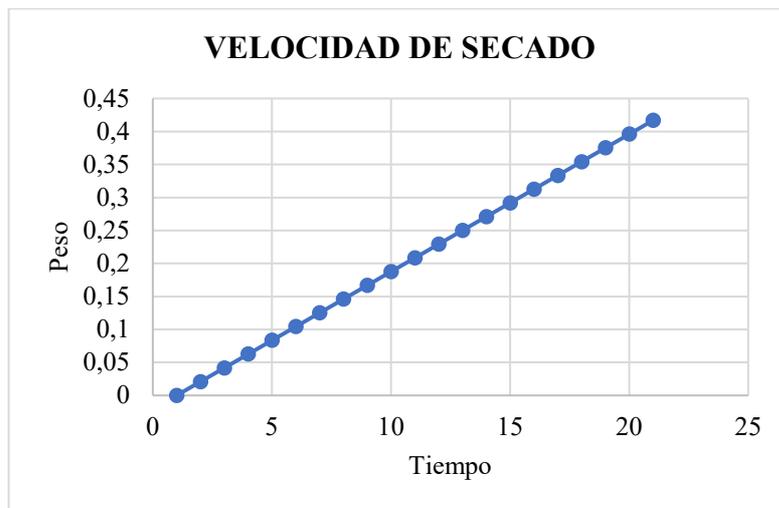


Figura 2. Velocidad de Secado a 70 °C en modelo Henderson & Pabis

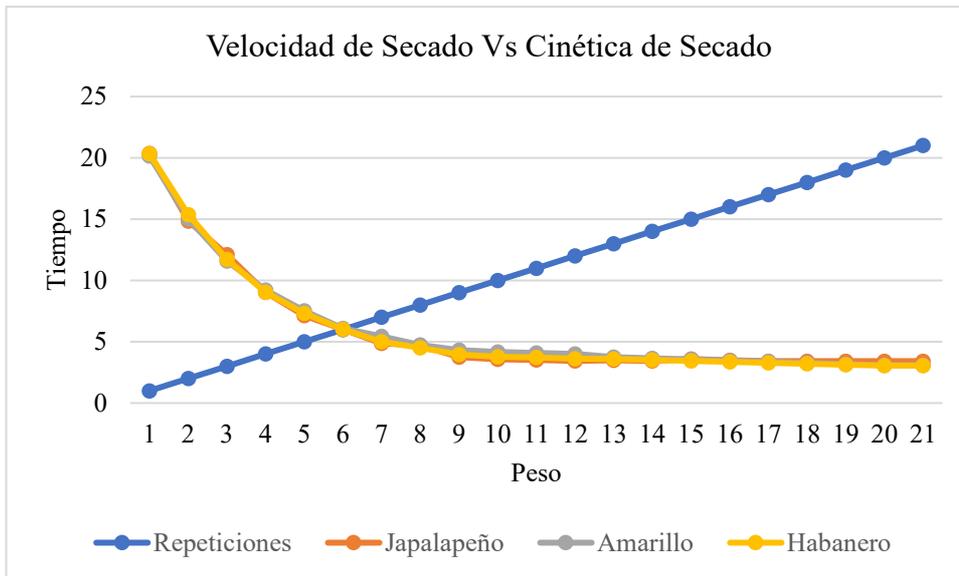


Figura 3. Velocidad de Secado vs Curva de deshidratación a 70 °C en modelo Henderson & Pabis

El porcentaje de humedad para ají en polvo deshidratado por aire forzado y los resultados obtenidos de la cinética de secado del ají de los factores temperatura y variedad de ají se muestra en la tabla 3, donde la humedad inicial, humedad en base seca, velocidad de secado, flujo de aire y cantidad de agua a evaporar son los resultados de la cinética de secado, duro 10 horas aproximadamente donde el modelo que más se ajusta es la de Henderson & Pabis con $R^2 = 73,130$ para el secado, mientras que para la deshidratación a 70 °C duro 9:30 horas aproximadamente y el modelo matemático que se ajusta es el de Henderson & Pabis $R^2 = 71,631$.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la humedad en base seca, velocidad de secado, cantidad de agua a evaporarse, humedad media y el flujo de aire.

Variable	Ají Amarillo	Ají Jalapeño	Ají Habanero
Humedad en base seca	36,16 %	36,14 %	32,03 %
Velocidad de secado	3,3 kg/t	2,2 kg/t	3,3 kg/t
Humedad media	36,13 %	36,12 %	32 %
Cantidad de agua al evaporarse	0,17 kg	0,16 kg	0,17 kg
Flujo de aire	1,28 m/s	2,18 m/s	1,28 m/s
Coefficiente de determinación	$R^2 = 0,7163$	$R^2 = 0,7313$	$R^2 = 0,7458$

Nota: Estos datos son obtenidos de los ensayos preliminares hechos con las variedades de ají.

Tabla 4. Cinética de secado en la estufa a 70°C para cada variedad de ají

En el caso del ají Jalapeño varió el color después de haber sido deshidratado a consecuencia del tratamiento térmico, el ají Habanero por su bajo contenido de humedad, el proceso de deshidratación fue de 9:30 horas en comparación con las otras dos variedades que tardaron diez horas en llegar a un dato constante. Este comportamiento fue observado por Prado et al.,¹⁰ y Nascimento,¹¹ secando tamaras (*Phoenix dactylifera L.*) y vainas de algarroba (*Ceratonia siliqua*), respectivamente. Este acontecimiento ocurre debido a que la temperatura elevada del aire produce mayor flujo de secado 2022, por causa del correspondiente aumento del coeficiente de convección de transferencia de calor.

En la tabla 4 se muestra que los modelos matemáticos que mejor se ajusta a la curva de secado a 70 °C.

Tipo	Temperatura (°C)	Nombre del modelo	Ecuación	Estadística
Secado	70 °C	Henderson & Pabis	$Y = \frac{X_{wt} - X_{we}}{X_{wo} - X_{we}}$	$R^2 = 73,130 \%$
Deshidratado	70 °C	Henderson & Pabis	$Y = \frac{X_{wt} - X_{we}}{X_{wo} - X_{we}}$	$R^2 = 71,631 \%$

Tabla 5. Modelo matemático que mejor se ajusta a la curva de secado y deshidratado

Velocidad Deshidratado

La mayoría de alimentos deshidratados deben ser reconstituidos antes de su consumo, siendo necesario determinar las condiciones óptimas para la rehidratación; en consecuencia, es importante obtener productos deshidratados de textura aceptable en el menor tiempo posible.

Resultados semejantes fueron obtenidos por Zuniga et al.⁸ para deshidratación de pulpa de cupuacu.

DISCUSIONES

La deshidratación es una metodología que aporta para la conservación de los alimentos, con la acción de la reducción de agua presente en los mismos y a su vez por dicho fenómeno podemos disminuir notoriamente la presencia de bacterias, mohos y levaduras, que podrían dar paso a la descomposición¹², en este trabajo se hace uso de esta tecnología con el fin de conocer cual es el mejor tiempo y temperatura de deshidratación para conservar a la matriz ají.

Los modelos matemáticos de Henderson & Pabis se utiliza en la industria alimentaria para predecir el contenido de humedad final de los productos alimenticios durante el proceso de secado¹³. Este modelo se basa en la ecuación de la transferencia de masa y asume que la velocidad de secado es directamente proporcional a la diferencia entre la humedad presente del producto y la humedad de equilibrio en el aire circundante¹⁴. Los términos de secado más adecuados en la investigación fueron de 70 °C con un tiempo de 10 h ya que no deterioran el valor nutricional y sensorial del producto fina.

Las matrices vegetales pueden cambiar su composición físico química en base al método de secado y el sometimiento de las variables tiempo y temperatura, así también este fenómeno se atribuye al proceso bioquímico como la oxidación¹⁵. En el caso de las variedades de ají sometidas a deshidratación se presentó el fenómeno de pardeamiento oxidativo, pero se mantuvo la capsaicina.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados indican que la temperatura y el tiempo de secado son factores críticos que influyen en el contenido de humedad del ají. El modelo matemático de Henderson & Pabis se ajustó mejor a la cinética de secado de las tres variedades de ají estudiadas. Se establecieron parámetros cinéticos, recomendando una temperatura de 70°C y un tiempo de secado de 10 horas. Estos hallazgos son valiosos para la industria del ají, ya que proporcionan directrices para mejorar la eficiencia y calidad del producto, permitiendo la implementación de un método estandarizado a gran escala.

REFERENCIAS

- Ramos, A., & Insolina A. Comportamiento reologico de la salsa de ají jalapeño [Internet]. Universidad nacional del centro de Perú; 2017. Available from: <https://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/1934>
- Villares J. Estudio comparativo de trichoderma harzianum más Bacillus subtilis para el control de

- agentes causal en el cultivo de ají (*Capsicum annuum*) en el canton Ventanas. [Internet]. 2020. Available from: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/VILLARES LEDESMA JOHNNY DANIEL.pdf>
3. Castillo F. Tipos de Ají, el toque picante de tus platos. Agencia, peruana de noticias [Internet]. Lima Andina. 2022. p. 1. Available from: <https://andina.pe/agencia/noticia-dia-los-ajies-peruanos-estos-son-los-embajadores-las-cocinas-regionales-812454.aspx>
 4. Cedrón J. La Capsapcina. Rev Quim PUCP [Internet]. 2013;27(1–2):7–8. Available from: <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/7590/7835>
 5. Guerrero, D., Motta R. Cinética de secado de ají jalapeño (*Capsicum annuum* L.) EncurtidoSecado de una variedad de *Capsicum*. Hum Rev. 2023;1–12.
 6. Beltrán Muñoz H. Propuesta de un plan de negocios para la recuperación de la cocina novoandina en la ciudad de Arequipa 2022 [Internet]. Universidad Alas Peruanas; 2022. Available from: <https://repositorio.uap.edu.pe/handle/20.500.12990/11128>
 7. Rocha Ángulo JÁ. Secado de ají tabasco (*Capsicum frutescens*) mediante deshidratación por convección forzada. Prospectiva [Internet]. 2016;14(1):89–95. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/prosp/v14n1/v14n1a11.pdf>
 8. Giraldo-Zuniga, A., Pinedo, A., Silva, A., Silva, P., Serra, J., & Pavlak M. Datos experimentales de la cinética del secado y del modelo matemático para pulpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) en rodajas. Cienc y Tecnol los Aliment [Internet]. 2010;30(1):179–82. Available from: <https://www.scielo.br/j/cta/a/HT4CM6wN7jD9Wnh7kSSHyhF/?format=pdf&lang=es>
 9. Dávila, S., Marín, M., & Franco A. Modelo Numerico para el comportamineto térmico de un secador tipo domo con circulación forzada para el sedaco de ajjies. Simp Peru Energía Solar, [Internet]. 2021;15–9. Available from: <https://xxviiiispes.perusolar.org/wp-content/uploads/2022/01/14.-Sandra-Vergara.pdf>
 10. Prado, M., Park, K., & Alonso L. Shrinkage of dates (*Phoenix dactilyfera*). Dry Technol [Internet]. 2010;18(1–2):295-310. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930008917705>
 11. Nascimento, A. P. S.; Lima, A. K. S.; Cavalcanti, C. F.; Gusmao RP. Cinética de secagem de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora* SW). Rev Verde Agroecol e Desenvolv Sustentável, [Internet]. 2015;10(5):115–119. Available from: doi: 10.18378/rvads.v10i5.3338. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/3338>.
 12. Figueredo-Rondón MC. Evaluación del secado de la Musa Paradisiaca (plátano) utilizando el aparato de laboratorio SBAN. Tecnología química. 2017; 37(2). Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/4455/445551175013.pdf>.
 13. Satimehin AA. Drying characteristics and mathematical modelling of the drying kinetics of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). International Drying Symposium. 2018; 21. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/4455/445551175013.pdf>.
 14. Vidal HG. Drying temperatures on the functional properties of purple-fleshed sweet potato. Ciência Rural. 2022; 52(6). Available from: <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20201044>
 15. Xavier G. Evaluación de la deshidratación osmótica para el enriquecimiento con compuestos bioactivos en manzana. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2019; 10(5). Available from: <file:///C:/Users/aleja/Downloads/Dialnet-EvaluacionDeLaDeshidratacionOsmoticaParaElEnriquec-7098890.pdf>

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Núñez D, Agualongo Sinchipa S, Callan Chela C, Gaibor Chávez J. Deshidratación de diferentes variedades de ají para la obtención de polvo. Revis Bionatura 2023;8 (4)

4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.4>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Estudio de la cinética de secado del maíz suave (*Zea mays* L) variedad Guagal (INIAP 111)

Study of the drying kinetics of soft corn (*Zea mays* L) Guagal variety (INIAP 111)

Roxana García-Culqui¹ ; Lady Guevara-Narváez¹ ; Franz Verdezoto-Mendoza¹ ; Juan Gaibor-Chávez¹ *

¹Carrera de Agroindustrias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Dirección de Investigación y Vinculación, Universidad Estatal de Bolívar – Provincia Bolívar – Ecuador, CP:020150.

*Corresponding author. jgaibor@ueb.edu.ec

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.5>

RESUMEN

El objetivo fue determinar la cinética de secado del maíz (*Zea mays* L), variedad Guagal mejorado. Se realizaron con tres muestras de materia prima a temperaturas no controladas entre 60 °C – 80 °C durante 12 horas, seguido por el proceso de cinética de secado en una estufa a 104°C durante 24 horas. Las muestras iniciaron con pesos de 8.09 g; 10.02 g; 11.16 g respectivamente con una humedad inicial de 22.13 % y se obtuvo una humedad final de 0,53 %; 0,7 %; 0,61 %. Las variables medidas incluyeron la humedad en base seca, total y en equilibrio, el flujo de calor, la cantidad y la eficiencia de calor, y la velocidad de secado. Se determinó que la velocidad de secado a mayores temperaturas favorece a la transferencia de masa y energía. Se estableció que el modelo de Henderson y Pabis fue el que mejor se adaptó a los datos experimentales obtenidos en el proceso de cinética de secado a 104°C por 24 horas $R^2 = 99,798\%$; mientras que el modelo de Page fue el que mejor se adaptó a los datos obtenidos durante la deshidratación a 60-80°C durante 12 horas $R^2 = 99,881 \%$. Esto sugiere que se pueden obtener mejores resultados de secado y deshidratación con la variedad de maíz INIAP 111 Guagal mejorado si se considera el establecimiento de la temperatura adecuada y el tiempo de procesamiento.

Palabras clave: Cinética, secado, maíz, modelo matemático, harina de maíz.

ABSTRACT

The objective was to determine the drying kinetics of corn (*Zea mays* L), variety INIAP 111 Guagal improved, for the production of corn flour. The experiments were conducted with three raw material samples at uncontrolled temperatures between 60 °C - 80 °C for 12 hours, followed by the drying kinetics process in an oven at 104°C for 24 hours. The samples started with weights of 8.09 g, 10.02 g, and 11.16 g, respectively, with an initial moisture content of 22.13 % and a final moisture content of 0.53 %; 0.7 %; 0.61 % was obtained. Variables measured included moisture on dry, total and equilibrium basis, heat flux, heat quantity and efficiency, and drying rate. It was determined that the drying rate at higher temperatures favors mass and energy transfer. It was established that the Henderson and Pabis model was the best fit to the experimental data obtained in the drying kinetics process at 104°C for 24 hours $R^2 = 99.798\%$, while the Page model was the best fit to the data obtained during dehydration at 60-80°C for 12 hours $R^2 = 99.881 \%$. This suggests better drying and dehydration results can be obtained with the improved INIAP 111 Guagal maize variety if proper temperature setting and processing time are considered.

Keywords: Kinetics, drying, corn, mathematical model, fit, Henderson-Pabis, Page

INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cereales más importantes en la alimentación humana, por sus diferentes usos y su valoración sociocultural. Presenta fuentes de aminoácidos y energía por su contenido de proteínas, aceite

y almidón. Contiene minerales como K, Fe, Zn, Ca, P, Si, Cu y Mg y vitaminas del tipo B, A y C, B4, B6, C, E, B2, B3, B1, B9 y A^{1,2}.

El cultivo de maíz suele en el Ecuador es de vital importancia por sus distintas variedades existentes, según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) en el año 2020 se sembró aproximadamente una superficie de cosecha 74018 ha pertenecientes a la Región Sierra, representando un 80% a nivel nacional con una tasa de consumo per-cápita del 14,5 kg/año². El maíz harinoso se cultiva en tierras altas de 4000 m sobre el nivel del mar; en las principales provincias de Tungurahua, Bolívar y Chimborazo se cultivan variedades de maíz blanco harinoso, especie Guagal (*Zea mays*, L), este cultivo es sembrado mayormente en la provincia de Bolívar^{3,2}. Siendo representado un 30% a nivel nacional, los principales cantones en producir este cereal San Miguel y Guaranda⁴.

El proceso de secado desempeña un papel crucial en la agroindustria al preservar los granos, ya que busca reducir al máximo la presencia de agua, lo que a su vez limita el crecimiento de microorganismos dañinos que pueden afectar negativamente el desarrollo del producto⁵. De igual manera, durante el proceso de secado del maíz, se produce la evaporación de aproximadamente un tercio a un cuarto de la masa del grano seco antes de que llegue al área de almacenamiento. En esta fase, el grano es expuesto a una corriente de aire caliente, lo que eleva su temperatura hasta el punto de ebullición del agua. En primer lugar, se elimina el agua libre, seguida por la eliminación del agua contenida en los capilares, hasta alcanzar un nivel conocido como el umbral de estabilización, que se logra cuando la humedad llega al 13%⁶.

La cinética de secado detalla la transferencia de masa y calor en el proceso de secado, revelando la conexión entre las variables del proceso y el tiempo necesario para el secado completo⁷. Las curvas de secado se representan como la relación entre el contenido de humedad y el tiempo en condiciones húmedas o secas, la velocidad de secado en función del tiempo, o la velocidad de secado en relación al contenido de humedad⁸. Para el secado de granos se describe usando modelos matemáticos tales como Newton, Page, Henderson y Pabis que permiten predecir la cinética del proceso⁷.

El objetivo fue estudiar la cinética de secado del maíz suave (*Zea mays* L) variedad Guagal (INIAP-111)

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales ocupados para la presente investigación fueron: maíz (*Zea mays*, L) Guagal INIAP-111; para la realización de la cinética de secado fue necesario una estufa Memmert con bandejas de aluminio de 10 cm de radio. La deshidratación se realizó en un secador de bandejas tipo vertical de dimensiones 61cm×78,5 cm×3,06 cm, donde el sistema de calentamiento funciona por aire apoyado de un ventilador eléctrico con resistencias de 110 V y 4 A.

El maíz se recolectó de forma manual en la parroquia Santa Fé, Guaranda – Ecuador Para la deshidratación del maíz se ocupó un secador por bandejas.

Cinética de secado

En la determinación de la cinética de secado del maíz (*Zea mays* L) INIAP 111 Guagal, se utilizó una estufa Memmert a 104°C, donde el grano se desprendió de la coronta y fue colocado en bandejas de aluminio de 10 cm de radio. Se ocupó tres muestras, de peso inicial 8,09 g; 10,02 g; 11,16 g respectivamente, con una humedad inicial de 22,13%; las muestras se introdujeron en la estufa durante 24 hr, controlando el peso cada hora. Para la construcción de las curvas de secado se graficó la relación de humedad (MR) con base al tiempo⁹. Para determinar el modelo matemático en la cinética de secado se utilizaron los siguientes modelos Newton-Lewis, Page, Henderson y Pabis.

Modelos matemáticos para cinética de secado

La curva de secado obtenida experimentalmente se representa mediante los modelos (1), (2), (3), citados en¹⁰, donde a y n son parámetros constantes característicos de la materia prima, k es un parámetro empírico del comportamiento cinético en (min^{-1}), t es tiempo (min) y MR relación de humedad (adimensional), que relaciona el gradiente de la humedad de la muestra a tiempo real con la humedad inicial y la humedad de equilibrio.

Modelo de Newton Lewis

$$MR = e^{-k \cdot t} \quad (1)$$

Modelo de Page

$$MR = e^{-k \cdot t^n} \quad (2)$$

Modelo de Henderson y Pabis

$$MR = a \cdot e^{-k \cdot t} \quad (3)$$

Para determinar el contenido de humedad en base seca (ω), se utilizará la fórmula (4) descrita a continuación, para las tres muestras de maíz (*Zea mays L*) INIAP 111 Guagal mejorado, en relación a masa de agua (m_{H_2O}) y masa seca (m_d) de la materia, además el peso seco ($m_{materia\ seca}$) mediante las ecuaciones (5).

$$\omega = \frac{m_{H_2O}}{m_d} \quad (4)$$

$$m_{materia\ seca} = m_{materia\ húmeda} \left(1 - \frac{\omega}{100}\right) \quad (5)$$

La razón de humedad (MR) durante el secado fue calculada mediante la ecuación (6)⁷, la cual sirve para realizar la cinética de secado donde ω_t es contenido de humedad en cualquier momento y ω_0 es humedad inicial.

$$MR = \frac{\omega_t - \omega_e}{\omega_0 - \omega_e} \quad (6)$$

Se calculó la humedad en equilibrio (ω_e) mediante la ecuación (7)¹¹, que relaciona el peso de la masa cuando alcanza el punto de equilibrio (m_e) con base al peso de la masa seca (ms).

$$\omega_e = \frac{m_e - ms}{m_e} * 100 \quad (7)$$

La eficiencia del secador se determina de la siguiente manera:

$$n = \frac{(Mh - Ms) * hfg}{\frac{Q_u}{Ab} * Ac} \quad (8)$$

n : Eficiencia del secador (%); Mh : Masa de gramínea con humedad (kg); Ms : Masa total de gramínea seca (kg); hfg : Calor de vaporización del agua ($\frac{KJ}{kg}$); Q_u : Calor útil. (kg); L_{camara} :¹²

Para determinar el flujo de calor promedio (\dot{q}_{prom}) se ocupa la ecuación (9) donde relaciona el índice de transferencia de calor promedio (\dot{Q}_{prom}) con el área (A)

$$\dot{q}_{prom} = \frac{\dot{Q}_{prom}}{A} \quad (9)$$

Deshidratación

El secador utilizado fue de escala de laboratorio, de geometría rectangular que simula condiciones normales, pues, la cámara de secado no tiene un control de temperatura. Las bandejas tienen longitudes de 61cm×78,5 cm×3,06 cm. El sistema de calentamiento funciona por aire apoyado de un ventilador eléctrico con resistencias de 110 V y 4 A. Para obtener las lecturas de temperatura dentro del secador se utilizó un termómetro, el proceso de secado duró hasta que la muestra inicial de 504.0 g llegó a un peso constante, tomando en cuenta que existió una variación de temperatura entre 60 a 80 °C.

Para el procesamiento de harina se ocupó el secador mencionado en el párrafo anterior, donde se trabajó con 10 kg de maíz, parte desde la recepción, desgranado manual y, clasificación eliminando cualquier tipo de material extraño, secado, molido y, tamizado. La Fig. 1 presenta el diagrama de procesos para la elaboración de harina a partir de maíz suave (*Zea mays L*).

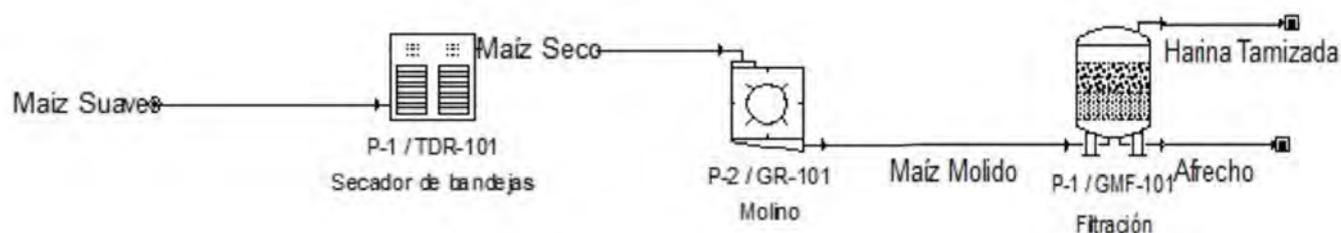


Figura 1. Diagrama de procesos para la elaboración de harina de maíz

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de secado

El maíz tiene una propiedad natural de absorber la humedad y, su calidad después de ser cosechado depende principalmente de su nivel de humedad. El contenido de humedad se refiere al peso total del grano, incluyendo el agua, generalmente a la base húmeda¹². El contenido de humedad para la cinética de secado de maíz inicial fue de 22,13%, cada muestra finalizó con un contenido de humedad de 0,53%; 0,7%; 0,61%. Según Cardador-Martínez et al.,¹³ realiza la cinética de secado por un lapso de 24 h con la diferencia que el peso se registra cada 5 min durante los primeros 30 min, luego a los 45, 60, 90, 120, 150 y 180 min. Hasta lograr que el contenido de agua de equilibrio. Así también, el contenido de agua final fue de 0,10% mientras que en el presente estudio se obtuvo 0,14%

La tabla 1 muestra los resultados de la humedad en base seca, total, en equilibrio y materia seca, base húmeda. La Fig. 2 se observa el peso de la materia, que se vuelve constante a partir de la hora 9.

Variable	Valor
Humedad en base seca	61,00 %
Humedad en base húmeda	69,52 %
Humedad total	97,23 %
Humedad en equilibrio	0,45 %
Materia Seca	2,97 g

Tabla 1. Resultados de humedad a 104 °C

Modelos matemáticos para cinética de secado.

La tabla 2 muestra los modelos matemáticos en base a los datos experimentales, los cuales fueron obtenidos mediante el Software Statgraphics, donde, la elección del modelo cinético de secado más apropiado se fundamentó en los criterios de obtener el coeficiente de determinación más alto¹⁴. Para lo cual se observa que para los 104 °C el mejor ajuste obtenido es el modelo de Henderson y Pabis seguido por el modelo de Page para los datos a 73°C.

Temperatura (°C)	Nombre del Modelo	Ecuación	Parámetros del modelo	Estadísticas
104°C	Newton (Lewis)	$MR = e^{-k \cdot t}$	$k = 0,349$	$R^2 = 90,267 \%$
	Page	$MR = e^{-k \cdot t^n}$	$k = 0,105$ $n = 2,093$	$R^2 = 98,578 \%$
	Henderson y Pabis	$MR = a \cdot e^{-k \cdot t}$	$k = 0,571$ $a = 1,790$	$R^2 = 99,798\%$
73°C	Newton (Lewis)	$MR = e^{-k \cdot t}$	$k = 0,357$	$R^2 = 95,144 \%$
	Page	$MR = e^{-k \cdot t^n}$	$k = 0,193$ $n = 1,499$	$R^2 = 99,881\%$
	Henderson and Pabis	$MR = a \cdot e^{-k \cdot t}$	$k = 0,454$ $a = 1,324$	$R^2 = 98,722 \%$

Tabla 2. Modelos estadísticos

La curva de cinética de secado representada en la Fig. 2, según el modelo de Henderson y Pabis muestra que los datos experimentales se ajustan según los criterios de aceptación de coeficiente de determinación (R^2). Que tiene una curva cóncava que representa un decaimiento exponencial¹⁵. Según Malvandi et al.,¹⁶ en su estudio refleja que el valor que más aproxima a 1 en R^2 es el modelo de Page, que se describe como el mejor modelo para describir la cinética de secado a 70°C de granos con un valor de 0.988.

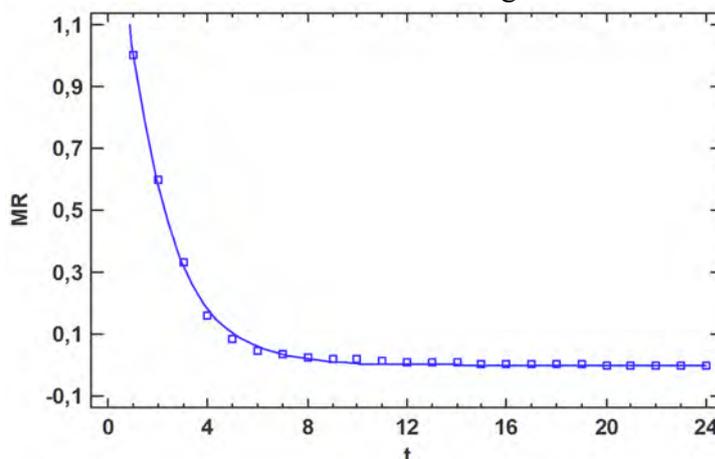
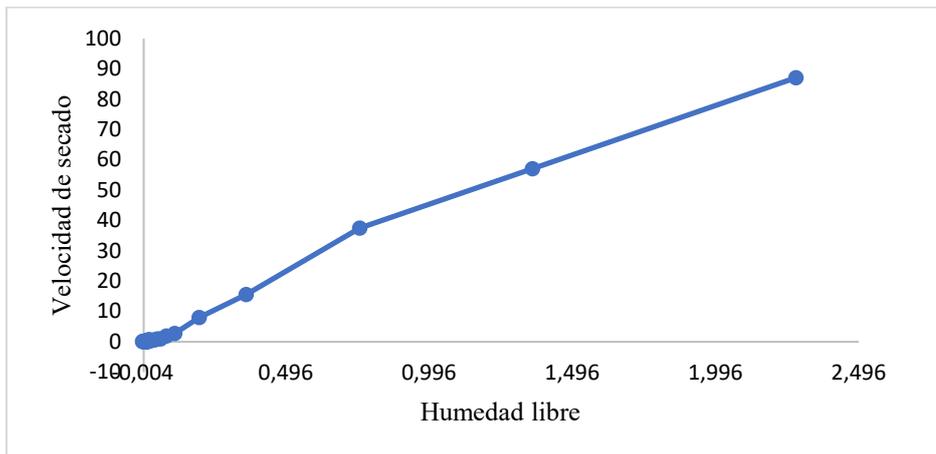


Figura. 1. Cinética de secado a 104°C modelo de Henderson y Pabis

En la velocidad de secado constante se debe tomar en cuenta las condiciones de secado que va a someterse los granos como la temperatura y la velocidad de aire, controlando la evaporación de la humedad mediante la utilización de equipos específicos que demuestren dicho manejo, sin embargo, el proceso de secado incluye la alteración de la transferencia de calor y masa a medida que se evapora por aire caliente realizando cambios en su velocidad de secado vs el tiempo de secado, debido a que mientras mayor cantidad de tiempo pase la humedad de los granos disminuirá considerablemente hasta volverla constante^{17,18}. Por tanto, en la Fig. 3 se observa la curva de velocidad de secado a temperatura de 104 °C, apreciado que, al inicio del proceso su velocidad es más elevada, mientras que con el transcurso del tiempo su velocidad va decreciendo considerablemente en la cual se puede observar el efecto directo de la incidencia en la velocidad del secado.



Nota: En la Fig 3 se leerá el grafico de derecha a izquierda

Figura 2. Velocidad de secado a 104°C

La representación gráfica en la Fig. 4 muestra cómo se relacionan la velocidad de secado y el contenido de humedad en el transcurso de un tiempo t. En este proceso, tanto la estructura del maíz como el transporte de humedad en el producto son factores determinantes en las velocidades de difusión¹⁹.

Para las curvas de secado en un metodo de deshidratacion se debe tener en cuenta el modelo que se vaya a utilizar buscando un ajuste de curva significativo. Según Malvandi et al.,¹⁶ menciona que uno de los metodos con un mayor ajuste es el modelo de Page debido a que el realiza un secado rapido a partir de la remocion de la humedad superficial en alimentos controlando su velocidad de secado y alcanzando su contenido de humedad en equilibrio, sin embargo en la Fig. 3 muestra que la curva de cinética probada en distintos modelos nos indica que el secado a un promedio de temperatura en el deshidratador (73°C), fue ajustada al modelo de Page por su ajuste en los datos experimentales según los criterios de aceptación de coeficiente de determinación (R^2).

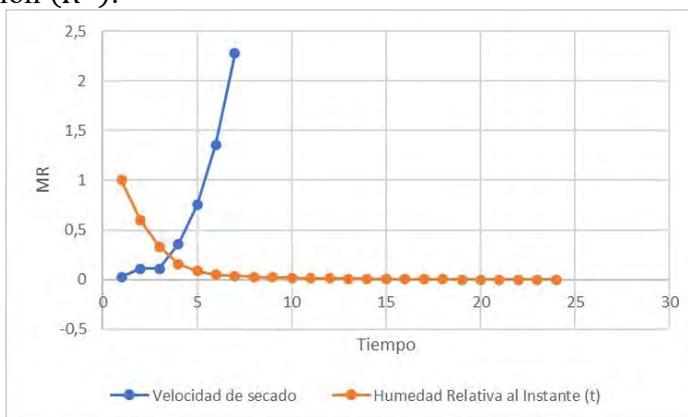


Figura. 3 Interacción de la velocidad de secado y el contenido de humedad en un tiempo t

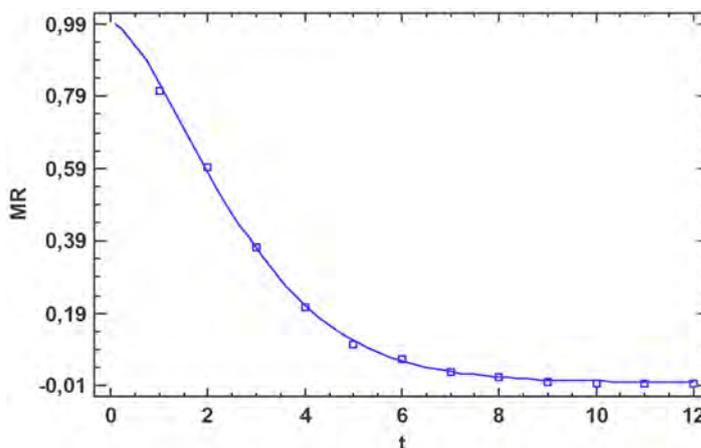


Figura. 4. Cinética de secado a 73 °C modelo de Page

Deshidratación

En un proceso de deshidratación se debe tomar en cuenta la humedad, temperatura y la velocidad de aire, debido a que la reducción del contenido de humedad durante el proceso de secado permite que la actividad microbiana de la materia prima se estabilice evitando el deterioro de la misma, y así obtener una cinética de secado significativa²⁰. Por tal razón, se observa en la Fig. 5, que el maíz obtuvo un peso constante en el transcurso de 12 horas; debido a su velocidad de secado y temperatura, además se observa que en el transcurso de las primeras horas es cuando se pierde mayor contenido de agua. Así también, a los 73 °C el grano presenta una humedad en base seca de 45,25 %, humedad en base húmeda de 68.85 %, humedad total de 81,56 %, la humedad en equilibrio de 0,63 % en un flujo de calor promedio de $8,36 \frac{W}{m^2}$.

CONCLUSIONES

La remoción de humedad en la cinética de secado de maíz suave variedad Guagal INIAP 111 está directamente influenciada por la temperatura y el tiempo. El modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el de Henderson y Pabis ($MR = a * e^{-k*t}$; $R^2 = 99,798\%$). Se observó que el proceso llegó a un equilibrio aproximadamente después de 8 horas, con una velocidad de secado variable en las primeras horas del proceso y constante en su etapa final. En el proceso de deshidratación a 73°C el modelo que se ajusta a los datos experimentales es el de Page ($MR = e^{-k*t^n}$; $R^2 = 99,881\%$) donde se observó un equilibrio a partir de la hora 9. Estos resultados indican que es importante considerar cuidadosamente la temperatura y el tiempo en el diseño de procesos de secado para esta variedad de maíz, a fin de lograr una óptima remoción de humedad en el producto final. Además, la cinética de secado implica entender como la humedad se comporta en el maíz durante el proceso de secado a lo largo del tiempo.

REFERENCIAS

1. Fuentes Figueroa, T., PARRALES Quimis, A. D., Morán Morán, J., García Cabrera, J., & Gabriel Ortega J. Caracterización Morfológica Y Etnobotánica Del Maíz Criollo (Zea mays L.) En La Comuna Sancán, Ecuador. UNESUM Ciencias [Internet]. 2022;2(6):101–116. Available from: <https://doi.org/10.47230/unesum-ciencias.v6.n2.2022.631>
2. Zambrano, J., Velásquez, J., Peñaherrera, D., Sangoquiza, C., Cartagena, Y., Villacrés, E., Garcés, S., Ortíz, R., León, J., Campaña, D., López, V., Asaquibay, C., Nieto, M., Sanmartín, G., Pintado, P., Yáñez, C., & Racines M. Guía para la producción sustentable de maíz en la Sierra ecuatoriana (Manual No 122). [Internet]. INIAP. 2022. p. 1. Available from: <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5796>
3. Caviedes-Cepeda, M., Carvajal-Larenas, F., & Zambrano-Mendoza JL. Generación de tecnologías para el cultivo de maíz (Zea mays. L) en el Ecuador. ACI Av En Ciencias e Ing [Internet]. 2022;14(1):1–21. Available from: <https://doi.org/10.18272/aci.v14i1.2588>
4. SIPA. Sistema de Información Pública Agropecuaria, Cifras Agroproductivas [Internet]. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2022. Available from: <http://sipa.agricultura.gob.ec/Index.Php/Cifras-Agroproductivas>
5. Quezada N. Estudio de la factibilidad para la implementación de una pyme procesadora de harina de fruta de pan en Santo Domingo [Internet]. 2023. Available from: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/11128>
6. Cuenca, A., & Murillo M. Evaluación económica del proceso de secado de maíz para calcular la incidencia en la productividad del proceso [Internet]. 2022. Available from: <https://www.uteq.edu.ec/pt/investigacion/ponencia/664>
7. Delfiya, D. S. A., Prashob, K., Murali, S., Alfiya, P. V., Samuel, M. P., & Pandiselvam R. Drying kinetics of food materials in infrared radiation drying: A review. J Food Process Eng [Internet]. 2022;45(6). Available from: <https://doi.org/10.1111/jfpe.13810>
8. López-Mejía, N., Andrade-Mahecha, M. M., & Martínez-Correa HA. Modelamiento matemático de la cinética de secado de espagueti enriquecido con pulpa de zapallo deshidratada (Cucurbita

- moschata). Rev UDCA Actual Divulg Científica [Internet]. 2019;22(1):1–11. Available from: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/1151/1666>
9. Camaño, J. A., Rivera, A. M., & Zapata JE. Efecto del espesor de película y de la ubicación de la muestra en un secador solar directo, sobre la cinética de secado de ensilado de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp*). Inf Tecnológica [Internet]. 2020;31(1):53–66. Available from: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642020000100053>
 10. Inyang, U. E., Oboh, I. O., & Etuk BR. Kinetic Models for Drying Techniques—Food Materials. Adv Chem Eng Sci [Internet]. 2018;8(2):27–48. Available from: <https://doi.org/10.4236/aces.2018.82003>
 11. Ostermeier, R., Giersemehl, P., Siemer, C., Töpfl, S., & Jäger H. Influence of pulsed electric field (PEF) pre-treatment on the convective drying kinetics of onions. J Food Eng [Internet]. 2018;237:110–117. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.010>
 12. Adquisiciones LEYDE, Vigente T, Frampton P, Azar S, Jacobson S, Perrelli TJ, et al. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析 Title. Duke Law J. 2019;1(1).
 13. Cardador-Martínez, A., Pech-Almeida, J. L., Allaf, K., Palacios-Rojas, N., Alonzo-Macías, M., & Téllez-Pérez C. A Preliminary Study on the Effect of the Instant Controlled Pressure Drop Technology (DIC) on Drying and Rehydration Kinetics of Maize Kernels (*Zea mays L.*). Foods [Internet]. 2022;11(14):2151. Available from: <https://doi.org/10.3390/foods11142151>
 14. Taveesuvun, C., Tirawanichakul, S., & Tirawanichakul Y. Equilibrium Moisture Content Modeling and Study of Circulating-Bed Drying Kinetics of Non-Fragrant and Fragrant Paddy Varieties. Trends Sci [Internet]. 2022;19(4):4950–4962. Available from: <https://tis.wu.ac.th/index.php/tis/article/view/4950>
 15. Buzrul S. processes Reassessment of Thin-Layer Drying Models for Foods: A Critical Short Communication. 2022; Available from: <https://doi.org/10.3390/pr10010118>
 16. Malvandi, A., Nicole Coleman, D., Loor, J. J., & Feng H. A novel sub-pilot-scale direct-contact ultrasonic dehydration technology for sustainable production of distillers dried grains (DDG). Ultrason Sonochem [Internet]. 2022;85(105982). Available from: <https://pdf.sciencedirectassets.com/271548/1-s2.0-S1350417722X00035/1-s2.0-S135041772200075X/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjEMD%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJHMEUCIFBOB18%2FHTJY%2F2zBp6fT0yVEUOSnKCRS2IoejtH%2BkL4mAiEA190UT9>
 17. Nornes Bryntesen S, Kahrom A, Lamb JJ, Tolstorebrov I, Stokke Burheim O. Experimental Analysis of Drying Kinetics and Quality Aspects of Convection-Dried Cathodes at Laboratory Scale. 2023; Available from: <https://doi.org/10.3390/batteries9020096>
 18. Rashid, M. T., Liu, K., Wei, D.-Z., Jatoi, M. A., Li, Q., & Sarpong F.). Drying kinetics and quality dynamics of ultrasound-assisted dried selenium-enriched germinated black rice. Ultrason Sonochem [Internet]. 2023;98. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106468>
 19. Meneses J. Osmoconvective dehydration in fruits and vegetables: A review of recent developments. Agroindustrial Sci [Internet]. 2018;8(1):67–72. Available from: <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2018.01.10>
 20. Kroehnke, J., Szadzińska, J., Radziejewska-Kubzdela, E., Biegańska-Marecik, R., Musielak, G., & Mierzwa D. Osmotic dehydration and convective drying of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) – The influence of ultrasound on process kinetics and product quality. Ultrason Sonochem [Internet]. 2021;71:105377. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105377>

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: García-Culqui R; Guevara-Narváez L; Verdezoto- Mendoza F; Gaíbor-Chávez J. Estudio de la cinética de secado del maíz suave (*Zea mays L*) variedad Guagal (INIAP 111). Revis Bionatura 2023;8 (4) 5. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.5>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Estudio de cinética de fermentación alcohólica de cacao en cajón tipo madera.**Study of kinetics of alcoholic fermentation of cacao in a wooden box.**

María Eugenia García² ; Rommel Aaron Pazmiño Vallejo¹ ; Dayana Belén Troya Carrera¹ , Juan

Gaibor Chávez¹ *

1 Carrera de Agroindustrias; Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y de Ambiente;

Universidad Estatal de Bolívar – Ecuador

2 Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Universidad Técnica de Ambato –

Ecuador

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.6>

RESUMEN

La investigación se enfocó en valorar la influencia de fermentadores en cajones de madera: Guayacán (*Tabebuia Chrysantha*), Laurel (*Laurus nobilis*), y Caña (*Guadua angustifolia*) sobre la calidad fisicoquímicas de las almendras de cacao (*Theobroma cacao L.*). Se aplicó un diseño AXB con arreglo factorial (2x3) y se determinó el porcentaje de fermentación en los tres tipos de cajas visualizando el 60 % mínimo de almendras bien fermentadas, granos violetas 21 %, granos pizarrosos superó el 12 %, lograr las mejores características organolépticas en el grano de cacao resultante, implica un adecuado tratamiento, mejores prácticas aplicadas y la incorporación de un tipo de fermentador que garantice el éxito del proceso.

Cabe señalar que el primer proceso se ve afectado por varios factores tales como: tipo de madera a utilizar para la construcción de los cajones, dimensiones de estos, el tamaño de los orificios que permiten la evacuación del mucilago y las remociones que se le dé a la masa durante el proceso. El proceso fermentativo se convierte en el principal proceso del beneficio pues los cambios que se originan son fundamentales para que aparezcan los agentes precursores del aroma y sabor típicos del cacao de calidad. Es por eso por lo que se ha utilizado un modelo matemático para poder determinar datos importantes en la fermentación alcohólica que se realiza en las cajas. Dicho de esta manera se aplica una modelación matemática para la fermentación de Cacao (*Theobroma cacao L.*), para la cinética correspondiente, el comportamiento de la biomasa con el consumo de sustrato y el comportamiento del sustrato y Crecimiento microbiano por medio de los modelos matemáticos de Monod y de Andrews y Levenspiel.

Palabras clave: Crecimiento Microbiano, Fermentación Alcohólica, Mucilago, Madera, Matemáticas Modelos.

Abstract

The research focused on assessing the influence of fermenters in wooden boxes: Guayacán (*Tabebuia Chrysantha*), Laurel (*Laurus nobilis*), and Cane (*Guadua angustifolia*) on the physical-chemical quality of cocoa kernels (*Theobroma cacao L.*). An AXB design with the factorial arrangement (2x3) was applied, and

the percentage of fermentation in the three types of boxes was determined, visualizing the minimum 60% of well-fermented almonds, violet grains at 21%, slate grains exceeding 12%, achieving the best characteristics. Organoleptic characteristics in the resulting cocoa bean imply adequate treatment, best-applied practices, and the incorporation of a type of fermenter that guarantees the success of the process.

It should be noted that the first process is affected by several factors, such as the type of wood to be used to construct the drawers, their dimensions, the size of the holes that allow the evacuation of the mucilage, and the removals that are given. To the dough during the process. The fermentation process becomes the primary benefit since the changes are essential for the precursor agents of the typical aroma and flavor of quality cocoa to appear. That is why a mathematical model has been used to determine crucial data in the alcoholic fermentation in the boxes. In this way, mathematical modeling is applied for the fermentation of Cocoa (*Theobroma cacao L.*) for the corresponding kinetics, the biomass's behavior with the substrate's consumption and the substrate's behavior and microbial growth through mathematical models of Monod, Andrews and Levenspiel.

Keywords: Microbial Growth, Alcoholic Fermentation, Mucilage, Wood.

INTRODUCCIÓN

El Ecuador, está situado entre los principales productores a nivel mundial de cacao¹; se produce en 16 de las 24 provincias en las cuales está dividido, con 527327 ha cosechadas². Por tanto, se convierte en una materia prima con mucho potencial. Una de las operaciones primordiales para alcanzar la calidad del chocolate es la fermentación³, se produce un proceso mayoritariamente anaeróbico, en el cual las levaduras anaeróbicas facultativas producen etanol a partir de la glucosa presente en la pulpa de los granos de cacao, posterior bajo condiciones semianaeróbicas que siguen al crecimiento inicial de la levadura favorecen las bacterias ácido lácticas (BAL) microaerófilas que convierten la glucosa, la fructosa y el ácido cítrico principalmente en ácido láctico, ácido acético y/o manitol. Cuando la mayor parte de la pulpa ha sido degradada debido a la acción pectinolítica. Por la actividad de las levaduras, se dispone de oxígeno y se desarrollan las bacterias del ácido acético las cuales son estrictamente aerobias, produciendo ácido acético a partir de etanol en una reacción de oxidación exotérmica, lo que hace que la temperatura de la masa de frijol aumente a 50 °C o más y convierta el lactato en acetoína y componentes básicos de biomasa⁴.

⁵Indican que la fermentación del cacao es un paso crucial en la producción de chocolate de alta calidad debido a que durante la fase de fermentación ocurren una serie de reacciones bioquímicas que se producen en los granos, necesarias para la inducción a las características de los productos de cacao⁶ señalan que las prácticas mal realizadas en el proceso de fermentación de cacao por lo general bajan la calidad y dan paso a enfermedades. En Ecuador el proceso de fermentación se realiza en varios medios como, tinajas de plástico, saquillos, fundas y un mayor porcentaje de granos de cacao se fermentan en cajas de madera. Además, se determina que las cajas de madera presentaban un menor porcentaje de granos de cacao violetas en

comparación con las cajas plásticas, producto del resultado de una fermentación incompleta⁷. Mientras las almendras en buen estado no muestran hinchazón y su apariencia interna es compacta, lo que contribuye al desarrollo de un sabor astringente y ácido⁸. Para lograr las mejores características organolépticas en el grano de cacao resultante, implica brindar un adecuado tratamiento, mejores prácticas aplicadas y la incorporación de un tipo de fermentador que garantice el éxito del proceso⁹. Las investigaciones realizadas en los procesos en la cual se ha visualizado la transformación del cacao, son diversas y todas tienen la finalidad de mejorar el proceso de fermentación del cacao en sus atributos sensoriales, para así poder facilitar los procesos de transformación dentro de los sistemas de producción industrial, artesanal e incluso en lo gastronómico¹⁰. Además,¹¹ mencionan que una forma de lograr la optimización de los sistemas de fermentación es el uso de prototipos de fermentadores de diversos materiales, formas e implementación del uso tecnológico, sobre las características fisicoquímicas que se presentan después de la fermentación y teniendo de respaldo la evaluación de los perfiles sensoriales. Los procesos de fermentación y la deficiente adecuación tecnológica que se existe al realizar la operación, son los que mayor problema generan para obtener la calidad organoléptica sensorial adecuada¹². Cabe indicar que este proceso tiene una gran relevancia industrial, los intentos de modelado existentes se centran en pasos específicos posteriores a la fermentación, como la cinética de secado¹³.

En la presente investigación se ha realizado una revisión bibliográfica exhaustiva de las mejores prácticas para la construcción y uso de prototipos de fermentación, diseñando una caja tipo de madera utilizada para el proceso de fermentación de cacao (*Theobroma cacao L.*), se realiza el estudio de cinética de la fermentación alcohólica de cacao y se obtiene biomasa, priorizando como propósito de esta investigación, producir biomasa (*Saccharomyces Sereviciae*), el objetivo de optimizar el proceso y obtener un mayor rendimiento de bioetanol a partir de estos materiales.

MATERIALES Y MÉTODOS

La fase experimental de la investigación se realizó en el centro de Acopio perteneciente a la Unión de Organizaciones de Participación Social por la Justicia del Cantón las Naves, cuya situación geográfica 01°16'0" latitud oeste, con una temperatura máxima de 32 °C y una humedad relativa de 85%.

El cacao fue obtenido en el cantón las naves (30kg de masa fresca de cacao nacional).

Se trabajó con cajas de madera (laurel, guayacán y caña), por un lado, cuadradas que tuvieron las siguientes dimensiones: 45 cm de largo, 45 cm de ancho y 45 cm de alto y, rectangulares de dimensiones: 60 cm de largo, 50 cm de ancho y 30 cm de alto, tomado del estudio de¹⁴. La investigación fue de carácter exploratoria, descriptiva y experimental, puesto a que no se ha encontrado datos sobre la utilización de maderas (laurel, guayacán y caña) en la fermentación de cacao (*Theobroma cacao L.*).

Se empleó un diseño experimental de dos factores AxB con un arreglo factorial (2x3), tomando como factor A al diseño de caja (cuadrada y rectangular) y factor B el tipo de madera (laurel, guayacán y caña), dando un total 6 tratamientos y realizando 3 repeticiones con un total de 18 unidades experimentales; para la comparación de la media de los tratamientos se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey ($p \leq 0,05$).

Análisis Proximal

Se caracterizó la materia prima cacao (*Theobroma cacao L.*) empezando por la determinación de la humedad. Aplicando la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$\%H$: porcentaje de humedad expresada en fracción de masa.

m_1 : masa del cristalizador sin tapa tarado en gramos.

m_2 : masa del cristalizador tarado sin tapa más muestra en gramos.

m_3 : masa del cristalizador tarado sin tapa más muestra desecada en gramos¹⁵.

También se realizó un análisis de ceniza que representa la parte inorgánica residual después de que el material orgánico se ha quemado a altas temperaturas. Durante el proceso de incineración, los componentes orgánicos se descomponen y se queman, dejando atrás los minerales inorgánicos en forma de ceniza. Los minerales presentes en la ceniza incluyen calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio y otros elementos traza.

Por lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\%C = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \times \frac{100}{100 - H} \quad (2)$$

Donde:

$\%C$: Contenido de Cenizas en porcentaje de masa.

m_1 : masa del crisol vacío (g)

m_2 : masa del crisol con la muestra (g)

m_3 : masa del crisol más la ceniza (g)

H : porcentaje de humedad en la muestra.

Fermentación

La fermentación alcohólica se realizó en un biorreactor homogéneo de tipo batch (cajones de madera). Teniendo en cuenta que para la fermentación de cacao existen algunas sucesiones de consorcios de

microorganismos, para el experimento relacionado a la fase alcohólica, empleamos levaduras de tipo *Saccharomyces Cerevisiae* Que entran en contacto con la fuente de azúcares de cacao y empieza el proceso de fermentación en donde se descomponen en alcohol etílico y dióxido de carbono, liberando así energía, de acuerdo a la investigación de¹⁶.

Cuantificación de la glucosa

Para la cuantificación de la glucosa se realizó mediante un espectrofotómetro infrarrojo BOECO, realizando previamente las curvas de calibración (método NIRS), esta técnica de espectroscopia de infrarrojo cercano ha emergido como un enfoque valioso y eficaz en la industria alimentaria, como un método analítico que ofrece ventajas significativas en términos de eficiencia y precisión en la determinación de compuestos químicos en productos alimentarios¹⁷

Cuantificación de la biomasa

La cuantificación de biomasa se realizó mediante el método de peso seco, para lo cual se tomaron muestras y se colocaron en una estufa de la marca Kalstein a una temperatura constante de 105 °C hasta alcanzar un peso estable¹⁸.

Cuantificación del bioetanol

La cuantificación del bioetanol se realizó mediante el método de “Winnick o microdifusión”, para lo cual, se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 4000 rpm, posterior se extrajeron 1ml del líquido sobrenadante, luego, se diluyó con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml¹⁹.

Modelación matemática

Para la cinética correspondiente a la fermentación de Cacao (*Theobroma cacao L.*), se planteó usar los siguientes modelos²⁰.

Modelo de Monod

Este modelo estudia el efecto de la concentración de sustrato sobre la rapidez de crecimiento, donde la velocidad específica de crecimiento de las células durante las fases de crecimiento y desaceleración depende de la concentración de nutrientes existentes en el medio ²¹.

$$\mu = \mu_{max}(S/(Ks + S)) \quad (3)$$

Donde:

μ : velocidad específica de crecimiento microbiano

μ_{max} : velocidad máxima específica de crecimiento

S : concentración de sustrato disponible

K_S : constante de saturación de sustrato.

Para modelar la producción de biomasa y bioetanol durante el proceso de fermentación se emplea la Ecuación Logística integrada, durante las fases exponencial y estacionaria del crecimiento de la levadura ²².

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) X \quad (4)$$

$$X = \frac{X_0 \exp(\mu_{max} t)}{1 - \left[\left(\frac{X_0}{X_{max}}\right) (1 - \exp(\mu_{max} t))\right]} \quad (5)$$

Donde:

X : Modelo de la relación de la biomasa

X_0 : Concentración inicial de masa

X_{max} : Concentración celular máxima

μ_{max} : Taza de crecimiento específica máxima

t : Intervalo de tiempo.

Para determinar parámetros cinéticos necesarios para la modelación se empleó, el modelo de Andrews y Levenspiel el cual considera el sustrato y producto; este modelo ha sido ampliamente utilizado para describir el comportamiento dinámico de la fermentación alcohólica ²³.

$$\mu = \mu_{max} * \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} * \left(1 - \frac{C_E}{C_{E_{max}}^*}\right)^n \quad (6)$$

Donde:

K_{IS} : Constante de inhibición del sustrato

$C_{E_{max}}^*$: concentración máxima de etanol a la que se detiene el crecimiento celular

C_S : Concentración del sustrato limitante

μ_{max} : velocidad específica máxima de crecimiento celular

K_S : Constante de saturación

n : Constante adimensional.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tiempo	Biomasa (x)	Concentración de Sustrato (s)	Velocidad de Crecimiento (μ)	Consumo de sustrato (qs)
0	0,05	20	0,192307692	0,404615385
1	0,06060217	19,9797692	0,192300203	0,404600406
2	0,07345191	19,9552496	0,192291107	0,404582214
3	0,08902543	19,9255322	0,192280054	0,404560107
4	0,1078997	19,8895161	0,192266615	0,404533229
5	0,13077374	19,8458671	0,192250265	0,40450053
6	0,15849435	19,792969	0,192230358	0,404460716
7	0,19208717	19,7288643	0,192206096	0,404412192
8	0,23279434	19,6511819	0,192176491	0,404352983
9	0,28211982	19,5570508	0,192140315	0,404280631
10	0,34188424	19,4429952	0,192096031	0,404192063
11	0,41429084	19,3048083	0,192041705	0,40408341
12	0,50200493	19,1374003	0,191974881	0,403949763
13	0,60824929	18,9346155	0,191892419	0,403784837
14	0,73691845	18,6890137	0,191790246	0,403580493
15	0,89271509	18,3916078	0,191663023	0,403326045
16	1,08131212	18,0315525	0,191503621	0,403007243
17	1,30954382	17,5957759	0,191302351	0,402604702
18	1,58562904	17,0685474	0,191045719	0,402091437
19	1,91942741	16,4309795	0,190714399	0,401428798
20	2,32272559	15,6604661	0,190279741	0,400559481
21	2,80954081	14,7300763	0,189697411	0,399394821
22	3,39640823	13,6079603	0,188895028	0,397790055
23	4,10256955	12,2569029	0,187745945	0,395491891
24	4,94986074	10,6343699	0,1860071	0,392014199
25	5,96176478	8,69395419	0,18314717	0,386294339
26	7,16002671	6,39095821	0,177749836	0,375499672
27	8,55284133	3,70237053	0,164463165	0,348926329
28	10,0817485	0,718059	0,094602252	0,209204503

Tabla 1. Tabla de datos obtenidos experimentalmente y adaptados a los modelos matemáticos de Monod y la ecuación logística integrada

En la tabla 1 se reportan los datos experimentales, a partir de los cuales se adaptan a los modelos matemáticos de Monod y la ecuación logística integrada para continuar con el proceso de modelamiento. El tiempo como variable independiente corresponde a las horas donde se midieron las variables como: biomasa por el método de peso en seco, la concentración de sustrato disponible, la velocidad de crecimiento que representa la primera derivada de la biomasa respecto al tiempo y, consumo de sustrato.

Parámetros	Resultado	Unidad
μ_{max}	0,2996	h^{-1}
q_{max}	1	g/(gh)
K_S	0,8	g/L
K_{sp}	2,2	g/L
K_{IS}	400	g/L
Y_{XS}	0,5	g/g
Y_{PS}	0,2999	g/g
m	0,02	h^{-1}
$P_{X max}$	18,9683	g/L
α	0,1742	g/L
β	2,255	g/L

Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de Andrews y Levenspiel

En la tabla 2 se reportan cada uno de los parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de Andrews y Levenspiel. Mediante el cual se determinó que el tiempo ideal para la producción de biomasa y etanol fue de 12 horas, y una concentración de biomasa de 0,50200493 g/L. Durante este tiempo, se observó que la velocidad máxima de producción de biomasa alcanzó su valor máximo cuando se obtuvo la concentración más alta de levaduras en la fermentación.

La velocidad específica de crecimiento celular (μ) en la fermentación utilizando el mucílago de cacao fue de 0,18624349 h^{-1} . Un resultado similar (0,18 h^{-1}) fue informado por²⁴, aunque existió una variación casi imperceptible debido a las diferencias en la metodología utilizada en ambos estudios.

El modelo de Monod y de la Ecuación Logística integrada, tuvieron $R^2 = 0,96$, que indica el éxito del ajuste al modelo matemático, como se puede observar en la figura 1.

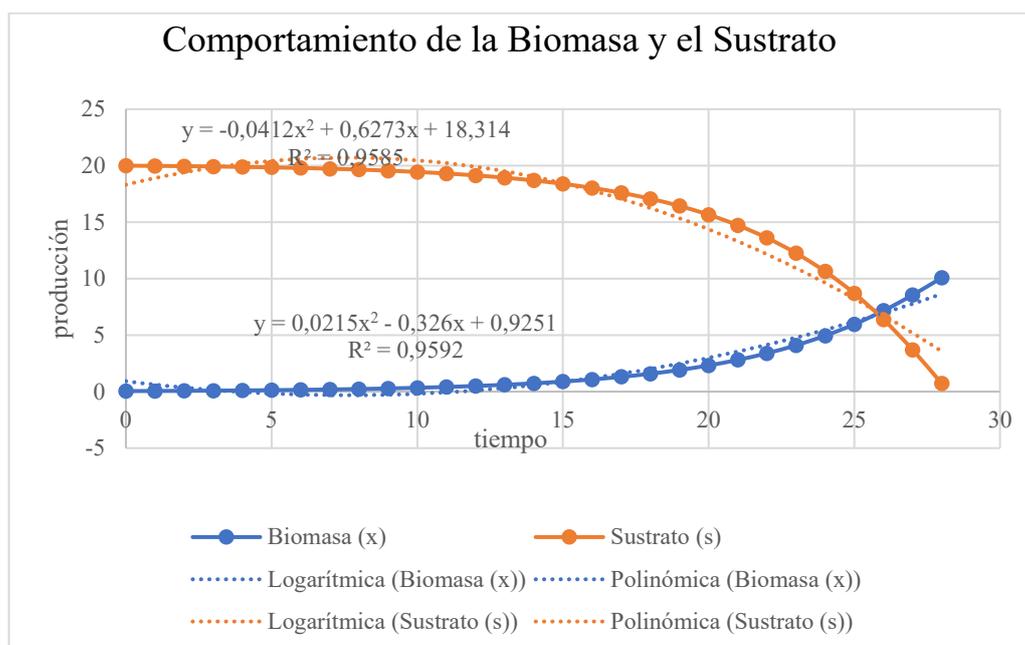


Figura 1. Cinética de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato ajustado al Modelo de Monod

De la prueba de rangos múltiples de Tukey ($p \leq 0,05$) para el diseño experimental propuesto, donde se trabajaron dos factores, para evaluar la influencia del diseño de la caja y el tipo de madera empleado, permitió identificar el porcentaje de almendras bien fermentadas, dando como resultado una mejor fermentación de la almendra de cacao en las cajas de madera cuadradas, mientras que los tres tipos de madera son adecuadas para garantizar que el porcentaje granos violetas cumplan con lo que establece la norma; NTE INEN 176:2006 Cuarta Revisión²⁵. En cuanto al porcentaje de granos pizarrosos se detecta que supera el rango establecido de 12 máximo, en las cajas de las maderas de Guayacán y en Caña a diferencia de Laurel siendo el único que mantiene al cacao nacional en los parámetros establecidos.

Según Wakao, citado en ²⁶, la composición química de los granos de cacao fermentado depende de varios factores entre los que se puede citar: Tipo de cacao, grado de madurez, calidad de la fermentación y el secado y además el subsiguiente procesamiento de los granos (tostado). En el estudio realizado se detalla que los índices físicos de calidad de los granos secos se relacionan con el grado de madurez de las almendras, es decir, mazorcas que no están completamente maduras dan origen a granos insuficientemente fermentados, violetas y pizarrosos.

CONCLUSIONES

El análisis y modelamiento matemático de la fermentación es muy amplio en relación a otras fermentaciones ya que comprende algunas fases, consorcios de microorganismos y compuestos resultantes, por eso resulta útil enfocarse en una fase. El mucílago de cacao nacional, que es un subproducto generado por la industria en expansión del cacao, tiene un enorme potencial como materia prima para la obtención de alcohol. Debido a su abundancia en Ecuador y a su contenido de azúcares fermentables, este residuo se presenta como una fuente prometedora para la producción de alcohol.

De acuerdo al análisis de la variable humedad, no hay diferencia estadísticamente entre tratamientos por lo tanto todos los tratamientos son estadísticamente iguales. A su vez los resultados del análisis de la variable temperatura, se establece el mejor tratamiento corresponde del diseño de caja cuadrada de madera de laurel. El tipo de madera en el que se obtuvo un proceso de fermentación adecuado fue el laurel, en este los cotiledones presentan una coloración marrón o marrón oscuro, de aspecto quebradizo, con estrías bien abiertas.

Para próximas investigaciones se recomienda analizar los compuestos naturales de la madera utilizada en la fermentación de cacao, antes, durante y después de hacer uso como cajones fermentadores.

REFERENCIAS

- 1 García A, Pico B, Jaimez R. La cadena de producción del Cacao en Ecuador: Resiliencia en los diferentes actores de la producción. *NOVASINERGIA REVISTA DIGITAL DE CIENCIA, INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA* 2021;4:152–72. <https://doi.org/10.37135/ns.01.08.10>.
- 2 Instituto Nacional de Estadística y Censos. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. Metodología 2021. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Metodologia%20ESPAC%202020.pdf (accessed September 30, 2023).
- 3 Pereira GV de M, Miguel MG da CP, Ramos CL, Schwan RF. Microbiological and Physicochemical Characterization of Small-Scale Cocoa Fermentations and Screening of Yeast and Bacterial Strains To Develop a Defined Starter Culture. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:5395–405. <https://doi.org/10.1128/AEM.01144-12>.
- 4 Romanens E, Näf R, Lobmaier T, Meile L, Miescher Schwenninger S. A lab-scale model system for cocoa bean fermentation, 2016.
- 5 Toapanta MGC, Pilay GKM, Paula GTS, Cano HAM. Métodos de fermentación en el cacao ccn-51 con norma inen 176 en la parroquia Guasaganda. *Polo Del Conocimiento* 2023;8:613–33. <https://doi.org/10.23857/PC.V8I6.5702>.
- 6 Plaza AM, Martínez Carriel T, Ibarra EC, Bustamante WB, Baque CS. Fermentation of cocoa CCN-51, on the basis of three methods, in different times. *Journal of Asia Pacific Studies* 2019;5:394–410.

- 7 Alvarez Fernández CO, Liconte Salgado ND, Pérez Silva EE, Lares Amaíz M del C, Perozo González JG. REVISIÓN SOBRE LOS ATRIBUTOS FÍSICOS, QUÍMICOS Y SENSORIALES COMO INDICADORES DE LA CALIDAD COMERCIAL DEL CACAO. *Petroglifos* 2022;5:12–25.
- 8 Bravo Franco KJ, Tuárez García DA. Micro fermentación de cacao (*Theobroma cacao L.*) en cajas de madera no convencionales: Impacto en la calidad del licor. *Quevedo : Uteq*; 2023.
- 9 Rios-Jara J, Lévano-Rodríguez D. Importancia de los dispositivos usados en la fermentación de Cacao (*Theobroma cacao L.*). *Revista Agrotecnologica Amazonica* 2022;2:e281–e281. <https://doi.org/10.51252/RAA.V2I1.281>.
- 10 Brunetto M del R, Bernardi MAG de, Contreras WJO, Roa S del SC, Cayama YJD, Montilla CDA, et al. RP-HPLC-DAD determination of free amino acids in cocoa samples during fermentation and roasting. *Revista Colombiana de Química* 2020;49:11–9. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v1n49.77811>.
- 11 Salous A El, Angulo-González A, Flores LS. Acceleration of cocoa fermentation through the action of bacteria (*Acetobacter aceti*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Espirales Revista Multidisciplinaria de Investigación* 2019;3:1–20. <https://doi.org/10.31876/ER.V3I28.572>.
- 12 Amable C, Torres V, Lisseth G, Flores L, Morales Rodríguez W, Chang JV, et al. Perfil sensorial de genotipos de cacao (*Theobroma cacao L.*) en la parroquia Valle Hermoso-Ecuador. *Revista ESPAMCIENCIA, ISSN-e 1390-8103, Vol 9, N° 2, 2018, Págs 103-113* 2018;9:103–13.
- 13 Moreno-Zambrano M, Grimbs S, Ullrich MS, Hütt MT. A mathematical model of cocoa bean fermentation. *R Soc Open Sci* 2018;5. <https://doi.org/10.1098/RSOS.180964>.
- 14 Gaibor IJ, Danilo TI, Biometrista M, Por A, Herminia : Dra, Área S, et al. Efecto del diseño de la caja y tipo de madera utilizada, en el proceso fermentativo del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*), cantón Las Naves, provincia de Bolívar 2010.
- 15 Alba Lechon JB, Quilo Catucumbamba JE. Aprovechamiento de residuos biomásicos de la mandarina (*Citrus reticulata*), en la obtención de aceites esenciales, para la elaboración de productos agroindustriales en la provincia Bolívar 2023.
- 16 Kouamé C, Loiseau G, Grabulos J, Boulanger R, Mestres C. Development of a model for the alcoholic fermentation of cocoa beans by a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Int J Food Microbiol* 2021;337. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108917>.
- 17 Hernández-Hernández C, Fernández-Cabanás VM, Rodríguez-Gutiérrez G, Fernández-Prior Á, Morales-Sillero A. Rapid screening of unground cocoa beans based on their content of bioactive compounds by NIR spectroscopy. *Food Control* 2022;131:108347. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108347>.
- 18 James M, James CA, Dixon M, Leathers R. Coffee, Tea and Herbals, and Cocoa, Chocolate and Derived Products. *Encyclopedia of Food and Safety*, Elsevier; 2024, p. 159–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00192-1>.

- 19 Cristina D, Chacón T. Efecto del uso de diferentes antiespumantes en la fermentación anaerobia de Mucilago de cacao CCN-51 en diversas concentraciones de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y su influencia en la producción de bioetanol 2019.
- 20 María A, Guzmán S. Modelación matemática de la temperatura durante la torrefacción del cacao (*Theobroma cacao* L.) en un tostador cilíndrico con fuente de gas y otro con fuente eléctrica. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica 2023.
- 21 Campoverde Nolivos KM. Modelación cinética de la fermentación alcohólica a partir de bebidas gaseosas caducadas. Tesis. Universidad Central del Ecuador, 2017.
- 22 Phukoetphim N, Salakkam A, Laopaiboon P, Laopaiboon L. Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models. *J Biotechnol* 2017;243:69–75. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2016.12.012>.
- 23 Almeida LP. Avaliação da transferência de calor em fermentações alcoólicas convencional e extrativa 2019.
- 24 Delgado Noboa JW, Soler J, Peña JÁ. Optimización de la producción de bioetanol en procesos fermentativos del mucílago de Cacao CCN – 51 en un biorreactor tipo batch. *Jornada de Jóvenes Investigadores Del I3A* 2018;6. <https://doi.org/10.26754/jji-i3a.201802821>.
- 25 Ecuatoriano de Normalización I. NTE INEN 0176: Cacao en grano. Requisitos n.d.
- 26 Solórzano CYE, Franco KJB, García DAT, Escobar ÁOF, Navarrete YGT, Chang JFV. Efecto de la fermentación de cacao (*theobroma cacao* L.), variedad nacional y trinitario, en cajas de maderas no convencionales sobre la calidad física y sensorial del licor de cacao. *Revista de Investigación Talentos* 2021;8:42–55. <https://doi.org/10.33789/TALENTOS.8.2.153>.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Garcia M E; Pazmiño Vallejo R A; Troya Carrera D B, Chávez J G Estudio de cinética de fermentación alcohólica de cacao en cajón tipo madera. *Revis Bionatura* 2023;8 (4)

6. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.6>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Variabilidad de actividades enzimáticas en suelos arenosos de playas del Municipio Puerto Cabello, Estado Carabobo, Venezuela

Variability of enzymatic activities in sandy soils of beaches of Puerto Cabello Municipality, Carabobo State, Venezuela

Joselin Albujar^{1*}; Arnaldo Armado²; Jorge Briceño³; Daniela Avalos⁴; Sonia Salazar⁵; Marcelo Rojas⁶

¹ Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, Suelos y Ambiente (LIBSA), Centro de Investigación y Extensión en Ambiente, Biología y Química (AMBIOQUIM), Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología (FACyT), Universidad de Carabobo. Venezuela. Campus Académico Bárbula, Naguanagua, Carabobo, Venezuela, jalbujar@uc.edu.ve

² Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, Suelos y Ambiente (LIBSA), Centro de Investigación y Extensión en Ambiente, Biología y Química (AMBIOQUIM), Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología (FACyT), Universidad de Carabobo. Venezuela. Campus Académico Bárbula, Naguanagua, Carabobo, Venezuela, armadoa@uc.edu.ve

³ Universidad Estatal de Bolívar, Campus Académico "Alpachaca" Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador, jbriceno@ueb.edu.ec

⁴ Universidad Estatal de Bolívar, Campus Académico "Alpachaca" Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador, poliolla_avalos@hotmail.com

⁵ Universidad Estatal de Bolívar, Campus Académico "Alpachaca" Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador, ssalazar@ueb.edu.ec

⁶ Universidad Estatal de Bolívar, Campus Académico "Alpachaca" Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador, mrojas@ueb.edu.ec

*Autor de correspondencia: jalbujar@uc.edu.ve

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.7>

RESUMEN

Los ecosistemas costeros reciben impactos negativos por actividades industriales, explotación de especies costeras, actividades turísticas y recreativas, lo que hace necesario evaluar su calidad ambiental. El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad de las actividades enzimáticas de catalasa, ureasa y proteasa en suelos arenosos de playas del municipio Puerto Cabello, estado Carabobo para su uso como indicadores de calidad ambiental. Las playas estudiadas fueron El Palito (EP), Waikiki (W) y Playa Blanca (PB). Se establecieron cuatro unidades de muestreo: zona lejana (L), zona cercana (C), zona seca (S), zona húmeda (H), tomando muestras superficiales (s) y sub-superficiales (ss) en época lluviosa y seca. Se determinaron parámetros fisicoquímicos y las actividades enzimáticas de catalasa, ureasa y proteasa. La actividad de catalasa, muestra variabilidad asociada a las zonas evaluadas, pero no se evidencian variaciones estacionales. La actividad de ureasa, refleja una variabilidad con respecto a las zonas de la playa y la fuente contaminante; mientras que la actividad proteasa no muestra variación estacional, pero si respecto a las zonas de la playa y la fuente contaminante. Se evidenció una correlación negativa significativa entre la actividad catalasa y el contenido de arena, retención de humedad, materia orgánica y una correlación positiva entre la actividad de la ureasa y el contenido de materia orgánica. Finalmente, se concluye que las actividades enzimáticas de catalasa, ureasa y proteasa son sensibles ante impactos antropogénicos, por lo que pueden ser usadas como indicadores de calidad en los suelos arenosos evaluados.

Palabras clave: Catalasa; indicadores de calidad de suelo; proteasa; suelos arenosos; ureasa.

ABSTRACT

Coastal ecosystems receive negative impacts from industrial activities, exploitation of coastal species, and tourist and recreational activities, making assessing their environmental quality necessary. This work aimed to study the variability of the enzymatic activities of catalase, urease and protease in sandy beach soils of the Puerto Cabello municipality, Carabobo state, for their use as indicators of environmental quality. The beaches studied were El Palito (EP), Waikiki (W) and Playa Blanca (PB). Four sampling units were established: distant zone (L), near zone (C), dry zone (S), and humid zone (H), taking surface (s) and sub-surface (ss) samples in the rainy and dry seasons. Physicochemical parameters and the enzymatic activities of catalase, urease and protease were determined. The catalase activity shows variability associated with the evaluated areas, but no seasonal variations are evident. The urease activity reflects variability concerning the beach areas and the polluting source. In contrast, the protease activity does not show seasonal variation; it does concerning the beach areas and the polluting source. A significant negative correlation was evidenced between catalase activity and sand content, moisture retention, and organic matter, and a positive correlation between urease activity and organic matter content. Finally, it is concluded that the enzymatic activities of catalase, urease and protease are sensitive to anthropogenic impacts so that they can be used as quality indicators in the evaluated sandy soils.

Keywords: Catalase; soil quality indicators; protease; sandy soils; urease.

INTRODUCCIÓN

En suelos arenosos de ecosistemas costeros se desarrollan diversos procesos relacionados con funciones del suelo distintas al uso agrícola, entre las que podemos mencionar filtrar, regular y transformar sustancias para proteger al ambiente de la contaminación, además de servir como hábitat para las plantas, animales y microorganismos¹. Estas zonas reciben, cada vez más, impactos negativos como la contaminación por actividades industriales, explotación de especies costeras, actividades turísticas y recreativas, por lo que es necesario evaluar su calidad ambiental². En el caso específico del municipio Puerto Cabello, del estado Carabobo, en Venezuela, se encuentran industrias como refinerías cercanas a playas arenosas que impactan de manera negativa, tanto el ecosistema marino, como el terrestre. El incremento de estas actividades pueden modificar los procesos bioquímicos naturales y el funcionamiento de estos ecosistemas, debido a que sus residuos pueden contener gran cantidad de metales y otras sustancias contaminantes que ocasionarían cambios notables en la calidad del sedimento superficial³.

Para evaluar la calidad ambiental del suelo se emplean propiedades físicas, químicas y biológicas que describan los procesos que ocurren en él. Estas son consideradas herramientas de medición que indican si la calidad de un suelo mejora, permanece constante o disminuye⁴. En este sentido, se considera a las propiedades bioquímicas del suelo indicadores de cambios en los procesos edáficos, debido a su sensibilidad y su relación con la actividad microbiana y los procesos de mineralización de la materia orgánica⁵. De estos, los parámetros biológicos y bioquímicos tienden a reaccionar de manera rápida y son sensibles a los cambios producidos por su uso, por lo que pueden constituir una señal temprana para estimar la calidad edáfica, incluso antes que las propiedades físicas y químicas. Numerosas investigaciones sugieren el uso de indicadores que reflejen la actividad, la abundancia y la diversidad de los microorganismos del suelo⁶.

Las enzimas del suelo funcionan como uno de los componentes orgánicos más activos en el suelo, y están involucrados en todos los procesos bioquímicos del suelo⁷. Las actividades enzimáticas se consideran apropiadas para evaluar la calidad del suelo, porque son sensibles al estrés ambiental⁸, más que los indicadores físicos y químicos⁹ y pueden reflejar oportunamente condiciones de recuperación en diferentes ecosistemas del suelo¹⁰. La variación en la actividad enzimática está directamente asociada con la dinámica y la concentración poblacional de microorganismos en la capa superior del suelo¹¹. La actividad de las enzimas del suelo impulsa la formación y degradación de la materia orgánica del suelo, ciclo de nutrientes y descomposición de xenobióticos¹². Dentro de las más estudiadas se encuentran las deshidrogenasas, catalasas, peroxidasas, β -glucosidasas, ureasas y fosfatasas.

Diversos estudios han mostrado que actividades humanas como el uso de la tierra y la fertilización pueden afectar significativamente las actividades enzimáticas del suelo¹³⁻²⁰. Por lo tanto, el conocimiento de las actividades de las enzimas del suelo se puede utilizar para describir cambios en la calidad del suelo debido a la recuperación a largo plazo, comprender mejor el funcionamiento de los ecosistemas del suelo y ayudar a los gobiernos en la evaluación de la calidad del suelo costero recuperado²¹.

La evaluación de los cambios en las actividades de las enzimas del suelo puede proporcionar una base fundamental no sólo para comprender los procesos que ocurren en el suelo sino también para predecir la respuesta de estos a las condiciones e impactos ambientales²². En esta investigación, se buscó analizar la diversidad en la actividad enzimática de la catalasa, ureasa y proteasa en suelos de tipo arenoso presentes en las playas ubicadas en el municipio Puerto Cabello, en el estado de Carabobo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron tres playas para el estudio: El Palito (EP) (10.4809, -68.10923), Waikiki (W) (10.48311, -68.03862) y Playa Blanca (PB) (10.47367, -68.01626), ubicadas en el municipio Puerto Cabello, estado Carabobo (Figura 1). En cada playa se tomaron cuatro unidades de muestreo, dos de acuerdo a su ubicación respecto al foco de contaminación puntual (L, zona lejana; C, zona cercana) y dos unidades en función de las zonas de la playa, en el área correspondiente a la duna, denominada zona seca (S) y en la intermareal, señalada como zona húmeda (H). En cada unidad de muestreo se tomaron 10 submuestras simples superficiales (0-20 cm) y 10 submuestras subsuperficiales (20-40 cm) para obtener las muestras compuestas. El muestreo se realizó en época lluviosa (julio, 2019) y seca (marzo, 2020). El tipo de muestreo fue aleatorio estratificado con un patrón de zig zag. En la tabla 1 se muestran las notaciones empleadas para identificar las unidades de muestreo.



Figura 1. Ubicación de las playas El Palito, Waikiki y Blanca del municipio Puerto Cabello, estado Carabobo. Fuente: Google Maps

Notación	Descripción	Notación	Descripción
EPLSs	Playa El Palito, zona lejana a fuente contaminante, zona seca, muestra superficial	WLHs	Playa Waikiki, zona lejana a fuente contaminante, zona húmeda, muestra superficial
EPLSss	Playa El Palito, zona lejana a fuente contaminante, zona seca, muestra subsuperficial	WLHss	Playa Waikiki, zona lejana a fuente contaminante, zona húmeda, muestra subsuperficial
EPLHs	Playa El Palito, zona lejana a fuente contaminante, zona húmeda, muestra superficial	WCSs	Playa Waikiki, zona cercana a fuente contaminante, zona seca, muestra superficial
EPLHss	Playa El Palito, zona lejana a fuente contaminante, zona húmeda, muestra subsuperficial	WCSss	Playa Waikiki, zona cercana a fuente contaminante, zona seca, muestra subsuperficial
EPCSs	Playa El Palito, zona cercana a fuente contaminante, zona seca, muestra superficial	WCHs	Playa Waikiki, zona cercana a fuente contaminante, zona húmeda, muestra superficial
EPCSss	Playa El Palito, zona cercana a fuente contaminante, zona seca, muestra subsuperficial	WCHss	Playa Waikiki, zona cercana a fuente contaminante, zona húmeda, muestra subsuperficial
EPCHs	Playa El Palito, zona cercana a fuente contaminante, zona húmeda, muestra superficial	PBSs	Playa Blanca, zona seca, muestra superficial
EPCHss	Playa El Palito, zona cercana a fuente contaminante, zona húmeda, muestra subsuperficial	PBSss	Playa Blanca, zona seca, muestra subsuperficial
WLSs	Playa Waikiki, zona lejana a fuente contaminante, zona seca, muestra superficial	PBHs	Playa Blanca, zona húmeda, muestra superficial
WLSss	Playa Waikiki, zona lejana a fuente contaminante, zona seca, muestra subsuperficial	PBHss	Playa Blanca, zona húmeda, muestra subsuperficial

Tabla 1. Notación de unidades de muestreo en playa el Palito, playa Waikiki y playa Blanca en el Municipio Puerto

Cabello, Estado Carabobo.

Se tomó una alícuota de 500 g de cada muestra y se almacenaron en bolsas plásticas a 4°C por un período no mayor a un mes para la evaluación de los parámetros bioquímicos. El resto de las muestras fueron secadas al aire a temperatura ambiente para los análisis de parámetros fisicoquímicos. La textura se estimó a través del método descrito por Bouyoucos (1936)²³, el pH y la conductividad se determinaron en un extracto acuoso en proporción 1:2 (m/v), la retención y el contenido de humedad se estimaron gravimétricamente. La materia orgánica se determinó mediante el método de pérdidas por ignición, según procedimiento descrito por Cargua et al., (2017)²⁴ y el carbono orgánico total (COT) se determinó mediante oxidación húmeda con H₂SO₄ concentrado y K₂Cr₂O₇ 2N y determinando el Cr (III) espectrofotométricamente a 600 nm²⁵. La capacidad de intercambio catiónico se determinó a pH 7, adicionando al suelo una solución de NH₄CH₃COO 1N, se filtró y se realizaron lavados con CH₃CH₂OH y luego con NaCl (10%), estos últimos se recolectaron y se les adicionó CH₂O (40%). La solución se valoró con NaOH 0,1N²⁶.

Las actividades enzimáticas se determinaron mediante los procedimientos que se resumen a continuación: para catalasa²⁷, se adicionó una cantidad determinada de H₂O₂ (0,3% v/v) al suelo, incubando a 20 °C durante 10 min, el H₂O₂ residual se valoró con KMnO₄ 0,01M, en medio ácido. Para ureasa²⁸, se adicionó a la muestra de suelo, 0,5 mL de una solución de urea 79,7mM con incubación a 37°C por 2 h, seguido de la adición de solución de KCl-HCl 1M, luego se agitó, centrifugó, y a los sobrenadantes se les agregó agua destilada, solución de salicilato de sodio/hidróxido de sodio y solución de dicloroisocianurato de sodio al 0,1%

p/v. Se dejaron en reposo por 30 minutos para el desarrollo de color, y se midió la absorbancia a 690 nm. Para la proteasa²⁹ se le adicionó a las muestras de suelo, solución amortiguadora Tris-HCl (pH 9) y solución calentada de caseinato de sodio al 2% p/v, se incubaron a 50°C por 2 horas, se adicionaron 5 mL de ácido cloracético (ACA) al 20%, se agitó y centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. Al sobrenadante, se le colocó Na₂CO₃ (2,8 N), CuSO₄ (0,06%), reactivo de Folin-Ciocalteu (1:3), se colocaron por 5 minutos a 37°C y se determinó la absorbancia a 578 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando una solución madre de tirosina de 200 µg/mL.

Para el análisis estadístico se utilizó el software libre PAST 3.24. Inicialmente se verificaron los supuestos de normalidad, y se determinó que los datos no cumplían los criterios de datos normales, por lo que se realizó la comparación mediante la prueba Kruskal-Wallis, con un nivel de confianza del 95%. Se realizó la comparación estadística de las actividades enzimáticas con respecto a las tres playas seleccionadas para el estudio a fin de establecer si estos parámetros son sensibles a las características del sitio; con respecto a las zonas de la playa (seca y húmeda); según la profundidad del muestreo (superficial y subsuperficial); proximidad a la fuente de contaminación puntual, en las que sólo se evaluaron a las playas El Palito y Waikiki, puesto que en Playa Blanca no se observó una fuente contaminante puntual. En el caso de la playa El Palito la fuente de contaminación puntual es una refinería y en Waikiki, una empresa de almacenamiento y distribución de productos químicos. También se realizó la comparación de cada actividad enzimática según las estaciones en las que se realizaron la toma de muestras. Adicionalmente se realizó un análisis de correlaciones de Spearman para estudiar las relaciones entre los parámetros seleccionados para el estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se muestran los intervalos obtenidos para los parámetros fisicoquímicos en las unidades de muestreo de las playas evaluadas en las estaciones lluviosa y seca, respectivamente. En los resultados obtenidos se refleja que el porcentaje de arena varía entre 89 y 92 %; mientras que el de arcilla varía entre 8,7 y 10 %. Esto permite clasificar los suelos como Arenosoles³⁰. La variación textural a lo largo de todas las zonas señala una ligera tendencia a disminuir el tamaño de partícula desde la playa (zona seca) hacia la zona intermareal, tal como lo describe Bunicontro et al., (2017)³¹. Los valores de pH obtenidos varían en un intervalo entre 7,5 y 9; lo cual indica que los suelos evaluados se clasifican como alcalinos. En cuanto a la conductividad, se observó una variación desde 0,2 hasta 8,3 mS. Este parámetro influye en los indicadores biológicos como el carbono microbiano³². Los valores de retención de humedad evidencian variaciones desde 20 a 35 %. La capacidad de retención de agua por el suelo depende de las fuerzas que se desarrollan en este y de factores como el tamaño de las partículas y la porosidad. En este caso, la retención del agua es baja. La materia orgánica mostró una variación de 0,09 a 0,4 %. Este es un parámetro que tiene efectos importantes sobre las propiedades físicas químicas y biológicas del suelo. El carbono orgánico total varió de 0,01 a 1,6 g C/kg ss. Estos resultados son bastante bajos, lo que indica que la disponibilidad de este elemento como nutriente está limitada. La capacidad de intercambio catiónico varió desde 1,2 hasta 11,2 meq/100 gss, valores que se relacionan con el bajo contenido de arcilla y materia orgánica.

Playa	Textura		pH	Cond (mS/cm)	RH (%)	MO (%)	COT (gC/kgss)	CIC (meq/100 gss)
	A (%)	Ar (%)						
Estación lluviosa								
EP	89,6-91,4	8,6-8,8	8,0-8,8	0,228-8,329	25,69-30,71	0,148-0,270	0,019-1,674	4,190-9,570
W	89,7-91,9	8,1-10,3	7,6-9,1	0,137-7,955	20,84-26,70	0,099-0,250	0,127-0,615	1,292-7,785
PB	89,8-90,1	9,9-10,2	7,6-8,4	0,187-6,934	24,62-25,21	0,072-0,262	0,242-0,684	3,499-7,125
Estación seca								
EP	89,7-92,3	7,8-10,3	7,7-7,9	2,14-7,84	26,28-35,24	0,212-0,452	0,586-1,203	6,448-11,271
W	89,6-91,4	8,6-10,2	7,7-8,2	1,43-5,79	22,66-26,85	0,117-0,296	0,093-0,616	1,294-8,174
PB	89,9-90,1	9,9-10,1	7,8-8,0	1,047-5,480	23,05-25,02	0,113-0,278	0,191-0,580	4,318-7,656

Fuente: Albuja y Armado, 2022

A= contenido de arena, Ar= contenido de arcilla, Cond=conductividad, RH= retención de humedad, MO=materia orgánica, COT=carbono orgánico total, CIC= capacidad de intercambio catiónico

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos en las playas El Palito, Waikiki y playa Blanca del Municipio Puerto Cabello, Estado Carabobo en las estaciones lluviosa (julio 2019) y seca (marzo 2020)

Los resultados de la aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de las actividades enzimáticas según diferentes criterios, para las playas en estudio se muestran en la tabla 3.

Parámetro	Playas	Fuente contaminante		Zonas de la playa			Profundidad			Estación
		EP	W	EP	W	PB	EP	W	PB	
Catalasa (mmoles H ₂ O ₂ /gss.h)	*1,4x10 ⁻⁸	0,0578	0,6207	0,4455	0,2482	0,2039	0,2238	0,0606	0,6441	0,793
Ureasa (µgN-NH ₄ ⁺ /gss.h)	0,1896	0,4579	*0,0019	0,07966	*0,01874	*0,0007	0,4962	0,2836	1	0,1627
Proteasa (µg tirosina/gss.h)	0,3667	*0,0246	0,4579	*6,9x10 ⁻⁵	0,1078	0,729	0,3535	0,0552	0,1659	0,132

Tabla 3. Comparación de actividades enzimáticas con respecto a las playas evaluadas, la proximidad a la fuente contaminante, zonas de la playa, profundidad del muestreo y estacionalidad.

De acuerdo a los resultados reflejados en la tabla 3, se observó diferencia significativa entre las playas evaluadas para la actividad de la catalasa, lo que evidencia que este parámetro es sensible a las actividades antrópicas que se desarrollan en cada una de las playas seleccionadas, así como también a las características fisicoquímicas y las condiciones hidrodinámicas del medio. En tal sentido, Furtak y Galqzka (2019)³³ encontraron diferencias en la actividad de esta enzima con respecto al uso del suelo. Reyes (2019)³⁴, reportó que la actividad catalasa cambia con la fertilidad y actividad microbiana del suelo.

Con respecto a la fuente contaminante, en la playa El Palito, el parámetro que difiere es la actividad de proteasa; mientras que en la playa Waikiki, es la actividad de ureasa. Estas dos enzimas tienen relación con el contenido de carbono y el tipo de materia orgánica. En el caso de la playa El Palito, los valores de actividad proteasa son más altos en la zona lejana al posible foco de contaminación, mientras que en Waikiki, se encuentran en la zona cercana. Esto puede asociarse a que en las zonas mencionadas los compuestos orgánicos son más fáciles de degradar por este tipo de enzimas. En la zona cercana de El Palito, los compuestos orgánicos que se pueden encontrar en mayor proporción pertenecen a las familias de hidrocarburos complejos y de alto peso molecular, lo que puede inferirse por los procesos que se realizan en la industria cercana; mientras que en la zona lejana los compuestos orgánicos provienen en su mayoría de las descargas de aguas residuales, por tanto, son más fácilmente oxidables. En la playa Waikiki, el COT es mayor en la zona cercana, por lo que es de esperarse que en esta zona la actividad proteasa sea mayor. Esto puede explicar las diferencias observadas para la actividad ureasa, donde diversos autores han reportado la dependencia del tipo de materia orgánica con la actividad de esta enzima³⁴⁻³⁵.

Para las zonas de playa se observan diferencias significativas en la actividad de la enzima proteasa en la playa El Palito. En playa Waikiki y playa Blanca, la diferencia se refleja en la actividad de la ureasa. Tanto la proteasa como la ureasa han mostrado dependencia con el contenido de carbono orgánico en el suelo y este parámetro tiende a disminuir en dirección hacia el mar³⁶. En las zonas secas y húmedas de las playas se observa también una variación en la distribución del tamaño de grano. En arenas finas hay mayor superficie que impulsa el desarrollo de hábitats para las poblaciones microbianas³⁷. Esto permite explicar las diferencias observadas en estos parámetros con respecto a las zonas de las playas.

Con respecto a la profundidad del muestreo, no se observaron diferencias significativas entre los parámetros evaluados; en tal sentido, es posible inferir que no tienen una variación significativa a través de los perfiles del suelo de los sistemas evaluados. Tomando en cuenta lo descrito, se puede establecer que las actividades de las enzimas evaluadas son sensibles a las actividades antrópicas que generan impacto ambiental, así como a las características físicas y químicas de los suelos de las playas arenosas evaluadas.

En la figura 2 se muestra el comportamiento obtenido para la actividad de catalasa, donde se evidencia variabilidad asociada a las zonas evaluadas, pero no variaciones estacionales. Está reportado que actividades enzimáticas como la catalasa están controladas principalmente por factores geológicos específicos e influenciadas por variaciones en las características innatas del suelo como textura y mineralogía³⁸.

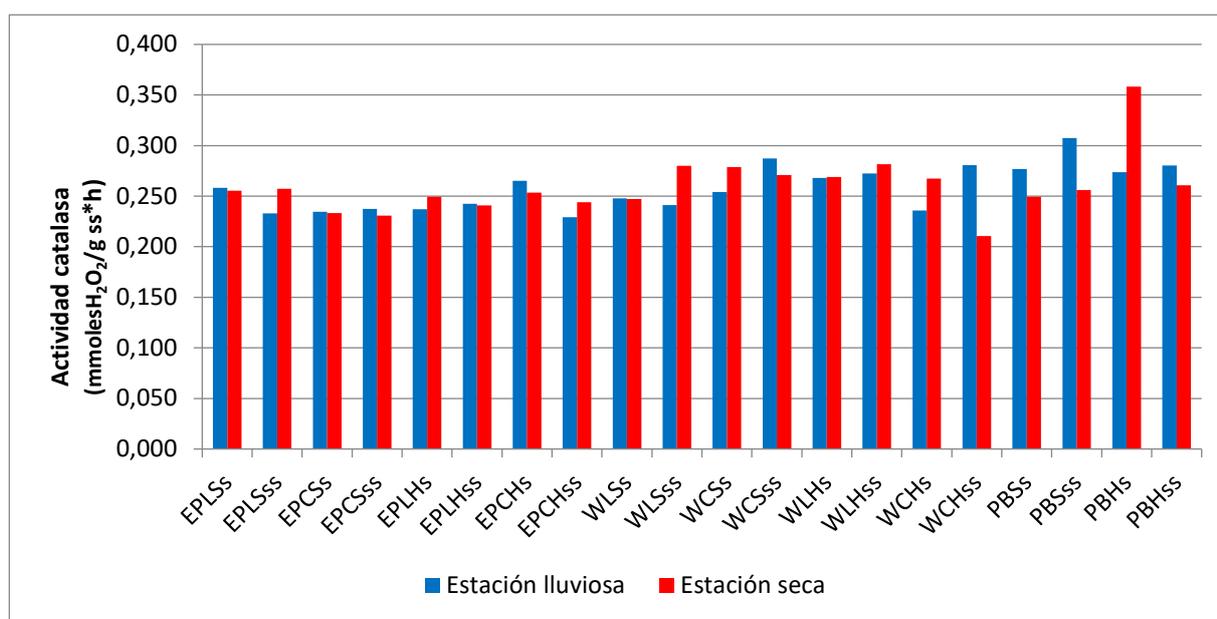


Figura. 2. Variación de la actividad enzimática de catalasa en las unidades de muestreo de las playas El Palito, Waikiki y Playa Blanca en las estaciones lluviosa (julio 2019) y seca (marzo 2020).

Los valores más altos de la actividad enzimática de la catalasa se observan en playa Blanca, donde la afluencia de personas, realizando actividades variadas en el suelo, es mayor con respecto a las otras zonas de estudio. Esto puede generar un impacto en el estado físico del suelo lo que tiene repercusiones en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Vallejo et al., (2018)¹⁸, establecen que el estado físico del suelo tiene un efecto potencial en la densidad, estructura, composición y actividad de la comunidad microbiana, lo que ha sido evaluado en diferentes tipos de ecosistemas con diferentes grados de intervención antrópica y condiciones climáticas. En tal sentido, Velez (2019)³⁹ señala que los organismos que habitan la zona litoral se ven afectados por el pisoteo, ya que la presión humana ejerce compactación y resuspende el sedimento. En la zona intermareal, las comunidades son vulnerables a condiciones de estrés, incluso a niveles de actividad antrópica bajos, particularmente los que se ubican en las capas superficiales del suelo. Estos factores pueden tener

influencia directa en el aumento leve de la actividad de la catalasa, que es una enzima asociada con situaciones de estrés ambiental.

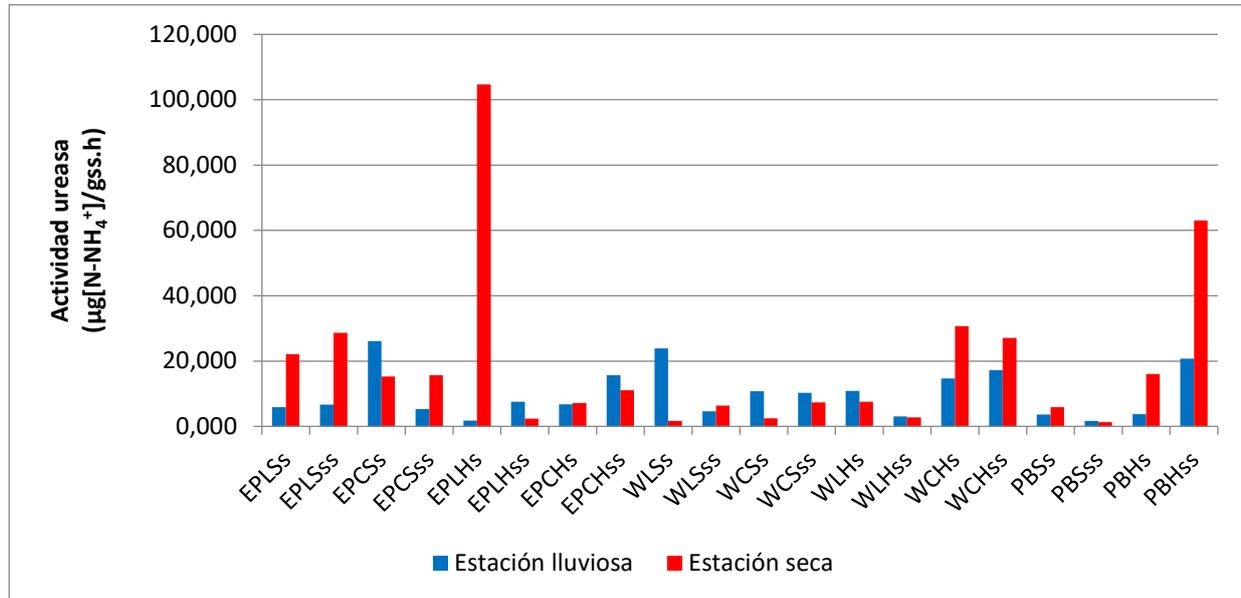


Figura 3. Variación de la actividad enzimática de ureasa en las unidades de muestreo de las playas El Palito, Waikiki y Playa Blanca en las estaciones lluviosa (julio 2019) y seca (marzo 2020).

En la figura 3 se muestra el comportamiento de la actividad enzimática de la ureasa en las unidades de muestreo seleccionadas para el estudio. Se refleja una variabilidad con respecto a las zonas de la playa y la fuente contaminante; al igual que la catalasa no se observa una variación con la estacionalidad. Diversos autores han reportado una correlación positiva entre la actividad ureasa con el contenido y tipo de materia orgánica, carbono orgánico del suelo y contenido de agua^{40,21,33-34}, propiedades que tienen valores bajos en los suelos arenosos; por lo que se esperaría que la actividad de esta enzima sea baja en los suelos evaluados. Se observa un valor alto en la unidad de muestreo correspondiente a la playa El Palito, zona lejana al posible foco contaminante, zona intermareal superficial, con respecto a las otras unidades evaluadas. En esta zona, existe un punto de descarga de aguas residuales, provenientes de los locales comerciales de la zona que aportan materia orgánica nitrogenada, lo que incrementa la actividad de la ureasa.

Se observaron incrementos de este parámetro en las zonas lejana seca de playa El Palito y en la cercana húmeda de Playa Waikiki en la estación seca. En estas zonas se evidenció también un incremento de la materia orgánica con respecto a las otras unidades de muestreo, lo que permite inferir que estos parámetros podrían estar relacionados, en este tipo de suelos. Adicionalmente, en la estación seca en el momento de la toma de muestra, se observó la presencia de la especie Carabela Portuguesa (*Physalia physalis*) en las zonas estudiadas⁴¹; una especie que genera toxinas compuestas por catecolaminas, aminas vasoactivas (histamina, serotoninas) bradicininas, colagenasas, hialuronidasas, proteasas, fosfolipasas, fibrinolisinias, dermatoneurotoxinas, cardiotoxinas, miotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas y antígenos proteicos⁴²; compuestos orgánicos que contienen grupos nitrogenados que pueden ser degradados por la ureasa, lo que incrementaría los valores de su actividad.

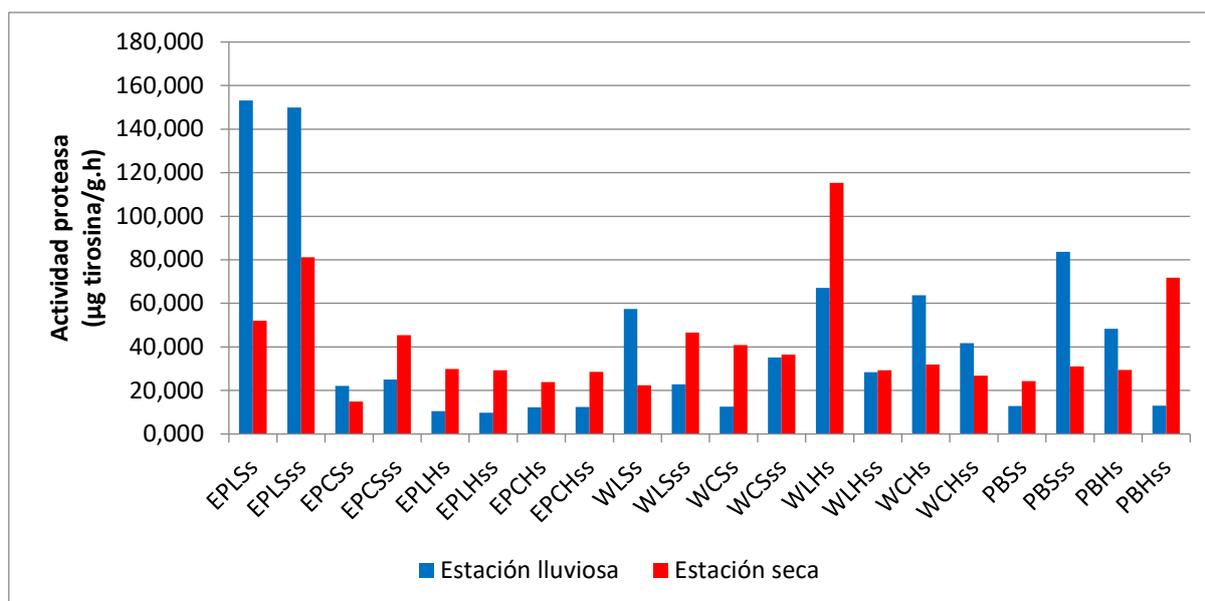


Figura 4. Variación de la actividad enzimática de proteasa en las unidades de muestreo de las playas El Palito, Waikiki y Playa Blanca en las estaciones lluviosa (julio 2019) y seca (marzo 2020).

En la figura 4 se muestra la variabilidad de la actividad enzimática de la proteasa en las unidades de muestreo seleccionadas. Al igual que para la actividad catalasa y ureasa, la actividad proteasa no muestra variación estacional, pero sí respecto a las zonas de la playa y la fuente contaminante. Se observaron los valores más altos en las unidades de muestreo de la playa El Palito, zona lejana seca, para la estación lluviosa. En estas zonas, también se observaron los valores más altos de carbono orgánico total (COT); esto coincide con lo planteado por Madejón et al. (2007)⁴⁰, quienes reportaron una alta dependencia de la funcionalidad de las enzimas del suelo con el contenido de materia orgánica. Resultados similares fueron reportados por Cañizales et al., (2011)⁴³ quienes encontraron una disminución de la actividad de esta enzima a estratos más profundos y lo relacionaron con el contenido de carbono orgánico. Ferreras et al., (2015)⁴⁴ también reportan incremento de la actividad microbiana como resultado de un aumento de la fracción de carbono fácilmente oxidable, que a su vez, genera una mayor producción de enzimas vinculadas a la degradación de sustratos y liberación de nutrientes.

Parámetro	Actividad catalasa (mmoles H ₂ O ₂ /gss.h)	Actividad ureasa (µgN-NH ₄ ⁺ /gss.h)	Actividad proteasa (µg tirosina/gss.h)
A (%)	*-0,4062	0,065938	-0,1121
Ar (%)	*0,36805	0,0034941	0,15049
pH	-0,10631	0,033262	-0,12372
Conductividad (mS/cm)	-0,14616	0,25628	-0,128
RH (%)	*-0,33893	0,17485	0,080776
MO (%)	*-0,20456	*0,38496	-0,16239
COT (gC/kgss)	-0,088614	*0,28132	0,098295
CIC (meq/100 gss)	*-0,34208	0,17303	-0,072773

Tabla 4. Coeficientes de correlación de Spearman ($p < 0,05$) para la actividades enzimáticas de la catalasa, ureasa y proteasa con parámetros fisicoquímicos en suelos arenos de playas del Municipio Puerto Cabello, Estado Carabobo.

Con el fin de estudiar las relaciones entre las variables analizadas se realizó un análisis de correlación de Spearman con un 95% de confianza (Tabla 4), donde se evidenció una relación negativa entre la actividad de la catalasa y el contenido de arena, mientras que mostró una positiva con el contenido de arcilla,

comportamiento similar al reportado por Avazpoor et al., (2019)⁴⁵ para otras enzimas. Esto permite suponer que esta enzima puede adsorberse en materiales arcillosos, ya sea en superficies externas o dentro de las redes de capas de silicatos⁴⁶. La catalasa también muestra una relación negativa significativa con la retención de humedad, contenido de materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico. Estos parámetros se relacionan de manera directa con las características texturales de los suelos. La retención de humedad es un parámetro asociado a la capacidad de almacenamiento de agua en el suelo y de acuerdo con los resultados obtenidos, puede sugerirse que se produce un efecto inhibitorio de la actividad enzimática de la catalasa al aumentar el contenido de agua. Con respecto a la materia orgánica, podría suponerse que al aumentar las sustancias coloidales húmicas, disminuye la adsorción de esta enzima en estas sustancias, disminuyendo así su actividad catalítica. Para la CIC, se puede establecer que el aumento de este parámetro implica una mayor disponibilidad de sitios en el complejo de cambio del suelo para el intercambio de especies catiónicas, lo que disminuye la cantidad de sitios disponibles para ser ocupados por la enzima, disminuyendo su actividad. Con respecto a la actividad enzimática de la ureasa, se observó relación positiva significativa con el contenido de materia orgánica y carbono orgánico total. Diversos autores han reportado relaciones similares entre la ureasa y la cantidad y tipo de materia orgánica^{21,34,20}.

CONCLUSIONES

Las actividades enzimáticas de catalasa, ureasa y proteasa presentaron variabilidad asociada a la fuente contaminante y zonas de las playas evaluadas. En las tres actividades enzimáticas no se observaron variaciones estacionales. Los valores más altos de actividades enzimáticas de ureasa y proteasa, se asocian a valores altos de carbono orgánico total; lo que demuestra una dependencia de la funcionalidad de las enzimas del suelo con el contenido de materia orgánica. La actividad de la catalasa se relaciona de manera negativa con el contenido de arena, retención de humedad, contenido de materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico; mientras que la actividad enzimática de la ureasa se relacionó de manera positiva con el contenido de materia orgánica y el carbono orgánico total. Se evidenció que las actividades enzimáticas de catalasa, ureasa y proteasa son sensibles ante impactos antropogénicos, por lo que pueden ser usadas como indicadores de calidad en los suelos arenosos evaluados. Estos resultados son importantes porque brindan información sobre las relaciones causa – efecto de los procesos de degradación a los que son sometidos los ecosistemas costeros; en tal sentido la evaluación de las actividades enzimáticas constituye una herramienta para la detección temprana de alteraciones en la calidad del suelo, lo que permitiría aplicar acciones de gestión ambiental de manera oportuna y el desarrollo de métodos de remediación o recuperación de suelos contaminados o impactados basados en propiedades bioquímicas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la Universidad Estatal de Bolívar a través del proyecto “Desarrollo y optimización de métodos analíticos para la extracción y cuantificación de polifenoles en matrices vegetales” (PIV-66-2021).

Conflicts of Interest: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Hernández, I. (2019). Impacto de actividades antrópicas sobre parámetros microbiológicos y bioquímicos del suelo: tres casos de estudio. *Acta Biológica Venezuelica*, 39(1): 73-90. Disponible en: https://saber.ucv.ve/ojs/index.php/revista_abv/article/view/19382
2. Albuja, J. y Armado, A. (2022). Actividad microbiológica como indicador de calidad en suelos arenosos de playas del municipio Puerto Cabello, estado Carabobo. *Revista Ingeniería UC*, 29(2), 145-155. DOI: <https://doi.org/10.54139/revinguc.v29i2.177>.
3. Fuentes, M. (2008). Metales pesados Cu, Cr, Ni, Zn, Pb y Cd en los sedimentos del muelle pesquero de Güiria, estado Sucre, Venezuela. *Tecnociencia*, 10(2): 61-79. Disponible en: <https://revistas.up.ac.pa/index.php/tecnociencia/article/view/848>.
4. González, H.; González, A.; Atencio, J. y Soto, A. (2021). Evaluación de calidad de suelos plataneros a través de la actividad microbiana en el sur el lago de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 38:01-25. DOI: [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v38.n1.03](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v38.n1.03).
5. De La Portilla, N.; Vaca, R.; Del Águila, P.; Salinas, L.; Yañez, G. y Lugo, J. (2021). Carbono de la biomasa microbiana, respiración basal y cinética del carbono de dos suelos erosionados enmendados con biosólidos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 37: 443-453. DOI: <https://doi.org/10.20937/RICA.53863>.
6. Fernández, R.; Frasier, I.; Rorig, M.; Quiroga, A. y Noellemeyer, E. (2018). Evaluación de indicadores biológicos en suelos de la región semiárida pampeana central. *Ecología Austral*, 28:145-156. DOI: <https://doi.org/10.25260/EA.18.28.1.0.555>.
7. Li, J.; Pu, L.; Han, M.; Zhu, M.; Zhang, R. y Xiang Y. (2014). Soil salinization research in China: Advances and prospects. *Journal of Geographical Sciences*, 24 (5):943-960. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11442-014-1130-2>.
8. Gili, P.; Marando, G.; Irisarri, J. y Sagardoy, M. (2004). Actividad biológica y enzimática en suelos afectados por sales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. *Revista Argentina de Microbiología*, 36(4):187-192. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412004000400008.
9. Zhang, X.; Dong, W.; Dai, X.; Schaeffer, S.; Yang, F.; Radosevich, M.; Xu, L.; Liu, X. y Sun, X. (2015). Responses of absolute and specific soil enzyme activities to long term additions of organic and mineral fertilizer. *Science of the Total Environment*, 536: 59-67. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.043>.
10. Araújo, A.; Cesarz, S.; Leite, L.; Borges, C.; Tsai, S. y Eisenhauer, N. (2013). Soil microbial properties and temporal stability in degraded and restored lands of Northeast Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, 66: 175-181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.07.013>.
11. Monserrat, V. (2020). Desarrollo de indicadores Bioquímicos de Calidad de Suelos del Sudoeste Bonaerense con Enmiendas de Residuos y Efluentes Agroindustriales. *AJEA- Actas de Jornadas y Eventos Académicos de UTN. V Jornadas de Intercambio y Difusión de los Resultados de Investigaciones de los Doctorados en Ingeniería*. <https://doi.org/10.33414/ajea.5.787.2020>.
12. Song, Y.; Song, Ch.; Yang, G.; Miao, Y.; Wang, J. y Guo, Y. (2012). Changes in Labile Organic Carbon Fractions and Soil Enzyme Activities after Marshland Reclamation and Restoration in the Sanjiang Plain in Northeast China. *Environmental Management*, 50: 418-426. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00267-012-9890-x>.
13. Ferreras, L.; Toresani, S.; Bonel, B.; Fernández, E.; Bacigaluppo, S.; Faggioli, V. y Beltrán C. (2009). Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos. *Ciencia del Suelo*, 27(1): 103-114. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1850-20672009000100011&script=sci_abstract.
14. García, J.; Kobza, J.; Soler, P. y Javorekova, S. (2013). Soil Microbial and Enzyme Activities Response to Pollution Near an Aluminium Smelter. *CLEAN Soil Air Water*, 00(0):1-8. DOI: <https://doi.org/10.1002/clen.201200099>.

15. Durango, W.; Uribe, L.; Henríquez, C. y Mata, R. (2015). Respiración, biomasa microbiana y actividad fosfatasa del suelo en dos agroecosistemas y un bosque de Turrialba, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 39(1): 37-46. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/>
16. Farrús, E. (2016). Influencia de la fertilización sobre la actividad biológica del suelo. Estudio comparativo de diferentes fuentes de materia orgánica. *Tesis Doctoral*. Universitat de les Illes Balears. Palma de Mallorca. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=214849>.
17. Jin, S.; Li, J.; Chen, J.; Wang, G.; Mayes, M.; Dzantor, K.; Hui, D. y Luo, Y. (2016). Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, 101: 32-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.003>.
18. Vallejo, V.; Afanador, L.; Hernández, M. y Parra, D. (2018). Efecto de la implementación de diferentes sistemas agrícolas sobre la calidad del suelo en el municipio de Cachipay, Cundinamarca, Colombia. *Bioagro*, 30(1), 27-38. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es>
19. He, L.; Lu, S.; Wang, Ch.; Mu, J.; Zhang Y. y Wang, X. (2021). Changes in soil organic carbon fractions and enzyme activities in response to tillage practices in the Loess Plateau of China. *Soil & Tillage Research*, 209: 104940. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.still.2021.104940>.
20. Sun, X.; Ye, Y.; Ma, Q.; Guan, Q. y Jones, D. (2021). Variation in enzyme activities involved in carbon and nitrogen cycling in rhizosphere and bulk soil after organic mulching. *Rhizosphere*, 19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisp.2021.100376>.
21. Xie, X.; Pu, L.; Wang, Q; Zhu, M.; Xu, Y. y Zhang, M. (2017). Response of soil physicochemical properties and enzyme activities to long – term reclamation of coastal saline soil, Eastern China. *Science of the Total Environment*, 607-608: 1419-1427. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.185>.
22. Cao, R.; Yang, W.; Chang, Ch.; Wang, Z.; Wang, Q.; Li, H. y Tan, B. (2021). Differential seasonal changes in soil enzyme activity along an altitudinal gradient in an alpine-gorge region. *Applied Soil Ecology*, 166: 104078. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104078>.
23. Bouyoucos, G. (1936). Directions for making mechanical analysis of soils by the hydrometer method, *Soil Science*, 42 (3): 225-228. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-193609000-00007>
24. Cargua, F. Rodríguez, M. Damián, D. Recalde, C. y Santillán, G. (2017). Comparación de dos métodos analíticos para la determinación de carbono orgánico del suelo de bosque andino, parque nacional Sangay-Ecuador, *Acta agronómica. Funcionamiento biológico, químico y físico del suelo*, 66(39), 408-413, DOI: <https://doi.org/10.15446/acag.v66n3.52467>.
25. Walinga, I.; Kithome, M.; Novozamsky, I.; Houba, V. y Van der Lee, J. (1992). Spectrophotometric determination of organic carbon in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, (15-16), 1935-1944. DOI: <https://doi.org/1080/00103629209368715>.
26. Jaramillo, D. (2002). Introducción a la ciencia del suelo. *Universidad Nacional de Colombia. Medellín*. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/>
27. Johnson, J. y Temple, K. (1964). Some variables affecting the measurement of “Catalase Activity” in soil. *Soil Science Society of America Journal*. 28 (2): 207-209. DOI: <https://dx.doi.org/10.2136/sssaj1964.03615995002800020024x>.
28. Kandeler, E. y Gerber, H. (1988). Short-term assay of urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6: 68-72. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00257924>
29. Ladd, J. y Butler, J. (1972). Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(1): 19-30 [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90038-7).
30. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. (2009). Guía para la descripción de los suelos, Roma, Italia. Disponible en: <https://www.fao.org/3/a0541s/a0541s.pdf>.
31. Bunicontro, M.; Marcomini, S.; Weiler, N.; López, R. y Quenardelle, S. (2017). Caracterización textural, composicional y análisis de procedencia de los sedimentos de playa del Golfo Nuevo, Provincia de Chubut. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 74(2): 207-222. Disponible en: <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/raga/article/view/9104>
32. Sánchez, L.; Paolini, J. y Rodríguez, J. (2010). Dinámica de las propiedades del suelo en bosques de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) en Isla de Margarita, Venezuela. *Revista de Biología*

- Tropical*, 58(2): 547-564. Disponible en:
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442010000200002.
33. Furtak, K y Galpuzka, A. (2019). Enzymatic activity as a popular parameter used to determine the quality of the soil Environment. *Polish Journal of Agronomy*, 37:22-30. DOI: <https://doi.org/10.26114/pja.iung.385.2019.37.04>.
 34. Reyes, A. (2019). Características de la actividad enzimática y el humus en suelos de Chinampa. *Terra Latinoamericana*, 37: 339-349. DOI: <https://doi.org/10.8940/terra.v37i4.487>
 35. Liu, L.; Li, D.; Sun, Y.; Zhu, Y.; Li, L.; Ren, Z.; Kong, R.; Jia, P.; Peng, N.; Jing, J.; Ghulam, R.; Rafique, T.; He, J.; Ji, Y. y Wang, X. (2021). Pattern of soil extracellular enzyme activities along a tidal wetland with mosaic vegetation distributions in Chongming Island, China. *Journal of Cleaner Production*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127991>
 36. Calva, L. y Torres, M. (2011). Textura de sedimentos y carbono orgánico en el sistema costero lagunar Alvarado, Veracruz. *Contactos*, 81:11-16. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/259604696_Textura_de_sedimentos_y_carbono_organico_en_el_sistema_costero_lagunar_Alvarado_Veracruz.
 37. McLachlan, A. y Defeo, O. (2018). The Ecology of Sandy Shores. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809467-9.00013-8>
 38. Tan, X.; Xie, B.; Wang, J.; He, W.; Wang, X. y Wei, G. (2014). County-Scale Spatial Distribution of Soil Enzyme Activities and Enzyme Activity Indices in Agricultural Land: Implications for Soil Quality Assessment. *The Scientific World Journal*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/535768>.
 39. Velez, J. (2019). Efectos de perturbaciones naturales y antropogénicas sobre las comunidades macrobentónicas en playas arenosas del Cantón San Vicente, Manabí-Ecuador. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/4363>.
 40. Madejón, E.; Moreno, F.; Murillo, J. y Pelegrín, F. (2007). Laboreo de conservación: efectos a largo plazo sobre el carbono orgánico y propiedades bioquímicas del estrato superficial de un suelo representativo de Andalucía occidental. *Tendencias Actuales de la Ciencia del Suelo*. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/37678>.
 41. Rodríguez, P. (2020). Peligroso cardumen de “aguamala” amenaza a playas porteñas. Te Lo Cuento Todo. <https://telocuentotodo.com/2020/03/10/peligroso-cardumen-de-aguamala-amenaza-a-playas-portenas>.
 42. Vera, C.; Kolbach, M.; Zegpi, M.; Vera, F. y Lonza, J. (2004). Picaduras de medusas: actualización. *Revista Médica de Chile*. 132 (2): 233-241. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004000200014>.
 43. Cañizales, N.; Tovar, M. y Ruiz, M. (2011). Actividad enzimática en suelos aluviales de los Llanos Centro-Occidentales. *Conferencia: XIX Congreso Venezolano de la Ciencia del Suelo*. Calabozo, Estado Guárico, Venezuela. Volumen 1. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/>
 44. Ferreras, L.; Toresani, S.; Faggioli, V. y Garza, C. (2015). Sensibilidad de indicadores biológicos edáficos en un Argiudol de la Región Pampeana Argentina. *Spanish Journal of Soil Science*. 5(3): 227-242. DOI: <https://doi.org/10.3232/SJSS.2015.V5.N3.04>.
 45. Avazpoor, Z.; Moradi, M.; Basiri, R.; Mirzaei, J.; Taghizadeh-Mehrjardi, R. y Kerry, R. (2019). Soil enzyme activity variations in riparian forests in relation to plant species and soil depth. *Arabian Journal of Geosciences*, 12:708. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12517-019-4910-2>.
 46. Burns, G. (1982). Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial Ecology. *Soil Biology Biochemistry*, Vol. 14, pp.: 423-427. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90099-2).

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation. Albuja J; Armado A, Briceño J; Avalos D; Salazar S; Rojas M. Variabilidad de actividades enzimáticas en suelos arenosos de playas del Municipio Puerto Cabello, Estado Carabobo, Venezuela Revis Bionatura 2023;8 (4) 7. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.7>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Analisis de la actividad antioxidante y antimicrobiana del propóleo en la provincia Bolivar, Ecuador

Analysis of the antioxidant and antimicrobial activity of propolis in the Bolivar province, Ecuador

Alicia Verdezoto Bósquez ¹, Favian Bayas-Morejón ^{*1,2}, Danilo Monter ¹, Yajaira Cuenca García ¹, Paul Lema Osorio ³.

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Agroindustrias, Universidad Estatal de Bolívar, CP:020150, Guaranda, Ecuador.

² Dirección de Investigación y Vinculación, Universidad Estatal de Bolívar, CP:020150, Guaranda, Ecuador.

³ Dirección Provincial del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social (IESS) Bolívar, CP:020150, Guaranda, Ecuador.

⁴ Instituto Superior Tecnológico tres de marzo, CP: 020302, San José de Chimbo, Ecuador

*Autor de correspondencia: fbayas@ueb.edu.ec

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.8>

RESUMEN

El propóleo ha sido utilizado desde la antigüedad con fines medicinales, en la actualidad investigaciones han demostrado que el propóleo posee propiedades terapéuticas, antiinflamatorias, analgésicas y antisépticas, en tal sentido el objetivo de la presente investigación fue estudiar la actividad antioxidante y antimicrobiana del propóleo y su aplicación en la Agroindustria; Para lo cual, se determinó la actividad antioxidante a los propóleos procedentes de La Magdalena, San Miguel y La Chima, donde se identificó que el propóleo de La Chima posee mayor concentración de antioxidante a diluciones de 20 y 60 mg/mL, de igual manera, se determinó la actividad antimicrobiana frente a dos bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus*) y dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp), donde el propóleo de La Chima resultó ser más efectivo frente a *Escherichia coli* con halos de inhibición de 11,33 mm de diámetro. En conclusión, el propóleo de La Chima por ser el mejor tratamiento puede ser utilizado en la industria alimentaria como conservante natural.

Palabras clave: Propóleo; antioxidantes; antimicrobiano; colmena; bacterias; queso.

ABSTRACT

Propolis has been used since ancient times for medicinal purposes; research has shown that propolis has therapeutic, anti-inflammatory, analgesic and antiseptic properties. In this sense, this research aimed to study propolis's antioxidant and antimicrobial activity and its application in Agribusiness. The antioxidant activity of the propolis from La Magdalena, San Miguel and La Chima was determined, where it was identified that the propolis from La Chima has a higher concentration of antioxidants at dilutions of 20 and 60 mg/mL; in the same way, the antimicrobial activity was determined against two Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus*) and two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp), where the propolis La Chima's pennyroyal was found to be more effective against *Escherichia coli* with inhibition halos of 11.33

mm in diameter. In conclusion, since La Chima propolis is the best treatment, it can be used in the food industry as a natural preservative.

Keywords: Propolis; antioxidants; antimicrobial; beehive; bacteria; cheese.

INTRODUCCIÓN

El propóleo fue conocido desde los antiguos griegos, romanos y egipcios, los cuales conocían sus propiedades curativas y fueron usados ampliamente como medicina, la composición química del propóleo es heterogénea y depende de la naturaleza que prevalece alrededor de la colmena *Apis mellifera*, la estación del año, de su origen geográfico ¹.

A partir de la década de los 50 en la Unión Soviética el propóleo fue utilizado para el control de enfermedades, pero en la década de los 80 se dio a conocer las cualidades farmacológicas que posee el propóleo en el 30^{vo} Congreso Internacional de Apicultura realizado en Nagoya². El término propóleo se deriva de las palabras griegas “pro” defensa y “polis” ciudad o colmena, el significado delante de la ciudad o colmena se ajusta favorablemente al papel protector que posee la colmena de las abejas³. El propóleo es una sustancia producida por las abejas de composición compleja, que se modifica por glucólisis a partir de las resinas de determinadas plantas, la resina parcialmente es una mezcla de cera y polen, es usado como sellador en la colmena en invierno, donde también mantiene un ambiente aséptico⁴.

El propóleo es conocido por el hombre desde tiempos remotos, siendo utilizado por los sacerdotes egipcios y más tarde por los griegos, quienes lo denominaron “propóleos”, porque significa delante y polis, que quiere decir ciudad, de acuerdo a un gran número de estudios, este producto apícola se caracteriza por poseer actividad antiviral, antifúngica, antiinflamatoria, cicatrizante, anestésica, anticancerígena, antiviral, antioxidante, inmunoreguladora y antibacteriana^{5, 1}.

En el propóleo en su partes resinosa se ha identificado más de 300 compuestos químicos en diferentes regiones geográficas en los últimos diez años, entre los compuestos químicos que están presentes son: los fenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, ésteres y taninos considerándolos los principales componentes que son muy importantes a nivel terapéutico y tienen un efecto sinérgico y son esenciales para la actividad biológica beneficiosa en humanos y animales, actuando como antibacteriana^{6,7,8}.

De hecho, la actividad antimicrobiana es debido a la presencia de propiedades de flavonoides como son: pinocembrina, quercetina, naringenina, acacetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol y pinobanksina, siendo atribuido a la compleja composición de la resina, el propóleo son sensibles a las bacterias Gram positivas y resistentes a las bacterias Gram negativas ¹.

También, la actividad antioxidante está relacionada con la concentración de los polifenoles que poseen los propóleos, por los ácidos grasos insaturados provenientes de las abejas, los flavonoides como la catequina o quercetina tienen mayor capacidad para contrarrestar los radicales libres ⁹.

En el Ecuador, una gran cantidad de apicultores no aprovechan los beneficios del propóleo como producto antioxidante y antibacteriano; la composición química del propóleo es cualitativa y cuantitativa dependiendo

de la diversidad geográfica de las plantas en su región de origen, lo que puede influir en sus propiedades biológicas¹⁰

Por otro lado, el excesivo uso de antibióticos ha dado lugar al incremento de resistencia bacteriana a estos agentes, de tal forma que en muchas investigaciones se recomiendan alternativas de orden natural como una estrategia prometedora para hacer frente a la resistencia bacteriana a los antibióticos^{11,12,13}. Generalmente, las bacterias patógenas son más común encontrarlas en los alimentos, destacando de entre ellos las bacterias, como *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Bacillus* entre¹⁴. *Escherichia coli* es considerada por muchos investigadores como patógena intestinal y extraintestinal¹⁵. *Salmonella* es otro patógeno intestinal comúnmente localizada en alimentos,¹⁶. También patógenos gram positivos como *Staphylococcus aureus* la ubicación más común son las fosas nasales, causando infecciones en la piel y tejidos blandos, neumonía, osteomielitis, bacteriemia¹⁷, El género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en agua dulce, marinos y en suelos, sus especies están muchas veces asociadas a plantas¹⁸. En este contexto, y debido a los múltiples beneficios que posee el propóleo, se vio la necesidad de aplicarlo como conservante alimentario en quesos frescos en sustitución de los aditivos sintéticos para inhibir el desarrollo de hongos y bacterias.

De tal manera que en la presente investigación se planteo como objetivo: Estudiar la actividad antioxidante y antimicrobiana del propóleo y su aplicación en la Agroindustria.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio General de la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, ubicado en el sector de Laguacoto I.

Los propóleos fueron adquiridos a productores de tres ubicaciones geográficas en Ecuador: La Magdalena (a una altitud de 2650 m.s.n.m) en el cantón San José de Chimbo, La Chima (a una altitud de 2480 m.s.n.m), y San Miguel (a una altitud de 2600 m.s.n.m), estas dos últimas que pertenecen al cantón homónimo, ubicado a 20 Km de la ciudad de Guaranda, en la provincia de Bolívar. Es relevante destacar que los productores contaban con los permisos y seguían los protocolos establecidos y normativos necesarios. Además, se utilizó propóleo con una concentración del 80%. Posteriormente, este material biológico fue transportado al laboratorio para su análisis subsiguiente.

En la presente investigación se plantearon dos diseños de experimentos, el primero para estudiar la actividad antioxidante del propóleo y el segundo para analizar la propiedad antimicrobiana (Tablas 1 y 2).

Análisis de la Actividad antioxidante

Para la actividad antioxidante, se realizaron a concentraciones de 20, 40, 60 mg/mL, donde los datos a tomar fueron las absorbancias de la solución oxidante y no oxidante a una longitud de onda de 230 nm.

Factor	Código	Niveles
Origen del propóleo	A	a ₁ : La Magdalena a ₂ : San Miguel a ₃ : La Chima
Antioxidante	B	b ₁ : 20 mg/mL b ₂ : 40 mg/mL b ₃ : 60 mg/mL

Tabla 1. Factores y niveles de estudio para antioxidantes

Para determinar la capacidad antioxidante de los propóleos se realizó espectrofotométricamente de acuerdo al método descrito por Ruch *et al.*,¹⁹.

Para medir la absorbancia de la solución oxidante y no oxidante se dejó reposar durante 15 min y se procedió a determinar en un espectrofotómetro GENESYS 10 (AZY1707308, Termo Fisher SCIENTIFIC, USA) a una longitud de onda de 230 nm, finalmente para el barrido de peróxido de hidrógeno al 1% se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Capacidad antioxidante (\% de H}_2\text{O}_2 \text{ secuestrado)} = \left(\frac{A_i - A_t}{A_i}\right) \times 100$$

Donde: **A_i**= Absorbancia del estándar de referencia; **A_t**= Absorbancia de la muestra

Análisis de la Actividad antimicrobiana

Para la actividad antimicrobiana se realizó por el método Kirby Bauer difusión disco-placa, donde con un calibrador pie de rey se midió los halos de inhibición del propóleo frente a las cepas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp y *Bacillus* spp.

Factor	Código	Niveles
Origen del propóleo	A	a ₁ : La Magdalena a ₂ : San Miguel a ₃ : La Chima
Antimicrobiana	B	b ₁ : <i>Escherichia coli</i> b ₂ : <i>Staphylococcus aureus</i> b ₃ : <i>Salmonella</i> spp b ₄ : <i>Bacillus</i> spp

Tabla 2. Factores y niveles de estudio para antimicrobiana

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se partió con la reanimación de las cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp y *Bacillus* spp fueron previamente caracterizadas y conservadas en el banco de microorganismos del laboratorio general de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Estatal de Bolívar.

Para la reanimación bacteriana de las 5 cepas de *E. coli* y las 5 cepas de *Bacillus* spp fueron realizadas en el medio Agar nutriente (7145A, Acumedia, USA), las 5 cepas de *Salmonella* spp en el medio XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) (7166^a, Acumedia, USA) y las 5 bacterias de *Staphylococcus aureus* se reanimaron en el medio MSA (agar sal manitol), para finalizar fueron incubadas a 37 °C durante 24 h a condiciones aeróbicas. Luego de reanimadas las bacterias, la actividad antimicrobiana del propóleo frente a las bacterias de interés se realizó mediante el método Kirby Bauer (difusión disco-placa), para lo cual, con un asa de siembra se tomó una proporción considerable de microorganismos reanimados y se colocó en tubos eppendorf para homogeneizar con agua salina hasta llegar a un nivel de turbidez de 0,5 McFarland. Posteriormente, con un hisopo estéril se procedió a sembrar los microorganismos en forma de estría simple en el medio Mueller Hinton. Con una pinza estéril se procedió a colocar los discos antibiogramas (de 6 mm de diámetro) previamente sumergidos en propóleo sobre la superficie del microorganismo cultivado. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 37 °C por 24 h a condiciones aeróbicas y finalmente con un calipper se midieron los diámetros de los halos de inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de la capacidad antioxidante de los propóleos

Mediante los análisis de espectrofotometría de los propóleos de los sectores: La Magdalena, San Miguel y La Chima, se desprendieron los siguientes resultados.

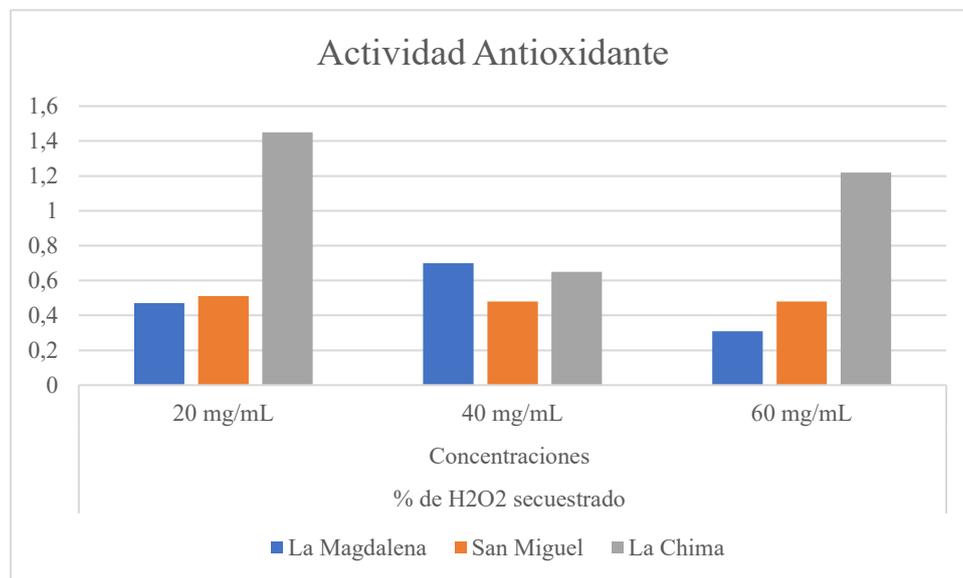


Figura 1. Actividad antioxidante del propóleo

Para la actividad antioxidante de los propóleos como se observa en la figura 1, se trabajó con tres concentraciones de 20, 40 y 60 mg/mL. La concentración más alta de la capacidad antioxidante fue a 20 mg/mL que correspondió al propóleo procedente de La Chima con un valor superior a 1,40% de H₂O₂ secuestrado, al concentrado de 40 mg/mL corresponde al propóleo procedente de La Magdalena con un resultado de 0,70 % H₂O₂ secuestrado y finalmente a la concentración 60 mg/mL pertenece al propóleo

adquirido de La Chima con una concentración de antioxidantes de 1,22% de H₂O₂ secuestrado. En conclusión, se determinó que el propóleo de La Chima a concentraciones de 20 y 60 mg/mL presenta mayor capacidad antioxidante, esto se puede atribuir a la flora circundante del sector, según Vilorio *et al.*,²⁰ menciona que los compuestos activos presentes en el propóleo dependen de la flora del lugar de donde se encuentra la colmena.

Origen del propóleo	Casos	Media LS	Grupos Heterogéneos
a ₃	6	1,10667	A
a ₁	6	0,495	B
a ₂	6	0,488333	B

Tabla 3. Pruebas de comparación de medias para el factor a (origen del propóleo)

En la tabla 3, se evidencia la presencia de dos grupos homogéneos y la media más alta corresponde al nivel a₃ con un valor de 1,10667% de H₂O₂ secuestrado, por lo tanto, el propóleo procedente de La Chima posee mayor concentración de antioxidante, esto debido a que el sector presenta vegetación abundante, lo que favorece a la formación de compuestos bioactivos, esto podemos corroborar con la investigación realizada por Arias²¹, donde informó que los propóleos procedentes de bosques ricos en vegetación presentaron mayor actividad antioxidante, del mismo modo, Sánchez¹⁷, menciona que los propóleos procedentes de rica en vegetación poseen muchos más compuestos fenólicos y la concentración de actividad antioxidante es más elevada.

Antioxidantes	Casos	Media LS	Grupos Heterogéneos
b ₁	6	0,81	A
b ₃	6	0,668333	B
b ₂	6	0,611667	B

Tabla 4. Pruebas de comparación de medias para el factor b (antioxidantes)

En la tabla 4, se evidencia la presencia de tres grupos heterogéneos y la media más alta pertenece al nivel b₁, por tal razón, el propóleo a una dilución de 20 mg/mL, presenta mayor concentración de antioxidantes con un resultado de 0,81% de H₂O₂ secuestrado, mientras que los niveles b₃ y b₂, la concentración de antioxidantes es relativamente baja. Por otro lado, Delgadillo²², evaluó la concentración de antioxidantes del propóleo a diluciones de 25 mg/mL; 50 mg/mL; 100 mg/mL y 200 mg/mL, donde la mayor concentración de antioxidantes se dio a una dilución de 200 mg/mL, del mismo modo, Carballo *et al.*,²³ analizó la actividad antioxidante en concentraciones de 12,5 y 100 µg/mg, donde la concentración de 100 µg/mg, resultó poseer mayor actividad antioxidante.

Resultados de la actividad antimicrobiana del propóleo

Actividad antimicrobiana frente a *E. coli*

Se presentan de manera general los promedios, las mismas que se realizaron con 5 cepas de *Escherichia coli*.

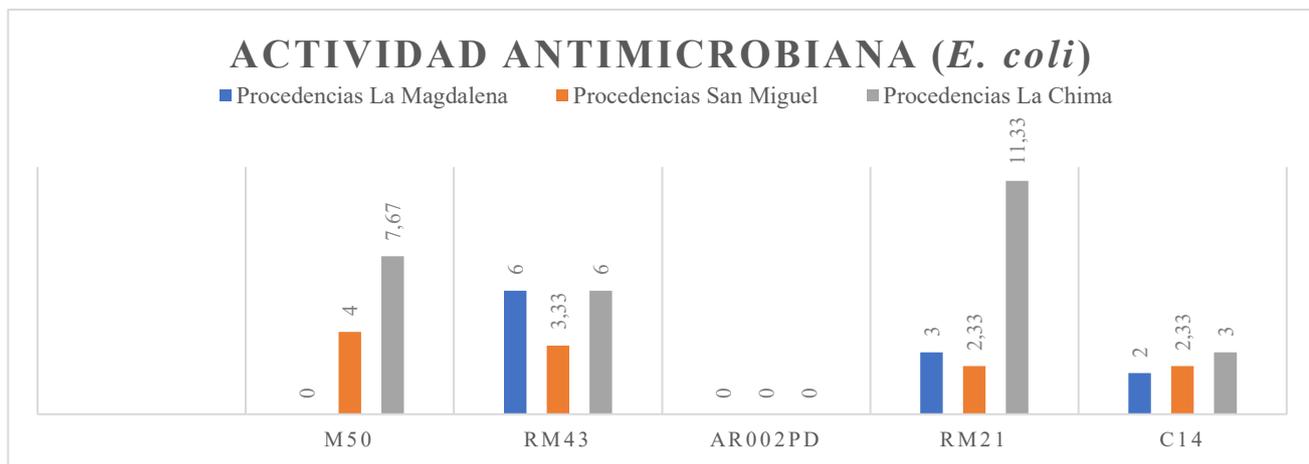


Figura 2. Actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (Halos de inhibición en mm)

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los propóleos (figura 2) frente a las 5 cepas de *Escherichia coli* se evidencian los halos de inhibición en mm, donde se observa que el propóleo de La Magdalena tiene 6 mm de diámetro de halo en la cepa RM43 el cual representa tener moderada actividad antimicrobiana, por otro lado, el propóleo de San Miguel en la cepa M50 presenta un diámetro de inhibición de 4 mm, mientras que el propóleo de La Chima con 11,33 mm de halo de inhibición en la cepa RM21 presentó mayor acción antimicrobiana, no obstante, la cepa AR002PD no presentó actividad antimicrobiana frente a los propóleos procedentes de La Magdalena, San Miguel y La Chima, en definitiva el propóleo procedente de La Chima tiene mayor actividad antimicrobiana con respecto a los propóleos de La Magdalena, San Miguel, esto debiendo atribuirse a la zona de recolección y a los métodos de obtención del propóleo.

Investigaciones realizadas muestran que los propóleos procedentes de distintos sectores varían en su efecto antimicrobiano. Vera & Vera²⁴, determinaron la actividad antimicrobiana en propóleo procedente de Tumbaco en Pichincha, donde mostraron moderada actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* con halos de inhibición de 10 mm de diámetro, Rodríguez *et al.*,¹ realizó la actividad antimicrobiana en los propóleos de distintos sectores, donde el mejor efecto antimicrobiano tiene un diámetro de halo de 15 mm de diámetro CLSI²⁵, determina que es resistente a *Escherichia coli* con un valor ≤ 14 mm de diámetros de halo, con respecto a nuestra investigación el propóleo procedente de La Chima presentó mayor actividad antimicrobiana con un halo de inhibición de 11,33 mm de diámetro, esto debido que La Chima se encuentra en una zona rural rica en vegetación lo que es un factor determinante para la composición química de los propóleos.

Velasquez & Montenegro²⁶, mencionan que la actividad antimicrobiana de propóleos está asociada a la respuesta microbiana de todas las especies, las propiedades antimicrobianas de los propóleos de abejas se le atribuye compuesto tales como: flavonoides galangina, pinocembrina y el ácido cinámico, estos compuestos desactivan la energía citoplasmática, inhabilitando la movilidad bacteriana, lo que le hace más vulnerables al ataque del sistema inmunológico y potenciando los antibióticos.

Actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* spp

La actividad antimicrobiana de los propóleos frente a las cepas de *Salmonella* spp, se presentan mediante los halos de inhibición en la figura 3.

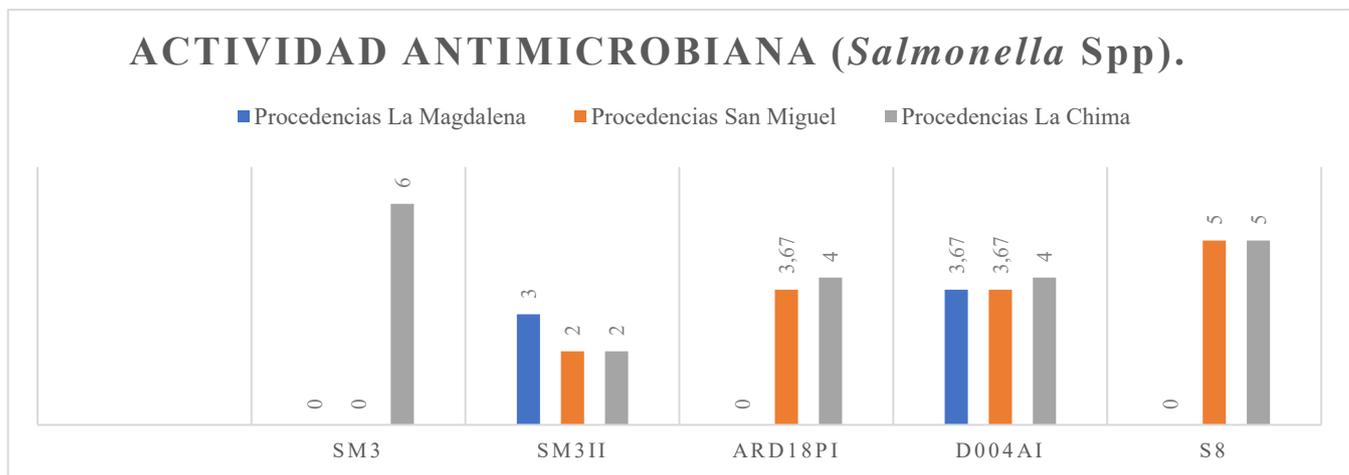


Figura 3. Actividad antimicrobiana frente a *Salmonella spp.* (Halos de inhibición en mm)

Los promedios de los halos de inhibición de las 5 cepas de *Salmonella spp* frente a los propóleos procedentes de La Magdalena, San Miguel y La Chima, se presenta en la figura 3, donde se evidencia que el propóleo de La Chima frente a la cepa SM3 presenta mayor actividad antimicrobiana con un halo de inhibición de 6 mm, asimismo, los propóleos de San Miguel y La Chima presentan un halo de inhibición de 5 mm de diámetro frente a la cepa S8, por otro lado, la cepa SM3 no presentaron actividad antimicrobiana frente a los propóleos procedentes de La Magdalena y San Miguel.

En la investigación realizada por Pulido *et al.*,²⁷ determinó los halos de inhibición según la escala Duraffourd, para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm se lo define como sensible, de tal forma que estos criterios determinan que las cepas de *Salmonella spp* son resistente al propóleo ya que sus halos de inhibición son menores a 14 mm. El mismo autor en el año 2019 encontró un halo de 7,33 mm de diámetro en el propóleo *in vitro*²⁸, estos resultados son similares al propóleo procedente de La Chima,

De manera contrapuesta Nuñez & Umanzor²⁹, identificaron zonas inhibitorias de 11 a 18 mm de diámetro en propóleos hidroalcohólicos, esta diferencia de resultados se debe especialmente al método de extracción de propóleos.

Actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*

En la figura 4, se presentan los halos inhibitorios de los propóleos procedentes de La Magdalena, San Miguel y La Chima, frente a las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*.

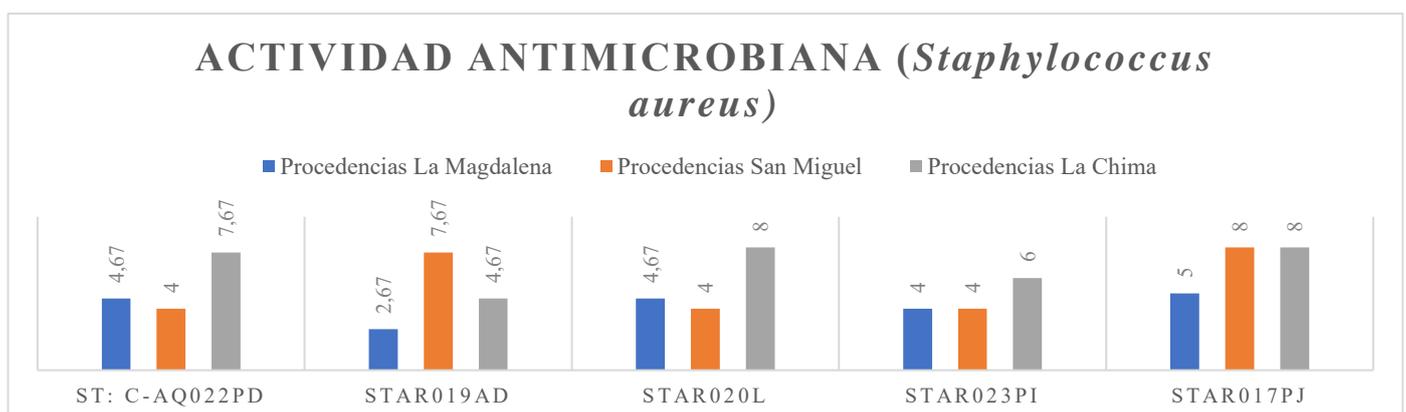


Figura 4. Actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (Halos de inhibición en mm)

Se realizó análisis de actividad antimicrobiana a los propóleos procedentes de los tres sectores en estudio, donde se demuestra que el propóleo de La Magdalena posee baja acción antimicrobiana a excepción de la cepa STAR017PJ que posee un valor más alto de tamaño de halo con 5 mm de diámetro, del mismo modo, los propóleos de San Miguel y de La Chima frente a la misma cepa de STAR017PJ, presenta un halo de inhibición de 8 mm de diámetro, el cual representa alta actividad antimicrobiana frente a las demás cepas.

La investigación realizada por Guaraca-Merchán & Palomino¹⁰ determinó la actividad antimicrobiana de los propóleos frente al microorganismo *Staphylococcus aureus*, donde su halo de inhibición fue de 7,5 mm de diámetro. Fonseca³⁰, demostró un halo de inhibición de propóleo frente a *Staphylococcus aureus* de 9 mm de diámetro, además Pulido *et al.*,²⁸, demostraron la actividad antimicrobiana in vitro del propóleo un halo inhibitorio de 8 mm de diámetro, realizando un análisis comparativo, los resultados adquiridos por los autores son similares a los resultados del propóleo de La Chima y San Miguel, donde determinaron que la bacteria evaluada es sensible al propóleo, por lo tanto, los propóleos de estos dos sectores pueden ser utilizados en la fabricación de antibióticos para el control de *Staphylococcus aureus*.

Actividad antimicrobiana frente a *Bacillus* spp.

La actividad antimicrobiana de los propóleos en estudio frente a las cepas bacterianas de *Bacillus* spp, se presentan los resultados mediante la medición de las zonas de inhibición, como se presenta a continuación en la figura 5.

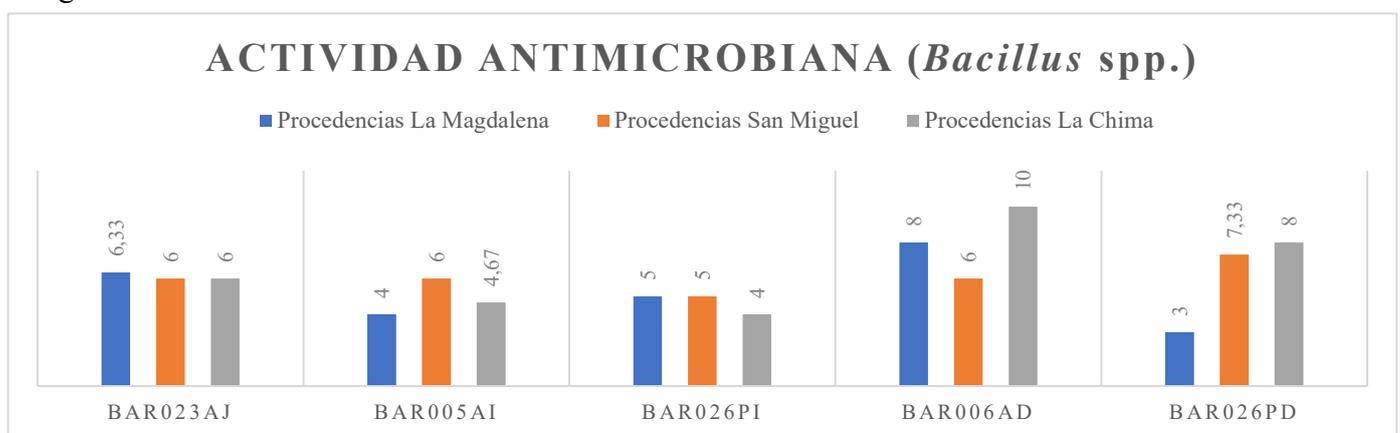


Figura 5. Actividad antimicrobiana frente a *Bacillus* spp. (Halos de inhibición en mm)

Los promedios de los halos de inhibición se presentan en la figura 5, donde se demuestra que el propóleo procedente de La Magdalena presenta alta actividad antimicrobiana frente a la cepa BAR006AD con un halo inhibitorio de 8 mm de diámetro, por otra parte, el propóleo de San Miguel frente a la cepa BAR026PD presentó un halo de inhibición de 7,33 mm de diámetro valor que representa mayor actividad antimicrobiana frente a las demás cepas, por último, el propóleo de La Chima con mayor actividad antimicrobiana presenta la cepa BAR006AD con un halo de inhibición de 10 mm de diámetro, por esta razón el propóleo de La Chima tiene mayor actividad antimicrobiana, esto debido a que la zona donde se adquirió el propóleo de vegetación abundante.

Rico-López³¹, indaga la actividad antimicrobiana en los propóleos frente a *Bacillus* spp, donde encontraron zonas inhibitorias de 6,5 mm de diámetro, por otro lado, Sosa *et al.*,³², en los ensayos realizados de la actividad

antimicrobiana del propóleo de semillas de plantas frente a *Bacillus* spp, demostraron no ser efectivas en dichos propóleos, mientras que en nuestra investigación el propóleo de La Chima presentó mayor acción antimicrobiana frente a la cepa de *Bacillus* BAR006AD con 10 mm de diámetro, esta diferencia de resultados se debe al lugar de procedencia y al método de extracción de estos propóleos.

Pese en nuestro trabajo se apreció un mayor efecto antimicrobiano del propóleo de una zona frente a las cepas de bacterias Gram -, en el trabajo de revisión sistemática desarrollado por Przybyłek y Karpiński ³³, demostraron que el propóleo es más efectivo frente a bacterias Gram positivas, esto puede deberse específicamente a la región de la cual es extraído el material biológico.

CONCLUSIONES

El propóleo se ha utilizado históricamente con fines medicinales y se ha demostrado que tiene propiedades terapéuticas, antiinflamatorias, analgésicas y antisépticas. La investigación se centró en estudiar la actividad antioxidante y antimicrobiana del propóleo y su aplicación en la Agroindustria.

El propóleo de La Chima mostró la mayor concentración de antioxidantes a ciertas diluciones y fue más efectivo contra *Escherichia coli* en comparación con otros propóleos.

En resumen, el propóleo de La Chima se destaca como un tratamiento eficaz y podría utilizarse como conservante natural en la industria alimentaria.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Universidad Estatal de Bolívar por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto PIV-66-2021, “Desarrollo y optimización de métodos analíticos para la extracción y cuantificación de polifenoles en matrices vegetales” RCU-001-2022-007.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés

REFERENCIAS

1. Rodríguez Pérez B, Canales Martínez M, Guillermo J, Carrillo P, Cruz Sánchez A. Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of Mexican propolis [Internet]. Available from: <http://doi.org/10.15174.au.2020.2435>
2. Ríos R. Caracterización físico química, antibacteriana y antioxidante de proóleo de Melipona eburnea de la región Amazónica. Univ Tec Ambato [Internet]. 2017;1–75. Available from: [https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/26403%0Ahttp://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26403/1/Tesis 104 Medicina Veterinaria y Zootecnia -CD 525.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/26403%0Ahttp://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26403/1/Tesis%20104%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-%20CD%20525.pdf)
3. Salamanca G. Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo. [Internet]. 2017. Available from: <http://repository.ut.edu.co/handle/001/3130>
4. Susana J, Navarro A, Lezcano MR, Mandri MN, Gili MA, Zamudio ME. Del Propóleo. Raao. 2018;58:50–3.

5. Arroyave, D., Molina, M., Ramírez, J., Vallejo, L., & Vélez V. Comparación de la efectividad antimicrobiana in vitro de un extracto hidroalcohólico de propóleo y un enjuague basado en cloruro de Cetilpiridinio: Un tamizaje piloto. Univ Coop Colomb [Internet]. 2021;1–23. Available from: http://scienti.colciencias.gov.co:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000141070
6. Guanche Gallardo D, Guanche Gallardo D. Evaluación de diferentes extractos de propóleos. Rev CENIC Ciencias Biológicas [Internet]. 2022;53(3):243–51. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24502022000300243&lng=es&nrm=iso&tlng=es
7. Herrera-Ortiz RN. Extracción y caracterización parcial de un extracto bioactivo oleoso de propóleos de *Melipona beecheii*. 2021;1–72.
8. Balboa N, Alvear M. Balboa et al. Efecto antimicrobiano de un propóleos chileno. 2018;17(6):541–54.
9. Rebaza R, Amaya L, Gutiérrez A, Haro R, Tumbajulca M, Valera F, et al. Aplicación del propóleo en envasado activo. Agroindustrial Sci. 2016;6(2):239–52.
10. Guaraca Merchán, A & palomino D. Estudio de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica. Univ Politécnica Sales [Internet]. 2018;88. Available from: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14947/1/UPS-CT007371.pdf>
11. World Health Organization. Antibiotic resistance. [Internet]. WHO. 2019. p. 1. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
12. Sabatier JM, Bakare OO, Gokul A, Fadaka AO, Wu R, Niekerk LA, et al. molecules Plant Antimicrobial Peptides (PAMPs): Features, Applications, Production, Expression and Challenges. 2022; Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules27123703>
13. Bayas-Morejón F, Ramón R, Núñez D, Mite-Cárdenas G. Antibacterial and antioxidant effect of natural extracts from *baccharis latifolia* (Chilca). Casp J Environ Sci. 2020;18(5):489–93.
14. World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. [Internet]. WHO. 2015. p. 1. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>.
15. Satán S. Diagnóstico de *Escherichia coli* como indicador de calidad sanitaria del agua y alimentos. Univ Nac Chimborazo [Internet]. 2021;3(1):1689–99. Available from: <http://journal.unilak.ac.id/index.php/JIEB/article/view/3845%0Ahttp://dspace.uc.ac.id/handle/123456789/1288>
16. Villar-Ledo L, Ledo-Ferre MC. Aplicación de herramientas estadísticas para el análisis de indicadores Application of statistical tools for indicators analysis.
17. Sánchez Hernández A. Características antioxidantes de propóleos de diferentes orígenes geográficos. 2018; Available from: <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/109879>
18. Gamarra M. Determinación de temperatura y pH para la optimización de la actividad proteolítica

- alcalina de *Bacillus* sp. aislados de tierras de cultivo de *Zea mays*. Univ Nac Mayor San Marcos [Internet]. 2020;1(1). Available from: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/15239/Gamarra_cm.pdf?sequence=1&isAllowed=y
19. Randall J. Ruch, Shu-jun Cheng JEK. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, Carcinogenesis, [Internet]. 1989;10(6):1003–1008. Available from: <https://doi.org/10.1093/carcin/10.6.1003>
 20. David Vilorio JB, Humberto Gil JG, Luís Durango DR, Mario García CP. Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del bajo cauca antioqueño (Antioquia, Colombia) physicochemical characterization of propolis from the region of bajo cauca antioqueño (Antioquia, Colombia) caracterização físico-química da própolis da região de bajo cauca antioqueño (Antioquia, Colômbia). Vol. 10, Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Enero-Junio; 2012.
 21. Enrique Rodríguez Rodríguez L, Góngora Amores W, Escalona Arias A, Beatriz Miranda Bazán M, Batista Suárez S, Bermúdez Cisneros Y. Optimización de la extracción alcohólica para la obtención de soluciones concentradas de propóleos [Internet]. Vol. 44, Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 2015. Available from: www.farmacia.unal.edu.co
 22. Delgadillo D. Evaluación de la actividad antioxidante y antibacteriana de extractos etanólicos de propóleos de abejas sin aguijón (Apidae Meliponini) del Estado de Veracruz. Univ Son Hermosillo [Internet]. 2016;34–6. Available from: <http://www.repositorioinstitucional.uson.mx/handle/20.500.12984/1304>
 23. Carballo LF, Takahashi JA, Solares MD, Santos DS, Osorio NPD, Osorio AMB, et al. Antioxidant activity of ethanolic extracts and essential oils from *gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex walp. and propolis from *melipona beecheii* bennett | Actividad antioxidante de extractos etanólicos, aceites esenciales de *gliricidia sepium* (Jacq.) kunth. Rev Cuba Plantas Med. 2019;24(4):1–15.
 24. Vera, D Vera F&. Actividad antimicrobiana del propóleo de abejas mestizas de *Apis mellifera* carnica y *Apis mellifera* ibérica de tumbaco en Pichincha (Ecuador). Univ Guayaquil. 2019;
 25. CLSI. CLSI M100-ED29: 2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition. Vol. 40, Clsi. 2020. 50–51 p.
 26. Velasquez D and Montenegro S. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*. Rev Investig Agrar y Ambient [Internet]. 2017;8(1):182–93. Available from: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/download/1848/2229>
 27. Pulido LM, Mendoza Y, Martínez A. Evaluación de la actividad antimicrobiana y sensorial del propóleo utilizado como desinfectante en áreas pecuarias. Rev Gipama [Internet]. 2021;3(1):89–96. Available from: <https://revistas.sena.edu.co/index.php/gipama/article/view/4780>
 28. Marina L, Peñaloza P, Del A, Martínez C. Antimicrobiana del propóleo frente a patógenos por alimentos in vitro preliminary evaluation of the antimicrobial activity of propolis against pathogens causing Resumen Introducción. 2019;5:60–6.
 29. Nuñez, J. & Umazor A. Estudio del efecto antibiotico de un extracto de propoleos y ciprofloxacina

- contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Univ El Salvador [Internet]. 2020;1–23. Available from: <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/23076/1/16103793.pdf>
30. Fonseca E. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (kunth) kuntze) frente a patógenos de enfermedades respiratorias (*Staphylococcus aureus* atcc: 25923, *Streptococcus pyogenes* atcc: 19615, *Streptococcus*. Univ Politécnica Sales Sede Quito [Internet]. 2016;1–100. Available from: [http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf%0Afile:///C:/Users/Usuario/Desktop/Camila/papers 1/31.pdf](http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf%0Afile:///C:/Users/Usuario/Desktop/Camila/papers%201/31.pdf)
31. Rico E. Optimización de un método de obtención de extracto etanólico de propóleo en base al poder antimicrobiano. Tesis Maest la Univ Politécnica Val. 2017;2015–7.
32. Sosa Á, Cabrera M, Álvarez M. Vegetación de origen como parámetro de caracterización microbiana de los propóleos Origin vegetation as a parameter for characterization antimicrobial of propolis. Selva Andin Biosph [Internet]. 2016;4(1):3–23. Available from: http://www.scielo.org.bo/pdf/jsab/v4n1/v4n1_a02.pdf
33. Przybyłek I, Karpí TM, Majtan J. molecules Antibacterial Properties of Propolis. 2019; Available from: www.mdpi.com/journal/molecules

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation. Verdezoto Bósquez A, Bayas-Morejón F, Monter D, Cuenca García Y, Lema Osorio .Análisis de la actividad antioxidante y antimicrobiana del propóleo en la provincia Bolívar, Ecuador.Revis Bionatura 2023;8 (4) 8. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.8>

Additional information Correspondence should be addressed to fbayas@ueb.edu.ec

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Aplicación de geomática y análisis de suelo para la determinación de áreas inestables en el cerro Cuchicahua del cantón Chillanes, provincia Bolívar

Geomatics application and ground analysis for the determination of unstable areas in Cuchicahua's hill in the Chillanes region, Bolívar province

Luis Villacis Taco¹ ; Carlos Ramírez Chimbo¹; Geomayra Meléndez Carrasco¹ ; Mayra Toalombo Tacuri^{1*}

¹Universidad Estatal de Bolívar, Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira. Provincia Bolívar, Guaranda Ecuador: lhvillacis@ueb.edu.ec; cramirez@ueb.edu.ec; gmelendez@mail.es.ueb.edu.ec;

*Autor de correspondencia: maytoalombo@mail.es.ueb.edu.ec

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.9>

RESUMEN

El cerro Cuchicahua, en el cantón Chillanes ha venido dando preocupantes muestras de inestabilidad, tanto por la materialización de deslizamientos hacia la vía principal cuanto por la presencia de cárcavas o grietas que de acuerdo a la población han venido aumentando en cantidad y tamaño.

Por esta razón se realizó un estudio de determinación de zonas inestables con base en la morfología del cerro y el tipo de suelo que presenta, para lo cual se utilizó un modelo digital de elevación y el análisis de laboratorio donde se identificó la composición y textura del suelo de varias muestras tomadas en zonas consideradas críticas.

Mediante el uso de la geomática a través del modelo SHALSTAB que trabaja bajo la aplicación de la ley de Mohr-Coulomb se ingresaron los datos del DEM de la zona geográfica en la que se encuentra el cerro, así como el ángulo de fricción y densidad del suelo los cuales fueron obtenidos del análisis de la textura del suelo en laboratorio. Al ser procesados estos datos se pudo determinar que gran parte del cerro presenta una inestabilidad crónica, convirtiéndose en un riesgo potencial para la población, ya que en caso de materializarse un deslizamiento de grandes magnitudes, las afectaciones se verían hasta el centro del área consolidada de la población de Chillanes.

Palabras clave: Cuchicahua; inestabilidad; geomática; Chillanes; deslizamientos

ABSTRACT

Cuchicahua's hill, in the Chillanes region, has been giving preoccupying signs of instability, so much so for the landslides materialization towards the main highway and the formation of gullies or cracks that, according to the local population, has been increasing in quantity and size.

For this very reason, a study of the determination of unstable zones has been made based on the morphology of the hill and the type of ground that it presents, for which a digital model of elevation was used and a laboratory analysis, where the composition and texture of several samples of land was identified in zones considered critical.

Through the use of geomatics, using the SHALSTAB model that works under the Mohr-Coulomb law, the data of the geographic zone of the hill's location was introduced into the *DEM data*, as well as de friction angle and the ground density, which were obtained through the examinations of the samples.

After the data was processed, it could be stated that a big part of the hill presents a chronic instability, that could lead to potential risk for the population, given that in case of landslide materialization of large magnitudes, the affectations would be seen up in the center area of Chillane's consolidated population.

Keywords: Cuchicahua; instability; geomatic; Chillanes; landslides

INTRODUCCIÓN

Ecuador, por ser parte del Cinturón de Fuego del Pacífico, se encuentra localizado en una zona de intensa actividad sísmica, tectónica y volcánica, lo que ha provocado deformaciones superficiales traducidas en procesos de geodinámica externa que, combinados con factores climáticos, sísmicos y antrópicos, han dado lugar a procesos intensos de erosión, movimientos en masa e inundaciones recurrentes que han causado ingentes pérdidas socio - económicas y vidas humanas¹.

El cantón Chillanes se encuentra expuesto a amenazas de origen natural y antrópico, las cuales vienen generando importantes afectaciones a la población desde hace varios años. Un caso particular es el riesgo de deslizamiento del cerro Cuchicahua, el cual se encuentra a 480 metros aproximadamente de la vía principal de ingreso al cantón y a una distancia de 1250 metros aproximadamente del parque central; en caso de materializarse un macro deslizamiento afectaría en grandes proporciones al área consolidada del centro cantonal, tanto en la parte de infraestructura, como también interrumpiendo el desarrollo de actividades en la agricultura, ganadería, silvicultura, pesca, manufactura y comercio al cantón en general.

En la figura 1 a continuación se muestra la ubicación del área de estudio, objeto de la investigación.

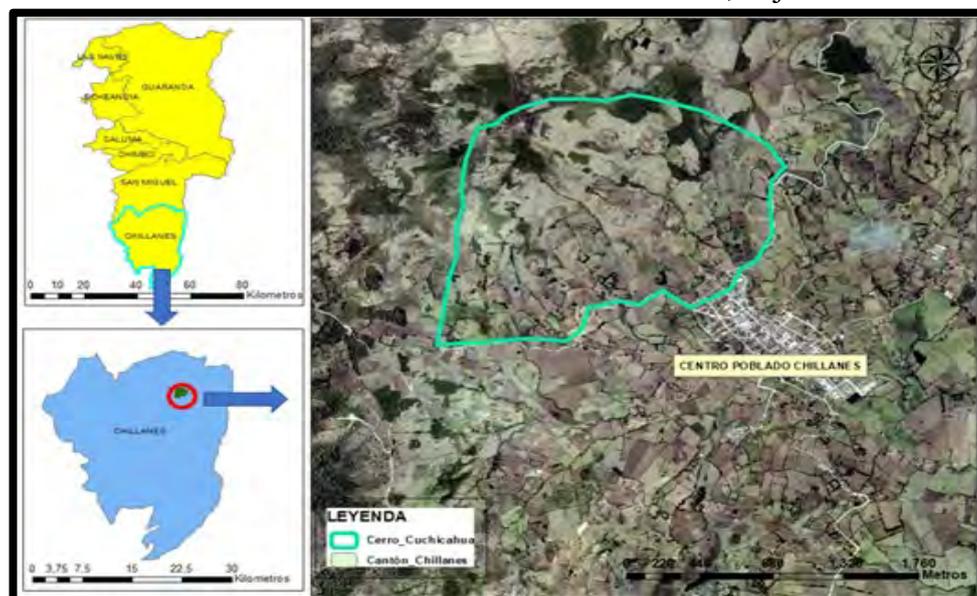


Figura 1. Ubicación de cerro Cuchicahua del cantón Chillanes

Debido a la geomorfología que presenta el territorio del cantón Chillanes, conformada por cerros de mediana altura con fuertes pendientes, las rocas presentan un comportamiento mecánico corriente, que, en combinación con otros factores como la deforestación, la pendiente y los severos fenómenos meteorológicos conforman las causas fundamentales para el desarrollo de los deslizamientos².

En la última temporada de lluvias ocurridas en la provincia Bolívar, sobre todo en el cantón Chillanes, se ha notado una sobresaturación del suelo originando grietas de diferentes dimensiones en el cerro Cuchicahua, las cuales fueron evidenciadas por los moradores del sector, generando mayor preocupación, por lo que se vieron en la necesidad de informar a las autoridades como mediante redes sociales del riesgo potencial que representaría el deslizamiento.

Los deslizamientos son fenómenos gravitacionales provocados por los efectos de los sismos, erupciones volcánicas y lluvias intensas entre otros factores. Estos pueden ocurrir en cuestión de pocos segundos o mantenerse en acción lenta por una semana o, incluso, más tiempo lo cual genera el interés investigativo por la problemática que está presente dentro de la población del cantón³.

Para determinar áreas susceptibles de deslizamiento, se pueden aplicar diversas metodologías que dependen de la escala de trabajo o nivel de detalle en el que se quieren obtener los resultados, pudiendo ir desde zonificaciones para territorios geográficamente amplios en escalas pequeñas hasta análisis de estabilidad de taludes y factores de seguridad desde el punto de vista de la geotecnia e ingeniería civil que son trabajos a escalas grandes o de gran nivel de detalle. Para el caso particular del cerro Cuchicachua, por tratarse de una unidad geomorfológica importante se decidió aplicar un estudio de mediana a gran escala como son las metodologías cartográficas, pero combinándolo con análisis de muestras de suelo, lo cual permitió obtener resultados con mayor precisión que fueron validados y verificados en el terreno; todo esto integrado mediante el uso de geomática aplicada.

La Geomática, es un término científico moderno que sirve para expresar la integración sistémica de técnicas y metodologías de adquisición, almacenamiento, procesamiento, análisis, presentación y distribución de información geográficamente referenciada⁴.

Estos datos espaciales provienen del análisis y de mediciones hechas con diversas técnicas empleadas en disciplinas tales como: la geodesia y la topografía, la cartografía, la teledetección o percepción remota, la fotogrametría, la geoestadística o análisis espacial, los Sistemas de Posicionamiento Global de Navegación por Satélite (GPS) y los Sistemas de Información Geográfica (SIG).

En el caso específico de este estudio se usó el módulo SHALSTAB, el cual se basa en una forma de pendiente infinita de la ley de falla de Mohr-Coulomb (Estabilidad de ladera) en la que el componente cuesta abajo del peso del suelo justo en el fallo, t , es igual a la fuerza de resistencia causada por la cohesión (cohesión del suelo y / o fuerza de la raíz), C , y por la resistencia a la fricción debido a la tensión normal efectiva en el plano de falla⁵.

Por otro lado, la densidad real se define como la densidad de la totalidad de las partículas del suelo. Se expresa como la relación entre la masa de partículas sólidas y el volumen del sólido, excluyendo, por lo tanto, los espacios porosos. Las unidades más comunes de expresión son $g\ cm^{-3}$ y $Mg\ m^{-3}$.

Para la determinación de la densidad real debe conocerse la masa de suelo y el volumen del mismo. La primera es determinada por pesada; el volumen real es un valor más complicado de establecer pues debe eliminarse totalmente el aire del suelo. La determinación es a través de la psicometría, el procedimiento significa la aplicación del principio de Arquímedes, es decir, determina qué volumen de agua desplazan los sólidos al ser sumergidos.

En cuanto al ángulo de fricción crítico ϕ_c se refiere al parámetro del suelo porque es un valor que una vez alcanzado no varía durante el proceso de deformación o de carga. El ϕ_c es una relación de los esfuerzos principales en el estado crítico y es importante para los modelos constitutivos, ya que define el estado crítico o último propio de cada material.

El estado crítico o último de un material está definido como la fase en la cual el material continúa deformándose indefinidamente sin presentarse cambios en el esfuerzo efectivo aplicado y en el volumen.

Tradicionalmente se considera el ángulo de fricción crítico igual que el ángulo de reposo ($\phi_c = \phi_{rep}$). El ϕ_c se obtiene de ensayos triaxiales monotónicos o de ensayos de corte simple. El ϕ_{rep} se obtiene a partir de diferentes métodos; uno de los métodos aplicables a materiales granulares es la construcción de una pila por medio de un embudo. ϕ_c es reemplazado por ϕ_{rep} dado lo dispendioso y complejo de los ensayos necesarios para determinar ϕ_c comparados con los métodos para obtener ϕ_{rep} y la similitud de los resultados obtenidos

(Herle y Gudehus, 1999). Esta simplificación se hace debido a que uno de los objetivos de los modelos constitutivos es obtener los parámetros del suelo de la forma más sencilla posible. Sin embargo, investigaciones previas demuestran que factores como rugosidad de la base, tamaño de la pila, tamaño y distribución de las partículas, densidad de la pila, efectos dinámicos, entre otros, influyen significativamente en el valor de ϕ_{rep} ⁶.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo estuvo definido por la obtención y preparación de dos tipos de insumos que se integraron mediante el uso de la geomática. Estas dos fases fueron:

a) FASE 1: Modelo digital de elevación

Para este apartado fue necesario descargar un raster que cubre el cantón Chillanes mediante un modelo digital de elevación (MDE) con una resolución de 12,5m. El servicio usado corresponde a la NASA a través del sensor ALOS PALSAR. Debido a la ubicación del cantón y el cerro, las imágenes estuvieron disponibles en dos imágenes diferentes consecutivas, las cuales fueron insertadas en el software ArcGIS 10.5 con el fin de mediante la creación de un mosaico obtener un solo producto de MDE.

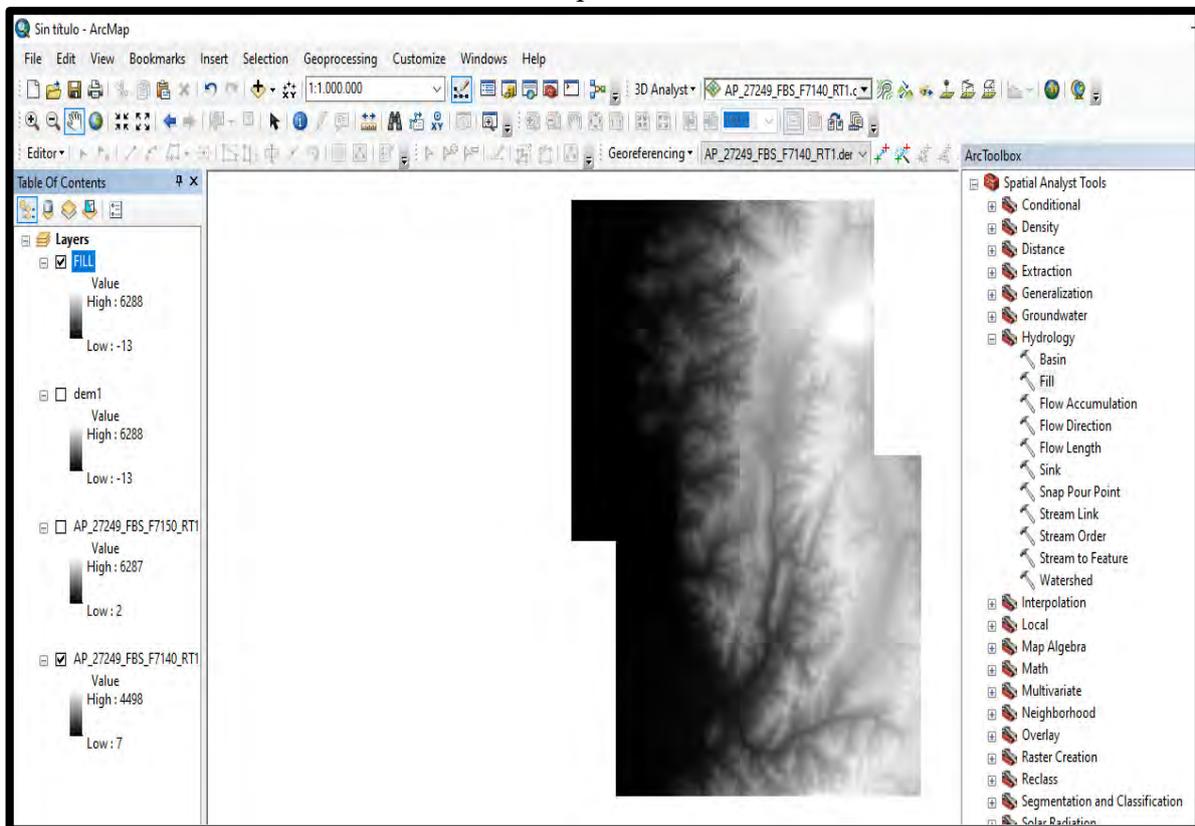


Figura 2. Modelo digital de elevación.

Luego de la obtención del MDE se procede a correr la imagen en la herramienta de shalstab dando como resultado el contorno del mapa, mapa de pendientes y el área de contribución.

b) FASE 2: Características del suelo

Para este proceso se definieron tres sectores de interés en el cerro Cuchicahua:

- 1.- Deslizamiento materializado,
- 2.- Zona de grietas y
- 3.- Cima del cerro;

de las cuales fueron extraídas muestras de suelo, cada uno de 500g de tierra con la finalidad de realizar el análisis en laboratorio para determinar la textura y densidad real del suelo.

Ubicación	Longitud (°)	Latitud(°)
Punto 1 Deslizamiento	- 79.067833	-1.934862
Punto 2 Grietas	-79.073994	- 1.934256
Punto 3 Cima del cerro	-79.080815	-1.9228794

Tabla 1. Ubicación de las muestras de suelo

Ensayos de laboratorio

Mediante el uso del laboratorio de la Universidad Estatal de Bolívar se implementó la metodología del Picnómetro la cual permite determinar la densidad real del suelo seco y la metodología de bouyoucos determinando la textura del suelo, cada muestra de suelo tiene 3 réplicas de análisis con el propósito de mejorar esta investigación.

El método más común es el uso del picnómetro. Este es un frasco aforado que se cierra mediante un tapón provisto de un capilar asegurando el volumen constante en el interior del aparato. El volumen del suelo se mide en función del volumen de agua desplazada⁷.

Se pesa en balanza de precisión 10 g de suelo tamizado por 2 mm, seco en estufa. Se designa como m1. Luego, se llena con agua destilada un picnómetro de 50 cm³, se tapa, se seca bien y se pesa en balanza de precisión; esta pesada se denomina m2. Finalmente, se vacía el picnómetro y se introducen los 10 g de suelo pesado anteriormente (m1), completar el volumen de agua destilada y tapar con cuidado de no dejar burbujas de aire en su interior. Secar y pesar nuevamente obteniéndose m3.

$$D = \frac{m}{v} \quad (1)$$

m1: 20 g de muestra seca v: volumen de la muestra en el interior del picnómetro expresado por la diferencia de masa entre (m1 + m2) – m3. Reemplazando:

$$Dr = \frac{m_1}{(m_1 + m_2) - m_3} \quad (2)$$

El valor promedio de la densidad real en suelos minerales es de 2,65 g cm³, densidad del cuarzo, uno de los minerales más abundantes del suelo.

La textura indica el contenido relativo (porcentaje en peso) de partículas de varios tamaños, más específicamente, arena, limo y arcilla en el suelo. La textura influye en la facilidad con la que se puede trabajar el suelo, la cantidad de agua y aire que retiene y la velocidad a la que el agua puede entrar y moverse a través del suelo⁸.

Los métodos más usados para determinar la textura en laboratorio son el método de la pipeta de Robinson y el del hidrómetro de Bouyoucos. Ambos métodos se basan en la ley de Stokes, que establece una relación entre el tamaño de las partículas y la velocidad de sedimentación. Por lo tanto, las partículas se evalúan por sus velocidades de sedimentación en una suspensión en agua que se puede usar para cuantificar el tamaño de las partículas.

En el método de Bouyoucos, el tamaño de los sólidos en suspensión se estima a partir de la densidad de la solución medida con un hidrómetro (densímetro), a diferentes tiempos. Las lecturas son corregidas por la temperatura de la suspensión. A medida que se sedimentan las partículas, la densidad de la solución disminuye.

Diagrama de implementación

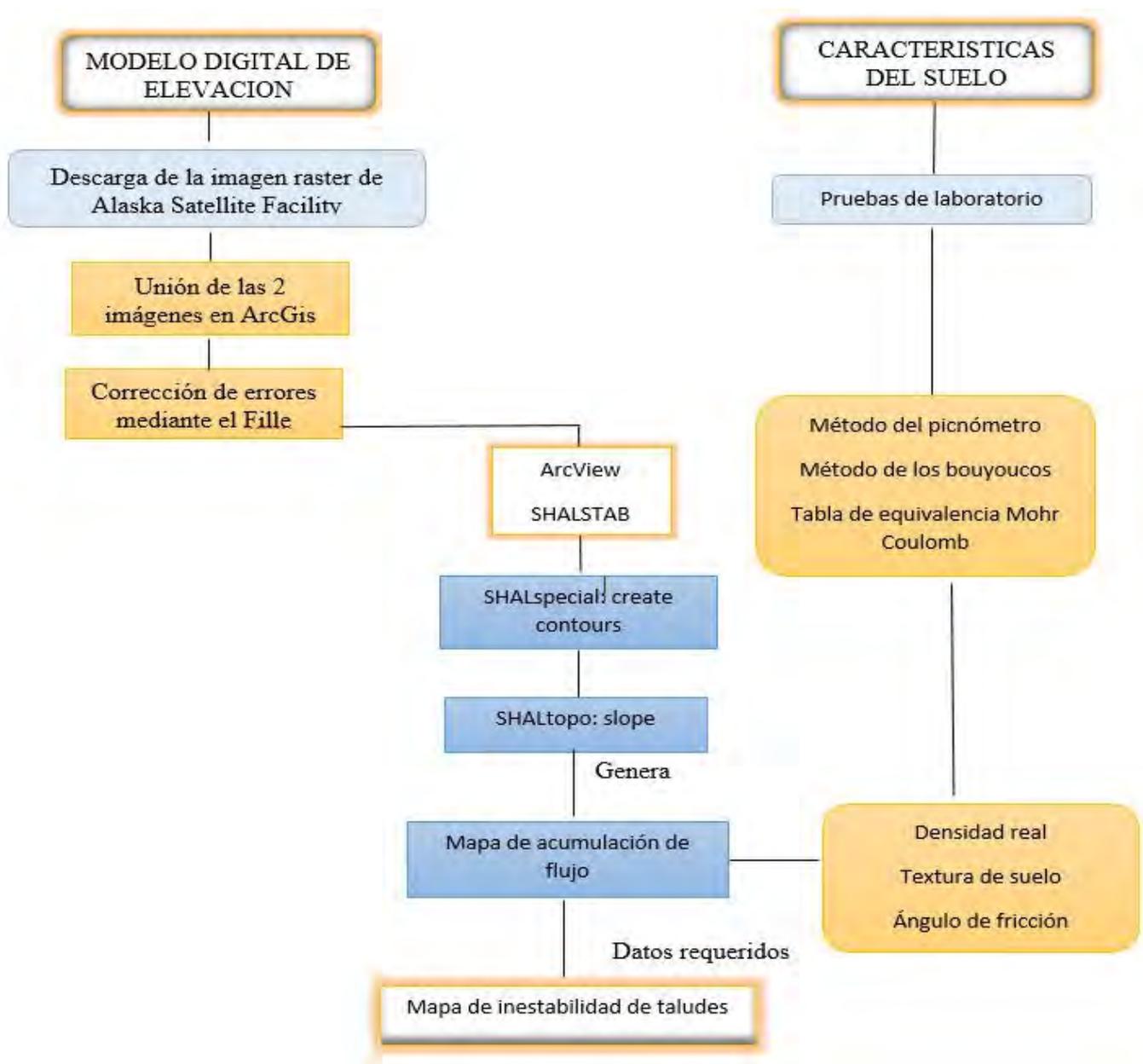


Figura 3. Diagrama de flujo para la implementación de los insumos requeridos

RESULTADOS

Resultados del procesamiento en la herramienta de SHALSTAB

La imagen MDE es insertada en Arcview con un intervalo de 10 metros, dando como resultado las curvas de nivel del cantón Chillanes.

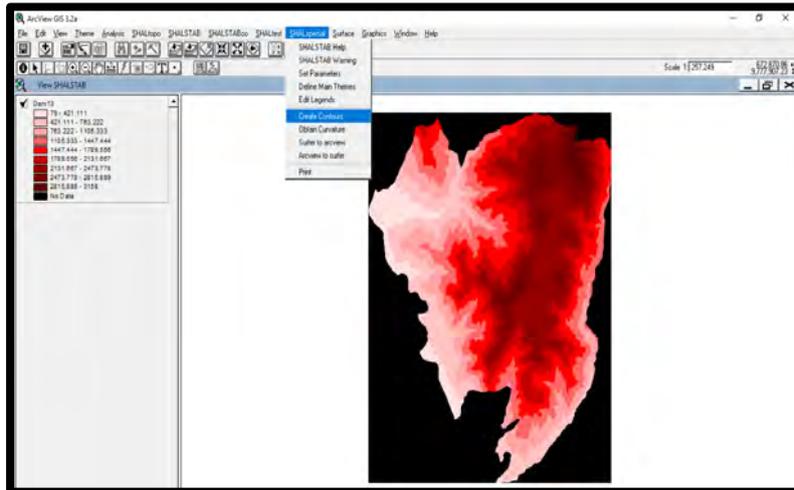


Figura 4. Contorno del mapa del cantón Chillanes.

Con las curvas de nivel se procedió a obtener el mapa de pendientes del cantón.

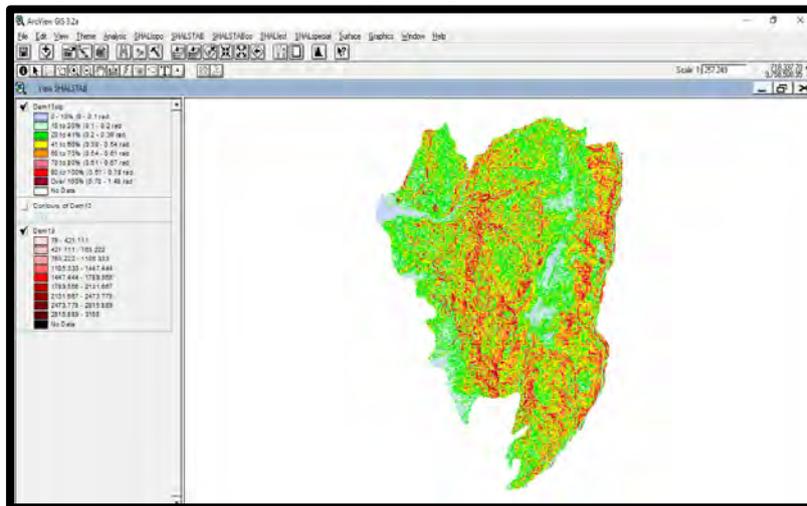


Figura 5. Mapa de pendientes de la zona de Chillanes.

Con el mapa de pendientes listo se dio paso a obtener el área de contribución.

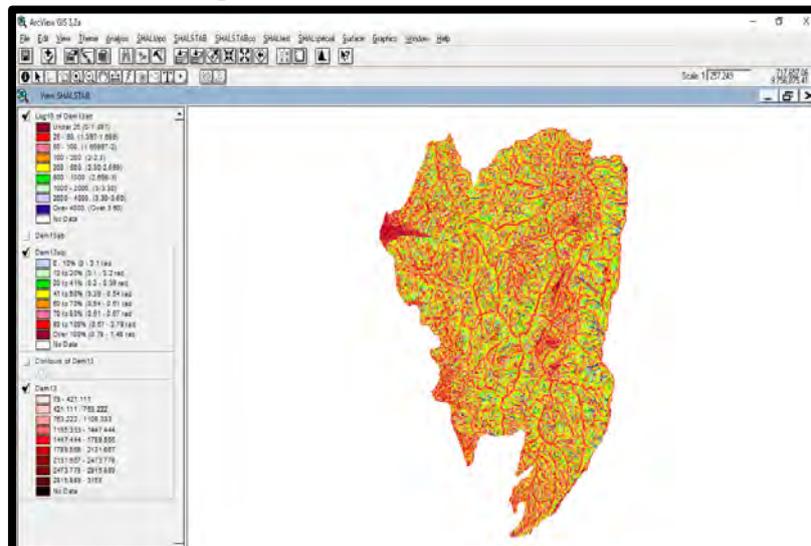


Figura 6. Resultado del área de contribución del cantón Chillanes.

Resultados de los ensayos de laboratorio

Con los resultados obtenidos en el laboratorio se procedió a sacar la media para así trabajar con un solo dato.

 DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN		LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN <small>Lagunacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.</small>		Código	FGG12-01	
		INFORME DE RESULTADOS		Versión	1	
				Año	2022	
				Página	Página 1 de 2	
INFORME N° 141-2022						
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA						
Solicitante	Geomayra Meléndez- Mayra Toalombo					
Muestra	Suelo Cerro Cuchicahua					
Código asignado UEB	INV 247- INV 248- INV 249					
Estado de la muestra	Sólido					
Envase de recepción	Funda ziploc					
Análisis requerido(s)	Determinación de textura y densidad real					
Fecha de recepción	07/10/2022					
Fecha de análisis	11-12/10/2022					
Fecha de informe	13/10/2022					
Técnico (s) asignado	MIPV					
RESULTADOS OBTENIDOS						
Código	Identidad de la muestra	Parámetro	Unidad	Método de análisis	Resultado	Promedio
INV 247	Deslizamiento/G asolinera-R1	Densidad Real en suelo seco	g/cm ³	Método del picnómetro	1,499	1.467
	Deslizamiento/G asolinera-R2				1,439	
	Deslizamiento/G asolinera-R3				1,463	
INV 248	Grietas- R1	Densidad Real en suelo seco	g/cm ³	Método del picnómetro	2,471	2.435
	Grietas- R2				2,407	
	Grietas- R3				2,427	
INV 249	Antenas- R1	Densidad Real en suelo seco	g/cm ³	Método del picnómetro	1,491	1.353
	Antenas- R2				1,302	
	Antenas- R3				1,267	

Figura 7. Resultados del laboratorio de la densidad del suelo

Código	Resultado
INV 247	1.467
INV 248	2.435
INV 249	1.353
Promedio	1.752

Tabla 2. Promedio final de la densidad del suelo

En este apartado según los resultados del tipo de suelo se escogió el porcentaje más alto que predomina en el cerro Cuchicahua.

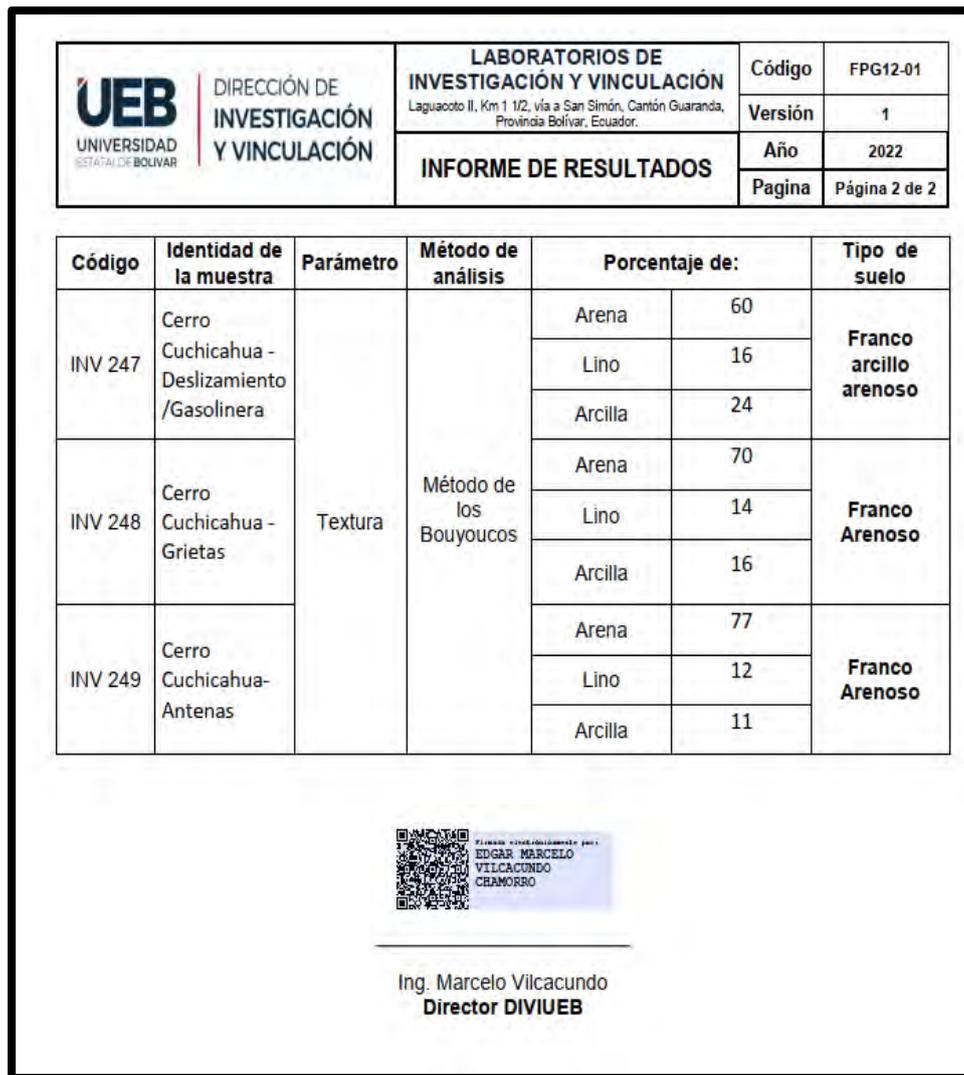


Figura 8. Resultados de la textura del suelo

Mediante la incorporación del procesamiento de SHALSTAB y los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio se tiene como resultado el q/t de las zonas inestables de la zona de estudio.

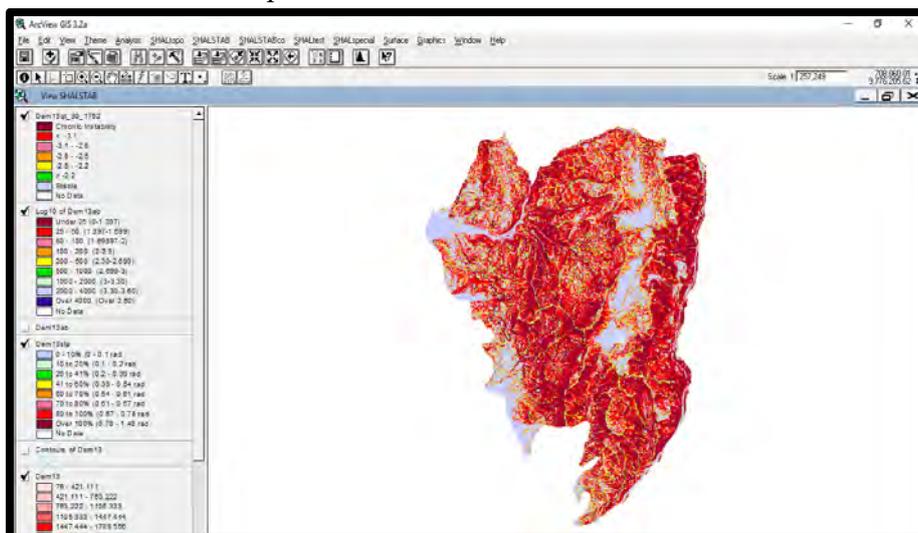


Figura 9. Resultado del q/T estabilidad e inestabilidad del cantón Chillanes.

Con el resultado del q/t (zonas estables e inestables) se procede a cortar en el software de arcgis el mapa del cantón con el cerro Cuchicahua, mediante el cual se pudo determinar y cuantificar los grados de inestabilidad presentes en el área de estudio.

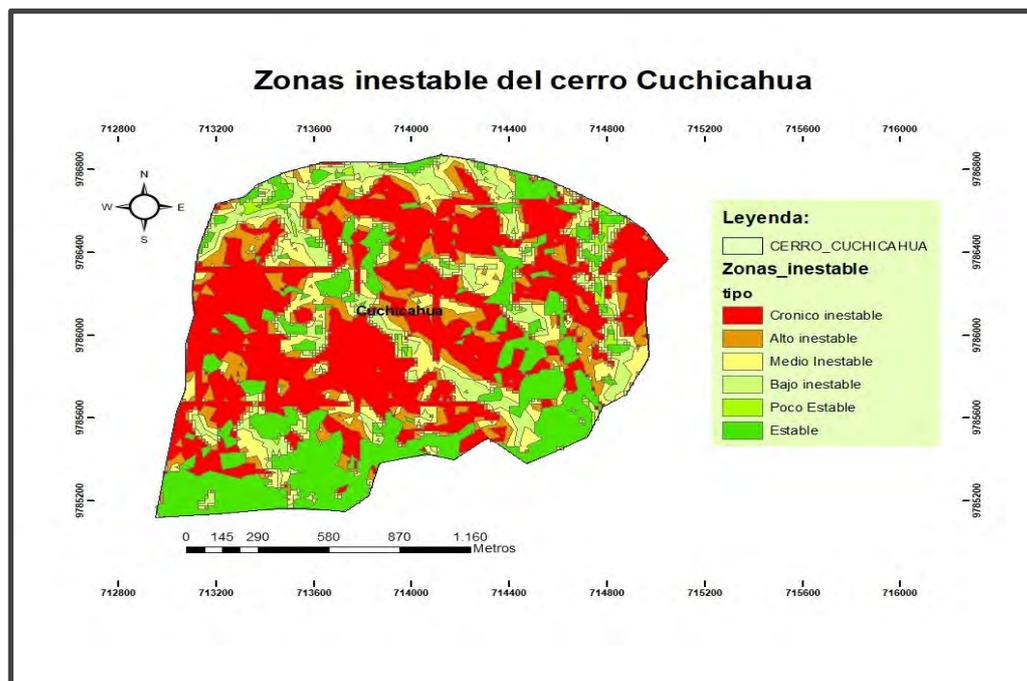


Figura 10. Mapa de identificación de zonas inestables del cerro Cuchicahua

ZONAS INESTABLES	ÁREA HA	%
Crónico inestable	108	40.44
Alto inestable	35	13.10
Medio inestable	36	13.48
Bajo inestable	24	8.98
Poco estable	4	1.49
Estable	60 HA	22.47

Tabla 3. Nivel de vulnerabilidad de las zonas inestables del cerro Cuchicahua

Según los mapas obtenidos mediante SHALSTAB, existen varias zonas del cerro Cuchicahua que presentan mayor valor de inestabilidad, como se puede observar en la figura No 10 el punto 1 resalta como una zona inestable, este lugar fue donde se tomó la primera muestra de suelo el cual presenta un deslizamiento de grandes proporciones que afectó a la vía principal y la gasolinera del cantón Chillanes.

La muestra de suelo punto 2 se encuentra en el lugar donde prevalecen las grietas de diferentes tamaños, este sitio en el resultado resalta con un valor de inestabilidad.

En el punto 4 se toma una imagen evidenciando un deslizamiento cerca de la vía principal haciendo validar una vez más la metodología implementada puesto que en el resultado ese lugar es inestable.

Los factores que intervienen en el deslizamiento del cerro Cuchicahua son la textura del suelo, la densidad real y el ángulo de fricción, datos importantes para desestabilizar el talud.

Según las áreas de afectación como se puede observar en la tabla No 3 la mayor proporción que ocupa dentro del cerro es el nivel crónico inestable con el 108 Ha, mientras que el nivel alto inestable es de 35 Ha, por otro lado, el medio inestable es de 36 Ha, además el bajo inestable tiene un área de 24 Ha, siendo el nivel poco estable el que tenga menos Ha en el resultado con el 4 y solo 60 Ha del cerro es estable.

Finalmente se muestra la ubicación del cerro Cuchicahua frente al casco urbano del cantón Chillanes donde serán identificados y caracterizados los elementos expuestos.

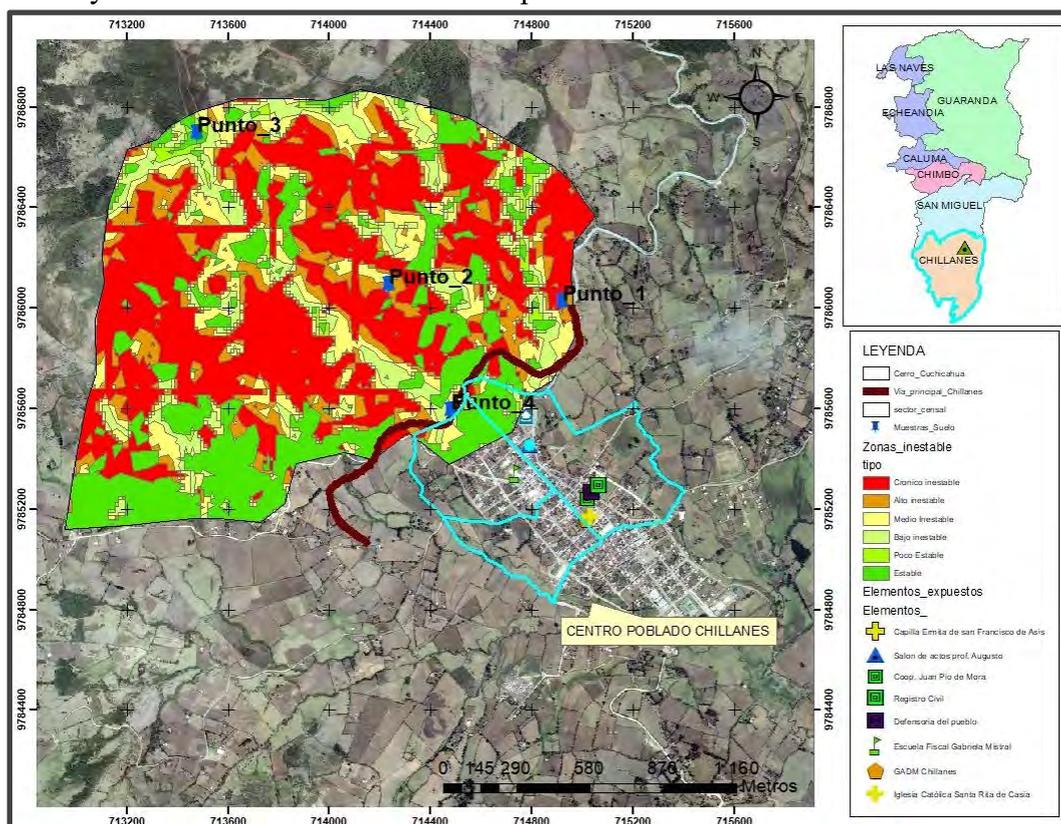


Figura 11. Mapa de inestabilidad frente al casco urbano del cantón Chillanes.

DISCUSIÓN

Existen varias investigaciones, sea por la parte geomática, o por el análisis de suelo en los que se usan técnicas que individualmente ayudarían a mejorar la precisión de los insumos usados y por ende los resultados finales en la determinación de áreas inestables o propensas a deslizarse.

Una forma de mejorar la precisión del Modelo Digital de Elevación y por ende el relieve del área de estudio es la topografía tradicional en la cual se llegaría a precisiones por debajo del metro (m), lo cual mejoraría sustancialmente la determinación de zonas de acumulación, sin embargo, está sujeta a condiciones climáticas y aumentos considerable de tiempo y recursos de personal. También se podría aplicar técnicas fotogramétricas como el levantamiento mediante fotografías aéreas usando vehículos aéreos no tripulados como drones, los cuales también permiten obtener modelos digitales de elevación con un adecuado pos-procesamiento y puntos de control GNSS en tierra. Finalmente, otra técnica para mejorar la precisión del relieve es obtener mediante plataformas satelitales donde adicionalmente se obtendrían índices de humedad o vegetación que pueden complementar el análisis, arrojando épocas del año donde la susceptibilidad a deslizamientos aumentaría de acuerdo a los últimos parámetros mencionados.

En cuanto a la parte de la caracterización del suelo, para obtener el ángulo de fricción directamente se deberían aplicar ensayos geotécnicos entre los cuales destacan el método de corte, método triaxial o el método SPT, los cuales trabajan directamente con la roca y arrojan un resultado de mayor precisión, sin embargo, no son tan recomendables para zonas extensas por ejemplo si se quiere replicar este tipo de análisis para una zonificación o para el análisis de una vía en donde pueden haber distintos tipos de suelo y roca; para el caso del cerro

Cuchicahua es una opción medianamente válida que se complicaría por la accesibilidad hasta ciertos puntos de la montaña.

Obviamente estas técnicas también implican el incremento de costos y tiempos en la obtención de datos.

En cuanto a la densidad real del suelo se considera que el método del picnómetro usado en esta investigación es totalmente adecuado, puesto que en otro tipo de estudios se trabaja mucho con mapas de suelos, lo cual es aceptable para zonificaciones o áreas de estudio mayores, pero para una unidad morfológica puntual como el cerro Cuchicahua no es recomendable.

Las mejoras en la precisión de los insumos de relieve y caracterización del suelo, conllevarían a tener resultados de mayor exactitud, sin embargo, al demostrar en el presente análisis, que las áreas de mayor inestabilidad en el cerro Cuchicahua obtenidas mediante geomática coinciden plenamente con los puntos donde ya han ocurrido deslizamientos o se están presentando agrietamientos, se plantea que a más de trabajar en estas mejoras de precisión de insumos, se debería incursionar en estudios multitemporales de monitoreo de áreas inestables o inventario de deslizamientos como el caso -Generación de cartografía de deslizamientos de laderas aplicando técnicas de detección de cambios⁹. “que incluyan índices de vegetación y humedad; así como análisis pre y pos deslizamiento -como el caso de la Evaluación de técnicas de ingeniería geomática para investigaciones de deslizamientos de tierra para la seguridad del tráfico” (10). donde las condiciones de relieve principalmente se verían alteradas, y de esta manera tener criterios adicionales para plantear medias de prevención y mitigación más concretas y puntuales dependiendo del escenario.

CONCLUSIONES

Mediante la caracterización de los factores que influyen en el deslizamiento del cerro Cuchicahua, como la textura del suelo (predominio de arena y arcillas), densidad (1752), ángulo de fricción (30) y pendiente, se pudo evidenciar que el cerro Cuchicahua presenta importantes áreas de inestabilidad con el 53.54% de inestabilidad crónica e inestabilidad alta.

La combinación de geomática y análisis de las características del suelo con el relieve de la zona, integrados en el módulo shalstab, arrojó resultados importantes de inestabilidad en el cerro Cuchicahua, los cuales fueron validados mediante trabajo de campo, donde se comprobó que en estas zonas ya presentan deslizamientos recurrentes, grietas y afloramientos de agua, lo que quiere decir que para la escala de trabajo los resultados fueron bastante aceptables.

Esta zonificación de áreas inestables en el cerro Cuchicahua debe servir de base para la actuación de las autoridades y técnicos del cantón Chillanes, tomando en cuenta que para áreas puntuales de mayor peligro se puede combinar con análisis geotécnicos, civiles, entre otros que arrojen resultados de mayor precisión y permitan el planteamiento de medidas estructurales y no estructurales de reducción del riesgo de deslizamiento.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés

REFERENCIAS

1. Riesgos, Subsecretaría de Gestión de la Información y Análisis de. Propuesta metodológica para el análisis de amenaza ante movimientos en masa en Ecuador Continental. [Online].; 2019 [cited 2023 Julio 18]. Available from: <https://es.scribd.com/document/442059115/Metodologia-Susceptibilidad-Movimientos-Masa-Escala-1-25000>.

2. Borja CR. Actualización del Ordenamiento Territorial. [Online].; 2019 [cited 2023 Julio 18]. Available from: https://chillanes.gob.ec/wp-content/uploads/2020/09/PDyOT_Chillanes_2020_Septiembre17.pdf.
3. Ruiz Palacios JP. "SUSCEPTIBILIDAD A DESLIZAMIENTOS EN EL VALLE DE JOA [Tesis] , editor. [Manabí]: Universidad Estatal de Manabí.
4. Aguirre Gómez R. Conceptos de Geomática y estudios de caso de México Mexico] [dGdIUAd, editor. [Mexico]: 978-607-02-0973-4; 2009.
5. Dietrich W, Montgomery D. Theory. [Online].; 1998 [cited 2023 Julio 17]. Available from: <http://calm.geo.berkeley.edu/geomorph/shalstab/theory.htm>.
6. Solaque Guzmán DP, Lizcano Peláez A. Ángulo de fricción crítico y ángulo de reposo de la arena del Guamo. Revista Épsilon. 2008 Diciembre; 1(11).
7. Pellegrini. POROSIDAD Y AIREACIÓN DENSIDAD REAL Y APARENTE. [Online].; 2019 [cited 2023 Julio 18]. Available from: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwj0jezb-u6BAxW1JUQIHauGA8EQFnoECBQQAQ&url=https%3A%2F%2Faulavirtual.agro.unlp.edu.ar%2Fmoodle%2Fresource%2Fview.php%3Fid%3D25660&usq=AOvVaw0bnj7YCMIOanLFwCXteAku&opi=89978449>.
8. Ortega R, Martínez M. MUNDOAGRO. [Online].; 2022 [cited 2023 Julio 18]. Available from: <https://mundoagro.cl/que-nos-indica-la-textura-de-un-suelo-y-como-determinarla/>.
9. Lorenzo de la Cruz J, Ramos Bernal R, Aguilar Gregorio D, Plata Hernández X. Generación de cartografía de deslizamientos de laderas técnicas aplicando la detección de cambios. ResearchGate. 2019 Octubre; 25(12).
10. Mahmoud A, B Samih AR, S Ghayda AR, Sadoun B. Evaluación de técnicas de ingeniería geomática para las investigaciones de deslizamientos de la seguridad del tráfico. ScienceDirect. 2021 Diciembre; 24(3).

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published: 15 December 2023

Citation. Villacis Taco L; Ramírez Chimbo C; Meléndez Carrasco G, Toalombo Tacuri M. Aplicación de geomática y análisis de suelo para la determinación de áreas inestables en el cerro Cuchicahua del cantón Chillanes, provincia Bolívar. Revis Bionatura 2023;8 (4) 9. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.9>

Additional information Correspondence should be addressed to maytoalombo@mailes.ueb.edu.ec

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Modelamiento matemático de la cinética de secado de café robusta (*Coffea canephora*)

Study of the drying kinetics of robusta coffee (*Coffea canephora*)

María Eugenia García ², Tania Moreta ¹; Sebastián Alberto Guerrero Luzuriaga ³, Juan Gaibor Chávez ^{1*}

¹ Carrera de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Universidad Estatal de Bolívar – Ecuador, CP:020150, tanmoreta@mail.es.ueb.edu.ec, jgaibor@ueb.edu.ec

² Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Universidad Técnica de Ambato – Ecuador, me.garcia@uta.edu.ec

³ Carrera de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Chimborazo – Ecuador, saguerrero@unach.edu.ec

*Autor por correspondencia, jgaibor@ueb.edu.ec Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.10>

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue modelar la cinética de secado del café robusta (*Coffea canephora*). Se realizó la recolección, recepción, despulpado, limpieza del grano, pesado y posterior se sometió al proceso de secado. El estudio se realizó en una estufa marca Memmert a 104 °C durante 24 horas, se tomaron tres muestras de similar tamaño (6,49 g; 8,57 g; 7,78 g) con una humedad inicial de 36,64 % y humedad final de 1,04 %; 0,92 %; 1,00 %. También se ocupó un secador vertical de bandejas a escala de laboratorio a temperatura de 73°C tomando lecturas del peso durante 24 horas, obteniendo la humedad de equilibrio a las 13 horas. Las variables que se midieron fueron: humedad en base seca, humedad en base húmeda, humedad total, humedad en equilibrio, flujo de calor, cantidad de calor, velocidad de secado. Se notó que la velocidad de secado a mayores temperaturas favorece a la transferencia de masa y energía. El modelo que tuvo mejor ajuste para ambos casos fue el de Henderson y Pabis con un coeficiente de determinación de 99,196 % a 104 °C y 99,561 % a 73 °C. Concluyendo que la temperatura tiene un efecto en la variación de humedad de la materia prima a diferentes tiempos.

Palabras clave: Cinética, café robusta, secado, humedad en equilibrio, modelamiento matemático.

ABSTRACT

The research aimed to model the drying kinetics of robusta coffee (*Coffea canephora*). The grain was collected, received, pulped, cleaned, weighed and subsequently subjected to the drying process. The study was carried out in a Memmert oven at 104 °C for 24 hours; three samples of similar size (6.49 g, 8.57 g, 7.78 g) were taken with an initial humidity of 36.64 % and final humidity of 1.04%; 0.92%; 1.00%. A laboratory-scale vertical tray dryer was also used at a temperature of 73°C, taking weight readings for 24 hours and obtaining equilibrium humidity at 13 hours. The measured variables were dry base humidity, wet base humidity, total humidity, equilibrium humidity, heat flow, amount of heat, and drying speed. It was noted that the drying speed at higher temperatures favors mass transfer and energy. The model best fit for both cases was that of Henderson and Pabis, with a coefficient of determination of 99.196% at 104 °C and 99.561% at 73 °C. They concluded that temperature affects the humidity variation of the raw material at different times.

Keywords: Kinetics, robust coffee, drying, moisture in equilibrium, mathematical modeling.

INTRODUCCIÓN

El café es una bebida popular por su sabor único, es cultivado ampliamente en regiones tropicales y subtropicales del mundo, en la actualidad el café *Coffea canephora* (robusta) y *Coffea arabica* (arábica) son las especies más conocidas en el mercado¹. El café (*Coffea canephora*) es constituida como una materia prima dentro del sector agroindustrial, debido a que se pueden obtener distintos productos como: licor, tinta, alcohol, alquitrán, cafeína, celulosa, jarabe, aceite, extracto y carbonato de potasio. El café robusto contiene carbohidratos (60 %), cafeína (1 - 2 %), azúcar reductor (1-0%), sacarosa (7-0%), pectina (2.0%), almidón (10.0%), pentano (5.0%), hemicelulosa (15.0%), celulosa entera (18.0%), lignina (2.0%), grasa (13.0%), proteína (13.0%), ácido tánico². Para ser procesado, se necesita una operación unitaria previa que es el secado; un método que se realiza para la conservación de alimentos, es decir que cumple la función de eliminar el contenido de agua de los productos. Hoy en día se pueden encontrar diferentes tipos de secado para el grano de café siendo el más utilizado el que consiste en colocar mantos directamente en el suelo, ya sea en la calzada o en pisos de cemento a expensas de sol y viento³. Para el proceso de secado es importante conocer los parámetros que intervienen en la operación y manejarla como tal para garantizar la conservación de las características organolépticas⁴. Este proceso tiene como finalidad la remoción de la humedad del grano mediante fenómenos de transferencia de masa y energía en forma simultánea⁵. De acuerdo a¹ el proceso de secado al sol o natural depende mucho del clima y tarda entre 3 a 4 semanas en alcanzar un contenido de humedad del 12 %, por ende, el tiempo de secado se puede acelerar utilizando secadores artificiales. El secado artificial utiliza condiciones controladas de temperatura y en algunos casos usa la convección forzada⁶, el secado en los granos de café se describe usando modelos matemáticos tales como Newton Lewis, Page, Henderson y Pabis que permiten predecir la cinética del proceso⁷, que se define como la “dependencia de la humedad del material y de la intensidad de evaporación en función del tiempo”⁸. En un ambiente controlado podemos establecer un modelo matemático que se ajuste a la cinética⁹, de esta manera garantizar la conservación nutricional del producto¹⁰, además de evitar el desperdicio de granos y optimizar el proceso¹¹. El objetivo de esta investigación fue estudiar la cinética de secado del café robusta (*Coffea canephora*), de esta manera direccionar a la optimización del tiempo y temperatura empleados en el proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado en el laboratorio del Laguacoto II, perteneciente a la Universidad Estatal de Bolívar, la materia prima (café robusto) se recolectó manualmente en una finca cafetera del recinto Matilde Esther, perteneciente al cantón Bucay – Ecuador, se trabajó con 100% de café maduro, dado que¹² indican que encontraron mejores características organolépticas para la elaboración de café pasado. Como segundo paso, se pesaron 3kg de la materia, se procedió a despulpar las almendras y desechar aquellas que presentaron daño físico o mecánico, así se quedó con 400 g para la experimentación, la cual se trabajó por triplicado para posterior obtener un promedio. Luego, se determinó el contenido de humedad del grano fresco en una balanza analítica marca BOECO. Para el proceso de secado se manejaron las variables independientes de tiempo y temperatura y se midió la variable dependiente de contenido de humedad hasta obtener un peso constante de la materia prima. En la figura 1 se indica un diagrama del proceso, desde la entrada de la materia prima.

Cinética de secado

Para determinar la cinética de secado se trabajó por triplicado, a partir de café despulpado, el mismo que se depositó en bandejas de aluminio de 10 cm de radio, una estufa de laboratorio marca Memmert a 104 °C, las muestras presentaron una humedad inicial de 36,64 %, en cuanto al peso, presentaron 6,49 g; 8,57 g; 7,78 g. Las muestras fueron pesadas en intervalos de 1 hora durante 24 horas.

Para la construcción de curvas de secado, se graficó la humedad (MR) como variable dependiente, versus al tiempo como variable independiente¹³. Para modelar, se utilizaron los siguientes modelos Newton-Lewis, Page, Henderson y Pabis.

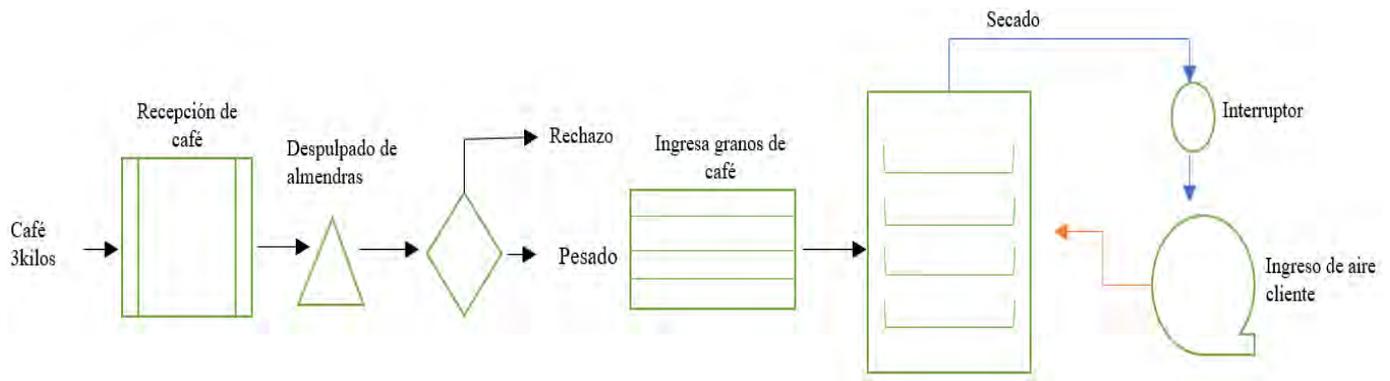


Figura. 1. Diagrama de proceso de secado de café robusto

Modelos matemáticos

La curva de secado obtenida experimentalmente se modela por los modelos matemáticos (1), (2), (3), de acuerdo al artículo “Dendrometric characterization of corn cane residues and drying models in natural conditions in Bolivar Province (Ecuador)”, según⁷, donde a , k , n son constantes, t es tiempo y MR relación de humedad adimensional.

$$\text{Modelo de Newton Lewis} \quad MR = e^{-k \cdot t} \quad (1)$$

$$\text{Modelo de Page} \quad MR = e^{-k \cdot t^n} \quad (2)$$

$$\text{Modelo de Henderson y Pabis} \quad MR = a \cdot e^{-k \cdot t^c} \quad (3)$$

Se determinó el contenido de humedad en base húmeda (ω)¹⁴, de las tres muestras de café robusta, en relación a masa de agua (m_{H_2O}) y masa inicial (m_0) de la materia, además el peso seco ($m_{\text{materia seca}}$) mediante las ecuaciones (4) y (5).

$$\omega = \frac{m_{H_2O}}{m_0} \quad (4)$$

$$m_{\text{materia seca}} = m_{\text{materia húmeda}} \left(1 - \frac{\omega}{100}\right) \quad (5)$$

La razón de humedad (MR) durante el secado fue calculada mediante la ecuación (6)¹⁵, la cual sirve para realizar la cinética de secado donde ω_t es contenido de humedad en cualquier momento y ω_0 es humedad inicial.

$$MR = \frac{\omega_t - \omega_e}{\omega_0 - \omega_e} \quad (6)$$

Se calculó la humedad en equilibrio (ω_e) mediante la ecuación (7)¹⁶ que relaciona el peso de la masa cuando alcanza el punto de equilibrio (m_e) con base al peso de la masa seca (ms).

$$\omega_e = \frac{m_e - ms}{m_e} * 100 \quad (7)$$

La eficiencia del secador se determina de la siguiente manera:

$$n = \frac{(Mh - Ms) * hfg}{\frac{Q_u}{Ab} * Ac} \quad (8)$$

n : Eficiencia del secador (%); Mh : Masa de gramínea con humedad (kg); Ms : Masa total de gramínea seca (kg); hfg : Calor de vaporización del agua ($\frac{KJ}{kg}$); Q_u : Calor útil (kg); L_{camara} : Largo exterior de la cámara. (m); A_{camara} : Ancho exterior de la cámara (m); L : Largo de la bandeja (m); A : Ancho de la bandeja (m).

Para determinar el flujo de calor promedio (\dot{q}_{prom}) se ocupa la ecuación (9) donde relaciona el índice de transferencia de calor promedio (\dot{Q}_{prom}) con el área (A)¹⁷.

$$\dot{q}_{prom} = \frac{\dot{Q}_{prom}}{A} \quad (9)$$

Deshidratación

Se utilizó un secador a escala de laboratorio con una variación de temperatura entre 60 – 80 °C, con bandejas de forma rectangular de longitudes de 61 cm×78,5 cm×3,06 cm, apoyado en un sistema de convección forzada donde se calienta el aire por medio de un ventilador eléctrico con resistencias de 110 V y 4A. Para la lectura de la temperatura en el secador se utilizó un termómetro marca HANNA %, trabajando a una temperatura estable de 73°C. Cada hora se procedió a pesar la muestra hasta que llegaron a un peso constante; empezando con un peso inicial de 454,00 y una humedad inicial de 36,64%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de secado

Las tasas de reducción de humedad más significativas se manifestaron en el proceso inicial del secado. Posterior se evidenció una disminución de manera constante en el tiempo, considerando así que se llegó al equilibrio., como se ha demostrado en estudios similares donde se trabajaron con materias primas vegetales¹⁸.

El contenido de humedad de la materia prima café inicial fue de 36,64 % que se trabajó por triplicado, cada muestra finalizó con un contenido de humedad de 1,4%; 0,92%; 1%, después de ser secada a 104 °C en la estufa.

En la tabla 1 se muestran los resultados de la humedad en base seca, humedad en base húmeda, humedad total, humedad en equilibrio, materia seca, para las dos temperaturas empleadas en el estudio.

Variable	Valor a 104 °C	Valor a 73°C
Humedad en base seca	98,67 %	76,65 %
Humedad en base húmeda	53,01 %	56,61 %
Humedad total	97,31 %	95,91 %
Humedad en equilibrio	0,34 %	0,61 %
Materia Seca	3,58 g	

Tabla 1. Cinética de secado en la estufa 104 °C y deshidratador a 73°C

En la figura 2 y tabla 2 se pueden observar que el peso de la materia se vuelve constante a partir de la hora 13 para la temperatura de 104°C y a partir de la hora 19 para la temperatura de 73°C, pues se produjo una disminución en el tiempo de secado cuando la temperatura era mayor porque una temperatura de secado alta aumenta la energía cinética de una molécula de agua hasta que se libera de la fuerza cohesiva, tal como indican¹⁹.

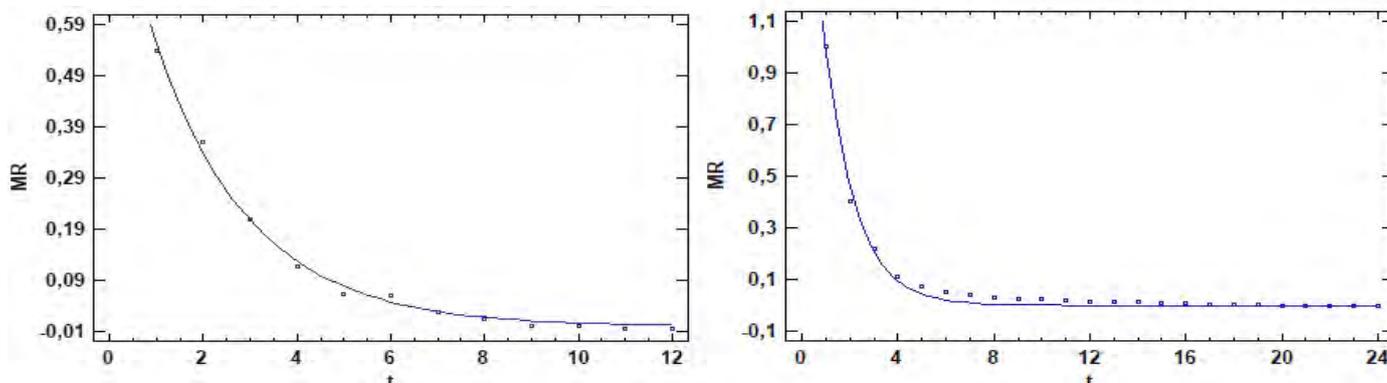


Figura 2. Cinética de secado a 104°C y 73°C, que se ajustan al modelo de Henderson y Pabis

Donde podemos apreciar que al iniciar el proceso de secado su velocidad es más elevada tendiendo a ser lineal, mientras que con el transcurso del tiempo su velocidad se va reduciendo considerablemente, cotejando con otros estudios de cinética de secado^{20, 21}.

Tiempo (h)	Peso (g) T=73°C	Peso (g) T =104°C
1	336,10	7,61
2	290,20	5,22
3	251,80	4,47
4	227,80	4,04
5	214,00	3,88
6	213,60	3,80
7	205,00	3,75
8	201,60	3,71
9	199,00	3,70
10	198,00	3,68
11	197,20	3,66
12	197,00	3,65
13	197,00	3,64
14	197,00	3,64
15	197,00	3,63
16	197,00	3,62
17	197,00	3,61
18	197,00	3,60
19	197,00	3, 58
20	197,00	3, 58
21	197,00	3, 58
22	197,00	3,58
23	197,00	3,58
24	197,00	3,58

Tabla 2. Peso de la materia prima transcurrido cada hora de pesado

T°C	Nombre del Modelo	Ecuación	Parámetros del modelo	Estadísticas
104 °C	Newton (Lewis)	$MR = e^{-k \cdot t}$	$k = 0,409$	$R^2 = 87,584 \%$
	Page	$MR = e^{-k \cdot t^n}$	$k = 0,146$ $n = 2,197$	$R^2 = 95,608 \%$
	Henderson y Pabis	$MR = a \cdot e^{-k \cdot t}$	$k = 0,780$ $a = 2,149$	$R^2 = 99,196 \%$
73°C	Newton (Lewis)	$MR = e^{-k \cdot t}$	$k = 0,540$	$R^2 = 99,051 \%$
	Page	$MR = e^{-k \cdot t^n}$	$k = 0,580$ $n = 0,920$	$R^2 = 99,386 \%$
	Henderson y Pabis	$MR = a \cdot e^{-k \cdot t}$	$k = 0,488$ $a = 0,896$	$R^2 = 99,561 \%$

Tabla 3. Ajuste a los Modelos Matemáticos

Modelo matemático

Utilizando los datos recopilados en nuestro experimento, se procedió a calcular los parámetros para ajustar a los modelos propuestos, así se identificó la ecuación apropiada que fuera capaz de describir y predecir de manera efectiva el comportamiento del secado del café a lo largo del proceso, el cual estaba siendo controlado en términos de temperatura.

La tabla 3 muestra los modelos matemáticos con los valores de los parámetros experimentales cuales fueron obtenidos a partir del software estadístico Statgraphics, donde se puede observar que tanto para para 104 °C como 73°C muestra los datos que los datos experimentales obtenidos que se ajustan a los criterios de aceptación de los coeficientes de R^2 para el modelo de Henderson y Pabis, al igual que^{22,23,24} quienes también consideran los modelos estudiados para la modelización . Con esto se desea brindar un estudio en el café ecuatoriano y optimizar el proceso de secado al ambiente que actualmente se realiza en las fincas cafeteras como el estudio de²⁵.

CONCLUSIONES

La temperatura y el tiempo ejercen un impacto directo en la reducción del contenido de humedad en las materias primas. Cuando las partículas absorben la energía necesaria para evaporar su contenido de agua, inicia un proceso en el que la velocidad de secado se modifica con el transcurso del tiempo. Esta velocidad de secado disminuye significativamente hasta que la humedad alcanza un valor constante en función del tiempo. El parámetro que mejor se ajusta a esta dinámica es el ratio de humedad (MR), que se define como la relación entre la humedad en un momento dado menos la humedad de equilibrio y la diferencia entre la humedad en el estado inicial y la humedad de equilibrio.

Las curvas de régimen de secado, que representan la velocidad de secado (expresada como la primera derivada dw/dt , muestran que al inicio del proceso se observa una disminución más marcada de la humedad, mientras que conforme se acerca al final, la pérdida de humedad se vuelve mínima, aproximándose a una recta constante. En este punto, se toma como referencia la humedad final del proceso.

En el contexto de la cinética de secado del café, se ha determinado que el modelo que mejor se ajusta a los datos obtenidos a dos temperaturas diferentes es el modelo Henderson y Pabis ($MR = [a \cdot e]^{(-kt)}$), con un coeficiente de determinación $[R]^2 = 99,196\%$ a $104\text{ }^\circ\text{C}$ y $[R]^2 = 99,561\%$ a $73\text{ }^\circ\text{C}$. Los resultados obtenidos mediante la aplicación de este modelo pueden ser de utilidad para prolongar la vida útil del producto o para su aplicación en operaciones unitarias subsiguientes, como es el caso del café seco y molido destinado a la preparación de café pasado.

Conflicts of Interest: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Zhang, K., Cheng, J., Hong, Q., Dong, W., Chen, X., Wu, G., & Zhang, Z. Identificación de cambios en los compuestos volátiles de granos de café robusta durante el secado basado en análisis HS-SPME/GC-MS y E-nose con la ayuda de quimiometría. ELSEVIER,. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113317>. 2022. p161.
2. Beltran, C. Estudio del impacto de las propiedades funcionales del café arábica (*coffea arabica*) durante las etapas post cosecha para su industrialización. Universidad Técnica De Machala, Machala, El Oro, Ecuador:, agosto de 2022.
3. Prada, Á., Vela, C., Bardález, G., & Saavedra, J. Efectividad de un Proceso de Secado de Café usando Secadores Solares con Sistema de Flujo de Aire Continuo Impulsado por Energía Fotovoltaica, en la Región San Martín, Perú. Scielo, 30(6), 2. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000600085>. 2019
4. Benítez, O., & Campo, D. Evaluación de la calidad el café tostado utilizando herramientas de procesamiento digital de imágenes. EBSCO, 2018. p 12.
5. Borja Velázquez, M. Principios del secado | | UPV. 2018. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=Lf4F7caSYrg>
6. Peña, M. P. Incidencia del secado artificial en las propiedades físicas y mecánicas de la madera de la especie forestal *Triplaris cumingiana* Fisch. Jipijapa, Manabí, Ecuador: Universidad Estatal del sur de Manabí. 2019.
7. Gaibor Chávez, J., Pérez Pacheco, S., Velazquez Martí, B., Nino Ruiz, Z., & Dominguez Narváez, V. Dendrometric characterization of corn cane residues and drying models in natural conditions in Bolivar Province. Renewable Energy. doi:doi:10.1016/j.renene.2015.09.009. 2016.
8. Quishpe, D. A. Determinación de la Cinética de Secado de una torta de lodo proveniente del tratamiento de agua de enjuague del proceso de Decapado. Quito, Pichincha, Ecuador: Universidad Central del Ecuador. 2018.
9. Flores, G. Determinación experimental de la cinética de secado de especias (*Allium schoenoprasum*, *Erygium foetidum* y *Mansoa alliacea* L.). Pastaza, Ecuador: Universidad Estatal Amazónica, 2019.
10. Flórez, F. Efecto del tiempo de fermentación sobre la calidad nutricional del ensilaje de pulpa de *Coffea arabica* L. Cienc. Tecnol. Agropecuaria, 3(21). doi:https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1423. 2020.
11. Carretero, A. Impactos sociales, económicos y medioambientales derivados de la pérdida y el desperdicio de alimentos. Przeglad Prawa Rolnego, 2018, 14. doi:10.14746/ppr.2018.23.2.9 . p23(2).
12. Bolívar Fabián Mendoza Marcillo, B. F. Influencia de la cosecha de café maduro y verde sobre la calidad física y organoléptica del café (*Coffea arábica* L.). Revista Agrosilvicultura y Medioambiente, 2023, p 14-25.
13. Camaño, J., Rivera, A., & Zapata, J. Efecto del espesor de película y de la ubicación de la muestra en un secador solar directo, sobre la cinética de secado de ensilado de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). Scielo, 31(1), 53-66. 2011. Obtenido de doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642020000100053>

14. Martines, E., & Lira, L. Analisis y Aplicación de las expresiones del contenido de humedad en solidos. Simpiso de metrologia. 2010. Obtenido de <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp01b.pdf>
15. León, U., Muñoz, J., Vargas, G., & Pacheco, Y. Cinética de secado del coco por radiación. Tecnología en marca, 32, 115-121. doi:<https://doi.org/10.18845/tm.v32i7.4269>. 2018.
16. Salazar, M. Modelo de la cinética de secado por convección forzada de la semilla de Pajuro(*Erythrina edulis* Triana). Modelo de la cinética de secado por convección forzada de la semilla de Pajuro(*Erythrina edulis* Triana). Perú: Universidad Nacional Agraria de la selva. 2020.
17. Cengel , Y., & Ghajar, A. Fundamentos de la convección. En Transferencia de calor y masa . McGrawHill, 2011.
18. Siqueira Valdiney Cambuy, G. E. Drying Kinetics of Processed Natural Coffee with High Moisture Content. Coffee Science, 2017. p400-409.
19. Phitakwinai, Sutida S. T. Thin-layer drying of parchment Arabica coffee by controlling temperature and relative humidity. Food Science and Nutrition. 2019. p 2921–2931.
20. Bejenari, Victoria C. L. Isothermal Drying Kinetic Study of Spent Coffee Grounds Using Thermogravimetric Analysis. International Journal of Chemical Engineering, 2022.
21. Mizera C, H. D. Describing of drying curves of green coffee beans using mathematical model . 2nd Nommensen International Conference on Technology and Engineering. 2018.
22. Wanich Nilnont, S. P. Thin-layer Drying Kinetics of Robusta Coffee. International Journal of Advanced Culture Technology. 2015, p138-143.
23. Guilherme E. Alves, F. M. Influence of Different Temperatures and Airflows on Drying of. Enghenaria Agricola, 2020. p 192-200.
24. Fatharani, A. Y. Drying characteristics of robusta coffee beans using YSDUNIB18 hybrid dryer based on thin-layer drying kinetics fitting model . International Journal of Agricultural Technology, 2023, 37-52.
25. Gallego Agudelo Claudia Patricia, L. C. Influencia del Proceso de Secado del Café Natural en las Características Físicas del Grano y la Calidad Sensorial. Revista Cenicafé, 2023. p94 – 110

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation. García M E, Moreta T; Guerrero Luzuriaga S A, Gaibor Chávez J. Modelamiento matematico de la cinética de secado de café robusta (*Coffea canephora*). Revis Bionatura 2023;8 (4)
10. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.10>

Additional information Correspondence should be addressed to jalbujar@uc.edu.ve

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Caracterización del germoplasma de cereales con potencial agromorfológico para la provincia de Bolívar

Cereals germplasm characterization with potential agro morphological for the Bolivar province

Julissa Borja Erazo ¹; Rubén Quinatoa Calvache ¹; Eduardo Rodríguez Maldonado ¹; David Silva García ¹; Andrea Román Ramos ^{1*}

1 Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador, juborja@mailes.ueb.edu.ec, rquinatoa@mailes.ueb.edu.ec, eduguez@gmail.com, dsilva@ueb.edu.ec,

*Autor de correspondencia: aroman@ueb.edu.ec

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.11>

RESUMEN

Los bancos de germoplasma son una fuente de materiales con potencial y tolerancia a enfermedades para la mejora de los cereales. En el Ecuador el INIAP mantiene un banco que permite realizar la reintroducción de material genético a las zonas de cultivo. La pérdida de tolerancia a enfermedades y reducida resiliencia a factores abióticos hacen necesario que se prueben estos materiales para su introducción en Bolívar. El objetivo de este trabajo fue caracterizar líneas diferenciales potenciales de trigo y cebada del banco de germoplasma de INIAP como fuentes materiales con características de adaptación y tolerancia a enfermedades en la provincia de Bolívar. Se utilizó un análisis de componentes principales para la separación de las características agronómicas e incidencia de enfermedades, después se realizó un análisis de conglomerados para agrupar las líneas diferenciales con características semejantes. Los resultados de esta investigación muestran que las variables: porcentaje de emergencia (PE), hábito de crecimiento (HC), días al espigamiento (DE), altura de planta (AP), longitud de espiga (LE), peso de 100 granos (PCG), Peso del grano partido (PCP), incidencia enfermedades (IE), y tamaño del grano (TGr) son las que mejor describen el comportamiento de las líneas evaluadas. Se determinó que existen dos grupos bien diferenciados de líneas de trigo, donde YR5/6*AOC, AC Avonlea, CDC Alsask, CDC GO, Ultima, Pronghorn, Bunker, Brevis y Yr43, así como AC Interpid y AC Certa comparten características homogéneas para caracterización. De la misma forma para cebada las líneas I5 y Bacroft, así como Topper y Mahigan comparten características y pueden ser seleccionadas con el propósito obtener materiales genéticos promisorios con la finalidad de ser potenciales variedades para Bolívar.

Palabras clave: accesiones, análisis de conglomerados, banco de germoplasma, cebada, trigo.

ABSTRACT

Germplasm banks are a source of materials with potential and disease tolerance for improving cereals. In Ecuador, INIAP maintains a bank that allows for reintroducing genetic material into cultivation areas. The loss of disease tolerance and reduced resilience to abiotic factors make it necessary to test these materials for their introduction in Bolivar. This study aimed to characterize potential differential wheat and barley lines from the INIAP germplasm bank as material sources with adaptation characteristics and disease tolerance in Bolivar province. Principal component analysis was used to separate agronomic traits and disease incidence, followed by a cluster analysis to group the differential lines with similar characteristics. The results of this research show that the variables: emergence percentage (EP), growth habit (GH), days to heading (DH), plant height (PH), spike length (SL), 100-grain weight (GW), split grain weight (SGW), disease incidence (DI), and grain size (GS) best describe the behavior of the evaluated lines. It was determined that there are two distinct groups of wheat lines, where YR5/6*AOC, AC Avonlea, CDC Alsask, CDC GO, Ultima, Pronghorn, Bunker, Brevis, and Yr43, as well as AC Interpid and AC Certa, share homogeneous characteristics for

characterization. Similarly, for barley, lines I5, Bancroft, Topper and Mahigan share features and can be selected to potentially obtain promising genetic materials to become varieties for Bolivar.

Keywords: Accessions, cluster analysis, germplasm bank, barley, wheat.

INTRODUCCIÓN

Los cereales son plantas monocotiledóneas herbáceas de ciclo vegetativo anual, pertenecen a la familia de las gramíneas¹. Todos los cereales proceden de gramíneas silvestres, pero se han transformado tanto de sus cepas originarias que actualmente forman especies distintas².

La producción mundial de cereales en 2021 fue de 2799 millones de toneladas, lo que supone un aumento del 0.8 % respecto de la producción en 2020. Además, la producción mundial de cereales secundarios, incluidos la cebada, la avena, el centeno y otros cereales de menor importancia fue de 1502 millones de toneladas en 2021, registrando un aumento anual de 18.9 millones de toneladas, debido a una mayor producción de maíz³.

Las provincias con mayor área de cereales sembrada son: Chimborazo, Cotopaxi, Pichincha, Bolívar e Imbabura; y las provincias con mayor producción de grano son: Cañar, Carchi y Loja⁴. En el 2022 en el Ecuador, el área de trigo fue de 4510 ha con una productividad de 1.69 t ha⁻¹ y para la cebada 8443 ha con una productividad de 1.46 t ha⁻¹⁵. Específicamente en la provincia de Bolívar se cultiva un área de 1164 Ha de trigo y 470 Ha de cebada⁶. Lo que contrasta con que en el Ecuador el trigo, arroz y cebada son los cereales de mayor consumo por la población⁴.

Sin embargo, la producción nacional no cubre la demanda de los cereales para consumo por lo que generalmente son importadas. En este contexto, el trigo es importado de Estados Unidos, Canadá y otros países, solamente el 10% de la necesidad restante es producida en Ecuador⁷. Por esta razón, la investigación en la identificación de cereales con potencial agromorfológico es un proceso continuo y metódico para conseguir información confiable y oportuna, que admita la generación de germoplasma con características deseables de adaptación, productividad, resistencia a enfermedades y calidad industrial⁸.

La caracterización de germoplasma permite identificar diferencias entre las accesiones que se evalúan. Ciertas características como su origen, son importantes, así como aquellas que están racionadas con su rendimiento asociadas a descriptores específicos de cada taxón y a sus características botánicas⁹.

En este contexto, el Programa de Cereales del INIAP ha venido trabajando por cerca de 60 años generando germoplasma con características de resistencia a enfermedades, productividad y calidad⁸, siendo importante que estos materiales deban seguir siendo caracterizados para continuar con el desarrollo de materiales aptos para su utilización en zonas de producción. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue caracterizar líneas diferenciales con potencial agromorfológico del banco de germoplasma de INIAP como fuentes materiales con características de adaptación y tolerancia a enfermedades en zonas de producción de Bolívar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal y localización del ensayo

El material vegetal utilizado en esta investigación fueron 54 líneas de cereales: 39 de trigo y 15 de cebada (Tabla 1). Esta investigación fue realizada en los años 2022 y 2023, en el sector de Laguacoto III, cantón Guaranda, provincia Bolívar a una altitud de 2622 msnm.

Cereal	Línea Diferenciales
Trigo	Avocet-YRA, Avocet+YRA, YR/6*AOC, Sietre Cerros T66 (Yr2), YR5/6*AOC, YR6/6*AOC, YR7/6*AOC, YR8/6*AOC, YR9/6*AOC, YR10/6*AOC, YR15/6*AOC, YR17/6*AOC, YR18/3*AOC, YR24/3*AOC, YR26/3*AOC, YR27/6*AOC, YRSP/6*AOC, YRCV/6*AOC, Yr28, Yr29, Yr31, ACBarrie, CDCTeal, Lillian, AC Avonlea, CDC Alsask, CDC GO, AC Interpid, Carberry, Produra, Yr26/6*Avocet S, AC Certa, Ultima, Pronghorn, Bunker, Brevis, Zak, Yr43, Yr44
Cebada	HB522, Mahigan, Topper, KAO-32-12, Heils Franken, Emir, Astrix, Hiproly, Varundha, Abed Binder 12, Trumpf, Mazurka, Bigo, I5, Bancroft

Fuente: Banco de germoplasma INIAP

Tabla 1. Líneas diferenciales utilizadas en la caracterización de materiales potenciales de trigo y cebada.

Diseño y manejo del experimento

Para la preparación de suelo se realizó una labor de arado y una de rastra con la finalidad con tractor dos meses antes de la siembra. La siembra del experimento fue 12 de abril de 2022, estableciendo 3 surcos 1 m separados por 17 cm para la siembra. El control de malezas se realizó de manera manual. La fertilización se realizó con 125 kg ha⁻¹ de urea y 250 kg ha⁻¹ de 10-3-10. No se realizó manejo de enfermedades ni de plagas.

La cosecha se realizó cuando el estadio de madurez fue alcanzado y posteriormente se realizó la trilla y la limpieza de grano, siendo almacenado hasta realizar las evaluaciones de variables relacionadas al rendimiento.

Determinación de variables agronómicas

Las variables fueron evaluadas de acuerdo Ponce et al⁸ en los estadios de cereales según la escala de Zadoks (1945), como se describe a continuación:

Porcentaje de emergencia (PE): Se evaluó de manera visual, expensando como bueno, regula y malo, con sus respectivos porcentajes, de acuerdo a la siguiente escala: buena: 81 – 100%; regular: 60 – 80% y Malo: < 60% plantas emergidas.

Vigor de la planta (VP): Se evaluó en el estadio de la hoja bandera (GS39) de acuerdo a la siguiente escala: 1: Bueno; Plantas y hojas grandes, bien desarrolladas; 2: Regular; Plantas y hojas medianamente desarrolladas y 3: Malo; Plantas pequeñas y hojas delgadas.

Hábito de crecimiento (HC): Se realizó mediante la utilización de una escala de tres descriptores relacionados a la disposición de las hojas, donde, 1: Erecto, hojas dispuestas verticalmente hacia arriba, 2: Intermedio (Semierecto o Semipostrado, hojas dispuestas diagonalmente, formado un ángulo de 45 grados; 3: Postrado, hojas dispuestas horizontalmente, sobre la superficie del suelo.

Días al espigamiento (DE): Esta variable fue registrada contando los días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las espigas de la parcela aparecieron en su totalidad.

Tipo de paja (TP): Esta variable se registró en el estadio de grano pastoso (GS80), empleando la siguiente escala: 1: tallo fuerte, tallos gruesos, erectos y flexibles, que soportan el viento y el acame; 2: tallo intermedio, tallos no muy gruesos, erectos y medianamente; 3: tallo débil, tallos delgados e inflexibles, que no soportan el viento y el acame.

Altura de planta (AP): La altura de planta se evaluó en el estadio de grano lechoso (GS70), desde la superficie del suelo hasta el extremo de la espiga, excluyendo las aristas, empleando un flexómetro, y fue expresado en cm.

Determinación de la Incidencia de enfermedades (IE)

Se evaluó de manera visual desde la etapa de formación de la hoja bandera (GS39) hasta la etapa de grano lechoso (GS71). Se cuantificó el número plantas enfermas del total plantas en un metro lineal, siendo expresado en porcentaje.

Rendimiento y componentes de rendimiento

Las variables fueron evaluadas de acuerdo Ponce et al⁸ en los estadios de cereales según la escala de Zadoks (1945) como se describe a continuación:

Longitud de espiga (LE): se evaluó durante el estadio de madurez (GS90), con la ayuda de un flexómetro se midió desde la base de la espiga hasta el ápice de la misma, se expresó en cm.

Tipo de grano (TG): fue evaluado de acuerdo a su color, forma, tamaño, uniformidad o daño después del estadio (GS92) cuando el grano estaba totalmente seco, mediante la siguiente escala para cebada: *** grano grande, grueso, redondo, blanco o crema; ** grano mediano, redondo, blanco amarillo; * grano mediano, alargado, crema o amarillo; + grano pequeño, delgado, manchado, chupado. Escala para trigo 1: grano grueso, grande, bien formado, limpio; 2: grano mediano, bien formado, limpio; 3: grano pequeño, delgado, manchado.

Peso de 100 granos (PCG) y peso del grano partido (PGP): para el PCG se contaron 100 granos en estado íntegro y para el PGP se separó grano partido, posteriormente se pesó en una balanza analítica (ADAM; 2000 g), el peso fue expresado en gramos.

Tamaño del grano (TG): se escogieron 20 granos íntegros al azar y se midió con una regla en mm obteniéndose un tamaño promedio por cada línea evaluada.

Análisis de Datos

Los datos fueron analizados mediante la visualización con la utilización de medias, rangos, máximos y mínimos mediante un análisis descriptivo con la utilización del programa estadístico Microsoft Excel (2016). Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) como criterio de clasificación a los diferenciales del cultivo, extrayendo las correlaciones y definiendo el número de componentes. Una vez analizado esto se procedió a realizar un análisis de conglomerados utilizando las variables del ACP determinadas como criterios de agrupamientos. Para el análisis se utilizó el programa estadístico Infostat versión 2020¹⁰.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los cultivares de trigo evaluados el análisis de componentes principales (ACP) muestra que las variables PE, HC, DE, AP, LE, PCG, PCP y TGr explican el 25.6 % de la varianza (Fig. 1.). En caso de la cebada las variables IE, LE, PCG y PGP explican 27.8 % de la varianza (Fig. 2.). Estas variables son útiles para la caracterización de líneas diferenciales para la incorporación en zonas de producción de Bolívar.

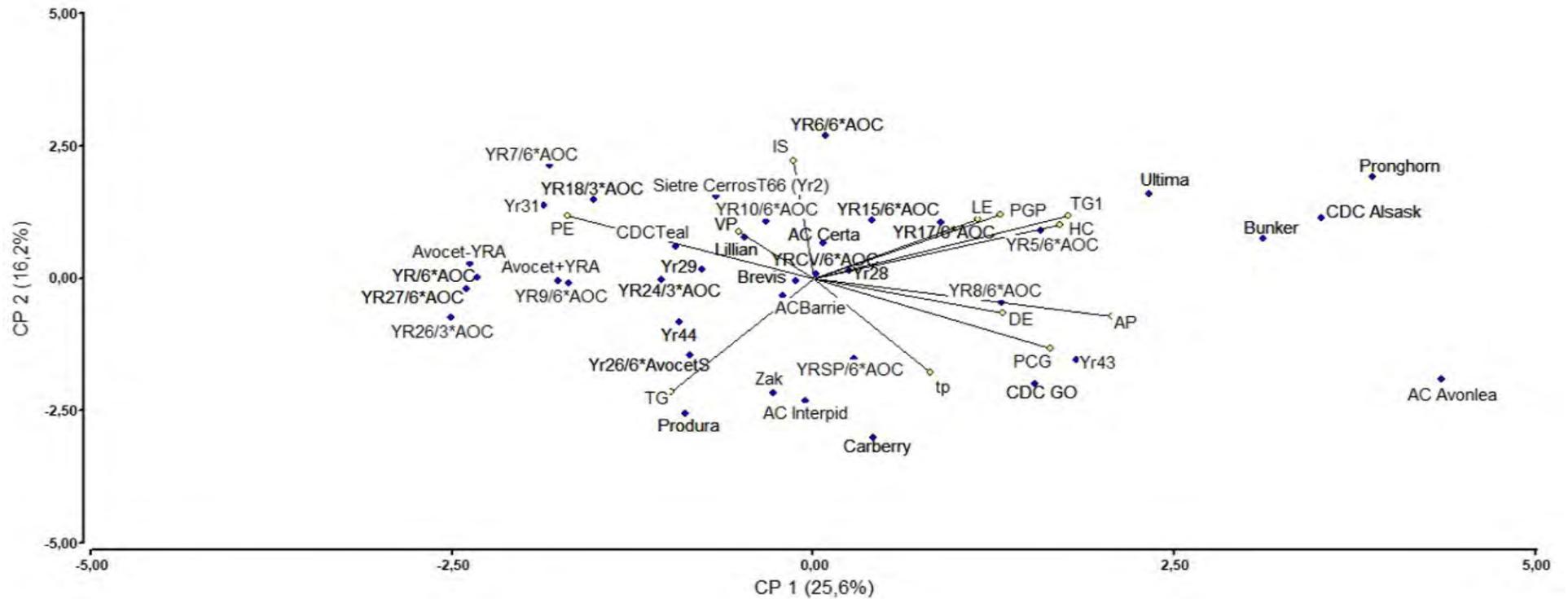


Figura 1. Análisis de componente principal (ACP) de las líneas diferenciales de trigo de las variables porcentaje de emergencia (PE), porcentaje de emergencia (PE), hábito de crecimiento (HC), días al espigamiento (DE), incidencia de enfermedades (IE), tipo de paja (TP), altura de planta (AP), longitud de espiga (LE), tipo de grano (TG), peso de 100 granos (PCG), Peso del grano partido (PGP), color del grano (CG), tamaño del grano (TGr).

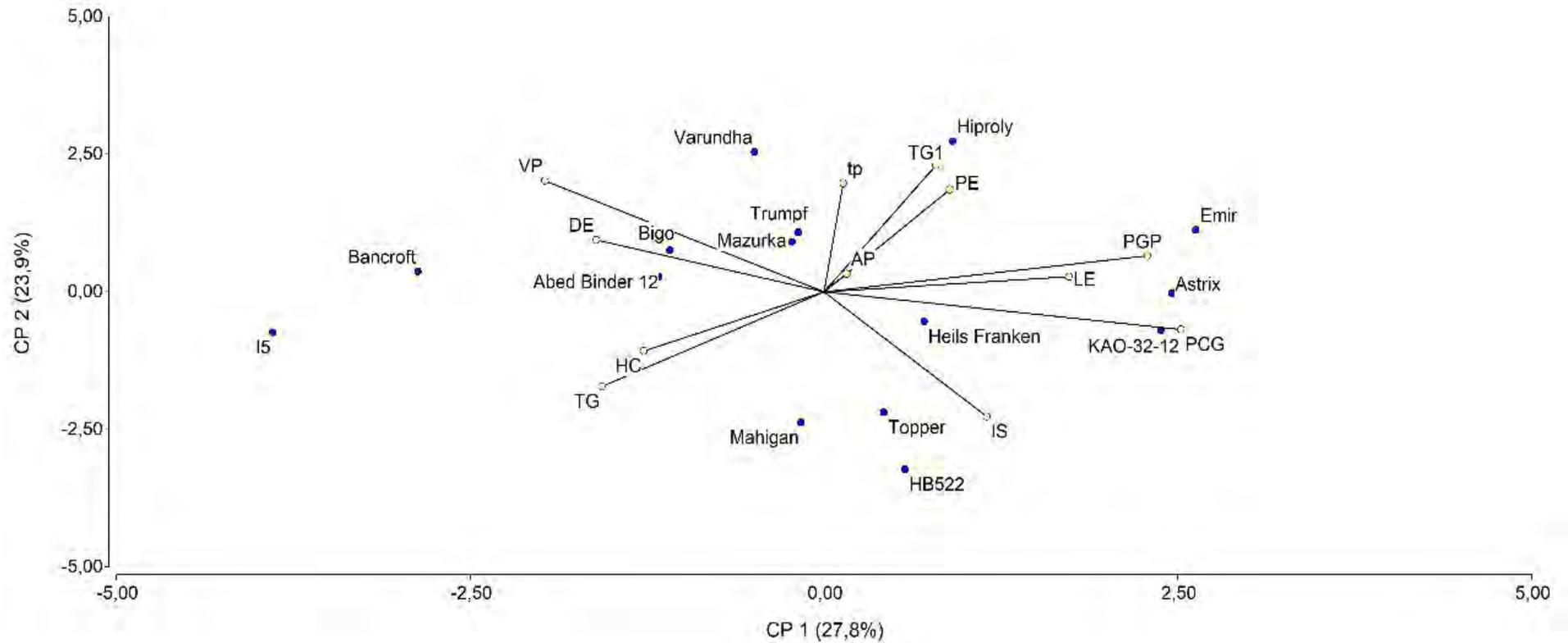


Figura. 2. Análisis de componente principales (ACP) de las líneas diferenciales de cebada de las variables porcentaje de emergencia (PE), porcentaje de emergencia (PE), hábito de crecimiento (HC), días al espigamiento (DE), incidencia de enfermedades (IE), tipo de paja (TP), altura de planta (AP), longitud de espiga (LE), tipo de grano (TG), peso de 100 granos (PCG), Peso del grano partido (PGP), color del grano (CG), tamaño del grano (TGr).

Del análisis descriptivo, en el caso del trigo el 58.97% y 73.33% de cebada de las 39 y 15 accesiones evaluadas, respectivamente, se observó un PE entre 81 al 100%. En este contexto una buena germinación depende de la calidad física y varietal de la semilla¹¹. Ya que el PE está asociado a la calidad de los germoplasmas, así como profundidad de la siembra, condiciones de humedad en etapas importantes del desarrollo del cultivo, al igual que el periodo de germinación y emergencia de plántulas¹², así como otros determinantes entre ellos la profundidad de siembra, temperatura, humedad especialmente en etapa de germinación y emergencia de la plántula¹³.

Otra variable de germoplasma estudiada fue el HC, de las 39 líneas de trigo y 15 accesiones el 76.92% y el 60%, respectivamente, presentan crecimiento tipo erecto. Sin embargo, en el caso de la cebada se observaron los tres tipos de forma erecta, intermedio y postrado, debido a la fuerte dependencia de los genotipos, siendo una respuesta de tipo varietal. Además, HC es un descriptor morfológico¹⁴, que depende del genotipo ambiente con gran importancia en los cereales evaluados, ya que en zonas donde se presencian vientos fuertes como es el caso de la provincia de Bolívar, se requiere materiales de crecimiento erecto que vaya acompañado de una buena resistencia al acame.

El DE es una variable de importancia para la determinación de potenciales germoplasmas precoces. En el caso del trigo el 79.40% de las accesiones de 100 a 110 días. En relación a las accesiones de cebada el 86.17% de 95-110 días. En este estudio se determinó que hay una media general de 107 en trigo entre 107 hasta a 106 días y 106 días en cebada en un rango de 120 a 97 días. El cereal más precoz fue la cebada, por ejemplo, Bigo con 97 días, en tanto que el trigo duro mostro un tiempo más prolongado para el desarrollo de espigas. Estos resultados muestran diferencias genéticas y fenológicas propias de las líneas diferenciales en estudio llevadas en fase de campo. Estos resultados son semejantes a los observados por Miller¹⁵ quien menciona que la floración ocurre de 4 a 5 días posterior al espigamiento, en tanto que el periodo de llenado de grano varía de acuerdo a la climatología de la zona.

Para la variable IE, en el caso de trigo el 25.64% de las accesiones tuvieron 40% de incidencia de roya amarilla causada por *Puccinia striiformis*. Diferente para las accesiones de cebada donde 26.67% de ellas mostraron un 20% de incidencia de roya amarilla. Conforme a las observaciones realizadas en esta investigación la incidencia fue baja durante el periodo de cultivo, debido a que las condiciones ambientales no favorecieron en el desarrollo de la enfermedad.

En el caso de variable AP se observó que el 69.23% de las 39 accesiones evaluadas de trigo presentaron una AP con en un rango de 60 cm a 80 cm, con una media general de AP de 79 cm. La línea con mayor altura fue CDC Alsask con 114 cm, mientras que el 33.33% de las 15 accesiones evaluadas de cebada el AP fue de un rango de 60 cm a 80 cm, por ejemplo, HB522, Mahigan, Topper, KAO-32-12, Heils Franken, Emir, Astrix, Hiproly, Varundha, Abed Binder 12, Trumpf, Bigo, I5 y Bancroft. El germoplasma con mayor altura fue Bigo con 87 cm.

En el caso de trigo se determinó que 74.36% de las 39 accesiones presentaron LE de 5 cm a 7 cm. La menor LE fue registrada para las accesiones Carberry, Produra y Yr26/6*Avocet S con 5 cm de longitud de espiga. En cebada el 80% de las 15 líneas diferenciales de cebada presentaron longitud en un rango de 6 a 7 cm. La línea con menor longitud se presentó en I5 con 5 cm. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos por Allan & Quinatoa¹⁶, que reportaron un LE que va de 5.83 a 9.50 cm, así como las 14 accesiones de cebada registraron en promedio 7.92 cm.

El PCG de 80% cebada y 66.67% trigo de las líneas evaluadas se observó pesos en un rango de 1.8 a 4 g. El PE tiene influencia directa sobre el rendimiento, granos por espiga y número de espigas por planta¹⁷. Sin embargo, al evaluar el PGP el 25.64% las líneas de trigo se ubicaron en un rango de 3.6 a 7 g diferente del caso de la cebada, donde el 53.33% de las líneas evaluadas se ubicaron en un rango 0.2 a 1 g de grano partido siendo bajo en comparación con trigo. El grano quebrado está relacionado a factores de temperatura y humedad

durante el secado, además de factores climáticos durante el desarrollo pueden influenciar en el incremento de PGP¹⁸.

El TGr en trigo y cebada fue de 4 mm, de acuerdo con los resultados establecidos el tamaño del grano es un carácter de rendimiento que depende de las condiciones ambientales y que se encuentra relacionado con variables como el grano quebrado y el número de granos por espiga¹⁹.

Al analizar las características de las líneas de trigo y cebada empleando los grupos de variables agrupadas por componentes obtenidas a partir del ACP se estableció que las variables que explican la mayor porción de la varianza permitieron separar las líneas diferenciales a través de un análisis de conglomerados. De esta forma se identificaron grupos de líneas de cada cultivo que comparten características similares, distinguidas de las líneas con disimilitudes evidentes dentro de las distancias euclídeas que se pueden observar en las Fig. 1 y 2. De esta forma, en el caso de trigo la Fig. 3., del análisis de conglomerados al estimar únicamente al grupo de variables contenidas en el componente 1 del PCA, las diferencias (distancia euclídea) fueron reducidas, generando dos grupos bien diferenciados de líneas de trigo, donde YR5/6*AOC, AC Avonlea, CDC Alsask, CDC GO, Ultima, Pronghorn, Bunker, Brevis y Yr43 comparten características, mientras que todas las demás líneas de trigo se agrupan en un segundo grupo. De este último las líneas denominadas como AC Interpid y AC Certa son las que comparten características homogéneas.

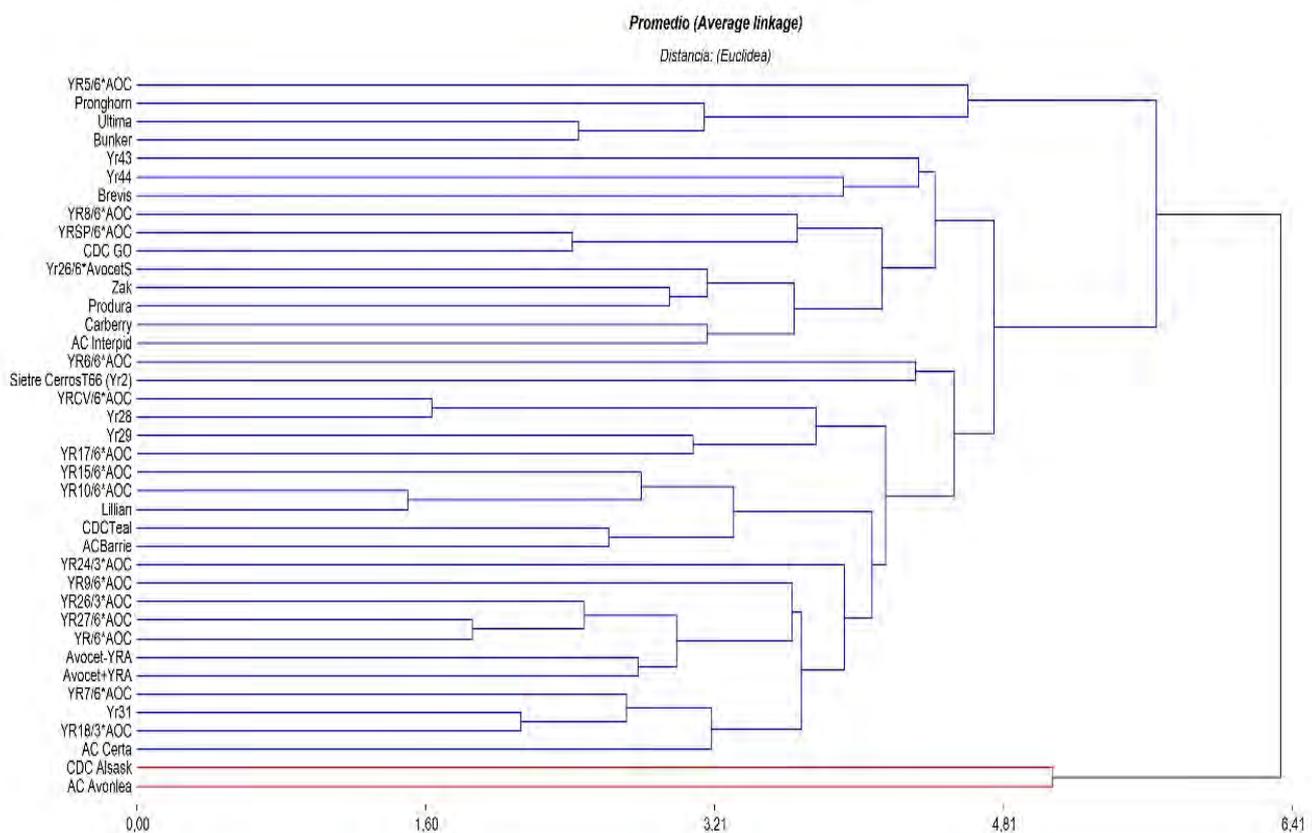


Figura 3. Análisis de conglomerados de las líneas diferenciales de trigo. Correlación cofenética= 0.773.

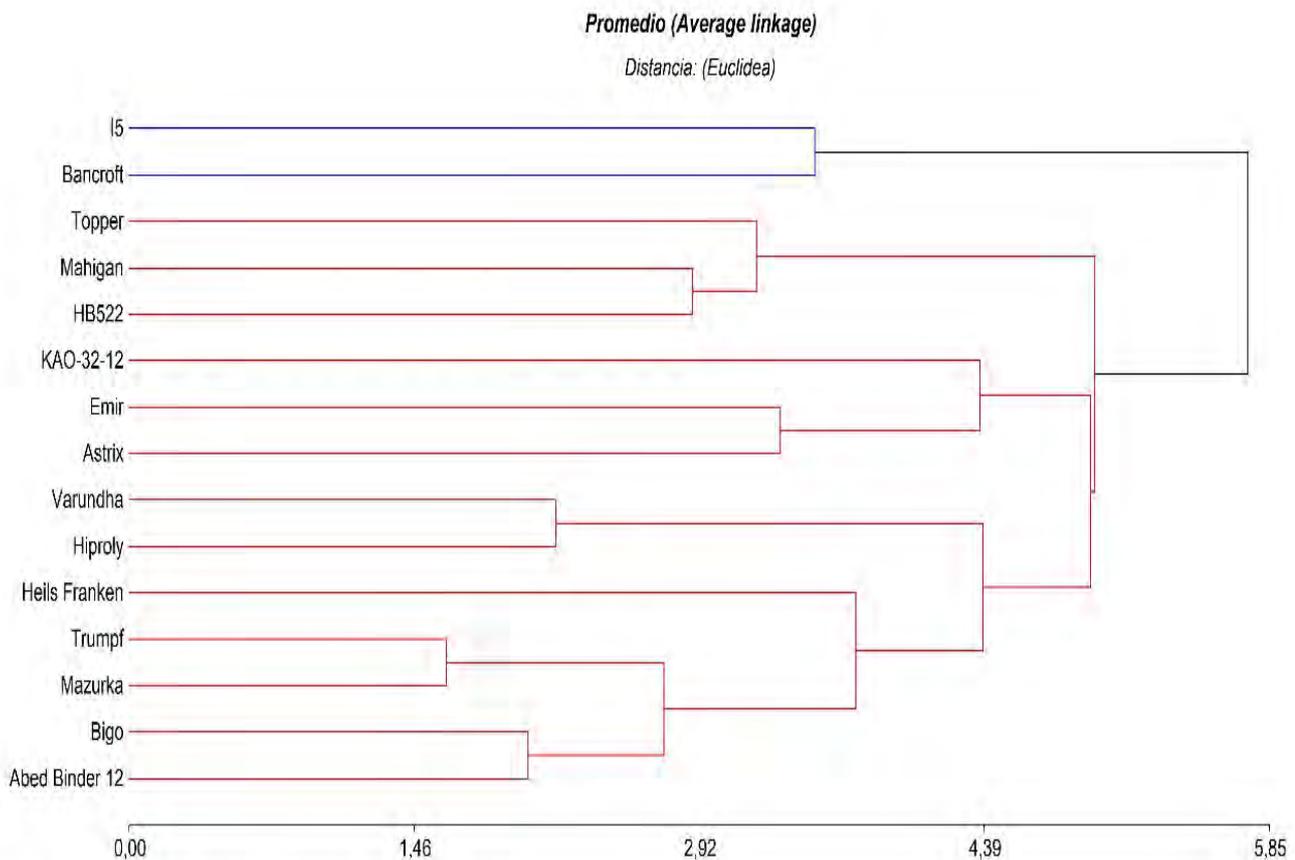


Figura 4. Análisis de conglomerados de las líneas diferenciales de cebada. Correlación cofenética= 0.834.

De la misma forma, de acuerdo a la Fig. 4., del análisis de conglomerados al estimar únicamente al grupo de variables contenidas en el componente 1 del PCA, en general las diferencias (distancia euclídea) fueron reducidas, generando dos grupos bien diferenciados de líneas de cebada, donde I5 y Bancroft, comparten características, mientras que todas las demás líneas de cebada se agrupan en un segundo gran grupo. Respecto del segundo grupo, las líneas denominadas como Topper y Mahigan son las que comparten características homogéneas.

CONCLUSIONES

Esta investigación permitió determinar que el porcentaje de emergencia (PE), hábito de crecimiento (HC), días al espigamiento (DE), altura de planta (AP), longitud de espiga (LE), peso de 100 granos (PCG), Peso del grano partido (PCP), incidencia de enfermedades (IE), y tamaño del grano (TGr), son las variables mejor describen la varianza entre líneas y que nos permiten caracterizar agromorfológicamente y con tolerancia a enfermedades.

Los análisis realizados permitieron diferenciar dos grupos de líneas diferenciales tanto para trigo como para cebada, por lo que esto permitirá que la selección de líneas diferenciales de cada grupo homogéneo puede ser utilizado como germoplasma para la selección de futuras variedades con características adecuadas de rendimiento y tolerancia a enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Los investigadores de este estudio agradecen al programa de cereales del INIAP por las semillas de germoplasma evaluado. Además, agradecen todas las facilidades del Programa de Semillas de la UEB, así como el Laboratorio de Fitopatología para el desarrollo del mismo.

Conflicts of Interest: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Jewsbury G. Plantas forrajeras [Internet]. 2018. Available from: <http://www.agro.unc.edu.ar/~wpweb/botaxo/wpcontent/uploads/sites/14/2016/08/Forrajeras.-2016.pdf>
2. Stephen B. Introducción a los cereales [Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 10]. Available from: <https://huerto.eco/cereales/introduccion>.
3. FAO. Perspectivas iniciales de la FAO sobre la oferta y la demanda de trigo en 2021/22 [Internet]. 2022 [cited 2022 Mar 15]. Available from: <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>
4. Morales ER. Manejo de cultivos andinos del Ecuador. Comisión Editorial de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; 2015.
5. SIPA. Principales cultivos 2022 en el Ecuador [Internet]. 2022 [cited 2022 Jun 15]. Available from: <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
6. SIPA. Principales cultivos 2022 en la provincia de Bolívar [Internet]. 2022 [cited 2022 Jun 15]. Available from: <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
7. Ugalde J. La producción de trigo no abastece al mercado. El diario [Internet]. 2017 Jun 25; Available from: <https://www.eldiario.ec/noticias-manabi-ecuador/437763-la-produccion-de-trigo-no-abastece-al-mercado/>
8. Ponce L, Garófalo J, Campaña D, Noroña P. Parámetros de evaluación y selección en cereales. Quito, Ecuador: INIAP: Estación experimental Santa Catalina; 2019. p. 58.
9. Jamali SH, Sadeghi L, Najafian M. A Multiplex PCR assay for Discriminating Charlock from Rapeseed: Implications for Seed Testing. In: Biol Forum Int J. 2017. p. 87–91.
10. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat [Internet]. versión 24. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba; 2011. Available from: <http://www.infostat.com.ar/>
11. Arenas LC, Heredia AK. Calidad y germinación de semillas de quinua *Chenopodium quinoa willd.* almacenadas artesanalmente por productores [Internet]. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales UDCA; 2017. Available from: <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/766>
12. Manobanda O, Rubín M. Respuesta productiva de cinco de variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) a la aplicación de dos sistemas de fertilización foliar, en la granja experimental Laguacoto III, cantón Guaranda, provincia de Bolívar [dissertation on the Internet]. Universidad Estatal del Bolívar; 2023. Available from: <https://dspace.ueb.edu.ec/handle/123456789/5103>
13. Hübner F, Arendt EK. Germination of cereal grains as a way to improve the nutritional value: a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2013;53(8):853–61.
14. Bayas B. Determinación del potencial productivo de cinco accesiones de avena (*Avena sativa* L) forrajera en la localidad de Naguan [dissertation on the Internet]. Universidad Estatal de Bolívar; 2022. Available from: https://www.dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/4170/1/TESIS_AVENA_BYRON_BAYAS.pdf#page=76&zoom=100,148,157
15. Miller D. Estadios de crecimiento del cultivo de trigo [Internet]. 2017. Available from: <https://www.lgseeds.es/media/Estadios-de-crecimiento-del-Trigo-1.pdf>
16. Allan A, Quinatoa C. Caracterización morfoagronómica de 144 accesiones de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en la granja experimental Lagucoto III Cantón Guaranda, provincia Bolívar [dissertation on the Internet]. Universidad Estatal de Bolívar; 2020. Available from: <https://www.dspace.ueb.edu.ec/handle/123456789/3673>
17. Ríos DK, Britto R, Delgado H. Evaluación del rendimiento y sus componentes en genotipos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) diferenciados por su tipo de espiga y grano. Rev UDCA Actual Divulg Científica. 2011;14(2):55–63.
18. de Souza ÍP, Schmidt AK, Ruffato S, Prado PMC. Condições de secagem e armazenamento na qualidade física de grãos de arroz Moti gome. Res Soc Dev. 2022;11(14):e77111435866–e77111435866.
19. Silva SG, Coronel CEI, Ramírez MA, Velasco PE. Análisis de la calidad del grano durante la cosecha de cebada con la combinada John Deere 9500. Rev Ciencias Técnicas Agropecu. 2004;13(1):25–30.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation. Borja Erazo J; Quinatoa Calvache R; Rodríguez Maldonado E; Silva García D; Román Ramos A. Caracterización del germoplasma de cereales con potencial agromorfológico para la provincia de Bolívar. Revis Bionatura 2023;8 (4) 11. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.11>

Additional information Correspondence should be addressed to aroman@ueb.edu.ec

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

El incremento matutino de la presión arterial es predictor de hipertrofia ventricular izquierda como señal de daño de organo blanco, confirmado por ecocardiografía

The morning increase in blood pressure is a predictor of left ventricular hypertrophy as a sign of target organ damage, confirmed by echocardiography.

Edison Guzmán ^{1*}; Alexandra Saguy ²; Janine Taco ³

¹ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador.

² Hospital General José María Velasco Ibarra. Av. 15 de Noviembre 1598 y Eloy Alfaro, San Juan de Tena, Ecuador. alexitasc115@gmail.com

³ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador. jtaco@ueb.edu.ec

Autor de correspondencia; Edison.guzman@ueb.edu.ec
Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.12>

RESUMEN

El incremento matutino de la presión arterial (IMPA) es predictor independiente de eventos cardiovasculares, los estudios que evalúan el IMPA y daño de órgano blanco son escasos y solo están basados en población asiática. El objetivo de esta investigación fue determinar que el incremento matutino de la presión arterial es predictor de hipertrofia ventricular izquierda como señal de daño órgano blanco, confirmado por ecocardiografía en los pacientes que se realizaron un MAPA (MONITOREO AMBULATORIO DE LA PRESION ARTERIAL) de 24 horas, en el servicio de Presurometría del Hospital de la UAI (UNIVERSIDAD ABIERTA INTERAMERICANA) durante el periodo Enero - Abril 2018, se aplicó un estudio de tipo descriptivo observacional de cohorte transversal, con una base de 210 pacientes, de los cuales solo 127 pacientes cumplieron los criterios de inclusión, se obtuvieron los nombres y apellidos, DNI, sexo, fecha del MAPA, Presión arterial (PA) de 24 horas, PA diurna, PA nocturna, patrón circadiano, porcentaje de mediciones validas, se calculó el IMPA con las fórmulas más utilizadas y se tomó como IMPA a valores ≥ 135 mmHg y ≥ 15 mmHg. Posteriormente se consulta la base de datos de los ecocardiogramas, obteniéndose MVI y se tomó como elevada en mujeres > 162 g y en hombres > 224 g y el EPR se consideró elevado > 0.42 .

Los resultados demostraron que la edad promedio fue de 68 años, el 22% presentaron HTA sistólica de 24 horas con predominio del patrón no dipper con el 39%, el 13% presento un IMPA y todos estos tuvieron algún tipo de hipertrofia ventricular izquierda como señal de daño de órgano blanco, lo que demostró que la HVI es un buen método para determinar el daño de órgano blanco en la HTA.

Palabras clave: Hipertensión arterial; incremento matutino de la presión arterial; hipertrofia ventricular izquierda; variabilidad de la presión arterial.

ABSTRACT

The morning blood pressure surge (MBPS) is an independent predictor of cardiovascular events. Studies assessing MBPS and target organ damage are limited and primarily based on Asian populations. The objective of this research was to determine whether the morning blood pressure surge is a predictor of left ventricular hypertrophy as a sign of target organ damage, confirmed by echocardiography in patients who underwent 24-hour ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) at the UAI Hospital (Open Interamerican University) from January to April 2018. A descriptive observational cross-sectional study was conducted with a sample of 210 patients, of whom only 127 met the inclusion criteria. Data collected included names, identification numbers, gender, date of ABPM, 24-hour blood pressure, daytime blood pressure, nighttime blood pressure, circadian pattern, and the percentage of valid measurements. The MBPS was calculated using commonly used formulas and defined as values ≥ 135 mmHg and ≥ 15 mmHg. Subsequently, echocardiogram data were retrieved, left ventricular mass index (LVMI) was calculated, and it was considered elevated in women >162 g and in men >224 g. Left ventricular relative wall thickness (RWT) was considered elevated >0.42 .

Results showed that the average age was 68 years, 22% had 24-hour systolic hypertension with a predominance of the non-dipper pattern at 39%, and 13% had a morning blood pressure surge, all of whom exhibited some form of left ventricular hypertrophy as a sign of target organ damage, indicating that LVH is a reliable method for assessing target organ damage in hypertension

Keywords: Arterial hypertension; morning blood pressure surge; left ventricular hypertrophy; blood pressure variability.

INTRODUCCIÓN

La Hipertensión Arterial (HTA) es una enfermedad crónica frecuente que afecta 1280 millones de personas a nivel mundial, cerca de 2/3 partes pertenecen a países de ingresos bajos y medianos ¹, es la causa principal de infartos agudos de miocardio y enfermedades cerebrovasculares, que son las principales responsables de la mortalidad a nivel global ², causada por una hipertensión arterial no controlada, en latinoamérica, se realizó el estudio RENATA 2 en el cual se pudo observar que solo el 55.5% de pacientes hipertensos esta medicado farmacológicamente y de estos solo el 24.2% tiene la presión arterial controlada ³. Un tratamiento adecuado de la hipertensión arterial (valores de presión arterial menor de 140/90 mmHg) ⁴, debe poner mucho énfasis en la variabilidad de la presión arterial (cambios bruscos de cifras de presión arterial) ⁵, ya que se relaciona frecuentemente con el síndrome aterotrombótico hemodinámico sistémico (SHATS), que se caracteriza por la combinación de estrés hemodinámico y enfermedad vascular, que es un factor de riesgo de eventos cardiovasculares y daño orgánico (cerebro, retina, corazón, riñon y arterias) ⁵; ⁶. Uno de los parámetros para valorar la variabilidad hipertensiva es el incremento matutino de la presión arterial (IMPA), que ha tomado mucha fuerza en los últimos años debido a que la mayoría de sucesos cardíacos fatales (infarto agudo de miocardio, ictus isquémico) ocurren por la mañana debido al ritmo circadiano elevado, debido a la elevación de catecolaminas y cortisol, la agregación plaquetaria y disminución del sistema fibrinolítico que son los mecanismos implicados con mayor frecuencia ⁷, ⁸, uno de los primeros en utilizar este término fue el Dr. Kazuomi Kario desde el año 2003 ⁹, que observó que un IMPA ≥ 55 mmHg se relacionó con enfermedad cerebrovascular con un RR 2.7; en el 2009, además demostró que los pacientes con IMPA ≥ 17.90 mmHg

presentan un OR: 2.63 de presentar hipertrofia ventricular izquierda concéntrica (HVI)¹⁰; otra evidencia proviene de la base de datos llamado IDACO, donde se evidenció que un IMPA >28 mmHg en el despertar se asoció con RR de 1.45 de presentar eventos cardiovasculares y mortalidad global con un RR 1.23¹¹, a nivel de América existen pocos datos, uno de los últimos estudios se realizó en Argentina que evidenció un IMPA ≥ 15 mmHg se relacionaba con HVI y presentaba una prevalencia del 12%¹², como se puede observar la falta de control de la hipertensión arterial acompañado del IMPA predispone a daño de órgano blanco (hipertrofia ventricular izquierda del corazón)¹³ y aumento de riesgo de muchas complicaciones cardiovasculares.

El IMPA es predictor de hipertrofia ventricular izquierda como señal de daño de órgano blanco, confirmado por ecocardiografía, son datos de vital importancia ya que nos ayudaran a los profesionales de la salud a conocer datos epidemiológicos sobre el IMPA, los mismos que a nivel de Latinoamérica y del país son pocos, con estos datos nos permitirá adoptar una conducta más responsable en todo el personal médico para un manejo óptimo de la HTA con énfasis en la triada propuesta por Kario: control adecuado de presión arterial en las 24 horas, control del ritmo circadiano y el manejo de la variabilidad hipertensiva¹⁴, brindando esquemas de fármacos adecuados para el manejo de la variabilidad hipertensiva, como son el amlodipino y la indapamida^{15,5}, y el uso de fármacos de tipo antagonista de los receptores de angiotensina en dosis nocturnas¹⁶ para evitar daño de órgano blanco y poder iniciar un tratamiento eficaz en los pacientes que se encuentran en riesgo de hipertrofia ventricular izquierda, con lo que obtendremos una mejor calidad de vida de los pacientes, reducción de complicaciones y una disminución de costos de hospitalización.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio realizado fue observacional de cohorte retrospectiva, a través de la evaluación de una base de datos construida ad hoc para este estudio, en base a la revisión de las historias clínicas del Hospital de la Universidad Abierta Interamericana, en el servicio de Presurometría, se formó la base de datos con todos los pacientes hipertensos que acudieron al servicio a realizarse un MAPA (monitoreo ambulatorio de la presión arterial) de 24 horas, desde el 01 de Enero del 2018 al 30 de Abril del 2018, obteniéndose una base de 210 pacientes, de los cuales solo 127 pacientes cumplieron los criterios de inclusión (pacientes que acuden para la realización de un MAPA, mediciones validas del MAPA del 50%, ecocardiograma entre los 6 meses antes o después de la realización del MAPA), y los criterios de exclusión (pacientes con valvulopatías y pacientes con insuficiencia cardiaca con FEY (fracción de eyección) reducida), luego de seleccionada la muestra, se plantearon las siguientes variables utilizadas: presión arterial sistólica (variable cuantitativa continua, medida en mmHg), ritmo circadiano 9.4 mmhg (variable cuantitativa continua, medida en mmHg), IMPA (variable cuantitativa continua, medida en mmHg), geometría ventricular (variable cuantitativa continua, medida en gramos), se procedió a calcular el IMPA mediante 3 formulas, de los cuales debían tener 2 valores elevado para ser considerado como IMPA elevado, las fórmulas fueron: IMPA 1= promedio de la PAS de las 2 h después del despertar, IMPA 2= promedio PAS de 2 horas al despertar – promedio PAS más baja nocturna y la siguiente, IMPA 3= PAS promedio de 2 horas al despertar – promedio de PAS nocturna, se tomó como IMPA valores mayores a 135 mmHg, 15 mmHg y 15 mmHg respectivamente⁵.

Posteriormente se consultó la base de datos de ecocardiografía, obteniéndose la fecha del estudio, DDVI(diámetro diastólico del ventrículo izquierdo), S(septum), PP(pared posterior); diámetro de la aurícula izquierda, diámetro de la aorta, se procedió a calcular la masa del ventrículo izquierdo en gramos, con la fórmula de modificado de Devereux: $MVI = 0,8 \times \{1,04 [(DdVI + PPdVI + SIVd)^3 - DdVI^3] \} + 0,6$ y el espesor parietal relativo con la fórmula: $(2 \times PPdVI) / DdVI$. Se consideró MVI(masa del ventrículo izquierdo) elevada en mujeres > 162 g y en hombres > 224 g, el EPR(espesor parietal relativo) se consideró elevado > 0.42 ¹⁷.

Una vez recolectada la información se procedió a relacionar el IMPA de los pacientes hipertensos de 24 horas con hipertrofia ventricular izquierda y la geometría ventricular. Para el procesamiento de los resultados se utilizó Microsoft Excel 2010, donde se obtuvieron los promedios, desviaciones estándar y las gráficas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de obtener la base de datos se obtuvieron los siguientes datos:

La edad promedio de nuestro pacientes fue del 68 años, el promedio de la presión arterial sistólica de 24 horas fue de 120.5 mmHg y de presión arterial diastólica fue de 73.7 mmHg que se considera valores normales, el promedio del ritmo circadiano (descenso de la presión arterial nocturna en relación a la matutina) fue de 8.8 mmHg presentando un patrón no dipper, el promedio de IMPA fue de 147.4 mmHg y 27.1 mmHg que se estaban elevados y el promedio de la masa ventricular en pacientes con IMPA elevado fue de 278.7 gramos que estaba elevado tanto para el sexo masculino y femenino.

VARIABLE	PROMEDIO	DS
EDAD	68	± 12.1
PAS PROMEDIO	120.5	± 13.6
PAD PROMEDIO	73.7	± 9.4
RITMO CIRCADIANO	8.8	±10.4
MASA	233.4	±87
EPR	0.5	±0.1
IMPA 1	147.4	±9.8
IMPA 2	27.1	±8.8
MASA IMPA	278.7	±100.9
EPR IMPA	0.5	±0.1

Tabla 1. Variables de estudio

Luego se procedió a filtrar los datos para determinar que pacientes presentan hipertensión arterial sistólica, evidenciando que el 22% (28 personas) tenían una HTA sistólica de 24 horas no controlada, además se observó hipertensión arterial sistólica diurna del 20% (25 pacientes) y por último la hipertensión sistólica nocturna con el 31% (40 pacientes).

	PAS PROMEDIO		PAS DIURNA		PAS NOCTURNA	
	No	%	No	%	No	%
NORMAL	99	78	102	80	87	69
ELEVADO	28	22	25	20	40	31
TOTAL	127	100	127	100	127	100

Tabla 2. Pacientes con hipertensión sistólica medido por mapa de 24 horas

En este estudio se encontró que 28 paciente (22%) que presentaron HTA sistólica de 24 horas medido por MAPA, el ritmo circadiano promedio fue de 9.4 mmHg, la más frecuente fue el patrón no dipper con el 39% (11 pacientes), seguido del patrón dipper con el 32% (9 pacientes), hiper dipper 18% (5 personas), y por ultimo dipper inverso con el 11% (3 personas).

PATRÓN	No	%
DIPPER	9	32
NO DIPPER	11	39
HIPER DIPPER	5	18
DIPPER INVERSO	3	11
TOTAL	28	100

Tabla 3. Patrón circadiano en pacientes con hipertensión sistólica, medido por mapa de 24 horas.

En este estudio también se pudo demostrar que de los 127 pacientes, el 13.3%(17 pacientes) con IMPA presentaron alguna alteración de la geometría ventricular izquierda con un promedio de masa de 278.7 g, la más frecuente fue la hipertrofia ventricular concéntrica con el 53% (9 pacientes), seguido de la hipertrofia excéntrica 29% (5 pacientes) y por último la remodelación concéntrica con el 18% (3 pacientes).

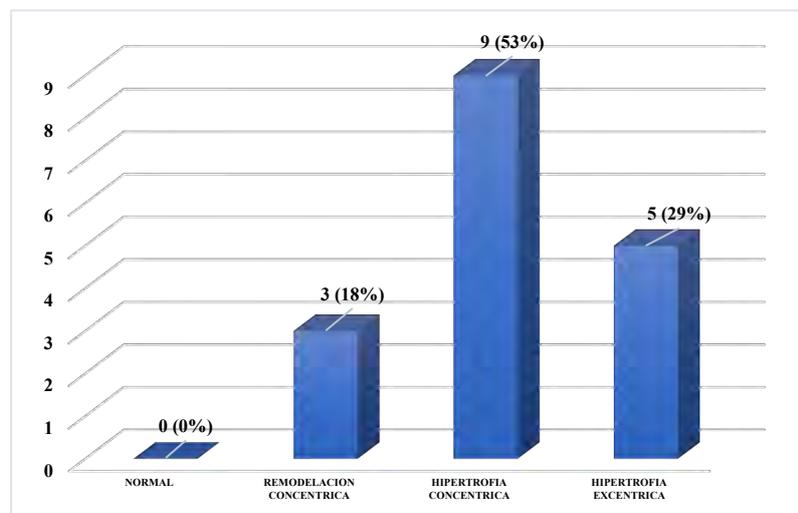


Figura 1. Pacientes con incremento matutino de la presión arterial y su geometría ventricular izquierda.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio se evidenció una HTA sistólica de 24 horas en el 22% que se acercan a los valores que se observaron en el estudio RENATA 2, los cuales presentaron HTA en el 36.3%¹⁸ al igual que en el estudio realizado de la base de datos IDACO presento una hipertensión arterial sostenida en el 25,4%¹¹.

El patrón circadiano más frecuente en nuestro estudio fue el patrón no dipper con el 39%, que concuerda con un estudio realizado de la base de datos de CARDIORISC, que se observó un patrón no dipper en el 40.2%¹⁹. Este estudio demostró que el IMPA ≥ 15 mmHg se relacionó con aumento de la masa ventricular con una media de 278.7 g y una PAS promedio 147.4 mmHg, las cuales todas estaban elevadas, que concuerda con un estudio que evidencio un IMPA ≥ 15 mmHg, PAS de 147.1 ± 9.6 mmHg, y una MVI de 215.5 ± 28.5 g y un IMVI de 131.4 ± 16.6 g/m²²⁰.

Se observo en el estudio que todos los pacientes con un IMPA ≥ 15 mmHg tenían HVI con predominio del tipo concéntrica en el 53%, concuerda con un estudio que determinó que un IMPA ≥ 9.31 mmHg tenían mayor riesgo de hipertrofia concéntrica (OR: 1.99, IC:95%, P: 0,008), y ≥ 17.90 mmHg tenían mayor riesgo de hipertrofia concéntrica (OR: 2.63, IC: 95%, P: 0,008)¹⁰.

La frecuencia del IMPA en nuestro estudio fue del 13% que se relaciona con un estudio realizado en el Hospital Italiano de Buenos Aires que publicó una prevalencia de IMPA del 13,4%¹², y se acerca a un estudio realizado en el Hospital Virgen Macarena (Sevilla, España) realizado en el año 2019, que reporto un IMPA del 9% en pacientes con un accidente cerebrovascular lacunar²¹.

CONCLUSIONES

Este estudio encontró que todos los pacientes con incremento matutino de la presión arterial elevada presentaron hipertrofia ventricular izquierda, demostrando que el IMPA es un predictor de hipertrofia ventricular izquierda como señal de daño de órgano blanco mediado por HTA, con la necesidad de seleccionar un mejor esquema terapéutico con énfasis en el control de la variabilidad hipertensiva y así disminuir la presentación de eventos cardiovasculares.

Agradecimientos: Este trabajo se ha concretado por el apoyo de todo el personal del Hospital Universitario de la Universidad Abierta Interamericana y todo su personal, en especial del Dr. Ricardo Levin quien me asesoro durante esta investigación, además agradezco a la Universidad Estatal de Bolívar quien me ha impulsado a continuar con la investigación como docente de esta prestigiosa institución educativa.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Hipertensión [Internet]. OMS. 2023. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
2. Organización Mundial de la Salud. Las 10 principales causas de defunción [Internet]. OMS. 2020. [Clinical Biotec, Universidad Católica del Oriente \(UCO\) and Universidad Nacional Autónoma de Honduras \(UNAH\)](#)

Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

3. Delucchi AM, Majul CR, Vicario A, Cerezo GH, Fábregues G. Registro nacional de hipertensión arterial. Características epidemiológicas de la hipertensión arterial en la argentina. estudio renata-2. *Rev Argent Cardiol.* 2017;85(4):340–6.
4. Laurent S, H Lip GY, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for managing arterial hypertension. *Eur Hear J [Internet].* 2018;39:3021–104. Available from: www.escardio.org/guidelines
5. Kario K. Morning Surge in Blood Pressure: A Systemic Hemodynamic Atherothrombotic Syndrome Phenotype. *Am J Hypertens [Internet].* 2015;28(1). Available from: <https://academic.oup.com/ajh/article/28/1/7/2730190>
6. Arocha I. R. El Daño Orgánico en la Hipertensión Arterial [Internet]. *medecs.* 2022. Available from: <https://www.medecs.com.ar/2022/06/21/el-dano-organico-en-la-hipertension-arterial/>
7. Hernandez Fernandes E, Coelho D, Missel Correa JR, Kumpinski D. Alteraciones circadianas del sistema cardiovascular. *Rev Española Cardiol [Internet].* 2000 Jan 1 [cited 2023 Oct 5];53(1):117–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300893200750688>
8. Gómez-Gómez B, Rodríguez-Weber FL, Díaz-Greene EJ, Gómez-Gómez B, Rodríguez-Weber FL, Díaz-Greene EJ. Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. *Med Interna México [Internet].* 2018 [cited 2023 Oct 6];34(2):244–63. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-48662018000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
9. Kario K, Hoshida S, Haimoto H, Yamagiwa K, Uchiba K, Nagasaka S, et al. Sleep Blood Pressure Self-Measured at Home as a Novel Determinant of Organ Damage: Japan Morning Surge Home Blood Pressure (J-HOP) Study. *J Clin Hypertens [Internet].* 2015;17(5):340–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jch.12500>
10. Matsui, Y., Eguchi, K., Shibasaki, S., Shimizu, M., Ishikawa, J., Shimada, K., Kario K. Association between the morning-evening difference in home blood pressure and cardiac damage in untreated hypertensive patients. *J Hypertens [Internet].* 2009;27(4):712–20. Available from: <https://europepmc.org/article/med/19516171>
11. Stolarz-Skrzypek K, Thijs L, Li Y, Hansen TW, Boggia J, Kuznetsova T, et al. Short-term blood pressure variability in relation to outcome in the International Database of Ambulatory blood pressure in relation to Cardiovascular Outcome (IDACO) HHS Public Access. *Acta Cardiol.* 2011;66(6):701–6.
12. Barochiner J, Aparicio LS, Cuffaro PE, Rada MA, Morales MS, Alfie J, et al. Morning rise in home blood pressure and target organ damage in hypertensive patients | Incremento matutino de la presión arterial domiciliar y daño de órgano blanco en paciente hipertensos. *Rev la Fac Ciencias Médicas (Córdoba, Argentina).* 2014;71(4):171–7.
13. Ennis IL, Del A, Yeves M. Palabras clave distintas formas de hipertrofia cardíaca patológica vs fisiológica capítulo 62 fisiopatología de la hipertrofia cardíaca: hipertrofia cardíaca fisiológica y patológica. 2004;

14. Kario K, Tomitani N, Matsumoto Y, Hamasaki H, Okawara Y, Kondo M, et al. Research and Development of Information and Communication Technology-based Home Blood Pressure Monitoring from Morning to Nocturnal Hypertension. *Ann Glob Heal*. 2016 Mar 1;82(2):254–73.
15. Zhang Y, Agnoletti D, Safar ME, Blacher J. Effect of Antihypertensive Agents on Blood Pressure Variability The Natrilix SR Versus Candesartan and Amlodipine in the Reduction of Systolic Blood Pressure in Hypertensive Patients (X-CELLENT) Study. *Hypertension* [Internet]. 2011; Available from: <http://cme.ahajournals.org>
16. Kario K, Hoshida S. Correspondence to Age-Related Difference in the Sleep Pressure-Lowering Effect Between an Angiotensin II Receptor Blocker and a Calcium Channel Blocker in Asian Hypertensives The ACS1 Study Clinical Trial-ACS1 Study. *Clin Trial-ACS1 Study* [Internet]. 2015;65(729–735). Available from: <http://hyper.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA>.
17. Marwick TH, Gillebert TC, Aurigemma G, Chirinos J, Derumeaux G, Galderisi M, et al. Recommendations on the use of echocardiography in adult hypertension: a report from the European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI) and the American Society of Echocardiography (ASE) †. *Eur Hear J – Cardiovasc Imaging* [Internet]. 2015;16:577–605. Available from: <https://academic.oup.com/ehjcardiovascular/article/16/6/577/2397586>
18. Consejo Argentino de Hipertensión Arterial: SAC;FAC; SAHA; Consenso de Hipertensión Arterial. *Rev Argent Cardiol*. 2018;86(1115):1–80.
19. Sierra C, De La Sierra A, Sobrino J, Segura J, Banegas JR, Gorostidi M, et al. Monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA): características clínicas de 31.530 pacientes. *Med Clin (Barc)*. 2007 Jun 1;129(1):1–5.
20. Ikeda T, Gomi T, Shibuya Y, Matsuo K, Kosugi T, Oku N, et al. Morning rise in blood pressure predicts left ventricular hypertrophy in treated hypertensive patients. *Hypertens Res*. 2004;27(12):939–46.
21. Castilla-Guerra L, Domínguez Mayoral A, González-Iglesias L, Fernández-Moreno MC, Rico-Corral MA. Morning blood pressure surge in patients with recent ischaemic stroke: the neglected factor. *Hipertens y Riesgo Vasc*. 2022 Apr 1;39(2):56–61.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation. E Guzmán; A Saguay; J Taco.El incremento matutino de la presión arterial es predictor de hipertrofia ventricular izquierda como señal de daño de organo blanco, confirmado por ecocardiografía
Revis Bionatura 2023;8 (4) 12. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.12>

Additional information Correspondence should be addressed to Edison.guzman@ueb.edu.ec

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

[Clinical Biotec](#), [Universidad Católica del Oriente \(UCO\)](#) and [Universidad Nacional Autónoma de Honduras \(UNAH\)](#)

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Factores de riesgo asociados a la hipertensión arterial y enfermedad crónica renal

Risk factors associated with high blood pressure and chronic kidney disease

Morayma Remache ^{1*}; María José Fierro ²; Gladys Mite ³; Juan Monserrate ⁴

¹ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador.

² Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador. mfierro@ueb.edu.ec

³ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador. gmite@ueb.edu.ec

⁴ Universidad Estatal Península de Santa Elena. Campus Académico Avda. principal “La Libertad”, Santa Elena, Ecuador. monserrate@upse.edu.ec

Autor de Correspondencia. lremache@ueb.edu.ec

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.13>

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los factores de riesgo asociados a la hipertensión arterial y a la enfermedad crónica renal, la muestra estuvo conformada por 22 docentes de sexo femenino mayoritariamente, con un total de 18 mujeres, en edades comprendidas entre 55-60 con la edad mínima de 28 y la edad máxima de 59, el grupo estudiado cuenta con un nivel de un nivel de educación superior. El estudio fue de tipo descriptivo, con un enfoque cuantitativo, de campo, y correlacional, y con un diseño transversal, los participantes del estudio suscribieron el consentimiento informado. Para la recolección de datos se utilizó una ficha sociodemográfica, y un análisis bioquímico completo. Los factores de riesgo que se asocian a la hipertensión arterial y a la enfermedad crónica renal se destaca la falta de ejercicio, lo cual tiende a afectar la salud física, mental y social de los participantes. Del análisis bioquímico se evidencia que un alto porcentaje de los participantes padecen de hipertensión.

Palabras clave: Hipertensión; enfermedad renal crónica; docentes.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the risk factors associated with arterial hypertension and chronic kidney disease. The sample consisted of 22 teachers, mostly women, with a total of 18 women, aged between 55-60, with a minimum age of 28 and a maximum age of 59. The study was descriptive, with a quantitative, field, and correlational approach, and with a cross-sectional design, study participants signed the informed consent form. A sociodemographic card and a complete biochemical analysis were used for data collection. In conclusion, among the risk factors associated with arterial hypertension and chronic kidney disease, the lack

of exercise stands out, which tends to affect the physical, mental and social health of the participants. From the biochemical analysis, it is evident that a high percentage of the participants suffer from hypertension.

Keywords: Hypertension; chronic kidney disease; teachers.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social y no se limita a la ausencia de enfermedad o discapacidad. solamente la ausencia de afecciones o enfermedades. Esta concepción, que trasciende los meramente físico. A su vez, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) incluyo un aspecto adicional, destacando que la salud también ésta relacionada con el medio ambiente que rodea a la persona¹. Por otro lado, la enfermedad puede definirse como una alteración del estado de salud, implicando la pérdida transitoria o permanente del bienestar físico, psíquico o social. Esta definición comprende dos dimensiones: una subjetiva, relacionada al malestar y sentirse mal con diferente intensidad, y otra objetiva, referente a la afectación a la capacidad de funcionar en diferentes grados². En este sentido, una enfermedad importante que afecta a millones de personas en el mundo es la Hipertensión arterial, la misma que es considerada como es un trastorno por el cual los vasos sanguíneos tienen persistentemente una tensión elevada. Normalmente la sangre se distribuye desde el corazón a todo el cuerpo por medio de los vasos sanguíneos. Con cada latido, el corazón bombea sangre a los vasos. La tensión arterial se genera por la fuerza de la sangre que empuja las paredes de los vasos sanguíneos (arterias) cuando el corazón bombea. Cuanto más alta es la tensión, más dificultad tiene el corazón para bombear³. La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud pública importante, basada en estudios poblacionales de países desarrollados, la prevalencia media de 7,2% en diferentes grupos etarios con enfermedades como diabetes mellitus (DM), Insuficiencia renal, infartos teniendo en cuenta el incremento de la morbimortalidad, relacionado con el deterioro renal. La hipertensión arterial (HTA) ocasiona la enfermedad renal y la enfermedad renal genera hipertensión. Cabe mencionar que la hipertensión sistémica provoca un aumento de la presión capilar glomerular que provoca daño renal y un deterioro acelerado. Lo contrario también es cierto, ya que el daño renal conduce al desarrollo de hipertensión a través de la retención de sodio y la activación del sistema renina-angiotensina. Independientemente de la etiología de la hipertensión, existen estudios en los cuales han demostrado que la reducción de la presión arterial (PA) reduce el riesgo cardiovascular, la mortalidad y la enfermedad renal crónica (ERC) progresiva.

La hipertensión es una de las causas de la ERC debido a los efectos nocivos que tiene el aumento de la PA en la vasculatura renal. La presión arterial alta no controlada y a largo plazo conduce a una presión intraglomerular alta, lo que altera la filtración glomerular; el daño a los glomérulos conduce a un aumento en la filtración de proteínas, lo que resulta en un aumento anormal de las cantidades de proteína en la orina (micro albuminuria o proteinuria). La micro albuminuria es la presentación de pequeñas cantidades de albúmina en la orina y suele ser el primer signo de ERC. La proteinuria (relación proteína/creatinina ≥ 200 mg/g) se desarrolla a medida que progresa la ERC y se asocia con un mal pronóstico tanto para la enfermedad renal como para la enfermedad cardiovascular (ECV). Como se mencionó anteriormente, la relación entre la ERC y la HTA es cíclica, ya que la ERC puede contribuir o causar HTA.

La hipertensión es una complicación de salud que ha venido afectando a todo el mundo teniendo como resultado que hay 1280 millones de adultos de 30 a 79 años con hipertensión, en donde el 46% de los adultos hipertensos desconocen que padecen esta afección; apenas uno de cada cinco adultos hipertensos (el 21%) tiene controlado el problema⁴; Cuando se trata de enfermedades renales, se sabe que 850 millones de personas en todo el mundo padecen algún tipo de enfermedad renal, evidenciándose que la prevalencia de la ERC en todo el mundo es del 10,4 % entre los hombres y del 11,8 % entre las mujeres⁵

En Ecuador según la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud⁶ estiman que aproximadamente el 20 % de la población mayor de 19 años tiene hipertensión arterial, donde según los resultados de la encuesta denominada STEPS el 54,2% de los encuestados desconocen que padecen de hipertensión arterial, aquellos que presentan niveles alterados de esta patología representan ser el 16,2%, mismos que consumen medicamentos para controlar la PA, mientras que 12,6% de la población encuestada padece de hipertensión pero no consume ningún tipo de medicamentos. En el Ecuador la ERC es la cuarta causa de mortalidad general y la quinta de mortalidad prematura; la mortalidad por ERC alcanza niveles entre el 6% y 7%; existen cerca de diez mil personas en tratamiento con hemodiálisis y diálisis peritoneal, lo que representa una tasa de 660 casos por millón de habitantes⁷

Tomando en consideración los datos expuestos se deja en evidencia la prevalencia de hipertensión y enfermedad renal complicaciones que no sólo afecta la condición de vida de los pacientes con estas patologías sino que también la acortan, en la actualidad no se han evidenciado estudios que den a conocer si estas complicaciones de salud están afectando a la población bolivariense o guarandeña, la misma que está constituida por 11.198 personas en edades de entre 30 a 90 años que podrían ser considerados como una población propensa a padecer este tipo de enfermedades.

Por lo tanto, la presión arterial elevada conduce al daño de los vasos sanguíneos dentro del riñón, así como en todo el cuerpo. Para determinar la influencia del control de hipertensión en la función renal, ya que puede causar daño por tal motivo esto afecta la capacidad del riñón para filtrar líquidos y desechos de la sangre, lo que lleva a un aumento del volumen de líquido en la sangre, lo que provoca un aumento de la presión arterial. En este sentido, el presente estudio tuvo como objetivo es identificar los factores de riesgo asociados a la hipertensión y la enfermedad renal crónica en docentes de la unidad educativa Verbo Divino debido a su exposición a la presión laboral, falta de actividad física, permanecer largas horas de pie y consumir poca agua. , reportan problemas frecuentes con infecciones del tracto urinario, limitaciones para ir al baño por el trabajo con estudiantes y otros factores que pueden provocar que padezcan estas enfermedades que pueden afectar su salud e incluso provocar la muerte.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en la unidad educativa Verbo Divino del cantón Guaranda. La población de estudio estuvo compuesta por un total de 22 docentes, entre ellos 18 mujeres y 4 hombres. Las variables de investigación fueron factores de riesgo, hipertensión arterial y enfermedad renal crónica, escala continua, comprendiendo de octubre a enero de 2022, recolección de datos, toma de medidas antropométricas, seguimiento. de signos vitales, especialmente la presión arterial, recolección de orina en 24 horas (clearance

de creatinina), por dos ocasiones la primera insitu, la segunda a los 6 meses , muestras de sangre para obtención de química sanguínea, analizado por el laboratorio gama salud y el laboratorio Clínico Alvarez del cantón Salcedo, los Docentes acudieron a las instalaciones de la Unidad Educativa en el auditorio. El enfoque utilizado en la investigación fue descriptivo, con un enfoque cuantitativo, de campo, y correlacional, y con un diseño transversal. Para la recolección de datos se utilizó una ficha sociodemográfica, medidas antropométricas y, un análisis bioquímico completo. El análisis de los datos se realizó mediante el software estadístico SSPS. Todos los participantes del estudio proporcionaron su consentimiento informado previo a su inclusión en la investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presenta los siguientes resultados:

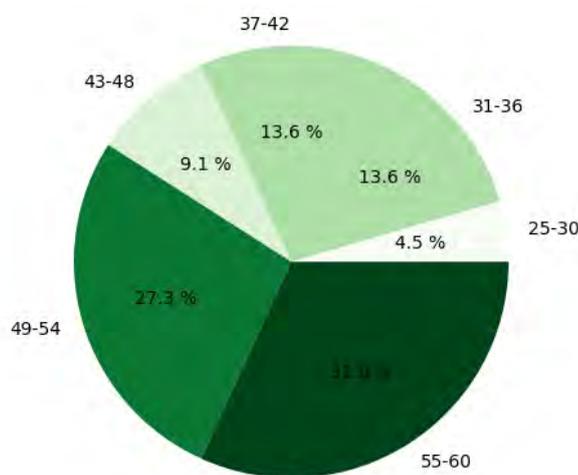


Figura 1. Edad

La figura indica la frecuencia de la edad de acuerdo a diferentes rangos. La mayor presencia se encuentra entre el rango de 55-60 años de edad.

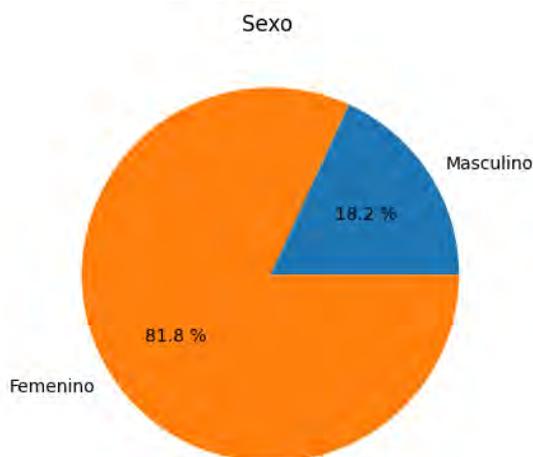


Figura 2. Sexo

La figura 2 pertenece al grupo de docentes está conformado mayoritariamente por personas el 18,18% corresponden al sexo masculino.

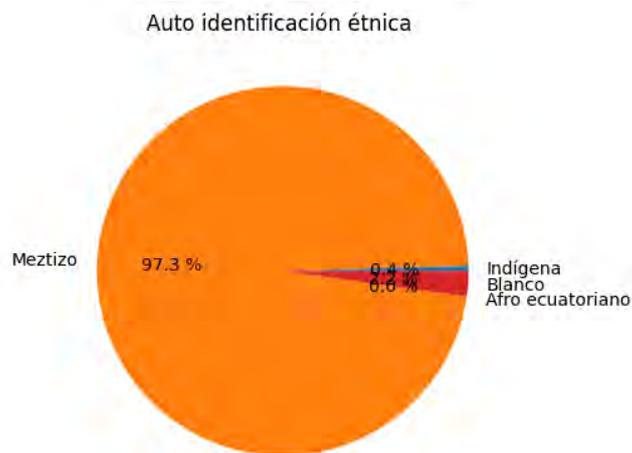


Figura 3. Auto identificación étnica

La auto identificación étnica permite evidenciar la predisposición ciertas patologías, es por esto que dentro del pres buscado identificar esta característica teniendo que los encuestados se auto consideran mestizos.

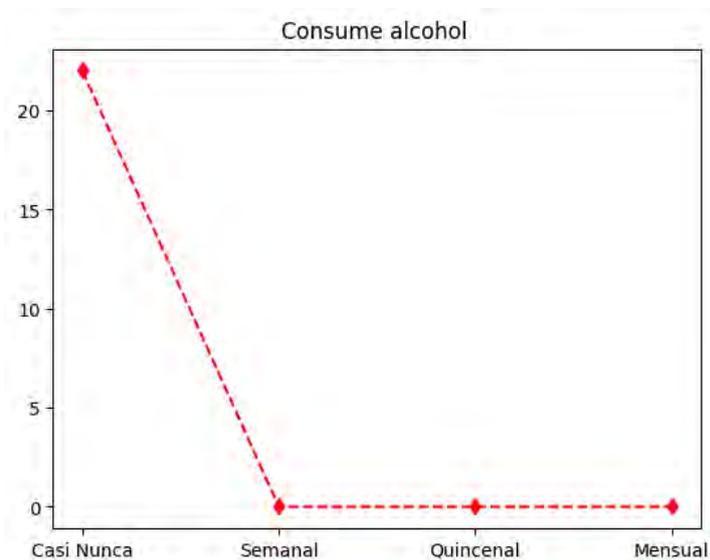


Figura 4. Consume alcohol

A respecto de los hábitos que mantienen estos docentes que pueden ser considerados como dañinos se evalúa el consumo de alcohol donde estos establecen que el consumo es mínimo ya que casi nunca ingieren bebidas con estas características, esto lo reporta.

Identificación de sedentarismo

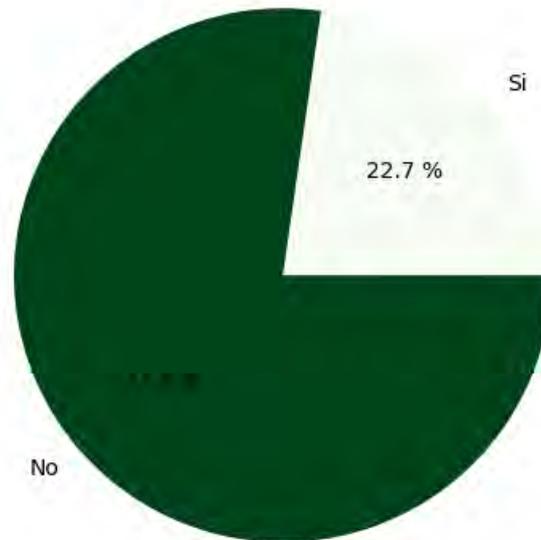


Figura 5. Identificación de sedentarismo

El sedentarismo es considerado como una de las causas que puede llevar a las personas a padecer problemas de salud tales como alteraciones de la presión arterial, en donde según los datos recabados el 22,73% de los profesores encuestado se auto consideran sedentarios lo que puede convertirles en un grupo propenso a padecer problemas de hipertensión y desencadenar enfermedad renal crónica que se reporta.

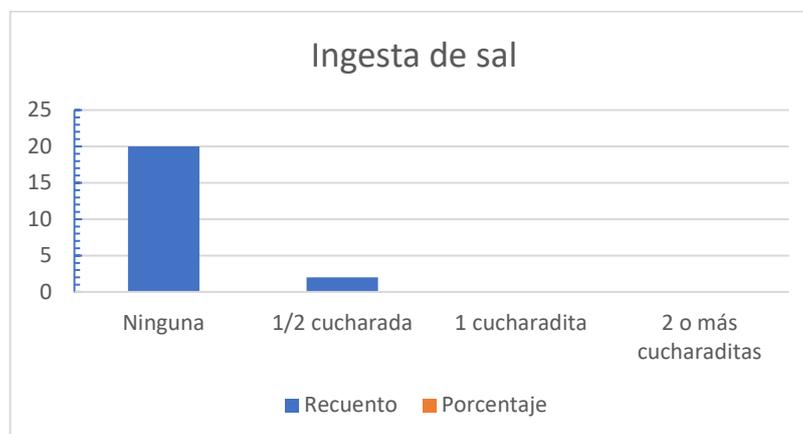


Figura 6. Ingesta de sal

La ingesta de altos niveles de sodio (mineral que compone la sal) es uno de los principales factores de alteración de la presión arterial, en donde del total de docentes encuestados se identifica que el 9,09% consume ½ cucharada de sal proporción que en combinación con otros alimentos puede superar la necesidad diaria de las personas, llegando a influir de forma negativa este hábito en la salud de los docentes.

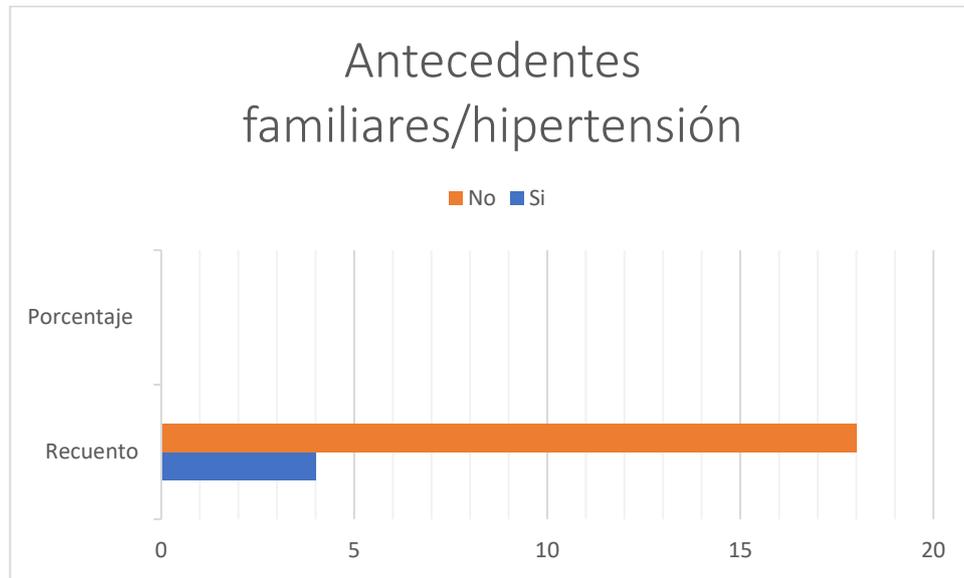


Figura 7. Antecedentes familiares/hipertensión

No se evidencia relación con antecedentes familiares, sin embargo, en la toma de signos vitales 27,27% presenta una PA limítrofe el 16,64% en etapa 1; mientras que en la segunda muestra solamente se ve presente la presión arterial limítrofe con un 13,64%...

Opciones	Recuento	Porcentaje
Normal	7	31,82%
Sobrepeso	12	54,55%
Obesidad 1	2	9,09%
Obesidad 2	1	4,55%

Tabla 1. Índice de masa corporal Se puede evidenciar que el sobrepeso es mayoritario lo cual es un factor de riesgo para sufrir enfermedades cardiovasculares.

Opciones	Presión arterial 1		Presión arterial 2	
	Recuento	%	Recuento	%
Optima	0	0,00%	0	0,00%
Normal	13	59,09%	15	68,18%
Limítrofe	6	27,27%	3	13,64%
Etapa 1	3	13,64%	0	0,00%
Etapa 2	0	0,00%	0	0,00%
Etapa 3	0	0,00%	0	0,00%

Tabla 2. Presión arterial

En la Tabla 2 la población con una condición normal de la presión arterial se incrementa en 9,09 puntos porcentuales lo que indicaría que el control de la hipertensión tiende a tener un afecto positivo disminuyendo el número de pacientes con hipertensión.

Opciones	Creatinina en suero 1		Creatinina en suero 2		
	Recuento	%	Recuento	%	% válido
Normal	13	59,09%	5	22,73%	41,67%
Disminución leve del filtrado glomerular	9	40,91%	7	31,82%	58,33%
Total	22	100%	12	54,55%	100,00%
Perdidos en el sistema			10	45,45%	
Total			22	100,00%	

Tabla 3. Cálculo filtración glomerular/creatinina en suero según la fórmula CKD-EPI

Con la creatinina en suero se logró calcular la tasa de filtración glomerular según la fórmula CKD-EPI, demostrando que el 40,91% padece una disminución en su función renal durante la primera observación, mientras que en la segunda recolección de muestras se establece que el 58,33% padece de disfunción leve de la función renal.

Opciones	Proteinuria 1			Proteinuria 2		
	Recuento	%	% válido	Recuento	%	% válido
Normal	18	81,82%	85,71%	10	45,45%	83,33%
Disminución leve del filtrado glomerular	3	13,64%	14,29%	2	9,09%	16,67%
Total	21	95,45%	100%	12	55%	
Perdidos en el sistema	1	5%		10	45%	
Total	22			22		

Tabla 4. Identificación de la función renal en base a la proteinuria

La evaluación de la proteinuria permite identificar la concentración de proteínas en la orina con lo cual se define que el 13,64% presenta una disminución en la función renal resultado que se repite en la segunda toma de muestras donde el 9,09% de igual forman presentan esta afección.

Opciones		Glucosa basal 1			Glucosa basal 2		
		Frecuencia	%	% válido	Frecuencia	%	% válido
Válido	Normal	20	90,91	95,24	18	81,82	100
	Diabetes mellitus	1	4,55	4,76			
	Total	21	95,45	100			100
Perdidos	Sistema	1	4,55		4	18,18	
Total		22	100		22	100	

Tabla 5. Resultados glucosa basal

La evaluación de la concentración de azúcar en la sangre ha dejado en evidencia que una persona presenta diabetes mellitus, resultado que desconocían los docentes al momento de encuestarles.

Triglicéridos 1				Triglicéridos 2		
	Opciones	Frecuencia	%	Frecuencia	%	% válido
Válido	Óptimo	13	59,09	9	40,91	50,00
	Límite alto	5	22,73	4	18,18	22,22
	Alto	4	18,18	5	22,73	27,78
	Total	22	100,00	18	81,82	100,00
Perdidos	Sistema			4	18,18	
Total				22	100,00	

Tabla 6. Resultados triglicéridos

En la Tabla 6 se observa que los docentes con niveles elevados de triglicéridos alcanzan el 40,91% en la primera toma y 50% en la segunda. Las concentraciones de urea en la sangre de los docentes están dentro de los rangos de normalidad.

Colesterol total, HDL, LDL 1				Colesterol total, HDL, LDL 2		
	Porcentaje	Frecuencia	%	Frecuencia	%	% válido
Válido	Deseado	20	90,91	17	77,27	94,44
	Fronterizo alto	2	9,09	1	4,55	5,56
	Total	22	100,0	18	81,82	100,0
Perdidos	Sistema			4	18,18	
Total				22	100,0	

Tabla 7. Resultados colesterol total, HDL, LDL

Las concentraciones de colesterol total en el 9,09 de los docentes alcanzan niveles fronterizos altos en la segunda toma el 5,56 presentan la misma afección

Análisis de los resultados

Se han identificado dentro del estudio, datos sociodemográficos edad, en los pacientes, prevalencia de la disminución de la función renal aumentó teniendo así que los docentes de 49 a 60 años, 4 (33,33%) de ellos padecen disfunción renal leve. El resultado anterior comparado con el de Alvarado⁸ guarda relación dado que en este concuerda que a mayor edad aumenta el riesgo o los casos con enfermedad renal teniendo así que el 27.77% los pacientes corresponden con la edad de 50-0 años, este resultado lo sustentan en la premisa de que la función renal disminuye en la vejez, cuanto mayor sea su edad, mayor es el riesgo de sufrirla.

La investigación ha develado que las mujeres son la población que presenta mayor prevalencia en la disminución de la función del filtrado glomerular teniendo así que el 58,33% de los docentes padezcan una

disminución en la función renal. El hallazgo expuesto discrepa con el resultado obtenido en otra investigación donde las poblaciones con mayores casos de problemas renales están ligados a pacientes del sexo masculino representando el 63% de los clientes con problemas de enfermedad renal crónica⁹

En el caso particular del estudio el 100% de la población considerada se auto identifica como mestiza donde el 58,33% padecen disfunción renal leve, no se identifica que exista alguna relación con la etnia dado que no se auto identificaron con alguna otra procedencia étnica. De acuerdo al American Kidney Fund¹⁰ los afroamericanos tienen más riesgo de presentar falla renal que todas las demás razas. En los Estados Unidos, más de 1 de cada 3 pacientes con falla renal son afroamericanos.

Con respecto a los factores modificables que pueden incrementar el riesgo de padecer hipertensión y con ello insuficiencia renal se tiene que el 22% de la población es sedentaria, el 9,09% consumen dosis superiores a la recomendada (5g) de sodio. En este sentido, con respecto a los riesgos de mayor influencia identificados en otro estudio se tiene que afectan a los pacientes el consumo de alcohol en un 28%, tabaco en un 24%, factores que aumentan la presión arterial, en los pacientes y con ello el riesgo de padecer disfunción renal.¹¹ La muestra estudiada está constituida mayormente por personas del sexo femenino, siendo el grupo etario predominante el de 55-60 años. Todos los participantes se auto identifica como mestizos; y cuentan con educación superior. Los participantes no presentan consumo problemático de alcohol, el sedentarismo constituye un factor de riesgo que influye en el aumento de peso para la estatura, como en la incidencia de hipertensión y disfunción renal; al igual que el consumo de sal que fue asociado con el incremento de los niveles de sodio en la sangre y la alteración de la presión arterial.

Los participantes del estudio presentan sobrepeso, y obesidad tipo 1 y 2; adicional seis personas padecen de hipertensión arterial.

En relación a la función renal de los participantes del presente estudio, en el pretest los valores se encontraron dentro de los niveles de normalidad, mientras que en el posttest se incrementaron los valores con disminución leve de la función renal.

Aunque el estudio no pudo establecer una influencia directa del control de la hipertensión en la condición renal de los docentes, se evidenció un incremento de personas con leve disfunción renal. Esto podría deberse a factores como una mala alimentación, falta de actividad física, enfermedades adyacentes o causas no identificadas.

Es de vital importancia fomentar cuidados, hábitos, estilos de vida y prácticas para mantener la salud, mejorar la calidad de vida y reducir el riesgo de padecer hipertensión o disfunción renal.

CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio destaca la relación entre la edad y la disminución de la función renal en docentes, así como la importancia de abordar factores como el sedentarismo y el consumo excesivo de sodio como posibles desencadenantes de la enfermedad. Aunque no se estableció una conexión directa con el control de la hipertensión, estos hallazgos enfatizan la necesidad de promover hábitos de vida saludables para reducir el riesgo de disfunción renal en esta población.

Agradecimientos: Nos complace expresar nuestro sincero agradecimiento a las autoridades institucionales de la Unidad Educativa Verbo Divino por el invaluable apoyo brindado en la realización de este trabajo y en el cumplimiento de las actividades establecidas.

Asimismo, deseamos extender nuestro agradecimiento a la Universidad Estatal de Bolívar por su decisiva aprobación de esta investigación, la cual contribuye significativamente al logro del Objetivo 3 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible: Garantizar una vida sana y promover el bienestar.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés

REFERENCIAS

1. OPS. Definición de salud. [Online].; 2021. Available from: <https://concepto.de/salud-segun-la-oms/>.
2. Alfonso cc. Salud, Enfermedad. hegoa. 2006;: p. 1.
3. OMS. Definición de hipertensión arterial. [Online].; 2021. Available from: https://www.who.int/es/health-topics/hypertension#tab=tab_1.
4. OMS. Hipertensión. [Online].; 2023. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>.
5. Nefrología LSId. A unique role in global nephrology. [Online].; 2020. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.05.011>.
6. OPS. Ecuador implementa el programa HEARTS para luchar contra la hipertensión. [Online].; 2021. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/17-5-2021-ecuador-implementa-programa-hearts-para-luchar-contra-hipertension>.
7. MSP. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal crónica. [Online].; 2018. Available from: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2018/10/guia_prevencion_diagnostico_tratamiento_enfermedad_renal_cronica_2018.pdf.
8. Alvarado V. Factores de riesgo de insuficiencia renal crónica en pacientes hipertensos Guayaquil : UG; 2016.
9. Bonilla M. Enfermedad renal crónica relacionado con niveles de hipertensión arterial. consultorio del adulto mayor. Hospital I Luis Albrecht, 2014 Perú: UCV; 2016.
- 10 American Kidney Fund (AKF). La raza y la etnia como factores de riesgo de la enfermedad renal. [Online].; 2021. Available from: <https://www.kidneyfund.org/es/todo-sobre-los-rinones/los-factores-de-riesgo/la-raza-y-la-etnia-como-factores-de-riesgo-de-la-enfermedad-renal>.
- 11 Corcuera J, Espinosa M. Hipertensión arterial. Definición, clínica y seguimiento. Gaceta médica de . Biblao. 2017;: p. 162-170.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation. Remache M; Fierro M J; Mite G; Monserrate J. Factores de riesgo asociados a la hipertensión arterial y enfermedad crónico renal Revis Bionatura 2023;8 (4)

12. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.13>

Additional information Correspondence should be addressed to lremache@ueb.edu.ec

[Clinical Biotech](#), [Universidad Católica del Oriente \(UCO\)](#) and [Universidad Nacional Autónoma de Honduras \(UNAH\)](#)

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Alimentación complementaria asociada al estado nutricional para niños/niñas de 6 a 12 meses de edad

Associated food complementary to nutritional status for boys/girls from 6 to 12 months of age

Janine Taco ¹; David Agualongo ²; Odilia Patín ³; Neyva Guano ^{*4}

¹ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador. jtaco@ueb.edu.ec

² Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador. dagualongo@ueb.edu.ec

³ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador. odiliapatin@gmail.com

⁴ Universidad Estatal de Bolívar. Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador

*Autor de Correspondencia. . neyvaguano21@gmail.com
Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.14>

RESUMEN

La nutrición complementaria es fundamental para el desarrollo mental y físico de las capacidades cognitivas, motoras y mentales del niño; la misma aporta los nutrientes y la fortaleza necesaria para el crecimiento y el desarrollo de hábitos alimenticios adecuados. Se presentan los resultados de un proyecto en el que se analizó la alimentación complementaria asociada al estado nutricional de los niños/niñas de 6 a 12 meses del Subcentro de Salud Los Trigales durante marzo a julio 2022, a partir de la colaboración de 41 madres que aceptaron el uso de una guía de observación y la valoración antropométrica de sus hijos. Se identificó un 81% con normopeso para su edad, 15% normopeso con riesgo de bajo peso, 2% bajo peso (desnutrición global) y el 2% bajo peso severo (desnutrición global severa). Respecto a la talla y su correspondencia con la edad, el 46% tiene talla normal, el 24% riesgo de talla baja, 20% talla baja (desnutrición crónica) y 5% talla baja (desnutrición crónica severa). Respecto al IMC para la talla, 85% dentro de parámetro normal, 7 % peso alto y 2% con riesgo de bajo peso, y 2% con emaciación aguda, 2% severa y el 7% riesgo de bajo peso, desnutrición aguda y severa. En la relación con el perímetro cefálico, 98% de la muestra se encuentra dentro de los parámetros normales y el 2% crecimiento anormal. Finalmente se obtuvo el estado nutricional de 41 niños y niñas la mayoría presentaba peso, IMC y perímetro cefálico normales para la edad, lo que se correlaciona con el inicio de la alimentación complementaria a los 6 meses.

Palabras clave: Estado nutricional; malnutrición; neurodesarrollo infantil; primera infancia.

ABSTRACT

Complementary nutrition is essential for the mental and physical development of the child's cognitive, motor and mental abilities; It provides the nutrients and strength necessary for growth and the development of adequate eating habits. The results of a project are presented in which complementary feeding associated with the nutritional status of boys and girls from 6 to 12 months of the Los Trigales Health Subcenter was analyzed from March to July 2022, based on the collaboration of 41 mothers who They accepted the use of

an observation guide and anthropometric assessment of their children. 81% were identified as having average weight for their age, 15% as normal weight with a risk of being underweight, 2% as skinny (global malnutrition) and 2% as severely malnourished (severe global malnutrition). Regarding height and its correspondence with age, 46% have a standard size, 24% are at risk of short stature, 20% have short importance (chronic malnutrition), and 5% have a short length (severe chronic malnutrition). Regarding BMI for height, 85% within normal parameters, 7% high weight and 2% at risk of low weight, 2% with acute wasting, 2% severe and 7% risk of low weight, sharp and powerful malnutrition. Concerning head circumference, 98% of the sample is within normal parameters, and 2% is abnormal growth. Finally, the nutritional status of 41 boys and girls was obtained; the majority had average weight, BMI and head circumference for their age, which correlates with the start of complementary feeding at 6 months.

Keywords: Nutritional status; malnutrition; child neurodevelopment; early childhood.

INTRODUCCIÓN

Todo niño tiene derecho a comenzar la vida con todo su potencial, independientemente del lugar de concepción, nacimiento, crecimiento o desarrollo; la primera infancia es un momento crucial en la vida para el desarrollo humano. Este derecho es privilegiado o limitado según las obligaciones y cuidados con la familia, los trabajadores de la salud y el Estado¹.

La nutrición en los primeros meses de vida constituye un papel trascendental en la salud del neonato y hasta su vida adulta². En los primeros 180 días de vida el mejor alimento que puede recibir un recién nacido es la leche materna y posteriormente la introducción progresiva de la alimentación complementaria. Aunque la leche materna se considera la fuente de alimento ideal para niños menores de dos años, ha sido influenciada por cambios sociales en los hábitos familiares y de crianza durante las últimas décadas, influenciados por la publicidad y promoción de sucedáneos de la leche materna, biberones y chupetes³. Según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud y de varios expertos, se consigue un desarrollo, crecimiento y salud óptimos con la lactancia materna exclusiva durante los primeros seis meses de vida, combinada con alimentación complementaria durante dos años o más⁴.

Es este mismo sentido, cuando se introducen nuevos alimentos adicionales a la leche materna, es importante considerar la frecuencia, calidad, consistencia, composición y diversidad que se brinda a partir de los seis meses de edad⁵. Se considera a la alimentación complementaria como todo líquido, sólido, fórmula distinta a la leche materna⁶. Estos alimentos están formados por macronutrientes como proteínas, carbohidratos y grasas; y micronutrientes como vitaminas del grupo B (B12, B9), Omega 3 y minerales que incluyen hierro, zinc, y yodo; el hierro en especial es necesario en la dieta complementaria del niño debido a que su biodisponibilidad es menor por la baja capacidad de absorción, en comparación con los adultos⁷. Con el crecimiento, las reservas de este mineral se agotan a la par del incremento de sus necesidades, por lo que los lactantes experimentan muchas veces deficiencias que conllevan a anemia si las condiciones de alimentación complementaria no son las adecuadas⁸.

Se ha comprobado que la desnutrición en las primeras etapas del crecimiento puede tener consecuencias irreversibles en la vida de un niño, como retraso del crecimiento, emaciación, desnutrición, incluida la deficiencia de vitamina A, deficiencia de zinc y lactancia materna inadecuada. La prevalencia de niños con bajo peso en los países en desarrollo ha disminuido del 28% en 1990 al 17% en 2013, en este ritmo de progreso está más o menos en línea con el ritmo requerido para alcanzar las metas de los ODM, pero la mejora se distribuye uniformemente. Heterogéneo entre y dentro de diferentes regiones⁹.

En circunstancias especiales, los alimentos complementarios deben introducirse a partir de los 6 meses de edad, no antes, porque los sistemas del niño aún no han madurado y desarrollado completamente para facilitar una correcta digestión. Agregar alimentos complementarios demasiado pronto provocará inconvenientes como alergias alimentarias y exposición a bacterias¹⁰. Además, se destaca que dicha dieta conlleva cambios metabólicos y endocrinos que afectan la salud futura del niño; asimismo, las malas prácticas alimentarias son un factor de riesgo de morbilidad y mortalidad en los niños pequeños¹¹.

Existen múltiples factores involucrados en la implementación de nuevos alimentos; tales como la edad, la capacidad de digestión y absorción de nutrientes, además de las habilidades sociales y motoras. Es así, que el proceso de nutrición conlleva esta participación entre los diferentes sistemas del cuerpo humano, el digestivo, neurológico, inmunológico y renal y que vayan acorde a su capacidad digestiva y metabólica⁵.

En referencia a las prácticas alimenticias el estudio realizado por Spipp y colaboradores¹². Que evaluó las prácticas alimentarias en niños de 6 a 23 meses de edad, en una localidad argentina que fueron parte del Programa Materno Infantil, en el que participaron 180 niños y dio como resultado que el 31,7% tenían ingestas energéticas por debajo de sus necesidades. “En cuanto al hierro, los datos obtenidos difieren de los resultados de la ENNyS, donde sólo el 18,9 % de los niños de 6 a 23 meses del país tenían ingestas inferiores al RPE”¹³.

En México, una investigación realizada con niños de entre 31,5 +- 17 meses de edad que analizó las características sociodemográficas se observó que la mayoría de los niños son preescolares. El 68,1% tenían uno o dos hermanos y pertenecían a una familia biparental (83,3%). El 79,1% recibieron lactancia materna por lo menos hasta los 6 meses de edad, de los cuales, un 47,8% continuó recibéndola después del año de edad. En relación a las medidas antropométricas el 25% de los niños estudiados presentaban desnutrición crónica y un 11,2% exceso de peso (sobrepeso u obesidad), los preescolares con mayor frecuencia presentaron desnutrición crónica (31,1%) y los lactantes mayores sobrepeso + obesidad (21,1%)².

En Ecuador, el estudio realizado en beneficiarios del programa de suplementación nutricional con “Chispaz” en la Provincia de Chimborazo, se realizó en 617 niños distribuidos homogéneamente según el sexo, en donde se obtuvo que “la cuarta parte de los niños padecía de anemia, con la evaluación antropométrica, determinación de la hemoglobina sérica de los niños y niñas”¹⁴.

Con estos antecedentes, este artículo presenta una evaluación del estado nutricional de la población de niños de 6 a 12 meses de edad que asisten al Subcentro de Salud “Los Trigales”, a través de un estudio de su alimentación complementaria y las circunstancias que rodean cada caso

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio con enfoque cuantitativo utilizando herramientas que ayuden con información sobre el estado nutricional de los niños, tipo y frecuencia de alimentación complementaria. Se caracterizó a la población de 6 a 12 meses de edad siendo un total de 41 niños, estudio descriptivo con el objetivo de identificar problemas a través de la caracterización individual. Diseño no experimental de corte transversal, no se realiza control ni seguimiento de variables en el tiempo, y la recolección de información de campo para describir el problema actual en su momento sin consideración. La población de estudio estará delimitada por los siguientes criterios:

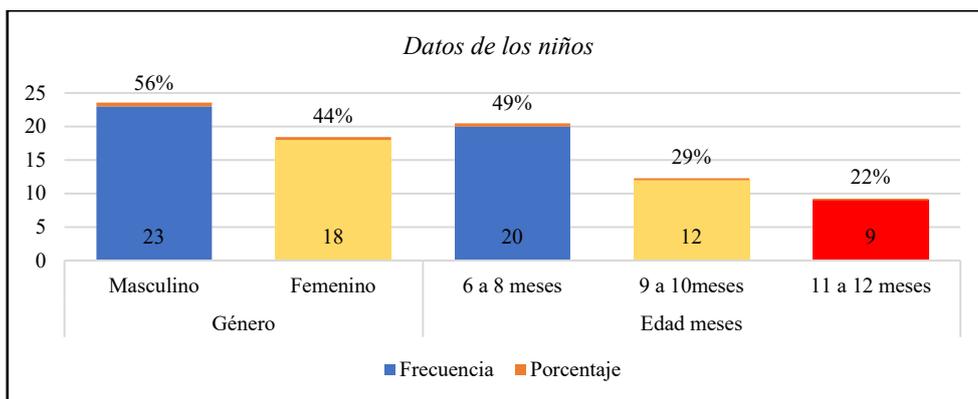
Criterios de inclusión: tener edad entre los 6 a 12 meses, ser atendidos en el Subcentro de Salud Los Trigales. Aceptar ser parte de la investigación mediante el consentimiento informado. Que las madres hayan iniciado la alimentación complementaria.

Criterios de exclusión: tener menos de 6 meses o más de 12 meses de edad, que las madres no acepten a brindar información, personas que se negaron a ser parte de la investigación

Para la recolección y análisis de información se utilizó dos instrumentos, una ficha de registro de datos antropométricos y otro instrumento fue una ficha de frecuencia de consumo de alimentos, una vez recolectada la información se procedió a tabular los datos y generar matrices para el análisis se empleó el software WHO Anthro, para la estadística descriptiva, frecuencia y porcentaje de ocurrencia de cada ítem evaluado se utilizó el software SPSS V.25.

RESULTADOS

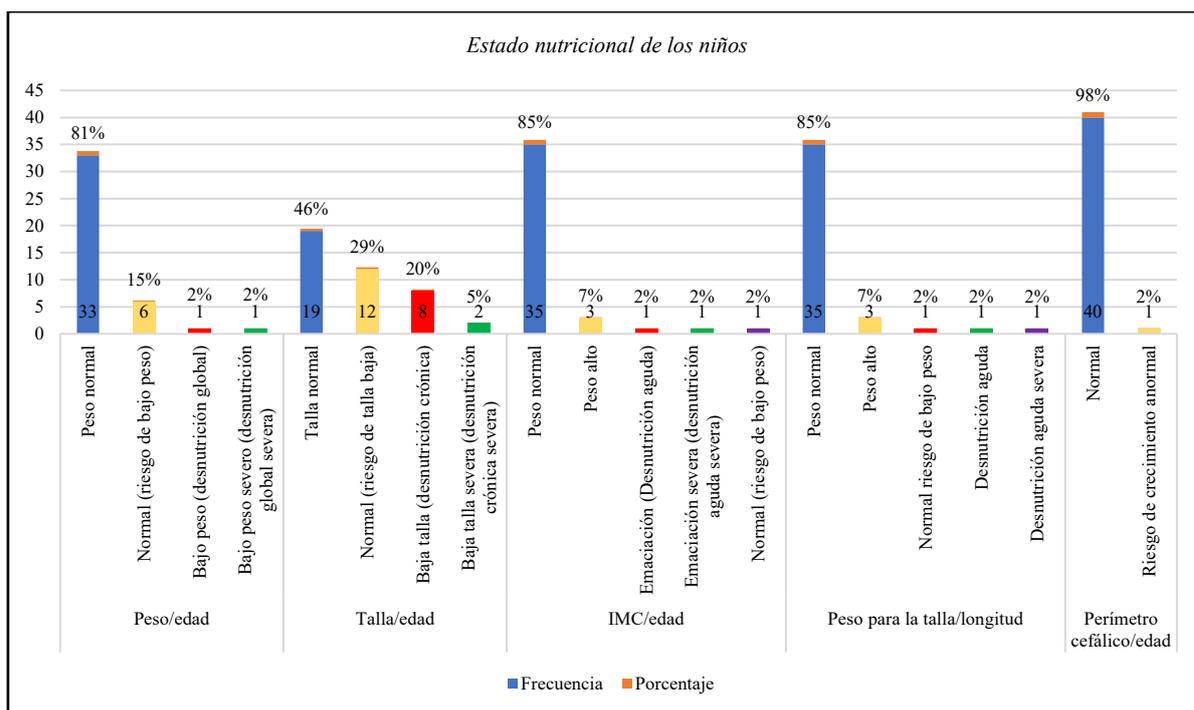
A continuación, se presentan los principales resultados de la investigación mediante tablas que resumen los hallazgos



Fuente: Taco, J.; Agualongo, D. 2023

Figura 1. Datos de edad y género de los niños.

La figura 1 muestra que los niños correspondían al 56% y las niñas al 44%. Al respecto de la distribución por grupos etarios, se identificó mayor la cantidad de niños con edades entre los 6 a 8 meses (49%), seguidos de los niños de 9 a 10 meses y de 11 a 12 meses.



Fuente: Taco, J.; Agualongo, D. 2023

Figura 2. Estado nutricional de los niños

La figura 2 indica que 33 niños (81%) presentaban un peso acorde a su edad dentro de los rangos de normalidad, y 6 niños (15%) peso normal con riesgo de bajo peso, Por otra parte, 1 niño bajo peso (desnutrición global) y 1 niño bajo peso severo (desnutrición global severa).

Al respecto del desarrollo de la talla para su edad, se identificó que 19 niños (46%) talla normal, mientras que 12 niños (24%) riesgo de talla baja, 8 niños (20%) baja talla

(desnutrición crónica) y 2 niños (5%) baja talla (desnutrición crónica severa).

También se reconoció que, de forma general con respecto al Índice de Masa Corporal para la talla, 35 niños (85%) con un IMC calificado como normal. Dentro de la población se reconoció que 3 niños presentaban peso alto y 1 de ellos presentaban un IMC con riesgo de bajo peso, y 1 niño con emaciación aguda y 1 niño con severa.

También se observó que, en la relación entre peso y talla, 35 niños (85%) presentaron un nivel normal de desarrollo acorde a la edad, de la población tres niños que presentaban uno de ellos, riesgo de bajo peso, desnutrición aguda y severa. Caso contrario en lo observado en la relación con el perímetro cefálico, donde se observó que casi la totalidad 40 niños (98%) presentó un diámetro dentro de los parámetros de la normalidad, solo un niño tuvo medidas de crecimiento anormal.

		Frecuencia	Porcentaje
Inicio de alimentación complementaria	No la he iniciado	8	20%
	Antes de los 6 meses	10	24%
	A los 6 meses	16	39%
	Entre los 9 a 12 meses	7	17%
Lactancia materna	Sí	38	93%
	No	3	7%
Consistencia de los alimentos	No consume	8	20%
	Licuados	8	20%
	Licuados, Espesas: Papillas, puré, Compotas	1	2%
	Licuados, Sopas/líquido, Alimentos picados en trozos pequeños	9	22%
	Licuados, Alimentos picados en trozos pequeños	1	2%
	Licuados, Espesas: Papillas, puré, Sopas/líquido	1	2%
	Licuados, Espesas: Papillas, puré, Compotas, Sopas/líquido, Alimentos picados en trozos pequeños	2	5%
	Espesas: Papillas, puré	1	2%
	Espesas: Papillas, puré, Compotas, Sopas/líquido	1	2%
	Espesas: Papillas, puré, Sopas/líquido, Alimentos picados, duplicados o enteros	1	2%
	Sopas/líquido	1	2%
	Sopas/líquido, Alimentos picados en trozos pequeños	7	17%

Fuente: Taco, J.; Agualongo, D. 2023

Tabla 1. Características de la alimentación complementaria

La Tabla 1 que se muestra con antelación, se refiere que el 39% de los niños inició a los 6 meses de edad la alimentación complementaria. Sin embargo, también se registró una población significativa de 10 niños, que reciben alimentos complementarios antes de la edad recomendada de 6 meses, mientras que un

pequeño número de personas de 7 niños inició la alimentación luego de los 9 meses. Se observa también que 38 niños, mantiene lactancia materna. Con relación a la consistencia de los alimentos se observa que la mayoría de las madres le brinda a su hijo alimentos licuados, sopas líquidas, espesas, puré, papillas y alimentos picados en trozos pequeños, esto en su mayoría acorde a la capacidad de los niños para masticar y procesar los alimentos.

Característica de la dieta por grupo de alimentos

		No consume	Diario	Semanal			Mensual		
				1 o 2 veces	3 o 4 veces	5 o más veces	1 o 2 veces	3 o 4 veces	5 o más veces
Lácteos	Leche	71%	0%	15%	10%	0%	5%	0%	0%
	Yogurt	24%	2%	44%	22%	5%	2%	0%	0%
	Queso	68%	0%	17%	2%	0%	12%	0%	0%
	Batidos	56%	5%	22%	0%	2%	15%	0%	0%
Huevos carnes y pescado	Huevos de gallina	46%	2%	17%	7%	0%	27%	0%	0%
	Carne de res	80%	0%	5%	0%	0%	15%	0%	0%
	Carne de cordero	93%	0%	5%	0%	0%	2%	0%	0%
	Carne de cerdo	85%	0%	2%	2%	0%	5%	5%	0%
	Pollo	34%	12%	32%	15%	2%	5%	0%	0%
	Pescado	66%	2%	7%	0%	0%	24%	0%	0%

Fuente: Taco, J.; Agualongo, D. 2023

Tabla 2. Consumo de lácteos, huevos, carnes y pescado por los niños del estudio.

Con relación a los alimentos de origen animal, correspondiente a los lácteos (Tabla 2), en su mayoría consume Yogurt y Batidos, en su mayoría con una frecuencia de 1 a 4 veces por semana. En menor medida se observa que a los niños les dan leche o queso.

Al respecto del consumo de huevos de gallina, se identifica que cerca de la mitad de los niños lo consumen, en su mayoría 1 o 2 veces por mes. En menor medida se observó el consumo de carnes de cordero, de res, de cerdo y pescado, donde más de la mitad de la población no la consumen aún, caso contrario, con la carne de pollo, la cual es consumida por casi la totalidad de los niños que han iniciado la alimentación complementaria, formando parte de las comidas con una frecuencia principalmente de 1 o 2 veces diarias.

		No consume	Diario	Semanal			Mensual		
				1 o 2 veces	3 o 4 veces	5 o más veces	1 o 2 veces	3 o 4 veces	5 o más veces
Tubérculos	Papa	34%	20%	32%	12%	0%	0%	2%	0%
	Zanahoria	56%	7%	22%	5%	0%	10%	0%	0%
	Mel loco	88%	2%	5%	0%	0%	5%	0%	0%
Vegetales	Acelga	56%	5%	27%	10%	0%	0%	2%	0%
	Cebolla	59%	12%	24%	2%	0%	2%	0%	0%
	Espinaca	61%	5%	20%	5%	0%	7%	2%	0%
	Brócoli	68%	2%	10%	5%	0%	10%	2%	2%
	Lechuga	71%	2%	17%	2%	0%	5%	2%	0%
	Rábano	80%	7%	2%	2%	0%	7%	0%	0%
	Coliflor	80%	0%	10%	5%	0%	2%	2%	0%
	Apio	83%	0%	10%	0%	0%	5%	2%	0%
	Remolacha	93%	0%	5%	0%	0%	2%	0%	0%
	Alcachofa	93%	0%	5%	0%	0%	2%	0%	0%

Fuente: Taco, J.; Agualongo, D. 2023

Tabla 3. Consumo de Tubérculos y vegetales por los niños del estudio.

Tal como se observa en la tabla 3, de los tubérculos consultados, la papa es incluida en la mayoría de las dietas de los niños que consumen alimentos complementarios, seguida de la zanahoria la cual es suministrada en cerca de la mitad de las dietas de los niños. En menor medida se identificó el mel loco como parte de los alimentos complementarios introducidos en las dietas de los niños de 6 a 12 meses.

En el caso de los vegetales, se identifica que en su mayoría no han sido incluidos en las dietas de los niños, siendo los vegetales de mayor presencia en los alimentos; la acelga, cebolla, espinaca y brócoli, y en menor medida la alcachofa, remolacha, apio, y el rábano.

	No consume	Diario	Semanal			Mensual		
			1 o 2 veces	3 o 4 veces	5 o más veces	1 o 2 veces	3 o 4 veces	5 o más veces
Arvejas verdes	46%	15%	17%	5%	0%	7%	10%	0%
Frijoles verdes	63%	7%	7%	5%	0%	10%	7%	0%
Habas	49%	7%	32%	7%	0%	5%	0%	0%
Choclos	59%	5%	24%	2%	0%	5%	5%	0%
Lentejas	76%	5%	2%	0%	0%	7%	10%	0%

Fuente: Taco, J.; Agualongo, D. 2023

Tabla 1 Consumo de granos por los niños del estudio.

La Tabla 4 refleja que las madres han incluido en su mayoría las arvejas verdes, choclos y habas, las cuales son ofrecidas con una frecuencia diaria de 1 o 2 veces por semana. En menor medida se registró la integración de granos como las lentejas y los frijoles verdes, las cuales eran dadas con frecuencia de 1 o 2 veces por mes.

		No consume	Diario	Semanal			Mensual		
				1 o 2 veces	3 o 4 veces	5 o más veces	1 o 2 veces	3 o 4 veces	5 o más veces
Cereales sin gluten	Arroz	29%	17%	39%	15%	0%	0%	0%	0%
	Trigo	90%	2%	2%	0%	0%	2%	2%	0%
	Amaranto	98%	0%	2%	0%	0%	0%	0%	0%
	Maíz	95%	0%	2%	0%	0%	2%	0%	0%
	Quinoa	83%	0%	12%	5%	0%	0%	0%	0%
	Avena	34%	15%	24%	15%	2%	7%	2%	0%
Cereales con gluten	Cebada	95%	0%	5%	0%	0%	0%	0%	0%
	Centeno	98%	0%	2%	0%	0%	0%	0%	0%

Fuente: Taco, J.; Agualongo, D. 2023

Tabla 5: Consumo de Cereales por los niños del estudio.

Se observa (Tabla 5) que al respecto de los cereales sin gluten, la mayoría de las dietas de niños que ya han iniciado la alimentación complementaria cuenta con arroz el cual es suministrado con una frecuencia diaria de 1 o 2 veces por semana. Seguidamente de la avena, la cual en su mayoría es brindada diaria, de 3 o 4 veces por semana. Con relación al trigo, amaranto, maíz y quinoa en la mayoría de las dietas no habían sido incluidas. Caso similar con respecto a los cereales con gluten, los cuales no son recomendados antes del primer año de vida, siendo la ceiba el administrado con mayor frecuencia 1 o 2 veces por semana.

En la valoración del estado nutricional se determinó que el peso de los niños era acorde con respecto a la edad en 81% de los casos, pero un niño presentaba desnutrición global y otra desnutrición global crónica.

De forma similar, la talla de los niños era acorde con la edad en el 46% de los casos, encontrando que el 29% estaba en riesgo de talla baja y el resto se ubicaban talla baja por desnutrición aguda y aguda severa. De la misma forma, se observa que, en la relación de peso para talla, la mayoría de los niños presentaron un nivel normal de desarrollo acorde a la edad, de la población tres niños que presentaban uno de ellos, riesgo de bajo peso, desnutrición aguda y severa. Caso contrario en lo observado en la relación con el perímetro cefálico, donde se observó que casi la totalidad de los niños presentó un diámetro dentro de los parámetros de la normalidad, solo un niño tuvo medidas de crecimiento anormal.

Finalmente, al calcular el IMC se pudo conocer que el 85% se encontraban en un rango normal pero tres niños presentaban valores por encima por tener un peso alto y tres niños se ubicaron por debajo por presentar emaciación aguda y severa.

En referencia a la frecuencia de alimentación complementaria que es suministrada por las madres, se pudo establecer que, sólo el 39% de los niños iniciaron la alimentación complementaria a los 6 meses, casi la cuarta parte la inició antes de cumplir los 6 meses y un porcentaje menor luego de los 9 meses. La frecuencia de consumo de alimentos complementarios: lácteos como leche la ingieren 1 o 2 veces por semana el 15% de los niños; queso el 17%, siendo yogurt el más consumido por casi la mitad de los niños. Las Proteínas consumidas 1 o 2 veces por semana: un 17% huevos, 32% pollo; 7% pescado; carne 1 o 2 veces al mes. Mientras que las Frutas son consumidas 1 o 2 veces a la semana, siendo los más consumidos: frutillas por un 29%, seguido por sandía, guineo, papaya y piña. Con relación a los Vegetales y Tubérculos son consumidos a diario por la mayoría de los niños, siendo los más consumidos: papa con un 20%, seguido por zanahoria cebolla, espinaca, acelga y apio. Por su parte, los Granos consumidos más a diario son: arvejas verdes con un 15%, seguido de frijoles verdes y habas. Finalmente, los Cereales consumidos a diario se destacan el arroz con 17% seguido de la avena.

Los resultados de la frecuencia de la alimentación complementaria han influido satisfactoriamente en el peso y talla de la mayoría de los niños al ubicarse entre los rangos considerados como normales para su edad.

Con respecto a la influencia de la alimentación complementaria y las recomendaciones realizadas por la Organización Mundial de la salud y el personal de asistencia del subcentro de salud “Los Trigales” se obtuvo que en algunos casos se inicia antes y en otros después de los 9 meses que puede incidir de manera negativa ya que, introducidos antes de los 4 meses, y más allá de 6 meses, podría impactar en la reducción del riesgo de alergia y obesidad.

DISCUSIÓN

En este estudio se pudo evidenciar que un porcentaje menor a la mitad de la muestra tuvo un inicio adecuado de alimentación complementaria; solamente un 39% de los niños iniciaron su respectiva alimentación complementaria a los 6 meses de edad, como lo indican las directrices a nivel mundial. Y, por su parte, un 41% de los niños iniciaron su alimentación complementaria de forma errada, con un 24% antes de los 6 meses y un 17% desde los 9 a los 12 meses de edad.

Es importante la inclusión de la alimentación complementaria de manera correcta en cuanto a tiempo, cantidad y calidad, permitiendo una progresión adecuada de la ingesta de alimentos en correspondencia a la edad del niño/a, como lo establecen recomendaciones de la OMS, en donde se menciona que esta alimentación debe ser iniciada a los 6 meses de edad⁶. Contrario a esto, en este estudio se ha mostrado una problemática evidente en cuanto al tiempo de introducción de la alimentación la cual se ha dado de forma tanto temprana como tardía, lo cual, pese a no mostrar cifras altas de desnutrición, vislumbra futuros problemas en el desarrollo de los niños debido a probables alergias alimentarias o problemas digestivos que pueden presentarse más adelante en la vida de los mismos, como lo indican estudios realizados en varios países de Sudamérica en donde se han observado los mismos comportamientos y errores de parte de los padres de familia y en ocasiones debido a la falta de educación en los centros de atención primaria, pese a las diferencias culturales y demográficas¹⁵.

Este problema visto a nivel latino en su mayoría, tiene varios contrastes que incluyen las costumbres y creencias culturales en ocasiones difíciles de cambiar, en especial en la población adulta que se encarga del cuidado de los niños, o el nivel de educación de las madres o cuidadores, viendo así, estudios que muestran que en países como Brasil se tiende a encontrar problemas con la introducción de la alimentación complementaria en su mayoría en padres con niveles menores de educación; por otra parte, estudios realizados en Nicaragua establecen niveles mayores de alimentación complementaria errada en familias con niveles socioeconómicos más elevados y con una mayor educación¹⁶.

En nuestro estudio y posterior análisis, en cuanto a estas variables como nivel educativo y socioeconómico, podemos establecer que la mayoría de madres se encargan de quehaceres domésticos, por lo que no cuentan con un trabajo estable remunerado, y a su vez, la mayoría de ellas cuenta con un nivel de instrucción secundaria.

Lo que indica que el mayor nivel educativo de los padres o cuidadores y también la ejecución de programas de promoción de la salud que cuenten con educación a madres gestantes y lactantes en materia de lactancia materna y alimentación complementaria es vital e importante para una correcta adherencia a las recomendaciones generales sobre la introducción de la alimentación complementaria a los niños, lo que conlleva a una mejoría en las cifras de nutrición.

Atendiendo a trabajos similares a este, realizados en su mayoría en países en vías de desarrollo, se observan niveles importantes de desnutrición y retardo del desarrollo en los niños menores de dos años, con relación a la introducción errada de alimentación complementaria, en correspondencia al tipo de alimentos que son administrados a los niños, como alimentos procesados como pan blanco, snacks, jugos endulzados, entre otros¹⁷. Este estudio no revela el consumo de este tipo de alimentos, por lo que se considera que los problemas nutricionales encontrados en 8 niños, se deben a la mala introducción precoz o tardía de alimentación complementaria, o también al bajo consumo de verduras encontrado.

Se ha comparado la eficacia que tiene los diferentes tipos de intervenciones en el aumento de la adherencia a las recomendaciones alimenticias de los niños menores de dos años en varios estudios, en donde se observa que las fuentes escritas y uso de tecnologías para la información, son de gran ayuda para las madres y cuidadores con mayor nivel educativo, en contraste con actividades interactivas con el personal de la salud, ya que el tiempo y actividades muchas veces no permiten que dediquen su atención en asistir a eventos

informativos o reuniones¹⁸.

Debido a los datos recolectados en este trabajo, en donde se evidencia que la mayoría de madres se encargan de los quehaceres domésticos, y poseen un nivel de educación secundaria, se considera que se podrían implementar estrategias que incluyan la interacción con el personal de salud de los centros, en clubes o grupos de apoyo a la lactancia y educación alimenticia, que forman parte de proyectos gubernamentales como el reciente Proyecto Ecuador Libre de Desnutrición Infantil (PELDI), en donde se busca mitigar las preocupantes cifras de desnutrición en niños menores de dos años implementando paquetes de atención priorizados a gestantes y niños en sus primeros 1000 días, procurando también la educación y promoción de los cuidados de la salud y alimentación adecuadas¹⁸.

Por otra parte, se estableció que el 93% de infantes recibieron lactancia materna como primera fuente de alimento desde su nacimiento y hasta la fecha de la recolección de datos, lo cual en gran medida ha contribuido en la prevención de cifras altas de desnutrición, encontrándose un 81% de ellos con peso normal; sin embargo no se deja de reconocer e impactar las cifras de alimentación complementaria inadecuadas, las cuales, en un mayor tiempo de observación en los mismo niños estudiados, desembocarán en posibles problemas del desarrollo.

Una vez realizada la valoración de los niños y niñas del estudio se concluye que en un porcentaje mayoritario tienen un peso, IMC y perímetro cefálico normal según la edad y cerca de la mitad una talla normal. Sin embargo, también existe el caso de 8 niños con desnutrición crónica y 2 niños con desnutrición crónica severa que refleja que la alimentación complementaria en esos casos no fue introducida ni llevada de manera adecuada por sus madres.

Con respecto al estudio realizado en el subcentro “Los trigales” la mayoría presentaba un peso normal 81%, IMC 85% y perímetro cefálico normal (98%) esperado para su edad y cerca de la mitad presentaba talla normal. Se destacaron casos de 2% niño con desnutrición global y 2% niño con desnutrición global severa, así mismo se identificaron 20% niños con desnutrición crónica y 5% niños con desnutrición crónica severa, con relación al IMC para la edad, se detectaron 2% caso de emaciación y 2% caso de emaciación severa, además de 7% niños con peso alto para la edad.

CONCLUSIONES

En el Subcentro de Salud Los Trigales en su mayoría la alimentación complementaria a partir de los 6 meses, como está establecido por la Organización Mundial de la Salud, iniciando un porcentaje de ellas antes y otras tanta después de los 9 meses. Los alimentos complementarios son suministrados forma de papilla, puré o picados a los niños entre 6 y 12 meses.

La influencia de la alimentación complementaria mediante frecuencia de consumo de alimentos en los 41 niños que se aplicó el estudio fue positiva en su mayoría, ya que aquellos que iniciaron las indicaciones luego de los seis meses tuvieron una relación positiva en la condición nutricional con respecto al peso, talla, IMC, perímetro cefálico dentro de los rangos normales, mientras mínimo porcentaje con su crecimiento anormal.

Los alimentos complementarios o productos lácteos de origen animal más consumidos son principalmente el

yogur, los batidos y, en menor medida, la leche y el queso. En cuanto al consumo de frutas, los plátanos, papaya, manzanas, fresas y piñas son los más habituales. Los tubérculos, las papas constituyen la mayor parte de la dieta, seguidos de las zanahorias y, en menor medida, los mellocos. Las principales verduras de la dieta son las acelgas, las cebollas, las espinacas, el brócoli y, en menor medida, las alcachofas, la remolacha, el apio y los rábanos. Los cereales sin gluten se incluyen en la mayoría de las comidas, comenzando con alimentos sólidos diarios como el arroz, seguidos de la avena.

Finalmente, con los valores presentados en los datos, la condición nutricional de los niños y niñas del Subcentro de Salud “Los Trigales” es positiva por encontrarse en los rangos normales y que continuar con las prácticas de alimentación constituyen un factor clave para el manejo de algunas enfermedades a corto, mediano y largo plazo.

Agradecimientos: Un cordial agradecimiento al personal de salud del Subcentro de Salud los Trigales, y a las madres de los niños del subcentro de salud, por haber contribuido en la recolección de información para el desarrollo del presente trabajo investigativo.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés

REFERENCIAS

1. Bustamante Llatas JP, Gordillo Julón MA, Díaz Manchay RJ, Mogollón Torres F de M, Vega Ramírez AS, Tejada Muñoz S. Lactancia materna, alimentación complementaria y suplementación con multimicronutrientes: Perspectiva intercultural. *Cul. Cuid.* [Internet]. 21 de agosto de 2019 [citado 13 de noviembre de 2023];23(54):231-43. Disponible en: <https://culturacuidados.ua.es/article/view/2019-n54-lactancia-materna-alimentacion-complementaria-y-supleme>.
2. Bernabeu Justes M, Sánchez-Ramírez CA. Asociación entre los factores demográficos y socioeconómicos con el estado nutricional en niños menores de 5 años en poblaciones rurales de Colima, México. *Rev Esp Nutr Hum Diet* [Internet]. 2019 Jun [citado 2023 Nov 13]; 23(2): 48-55. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2174-51452019000200002&lng=es. Epub 29-Jun-2020. <https://dx.doi.org/10.14306/renhyd.23.2.545>.
3. Forero Y, Hernández A, Morales G. Lactancia materna y alimentación complementaria en un grupo de niños y niñas atendidos por un programa de atención integral en Bogotá, Colombia. *Rev. Chil. Nutr.* [Internet]. 2018 Dic [citado 2023 Nov 13];45(4):356-362. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182018000500356&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182018000500356>.
4. Ibáñez Navarro A, Ochoa Gómez I, Clavero Montañés N, Orden Rueda C, Sánchez Gimeno J, Berdún Chéliz E. Prevalencia y duración de la lactancia materna en el medio rural. *Rev. Esp. Ped.* [Internet]. 2017 [citado 2023 Nov 13];73(4):215-218. Disponible en: <https://medes.com/publication/133971>
5. Cuadros-Mendoza, CA, Vichido-Luna, MA, Montijo-Barrios, E, Zárate-Mondragón, F, Cadena-León, JF, Cervantes-Bustamante, R, Toro-Monjárez, E, & Ramírez-Mayans, JA. Actualidades en alimentación complementaria. *Acta pediatr.Méx.* [Internet]. 2017 Jun [citado 2023 Nov 13];38(3):182-201. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912017000300182
6. OMS. La alimentación del lactante y del niño pequeño: capítulo modelo para libros de texto dirigidos a estudiantes de medicina y otras ciencias de la salud. Washington, D.C.: Editorial OPS; 2010.

7. Sánchez-Borja C, Espinoza-Merchán GA, Eras-Sarango G. Afecciones cognitivas motoras en infantes a causa de lactancia materna interrumpida y alimentación complementaria ineficaz.// Cognitive and motor disorders in infants due to interrupted breastfeeding and ineffective complementary feeding. CU [Internet]. 16 de mayo de 2019 [citado 13 de noviembre de 2023];12(30):14-2. Disponible en: <https://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/886>
8. Becerra Bulla F, Poveda Espinosa E, Vargas Zarate M. El hierro en la alimentación complementaria del niño lactante: una revisión . *Perspect Nut Hum* [Internet]. 24 de febrero de 2021 [citado 13 de noviembre de 2023];23(1):85-97. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/nutricion/article/view/343697>.
9. OMS. Objetivos de Desarrollo del Milenio. [Online].; 2018. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/millennium-development-goals-\(mdgs\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/millennium-development-goals-(mdgs)).
10. Forero TY, Acevedo R. MJ, Hernández M. JA, Morales S. GE. La alimentación complementaria: Una práctica entre dos saberes. *Rev. chil. pediatr.* [Internet]. 2018 Oct [citado 2023 Nov 13];89(5):612-620. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-410620180005000612&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0370-410620180005000707>.
11. UNICEF. Desnutrición Crónica Infantil. Uno de los mayores problemas de salud pública en Ecuador. [Online].; 2022. Disponible en: <https://www.unicef.org/ecuador/desnutrici%C3%B3n-cr%C3%B3nica-infantil>.
12. Spippa JP, Riernersmana CN, Rivas FP, Calandri EL. C, Albrechtd CA. Evaluación de las ingestas dietéticas y prácticas alimentarias en niños de 6 a 23 meses en una localidad del noreste argentino. *Arch Argent Pediatr* [Internet]. 2022 [citado 2023 Nov 13];120(6):369-376. Disponible en: <https://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/archivosarg/2022/v120n6a04.pdf>
13. UNICEF. Estado Mundial de la Infancia 2019. Niños, alimentos y nutrición: crecer bien en un mundo en transformación. [Online].; 2019. Disponible en: <https://www.unicef.org/es/informes/estado-mundial-de-la-infancia-2019>.
14. Betancourt-Ortiz S, Ruiz-Polit P. Estado nutricional de los niños beneficiados en los Andes ecuatorianos con un programa de suplementación nutricional. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* [Internet]. 2019 [citado 13 Nov 2023]; 29 (1) :[aprox. -10 p.]. Disponible en: <https://revalnutricion.sld.cu/index.php/rcan/article/view/673>
15. Farro Roque ME. Alimentación complementaria y su relación con el estado nutricional en lactantes de 6 a 12 meses del centro de salud punta del este, Tarapoto. Período julio-diciembre 2021. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Perú; 2022.
16. Esteban Zubero E, Baquer Sahún CA, Jordán Domingo M, Trueba Insa S, Lubián Martínez M, Barberá Pérez PM et al . Adherencia a las recomendaciones de introducción de la alimentación complementaria en un área de salud urbana multicultural. *Rev Pediatr Aten Primaria* [Internet]. 2018 [citado 2023 Nov 13] ; 20(80): 341-352. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322018000400003&lng=es.
17. Moran Prado MM. Conocimiento y prácticas sobre alimentación complementaria en madres con niños de 6 a 24 meses que acuden al Centro de Salud San Juan de la Virgen, Tumbes, 2022. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional de Tumbes. Tumbes, Perú; 2022.
18. Aguilar Valera YO, Rojas Gamboa AF. Conocimientos maternos en alimentación complementaria relacionados al estado nutricional del lactante, Hospital I Essalud, Nuevo Chimbote 2022. [Tesis de licenciatura]. Universidad César Vallejo. Trujillo, Perú; 2022.

Citation. Taco J; Agualongo D; Patín O; Guano N. Alimentación complementaria asociada al estado nutricional para niños/niñas de 6 a 12 meses de edad. Revis Bionatura 2023;8 (4)
14. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.14>

Additional information Correspondence should be addressed to lremache@ueb.edu.ec

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Evaluación del contenido de metales biodisponibles en suelos arenosos de playas del Municipio Puerto Cabello, Estado Carabobo, Venezuela

Evaluation of the content of bioavailable metals in sandy soils of beaches of Puerto Cabello Municipality, Carabobo State, Venezuela

Joselin Albujar ^{1*}; Arnaldo Armado ²; Jorge Briceño ³; Daniela Avalos ⁴; Sonia Salazar ⁵; Marcelo Rojas ⁶

¹ Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, Suelos y Ambiente (LIBSA), Centro de Investigación y Extensión en Ambiente, Biología y Química (AMBIOQUIM), Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología (FACyT), Universidad de Carabobo. Venezuela. Campus Académico Bárbula, Naguanagua, Carabobo, Venezuela, jalbujar@uc.edu.ve

² Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, Suelos y Ambiente (LIBSA), Centro de Investigación y Extensión en Ambiente, Biología y Química (AMBIOQUIM), Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología (FACyT), Universidad de Carabobo. Venezuela. Campus Académico Bárbula, Naguanagua, Carabobo, Venezuela, armadoa@uc.edu.ve

³ Universidad Estatal de Bolívar, Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador, jbriceno@ueb.edu.ec

⁴ Universidad Estatal de Bolívar, Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador, poliolla_avalos@hotmail.com

⁵ Universidad Estatal de Bolívar, Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador, ssalazar@ueb.edu.ec

⁶ Universidad Estatal de Bolívar, Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Ecuador, mrojas@ueb.edu.ec

*Autor de correspondencia: jalbujar@uc.edu.ve

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.16>

RESUMEN

Dentro de las sustancias valoradas como contaminantes se encuentran los metales pesados, considerados elementos potencialmente tóxicos. Estas sustancias son motivo de preocupación, ya que son persistentes en los suelos y alteran diversos procesos ecosistémicos que incluyen las interacciones multitróficas. En tal sentido, en esta investigación se plantearon como objetivos evaluar el contenido de metales disponibles y analizar su relación con los parámetros fisicoquímicos y biológicos de suelos arenosos de playas del municipio Puerto Cabello, estado Carabobo. Los parámetros fisicoquímicos determinados fueron: textura, pH, conductividad, retención de humedad, materia orgánica, carbono orgánico total y capacidad de intercambio catiónico. Los parámetros biológicos fueron: actividad microbiológica, carbono de biomasa microbiana, actividades enzimáticas de catalasa, ureasa y proteasa. La extracción de los metales se realizó utilizando una mezcla de EDTA, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y Trietanolamina y la determinación se llevó a cabo por Espectrofotometría de absorción atómica a la llama. Los metales evaluados fueron: Cu, Cr, Ni y Pb. Dentro de los resultados obtenidos se tiene que sólo se detectó en su forma disponible el plomo y éste se correlacionó de forma positiva con el pH y de manera negativa con la respiración edáfica. Finalmente, se concluye que las concentraciones de Plomo disponible en los suelos arenosos evaluados, no superan los límites máximos permitidos en diversas normativas ambientales en el mundo; sin embargo, superan el valor establecido en el Decreto N° 2635 de Venezuela para lixiviados (5 mg/l) permitiendo inferir que estos suelos están impactados por este metal.

Palabras clave: Suelo arenoso, metales biodisponibles, contaminación.

ABSTRACT

Heavy metals are considered potentially toxic elements among the substances valued as pollutants. These substances are cause for concern since they persist in soils and alter various ecosystem processes, including multitrophic interactions. In this sense, in this research, the objectives were to evaluate the content of available metals and analyze their relationship with the physicochemical and biological parameters of sandy beach soils in the Puerto Cabello municipality, Carabobo state. The determined physicochemical parameters were texture, pH, conductivity, moisture retention, organic matter, total organic carbon and cation exchange capacity. The biological parameters were microbiological activity, microbial biomass carbon, catalase, urease and protease enzymatic activities. Metal extraction was carried out using a mixture of EDTA, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and Triethanolamine, and Flame Atomic Absorption Spectrophotometry carried out the determination. The metals evaluated were Cu, Cr, Ni and Pb. Among the results obtained, only lead was detected in its available form, and this was positively correlated with pH and negatively with edaphic respiration. Finally, it is concluded that the concentrations of lead available in the evaluated sandy soils do not exceed the maximum limits allowed in various environmental regulations in the world; however, they exceed the value established in Decree No. 2635 of Venezuela for leachate (5 mg/l), allowing us to infer that this metal impacts these soils. **Keywords:** Sandy soil, bioavailable metals, pollution.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo se debe principalmente al aporte de elementos, iones o compuestos que son foráneos al mismo, o de cantidades anormalmente altas de algunos de los intrínsecos en él. Esto da lugar a efectos tóxicos para los organismos y aumenta la posibilidad de que entren en la cadena trófica o de que sean transferidos a otros ecosistemas, provocando deterioro ambiental. El recurso suelo tiene una capacidad amortiguadora que puede reducir los impactos negativos de un contaminante al formarse enlaces entre los componentes del suelo y las sustancias tóxicas, sin embargo, al superarse esa capacidad de amortiguación, estas sustancias se convierten en un problema porque modifican los equilibrios biogeoquímicos y aparecen cantidades anómalas de determinados componentes que causan cambios en sus propiedades físicas, químicas y/o biológicas¹.

Dentro de las sustancias valoradas como contaminantes se encuentran los metales pesados, considerados elementos potencialmente tóxicos. El contenido total de metales pesados en un suelo es la suma de las concentraciones de elementos derivados de minerales en el material geológico original sobre el que el suelo se ha desarrollado (fuente litogénica) y posibles fuentes antropogénicas. Estas incluyen deposición atmosférica, gotas de lluvia que contienen metales pesados, formas gaseosas de elementos, aplicaciones directas de fertilizantes agrícolas, agroquímicos y diversos materiales orgánicos, incluidos lodos de depuradora, ganado, abonos, desechos de alimentos, compost y materiales tecnogénicos como cenizas y minas².

Los elementos potencialmente tóxicos son motivo de preocupación, ya que son persistentes en los suelos y difíciles de eliminar, pueden afectar de manera negativa la funcionalidad del suelo, alterando diversos procesos ecosistémicos que incluyen las interacciones multitróficas, entre otros³. El contenido total de metales en el suelo se utiliza habitualmente como indicador para determinar los límites de referencia o de intervención de los niveles de contaminación. Aunque las concentraciones totales sirven para identificar su potencial riesgo ambiental, no informan sobre su movilidad o disponibilidad para las plantas y otros organismos del suelo ya que el contenido total de metal incluye todas las diferentes formas químicas¹. La fracción disponible de un elemento químico en el suelo depende de las propiedades del suelo, de su distribución, de los procesos fisicoquímicos que ocurren con el tiempo (intercambio iónico, disolución de ácidos y reacciones redox), y de

factores biológicos, tales como las actividades fisiológicas de los organismos del suelo⁴. Según Peijnenburg et al., (2007)⁵, la fracción biodisponible de una sustancia química es la fracción de su cantidad total presente en un compartimento ambiental específico que, dentro de un período de tiempo determinado, está disponible o puede ser disponible para ser absorbido por organismos del entorno directo o por ingestión.

Los ecosistemas costeros en Venezuela son diversos y productivos ya que sustentan actividades turísticas, recreativas, económicas, como la pesca y el desarrollo portuario; además, son hábitats de diversas especies. En el estado Carabobo, específicamente en el municipio Puerto Cabello, se encuentran industrias dedicadas a la refinación de petróleo y al almacenamiento y distribución de productos químicos; así como también asentamientos urbanos y comerciales que promueven una afluencia de turistas alta. Estas actividades pueden modificar los procesos bioquímicos y el funcionamiento de ecosistemas muy productivos, debido a que sus residuos pueden contener gran cantidad de metales y otras sustancias contaminantes que ocasionarían cambios en la calidad del sedimento⁶.

La contaminación por metales pesados es una de las formas más peligrosas para este tipo de ecosistemas, debido a que estas especies tienden a acumularse en los tejidos de animales y plantas, permaneciendo por largos períodos, originando procesos de biomagnificación y acciones toxicodinámicas, que generan alteraciones metabólicas, mutaciones y transformaciones anatómicas en las especies animales, incluido el hombre⁷. En consecuencia, la estimación de la concentración de metales pesados en los suelos de las áreas costeras reviste una importancia significativa, ya que contribuye a la evaluación de la salud ambiental del suelo y a la toma de decisiones relacionadas con la implementación de métodos de remediación apropiados que se adapten a las características físicas, químicas y biológicas del entorno. En este contexto, el propósito de esta investigación se centra en la evaluación del contenido de metales biodisponibles y en el análisis de su relación con los parámetros fisicoquímicos y biológicos en suelos de tipo arenoso presentes en las playas del municipio Puerto Cabello, ubicado en el estado de Carabobo, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron tres playas para el estudio: El Palito (EP) (10.4809, -68.10923), Waikiki (W) (10.48311, -68.03862) y Playa Blanca (PB) (10.47367, -68.01626), ubicadas en el municipio Puerto Cabello, estado Carabobo (Figura 1).



Figura 1. Ubicación de las playas El Palito, Waikiki y Blanca del municipio Puerto Cabello, estado Carabobo. Fuente: Google Maps.

En cada playa se tomaron cuatro unidades de muestreo, distribuidas en función de las zonas de la playa. Dos unidades en el área correspondiente a la duna, denominada zona seca (S) y dos en la intermareal, señalada como zona húmeda (H). En cada unidad de muestreo se tomaron 10 submuestras simples superficiales (0-20

cm) y 10 submuestras subsuperficiales (20-40 cm). Las muestras se tomaron en julio 2019 en la estación lluviosa y en marzo 2020 en estación seca. Se tomó una alícuota de 500 g de cada muestra y se almacenaron en bolsas plásticas a 4°C para la evaluación de las propiedades bioquímicas por un período aproximado de un mes. El resto de las muestras fueron secadas al aire a temperatura ambiente para los análisis de parámetros fisicoquímicos. La textura se estimó a través del método descrito por Bouyoucos (1936)⁸, el pH y la conductividad se determinaron en un extracto acuoso en proporción 1:2 (m/v), la retención y el contenido de humedad se estimaron gravimétricamente. La materia orgánica se determinó mediante el método de pérdidas por ignición, según procedimiento descrito por Cargua et al., (2017)⁹ y el carbono orgánico total (COT) se determinó mediante oxidación húmeda con H₂SO₄ concentrado y K₂Cr₂O₇ 2N y determinando el Cr (III) espectrofotométricamente a 600 nm¹⁰. La capacidad de intercambio catiónico se determinó a pH 7, adicionando al suelo una solución de NH₄CH₃COO 1N, se filtró y se realizaron lavados con CH₃CH₂OH y luego con NaCl (10%), estos últimos se recolectaron y se les adicionó CH₂O (40%). La solución se valoró con NaOH 0,1N¹¹. La respiración basal se determinó utilizando el método de incubaciones estáticas, referenciado por Pardo et al., (2019)¹² y la biomasa microbiana se evaluó empleando la metodología de fumigación con cloroformo y posterior incubación, propuesta por Brookes et al., (1982)¹³. Las actividades enzimáticas determinadas fueron: catalasa¹⁴, ureasa¹⁵ y proteasa¹⁶.

Para la extracción de los metales disponibles se aplicó el método descrito por Briceño et al., (2020)¹⁷, empleando una mezcla extractante preparada con EDTA 0,05M, trietanolamina 0,1 M y CaCl₂.2H₂O 0,01M ajustada a pH: 7. Se realizó una extracción en una relación 1:2 suelo/mezcla extractante, dejando en agitación durante 24 h, posteriormente se centrifugó a 4500 rpm/ 10 min. El sobrenadante se filtró y se aforó a 50 mL con HNO₃ 0,14 M. Los metales determinados fueron Cu (324,8 nm), Cr (357,9 nm), Ni (232,0 nm), Pb (217,0 nm) aplicando las condiciones de operación establecidas por el equipo para cada metal. El proceso se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica de llama perteneciente a la serie SOLAAR, y se empleó una lámpara de cátodo hueco específica para cada metal, como fuente de radiación durante el análisis. La determinación del contenido de metales se realizó mediante comparación directa de la señal de cada elemento frente al calibrado obtenido para cada metal. Todas las muestras se procesaron por triplicado. La evaluación del efecto matriz se hizo para Ni, a partir de la mezcla extractante obteniéndose como resultado que no se presenta tal efecto. Para el análisis estadístico se utilizó el software PAST 3.24 utilizado comúnmente para análisis de datos científicos, con funciones para manipulación de datos, estadística univariada y multivariada. Inicialmente se verificaron los supuestos de normalidad, y se determinó que los datos no cumplían los criterios de datos normales, por lo que se realizó la correlación de correlaciones de Spearman para estudiar las relaciones entre los parámetros seleccionados para el estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los parámetros fisicoquímicos y bioquímicos obtenidos en las unidades de muestreo evaluadas en las estaciones lluviosa y seca, respectivamente. Se refleja que el porcentaje de arena varía entre 89 y 92%; mientras que el de arcilla varía entre 8 y 10%. Esto permite clasificar los suelos como Arenosoles¹⁸. Los valores de pH obtenidos varían en un rango entre 7,5 y 9, lo cual indica que los suelos evaluados se clasifican como alcalinos. En cuanto a la conductividad, su determinación en extractos de suelos permite estimar su contenido de sales, observándose una variación desde 0,1 hasta 8 mS. Los valores de retención de humedad evidencian variaciones desde 20 a 35%. La capacidad de retención de agua por el suelo depende del tamaño de las partículas y la porosidad. La materia orgánica es un parámetro que tiene efectos importantes sobre las propiedades físicas químicas y biológicas del suelo. En los suelos evaluados se observó una variación de 0,09 a 0,4%. El carbono orgánico total varió de 0,01 a 1,6 g C/kg ss. Estos resultados son bastante bajos, lo que indica que la disponibilidad de este elemento como nutriente está limitada. La CIC varió de 1,2 a 11

meq/100 gss), mostrando valores bajos en este tipo de suelos, asociados a los bajos valores de materia orgánica y contenido de arcilla, que están relacionados con este parámetro.

Parámetros fisicoquímicos								
Playa	Textura		pH	Cond (mS/cm)	RH (%)	MO (%)	COT (gC/kgss)	CIC (meq/100 gss)
	A (%)	Ar(%)						
Estación lluviosa								
EP	89,6-91,4	8,6-8,8	8,0-8,8	0,228-8,329	25,69-30,71	0,148-0,270	0,019-1,674	4,19-9,57
W	89,7-91,9	8,1-10,3	7,6-9,1	0,137-7,955	20,84-26,70	0,099-0,250	0,127-0,615	1,29-7,79
PB	89,8-90,1	9,9-10,2	7,6-8,4	0,187-6,934	24,62-25,21	0,072-0,262	0,242-0,684	3,50-7,13
Estación seca								
EP	89,7-92,3	7,8-10,3	7,7-7,9	2,14-7,84	26,28-35,24	0,212-0,452	0,586-1,203	6,45-11,27
W	89,6-91,4	8,6-10,2	7,7-8,2	1,43-5,79	22,66-26,85	0,117-0,296	0,093-0,616	1,29-8,17
PB	89,9-90,1	9,9-10,1	7,8-8,0	1,05-5,48	23,05-25,02	0,113-0,278	0,191-0,580	4,32-7,66
Parámetros bioquímicos								
Playa	Actividad microbiológica (mg C-CO ₂ /kgss)	CBM (mg C biomasa/kg ss)	Actividad Catalasa (mmoles H ₂ O ₂ /gss.h)	Actividad Ureasa (µgN-NH ₄ ⁺ /gss.h)	Actividad Proteasa (µg tirosina/gss.h)			
Estación lluviosa								
EP	50,007- 230,675	20,555- 184,800	0,2201- 0,2735	1,6535- 27,2952	9,2966- 156,0448			
W	12,449- 158,314	23,341- 447,822	0,2083- 0,2974	1,6884- 25,6779	10,5205- 84,2210			
PB	70,460- 144,887	43,055- 134,226	0,2669- 0,3129	1,5625- 24,0767	10,9203- 84,9150			
Estación seca								
EP	152,211-271,888	349,334-1082,800	0,2169-0,2766	1,3386-108,114	13,5917-89,9744			
W	120,122-256,749	252,076-1246,948	0,1906-0,2902	1,3186-33,2449	12,5774-125,3815			
PB	152,968-279,951	161,348-1186,281	0,2454-0,3599	1,2019-69,3216	14,9405-72,5098			

Fuente: Albujar y Armado, (2022)¹⁹

A= contenido de arena, Ar= contenido de arcilla, Cond=conductividad, RH= retención de humedad, MO=materia orgánica, COT=carbono orgánico total, CIC= capacidad de intercambio catiónico, CBM=carbono de biomasa microbiana.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos y bioquímicos de las unidades de muestreo en las playas El Palito, Waikiki y playa Blanca para las estaciones lluviosa y seca.

La actividad microbiológica se evaluó a través de la estimación de la respiración basal, obteniéndose los valores más altos en la estación seca, donde la disponibilidad de O₂ es mayor. Para el carbono de la biomasa microbiana se obtuvo un comportamiento similar, asociado a la mayor disponibilidad de materia orgánica en la estación seca¹⁹. En el caso de la actividad enzimática de la catalasa se observan variaciones pequeñas, desde 0,19 a 0,35 mmoles H₂O₂/gss.h. La actividad de la ureasa varió desde 1,2 a 69,3 µgN-NH₄⁺/gss.h y la actividad de la proteasa varió de 9,2 a 156,0 µg tirosina/gss.h, éstas variaciones se evidenciaron en las zonas de la playa evaluadas.

En la tabla 2 se reflejan las concentraciones de los metales evaluados. El método utilizado está basado en los diversos procedimientos de extracción para evaluar la movilidad de metales pesados en suelos y sedimentos, y están fundamentados en el uso racional de reactivos para disolver las diferentes fracciones mineralógicas²⁰. Estas fracciones se dividen en cuatro grupos. La primera fracción, denominada intercambiable, incluye los metales retenidos por una interacción electrostática relativamente débil sobre superficies del suelo como arcillas, óxidos de Fe y Mn y materia orgánica; esta representa la fracción con mayor biodisponibilidad. La segunda fracción, denominada reducible, corresponde a los metales asociados a óxidos de Fe y Mn por mecanismos como coprecipitación, adsorción, formación de complejos de superficie, intercambio iónico y penetración en la estructura cristalina; representa la segunda fracción en biodisponibilidad. En la tercera fracción, conocida como oxidable, los metales pueden estar asociados por reacciones de complejación a la materia orgánica del suelo. En este caso, las formas metálicas solubles son liberadas cuando la materia orgánica es atacada en condiciones oxidantes fuertes. La biodisponibilidad de esta fracción depende de las características de la materia orgánica. La cuarta fracción, señalada como residual, corresponde a aquellos metales secuestrados en la estructura cristalina de los minerales primarios. La biodisponibilidad de esta fracción es muy baja²¹.

La atenuación resultante de la movilidad y la biodisponibilidad de los metales en el medio ambiente es uno de los más importantes servicios ecosistémicos atribuibles a los suelos, con implicaciones tanto para la disponibilidad de los micronutrientes, como para la toxicidad potencial sobre los organismos terrestres y acuáticos. La fuerza con la que los metales son retenidos en los suelos depende de: propiedades atribuibles al origen del metal; la afinidad intrínseca de los iones metálicos individuales por las superficies de adsorción del suelo; el conjunto de superficies de adsorción presentes en los suelos (humus, óxidos metálicos, aluminosilicatos, arcillas, etc.); las propiedades del suelo, incluido el pH, el potencial redox, contenido de humedad, temperatura, actividad biológica, conductividad, entre otros, y el tiempo de contacto suelo-metal²².

Unidad de muestreo	Estación lluviosa				Estación seca			
	mg Ni/kg ss	mg Cr/kg ss	mg Cu/kg ss	mg Pb/k ss	mg Ni/kg ss	mg Cr/kg ss	mg Cu/kg ss	mg Pb/k ss
EPLSs	ND	ND	ND	21,546± 0,718	ND	ND	ND	23,644± 0,871
EPLSss				20,223± 0,625				23,551± 0,854
EPCSs				21,629± 0,048				21,829± 0,833
EPCSss				22,294± 0,800				21,021± 0,728
EPLHs				22,881± 0,118				24,070± 0,852
EPLHss				23,653± 0,821				22,693± 0,930
EPCHs				23,254± 1,027				22,965± 1,456
EPCHss				23,863± 0,838				21,304± 0,100
WLSs				26,972± 0,732				20,222± 0,824
WLSss				23,905± 0,860				23,512± 0,712
WCSs				25,286± 0,858				22,042± 1,426
WCSss				23,856± 0,882				19,222± 0,709
WLHs				23,407± 0,889				17,773± 0,068
WLHss				20,712± 0,802				17,912± 0,062
WCHs				25,244± 0,852				19,328± 0,057
WCHss				24,348± 0,926				20,585± 0,123
PBSs				19,917± 0,724				21,029± 0,797
PBSss				23,167± 1,031				20,216± 0,033
PBHs				23,699± 0,840				18,028± 0,112
PBHss				25,408± 0,775				21,254± 0,071

EPLSs=Playa El Palito, zona lejana, seca, superficial, **EPLSss**= Playa El Palito, zona lejana, seca, subsuperficial, **EPCSs**= Playa El Palito, zona cercana, seca, superficial, **EPCSss**= Playa El Palito, zona cercana, seca, subsuperficial, **EPLHs**= Playa El Palito, zona lejana, húmeda, superficial, **EPLHss**= Playa El Palito, zona lejana, húmeda, subsuperficial, **EPCHs**= Playa El Palito, zona cercana, húmeda, superficial, **EPCHss**= Playa El Palito, zona cercana, húmeda, subsuperficial, **WLSs**= Playa Waikiki, zona lejana, seca, superficial, **WLSss**= Playa Waikiki, zona lejana, seca, subsuperficial, **WCSs**= Playa Waikiki, zona cercana, seca, superficial, **WCSss**= Playa Waikiki, zona cercana, seca, subsuperficial, **WLHs**= Playa Waikiki, zona lejana, húmeda, superficial, **WLHss**= Playa Waikiki, zona lejana, húmeda, subsuperficial, **WCHs**= Playa Waikiki, zona cercana, húmeda, superficial, **WCHss**= Playa Waikiki, zona cercana, húmeda, subsuperficial, **PBSs**= Playa Blanca, zona seca, superficial, **PBSss**=Playa Blanca, zona seca, subsuperficial, **PBHs**=Playa Blanca, zona húmeda, superficial, **PBHss**= Playa Blanca, zona húmeda, subsuperficial.

Tabla 2. Contenido de metales biodisponibles en las unidades de muestreo seleccionadas de las playas El Palito, Waikiki y Blanca del Municipio Puerto Cabello, en las estaciones lluviosa y seca correspondientes al período 2019-2020.

Los resultados obtenidos reflejan que de los metales evaluados, sólo se detectó Pb en su forma disponible. Esto permite inferir que tanto el níquel, cromo y cobre pueden encontrarse en fracciones con baja biodisponibilidad o movilidad, como por ejemplo, la fracción residual. González et al. (2011)²¹, demostraron que, metales como Ni, Cu, Zn, Cd y Pb, están retenidos en un alto porcentaje en las fracciones más estables, la oxidable y residual. Gómez et al. (2020)²³, mostraron resultados similares, concluyendo que el contenido de metales pesados en los suelos evaluados en su investigación, tiende a predominar en las fracciones residual y materia orgánica lo que favorece su retención en el suelo limitando con ello su movilidad. Con respecto al Cr, el mayor contenido lo encontraron en la fracción residual, consistente con lo reportado en diversos estudios y lo atribuyeron a la baja tendencia del Cr a formar los oxoaniones cromato y dicromato. En cuanto al Cu, encontraron el mayor porcentaje entre la fracción residual y de materia orgánica. Para el níquel, éste se concentró en la fracción residual. En el caso del plomo, encontraron como fracción dominante la residual seguida de la materia orgánica. En el suelo, el Pb es relativamente inmóvil debido la tendencia a ser transformado en compuestos de baja solubilidad como sulfatos y fosfatos además de que forma complejos con materia orgánica y arcillas.

Metal (mg/kg dm)	Bélgica	Francia	Alemania	Gran Bretaña	Hungría	España	Suecia	Australia	Canadá	China	Noruega	Suiza	Estados Unidos
Cromo (III)	300	130	400	130	75	100-150	120	100	64	58,9	25	N.A.	100000
Cobre	400	190	N.A.	N.A.	30	50-210	100	7000	63	31,7	100	1000	3100
Plomo	700	400	400	450	100	50-300	80	300	140	37,5	60	1000	400
Níquel	470	140	140	50	40	30-112	35	400	50	27,5	50	N.A.	1600

N.A= no aplica

Tabla 3. Valores límite de Cr, Cu, Pb y Ni para uso en terrenos residenciales para diferentes países²⁴.

En la tabla 3 se muestran valores límite de metales en suelos de uso residencial. Allí se reflejan los valores límite para plomo, observándose que los valores obtenidos en esta investigación se encuentran por debajo de los reflejados en la tabla. En el caso de Venezuela, no se dispone de una normativa de regulación directa de la calidad del suelo; sin embargo, tomando en cuenta los valores establecidos en el Decreto N° 2635 (1998)²⁵, en el Anexo D, donde se establecen las concentraciones máximas permitidas para lixiviados, los valores reflejados en la tabla 2 superan el valor permitido para el plomo (5 mg/l), lo que permite inferir que el suelo de las playas en estudio se encuentra impactado por la presencia de éste contaminante.

La presencia de este metal en las zonas evaluadas, en su forma biodisponible, puede atribuirse a las actividades antropogénicas que se realizan en el área circundante. Las tres playas seleccionadas se ubican en áreas de alta afluencia vehicular, con cercanía a estaciones de servicio y de muelle de transporte marítimo; sitio donde se

desarrollan actividades que generan este tipo de contaminante, el cual puede ser transportado al suelo de las playas a través de las corrientes marítimas o por dispersión eólica.

Aunque las cantidades de Pb determinadas son inferiores a los límites establecidos a nivel internacional, éstas pueden tener efectos negativos sobre los microorganismos y las especies vegetales características de la zona. Martínez et al. (2018)²⁶, encontraron que metales como el Pb, Hg tienen un efecto sinérgico en la composición de género de nemátodos. Li et al. (2017)²⁷, encontraron que la composición de las comunidades microbianas, así como las interacciones entre las redes tróficas cambian a fin de adaptarse a la presencia de contaminantes inorgánicos como los metales pesados. Khan et al. (2018)²⁸ encontraron que Pb, Cd y As, son contaminantes ambientales significativos que tienen efectos sobre la biodisponibilidad de otros metales considerados esenciales, en especies vegetales. Armado et al. (2018)²⁹, establecieron que a pesar de que las concentraciones de los metales que estudiaron se encontraban por debajo de los niveles máximos permitidos para lixiviados, éstos ejercían un efecto en parámetros como, carbono orgánico total (COT), actividad ureásica (AU) y biomasa microbiana (BM), propiciando su disminución.

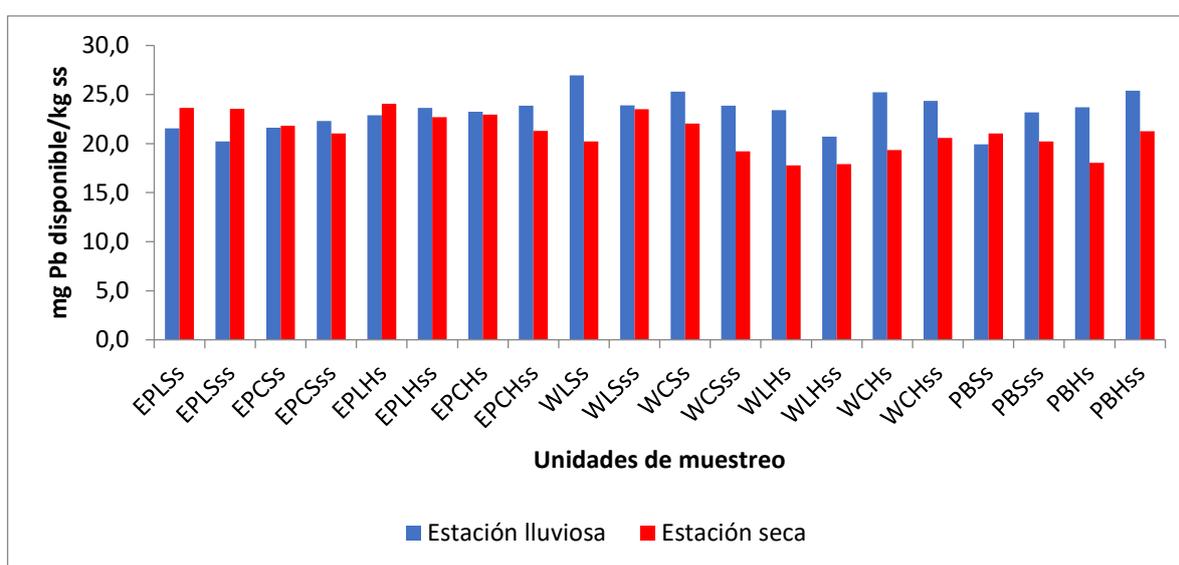


Figura 2. Comparación del contenido de Pb biodisponible en suelos arenosos de las playas El Palito, Waikiki y Blanca del municipio Puerto Cabello, en las estaciones lluviosa y seca.

En la figura 2 se muestra una comparación del contenido de Pb biodisponible en las estaciones lluviosa y seca en los suelos de las playas estudiadas. Se observa que en la mayoría de las estaciones de muestreo el contenido de plomo es mayor en la estación lluviosa. Esto puede asociarse a que las precipitaciones tienden a transportar al suelo las partículas dispersas en el aire, aumentando así la cantidad de estas especies. Adicionalmente, Steinnes (2013)³⁰, establece que alternancia de condiciones aeróbicas y anaeróbicas, como las que se observan por inundación del suelo, conducen a cambios en el pH y el potencial redox, lo que afecta la mayoría de los procesos que regulan la especiación y movilidad de los metales en el suelo. En el caso del Pb, la reducción de los óxidos de Mn y Fe y cambios de pH inducidos, tal como se observa en algunas unidades de muestreo en las estaciones seca y lluviosa, pueden conducir a la liberación de Pb de las fases sólidas a la solución del suelo, lo que explicaría el aumento de la concentración del metal en las fracciones disponibles, en la estación lluviosa.

También se observa que en el caso de la playa El Palito, las diferencias entre las estaciones seca y lluviosa son pequeñas, excepto en el caso de la unidad de muestreo lejana a la posible fuente contaminante. En este punto, se ubica una de las descargas de aguas residuales provenientes de las infraestructura comercial que allí se encuentra; parte de las actividades que allí se desarrollan incluyen el mantenimiento de las embarcaciones utilizadas por los pescadores de la zona, que implica el uso de sustancias como combustible, entre otros. Esta

actividad es una de las generadoras de contaminantes como el plomo y, tomando en cuenta que en la estación seca, disminuyen los lavados producto de las precipitaciones, es de esperarse que las concentraciones de este elemento sean mayores.

Parámetro	Pb disponible (mg/kgss)
pH	0,49444
Conductividad (mS/cm)	0,17195
RH (%)	0,13526
MO (%)	0,065948
COT (gC/kgss)	0,17943
A (%)	0,18915
Ar (%)	-0,0071182
Actividad microbiológica (mgC-CO ₂ /kgss)	-0,48219
Carbono de biomasa microbiana (mgCmic/kgss)	-0,24445
AC (mmoles H ₂ O ₂ /gss.h)	-0,1933
AU (μgN-NH ₄ ⁺ /gss.h)	0,16958
AP (μg tirosina/gss.h)	-0,11743

RH= retención de humedad; MO= materia orgánica; COT= carbono orgánico total; %A= arena; %Ar= arcilla; AC= actividad catalasa; AU=actividad ureásica; AP= actividad proteasa.

Tabla 4. Correlación entre los parámetros fisicoquímicos, biológicos y bioquímicos con el contenido de Pb disponible en suelos arenosos de las playas El Palito, Waikiki y Blanca del Municipio Puerto Cabello, Estado Carabobo. (p<0,05)

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en la correlación del contenido de plomo disponible con los diferentes parámetros fisicoquímicos, biológicos y bioquímicos determinados en los suelos evaluados. Se evidencia que la fracción disponible del metal, se correlaciona de manera positiva con el pH. En tal sentido, Young (2013)²² establece que en el caso de los metales catiónicos (por ejemplo, Pb⁺²), el pH influye en la fuerza de adsorción de los sólidos del suelo. A medida que aumenta el pH se producen transformaciones como el hecho de que la especiación del catión metálico puede cambiar a través de la formación de complejos de hidroxilo y bicarbonatos solubles, aumentando así la solubilidad de los metales. Por su parte, Steinnes (2013)³⁰ establece que en suelos alcalinos, como es el caso de los suelos evaluados, la solubilidad puede aumentar debido a la formación de complejos solubles de Pb- orgánico y Pb-hidróxido.

Otro de los resultados indicados en la tabla 4 es la correlación negativa significativa entre el contenido de Pb disponible y la actividad biológica, estimada mediante el método de respiración basal. Esto concuerda con lo obtenido por Xu et al. (2019)³¹, donde observaron una disminución abrupta en la tasa de respiración microbiana, asociándolo a una influencia negativa de los metales en los procesos enzimáticos microbianos y funciones celulares, lo que promueve una disfunción metabólica en los microorganismos del suelo, afectando así la respiración edáfica. En tal sentido, definieron a los metales evaluados en su investigación (Cd y Pb) como inhibidores instantáneos de los procesos microbianos.

En este orden de ideas, Shi y Ma (2017)³², también observaron una correlación negativa entre la respiración del suelo y la concentración de cadmio, asociándole a este metal un efecto inhibitorio de la actividad de los microorganismos de los suelos que evaluaron. Armado et al. (2018)²⁹, también reportaron una disminución en la respiración basal en suelo con niveles bajos de metales pesados, aunque no significativa desde el punto de vista estadístico. Guillaumot et al., (2014)³³, reportaron disminución en la respiración de los microorganismos en suelos del Mediterráneo en presencia de Antimonio (Sb). Xiao et al. (2017)³⁴, observaron una reducción en la respiración basal (RB) en muestras con concentraciones altas de vanadio durante períodos

de incubación de 1–8 semanas, concluyendo que este metal mostró un efecto adverso sobre la respiración basal. Este resultado fue asociado a un mecanismo inhibitor del crecimiento y la reproducción de los microorganismos del suelo, lo que reduce la síntesis y secreción de enzimas, originando la disminución de la actividad enzimática y en la producción de CO₂.

En tal sentido, es posible inferir que la presencia de especies inorgánicas, como los metales pesados, en las fracciones disponibles de los suelos arenosos evaluados, tienen un impacto negativo en las propiedades bioquímicas como la respiración edáfica, aun cuando sus concentraciones no excedan los límites establecidos en las normativas ambientales. Tomando en cuenta que el suelo se considera un sistema complejo heterogéneo, donde confluyen distintas propiedades físicas, químicas y biológicas, es posible suponer que efectos de este tipo inciden en estas variables, ocasionando alteraciones en la calidad del suelo.

De igual forma, se deduce que la actividad biológica del suelo, estimada a través de la respiración basal, puede considerarse como un indicador de impactos ambientales asociados a las concentraciones de metales pesados en suelos arenosos de playas, específicamente de impactos asociados al plomo disponible. Esta premisa ha sido demostrada por diversos autores como Nwachukwu y Pulford (2011)³⁵, que establecieron que la capacidad de las bacterias para descomponer sustratos complejos es significativamente reducida por la presencia de metales pesados, por lo que la cantidad de CO₂ evolucionado es un indicador muy fiable del efecto de la contaminación metal en la actividad microbiana.

CONCLUSIONES

En los suelos arenosos de las playas evaluadas solo se detectó en su forma disponible el Pb. Los metales Ni, Cr y Cu no fueron detectados en forma biodisponible mediante el método utilizado. Las concentraciones de plomo disponible en los suelos arenosos de las playas evaluadas, no superan los límites máximos permitidos en diversas normativas ambientales en el mundo; sin embargo, superan el valor establecido en el Decreto N° 2635 de Venezuela para lixiviados, permitiendo inferir que estos suelos están impactados por este metal. En la estación lluviosa, el aumento de las concentraciones de plomo disponible puede asociarse a cambios de pH y de condiciones redox del sitio, afectando la especiación y movilidad de esta especie. Las concentraciones de plomo disponible en los suelos arenosos evaluados se correlacionan de forma positiva, a un nivel significativo con el pH, debido a que la solubilidad puede aumentar por la formación de complejos solubles de Pb-orgánico y Pb-hidróxido. También se correlacionan de forma negativa con la respiración basal, debido a que este metal ejerce un efecto inhibitor en la actividad de los microorganismos presentes en este tipo de suelos. La respiración edáfica, puede considerarse un indicador de alteración de la calidad de suelos arenosos de playas, producto de la presencia de metales como el plomo. Para mitigar los efectos del impacto de este metal en este tipo de suelos, se pueden aplicar métodos de remediación que empleen microorganismos o especies vegetales que se desarrollen en estos ambientes, o aplicar enmiendas orgánicas que modifiquen el pH, entre otras propiedades, a fin de disminuir la movilidad de este elemento en el suelo arenoso.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la Universidad Estatal de Bolívar a través del proyecto “Desarrollo y optimización de métodos analíticos para la extracción y cuantificación de polifenoles en matrices vegetales” (PIV-66-2021).

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interes

REFERENCIAS

1. Lago, M. (2018). Biodisponibilidad de metales pesados en suelos contaminados. *Tesis Doctoral*. Universidad de Vigo. Disponible en: <http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/>
2. Alloway, B. (2013). Sources of heavy metals and metalloids in soils. En B.J. Alloway (ed.), *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability, Environmental Pollution* 22. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7_2.
3. Voglar, G.; Mrak, T.; Krizman, M.; Jagodic, A.; Tardan, S. y Laznik, Z. (2018). Effect of contaminated soil on multitrophic interactions in a terrestrial system. *Plant Soil*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-01803903-z>.
4. Nannoni, F. y Protano, G. (2016). Chemical and biological methods to evaluate the availability of heavy metals in Soils of the Siena urban area (Italy). *Science of the Total Environment*, 568: 1-10. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.208>.
5. Peijnenburg, W.; Zablotkaja, M. y Vijver M. (2007). Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 163-179. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.02.008>.
6. Fuentes, M. (2008). Metales pesados Cu, Cr, Ni, Zn, Pb y Cd en los sedimentos del muelle pesquero de Güiria, estado Sucre, Venezuela. *Tecnociencia*, Vol. 10, N°2, pp.61-79. Disponible en: <https://revistas.up.ac.pa/index.php/tecnociencia/article/view/848>.
7. Doria, C. (2018). Niveles de metales pesados en los sedimentos superficiales de las zonas de playas turísticas de La Guajira norte de Colombia. Fundación Universidad de América. *Revista de Investigación*. Vol. 11 (2): 49-66. DOI: <https://doi.org/10.29097/2011-639X.226>
8. Bouyoucos, G. (1936). Directions for making mechanical analysis of soils by the hydrometer method, *Soil Science*, 42 (3): 225-228. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-193609000-00007>
9. Cargua, F.; Rodríguez, M.; Damián, D.; Recalde, C. y Santillán, G. (2017). Comparación de dos métodos analíticos para la determinación de carbono orgánico del suelo de bosque andino, parque nacional Sangay-Ecuador, *Acta agronómica. Funcionamiento biológico, químico y físico del suelo*, 66(39): 408-413. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n3.52467>
10. Walinga, I.; Kithome, M.; Novozamsky, I.; Houba, V. y Van der Lee, J. (1992). Spectrophotometric determination of organic carbon in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, (15-16), 1935-1944. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103629209368715>.
11. Jaramillo, D. (2002). Introducción a la ciencia del suelo. *Universidad Nacional de Colombia. Medellín*. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/>
12. Pardo, Y.; Paolini, J. y Cantero, M. (2019). Biomasa microbiana y respiración basal del suelo bajo sistemas agroforestales con cultivos de café. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(1). DOI: <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n1.2019.1144>
13. Brookes, P.; Powlson, D. y Jenkinson, D. (1982). Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 14: 319-329. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90001-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90001-3)
14. Johnson, J. y Temple, K. (1964). Some variables affecting the measurement of "Catalase Activity" in soil. *Soil Science Society of America Journal*. 28 (2): 207-209. DOI: <https://dx.doi.org/10.2136/sssaj1964.03615995002800020024x>.
15. Kandeler, E. y Gerber, H. (1988). Short-term assay of urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6: 68-72. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00257924>.
16. Ladd, J. y Butler, J. (1972). Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(1): 19-30 DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90038-7)
17. Briceño, J.; Tonato, E.; Silva, M.; Paredes, M. y Armado, A. (2020). Evaluación del contenido de metales en suelos y tejidos comestibles de *Allium fistulosum* L. cultivado en zonas cercanas al volcán Tungurahua. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. 32(2): 114-126. DOI: <http://doi.org/10.17163/lgr.n32.2020.09>.
18. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. (2009). *Guía para la descripción de los suelos*, Roma, Italia. Disponible en: <https://www.fao.org/3/a0541s/a0541s.pdf>.

19. Albuja, J. y Armado, A. (2022). Actividad microbiológica como indicador de calidad en suelos arenosos de playas del municipio Puerto Cabello, estado Carabobo. *Revista Ingeniería UC*. 29(2): 145-155. DOI: <https://doi.org/10.54139/revinguc.v29i2.177>
20. Yin, H.; Tan, N.; Liu, C.; Wang, J.; Liang, X.; Qu, M.; Feng, X.; Qiu, G.; Tan, W. y Liu, F. (2016). The associations of heavy metals with crystalline iron oxides in the polluted soils around the mining áreas in Guangdong Province, China. *Chemosphere*, 161: 181-189. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.018>.
21. González, E.; Tornero, M.; Sandoval, E.; Pérez, A. y Gordillo, A. (2011). Biodisponibilidad y fraccionamiento de metales pesados en suelos agrícolas enmendados con biosólidos de origen municipal. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(4): 291-301. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/>
22. Young, S. (2013). Chemistry of Heavy Metals and Metalloids in Soils. En B.J. Alloway (ed.), Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability, *Environmental Pollution*. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7_3.
23. Gómez, F.; Reyes, J. y Amado, M. (2020). Fraccionamiento de metales pesados en un suelo contaminado del Valle de Mexicali. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33(4):103-113. <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4586>.
24. Rodríguez, E.; McLaughlin, M. y Pennock, D. (2019). *La contaminación del suelo: una verdad oculta*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. Roma. Disponible en: <https://www.fao.org/3/i9183es/i9183es.pdf>
25. Decreto 2635 (1998). Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos. Gaceta Oficial N° 5245. *República Bolivariana de Venezuela*. Disponible en: <https://www.lurconsultores.com/wp-content/uploads/2016/12/Decreto-2635.pdf>.
26. Martínez, J.; Torres, M.; dos Santos, G y Moens, T. (2018). Influence of heavy metals on nematode community structure in deteriorated soil by gold mining activities in Sibutad, southern Philippines. *Ecological Indicators*, 91, pp.: 712-721. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.021>
27. Li, X.; Meng, D.; Li, J.; Yin, H.; Liu, H.; Liu, X.; Cheng, C.; Xiao, Y.; Liu, Z. y Yan, M. (2017). Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. *Environmental Pollution*, 231: 908-917. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.057>.
28. Khan, A.; Khan, S.; Aamir, M.; Ullah, H.; Nawab, J.; Rehman, I. y Shah, J. (2018). Heavy metals effects on plant growth and dietary intake of trace metals in vegetables cultivated in contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s137620181849x>.
29. Armado, A.; Pérez, J.; Durán, D.; Reyes, D.; Medina, M. y Valbuena, O. (2018). Efectos sobre parámetros bioquímicos y biológicos bacterianos en suelos que contienen concentraciones permisibles de metales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(3): 441- 451. DOI: <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.03.07>.
30. Steinnes, E. (2013). Lead. En B.J. Alloway (ed.), Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability, *Environmental Pollution*, DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7_14.
31. Xu, Y.; Seshadri, B.; Bolan, N.; Sik Ok, Y.; Zhang, W.; Rumpel, C.; Sparks, D.; Farrell, M.; Hall, T. y Dong, Z. (2019). Microbial functional diversity and carbon use feedback in soils as affected by heavy metals. *Environmental International*, 125: 478-488. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.071>.
32. Shi, W. y Ma, X. (2017). Effects of heavy metals Cd pollution on microbial activities in soils. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(4): 722-725. DOI: <https://doi.org/10.26444/aaem/80920>.
33. Guillamot, F.; Calvert, V.; Millot, M. y Criquet, S. (2014). Does antimony affect microbial respiration in Mediterranean soils? A microcosm experiment. *Pedobiología*, 57 (2): 119-121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2014.01.003>.
34. Xiao, X.; Wang, M.; Zhu, H.; Guo, Z.; Han, X. y Zeng, P. (2017). Response of soil microbial activities and microbial community structure to vanadium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142: 200-206. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.047>.

35. Nwachukwu, O. y Pulford, I. (2011). Microbial respiration as an indication of metal Toxicity in contaminated organic materials and soil. *Journal of Hazardous Materials*, 185: 1140-1147. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.024>.
-

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation. Albujar J; Armado A, Briceño J; Avalos D; Salazar S; Rojas M. Evaluación del contenido de metales biodisponibles en suelos arenosos de playas del Municipio Puerto Cabello, Estado Carabobo, Venezuela. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 16. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.16>

Additional information Correspondence should be addressed to jalbujar@uc.edu.ve

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Dolor neuropático localizado: A propósito de un caso de neuralgia posherpética

Localized neuropathic pain: A case report of postherpetic neuralgia

Patricia Bonilla-Sierra ^{1*}, Mohamed Sánchez ²

1 Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica Particular de Loja / Loja / Ecuador; pbonilla65@utpl.edu.ec; ORCID: 0000-0003-4782-523X

2 Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica Particular de Loja / Loja / Ecuador; msanchez44@utpl.edu.ec; ORCID: 0000-0001-7415-6225

* Correspondence: : pbonilla65@utpl.edu.ec

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.17>

RESUMEN

El Dolor Neuropático (DN) aparece después de que una lesión o afección impacte el sistema somatosensorial. Dependiendo de su ubicación puede ser periférico o localizado (DNL). Debido a un diagnóstico inadecuado existe un número importante de pacientes con DNL sin tratamiento. Es por ello que el presente caso de DNL por neuralgia posherpética muestra cómo el diagnóstico tool para DNL es de fácil implementación. Además, este reporte presenta esquemas terapéuticos adecuados para una resolución exitosa un tratamiento exitoso de DNL. Dentro de los agentes tópicos los parches de lidocaína han mostrado una tasa de éxito alta con una buena adherencia por parte de los pacientes.

Palabras Clave: Dolor neuropático localizado; neuralgia post herpética; diagnóstico de DNL, lidocaína

ABSTRACT

Neuropathic Pain (NP) appears after an injury or condition impacts the somatosensory system. Depending on location, it can be peripheral or localized (LNP). Due to an inadequate diagnosis, many patients with NPL are without treatment. The present case of LNP due to postherpetic neuralgia shows how the LNP diagnostic tool is easy to implement. In addition, this report presents adequate therapeutic protocols for a successful resolution of DNL. Lidocaine patches have shown a high success rate with good patient adherence among the topical agents.

Keywords: Localized neuropathic pain; postherpetic neuralgia; LNP diagnosis; lidocaine

INTRODUCTION

El dolor neuropático (DN) es aquel que se produce como consecuencia de una lesión o enfermedad que afecta el sistema somatosensorial ¹.

Según su etiología se clasifica en central o periférico dependiendo de la localización de la afección del sistema nervioso ¹. Se ha reportado que más del 60 % del dolor neuropático periférico es dolor neuropático localizado (DNL) ² Este último está caracterizado por presentarse en áreas circunscritas de máximo dolor, asociado a una sensibilidad cutánea anormal y / o síntomas espontáneos típicos del DN. Afecta un área corporal pequeña y esta zona puede ser igual o menor al tamaño de una hoja A4 ³. Por la delimitación del dolor, éste merece en primera instancia un manejo con analgésicos tópicos específicos ⁴.

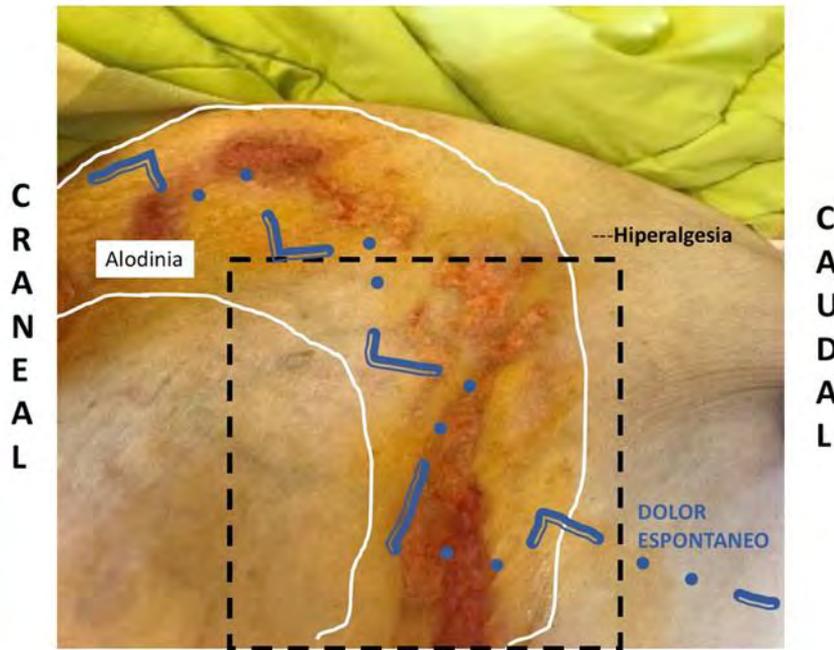
La neuralgia posherpética (NPH), es la complicación más frecuente de la reactivación del virus varicela zóster (VVZ), ocurre con frecuencia en adultos mayores por la disminución de la respuesta inmunitaria relacionada con la vejez ⁵.

Se estima que la NPH ocurre entre el 5 y el 20% del total de pacientes con herpes zóster (HZ). Su prevalencia aumenta con la edad, ocurre en la sexta década de vida hasta en el 20% de pacientes que han padecido HZ y en más del 30% de estos pacientes mayores de 80 años de edad ⁶. Afecta el funcionamiento físico y el bienestar psicoemocional, provocando un impacto negativo en la calidad de vida del paciente y su entorno ^{5,7}.

A pesar de existir múltiples guías clínicas a nivel mundial que orientan el diagnóstico y tratamiento adecuados, aún persisten un número importante de pacientes sin diagnóstico y tratamiento apropiados ⁴. Por tanto, el objetivo del presente reporte es resaltar la importancia del diagnóstico oportuno del DNL y recordar tratamientos efectivos con énfasis en el ámbito de atención primaria en salud.

CASO CLINICO

Paciente femenina de 84 años de edad, quien presentó infección por HZ, evaluada en atención primaria. Inició tratamiento con aciclovir 400 mg vía oral (VO) 2 veces al día por 5 días, carbamazepina 400 mg día VO para control del dolor, ardor y prurito severo. Este esquema de tratamiento se mantuvo por 15 días y se detectó reacción adversa de hiponatremia severa, ameritando hospitalización y retiro inmediato de la medicación. Posterior a su estabilización, la paciente egresó con tratamiento de paracetamol 500 mg VO en caso de dolor intenso. A pesar de esto, la paciente se mantuvo por más de tres meses con dolor insoportable, insomnio, labilidad emocional, ansiedad. Por lo que es referida a clínica del dolor en donde es evaluada y al examen físico llama la atención zona hiperpigmentada a nivel de la región dorso-lumbar izquierda (T12 - L1). Se valoró la zona de dolor con presencia de alodinia en todo el recorrido neuroanatómico de la lesión, refiriendo intensidad severa a nivel de la línea axilar posterior y en la región inguinal izquierda, acompañado de sensación de prurito, tumefacción, hiperalgesia de predominio en la región inguinal, en ausencia de hipoestesia e hipoalgesia (Figura 1). El dolor era tipo urente, punzante, incisivo e intenso que mejoraba al aplicar medios físicos (pañes de agua fría). De acuerdo a la escala numérica (EN) el dolor era de 6 a 8/10, el cual era variable en el día y empeoraba durante la noche. La paciente reportaba crisis de dolor intolerable de EN 10/10.



Alodinia: zona demarcada con líneas blancas continuas
 Hiperalgnesia: zona cuadrada con líneas negras punteadas
 Dolor espontáneo: líneas intermitentes azules gruesas .
 Intensidad severa: >7-10/10

Figura 1. Área de dolor pretratamiento: intensidad severa acompañada de una amplia zona de alodinia e hiperalgnesia.

Dentro de los antecedentes personales la paciente indicaba ser diabética e hipertensa controlada con metformina 500 mg día y losartán 100 mg día, respectivamente. Además, refirió presentar episodios de arritmias supraventriculares que fueron corregidas con tratamiento respectivo.

Al examen físico los signos vitales, órganos y sistemas se encontraban en buenas condiciones. Los exámenes de laboratorio estaban dentro de límites normales para su edad. Finalmente, se le realiza el Diagnostic Tool propuesto por Mick y cols.³ para DNL confirmando NPH (Tabla 1).

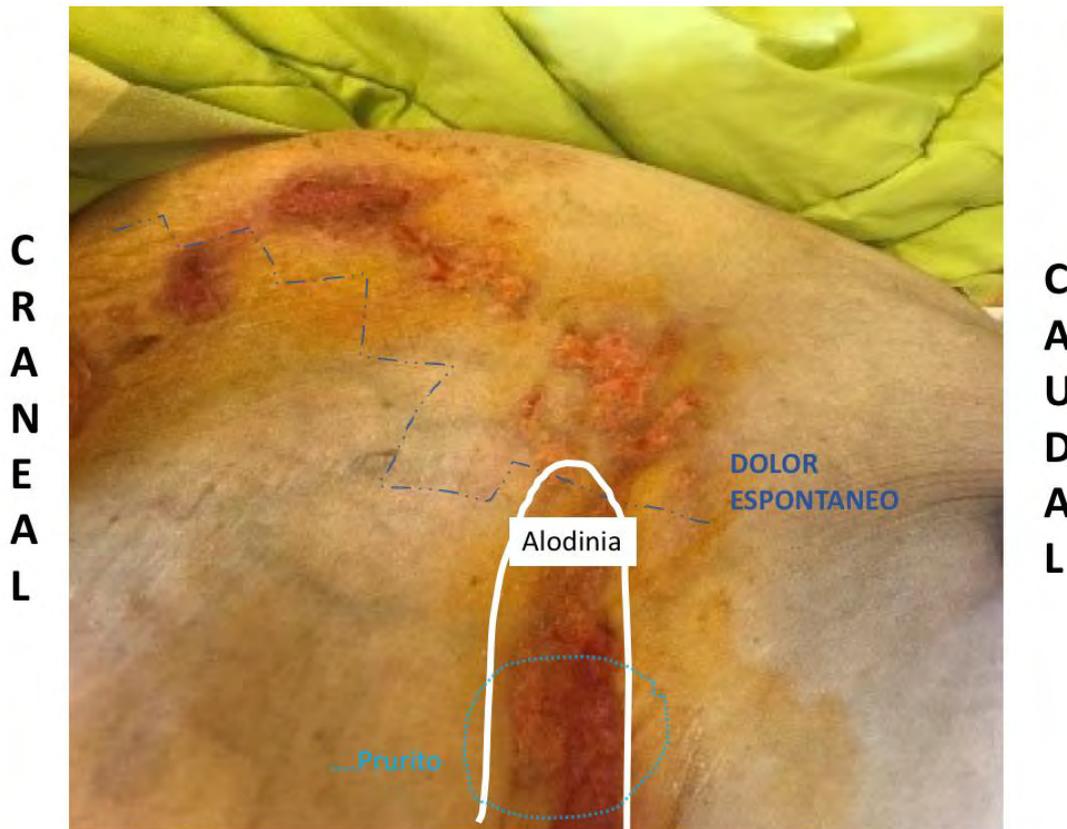
Pregunta	SI	NO
La historia del paciente sugiere una lesión o enfermedad nerviosa relevante?	X	
Resulta coherente la distribución del dolor desde el punto de vista neuroanatómico?	X	

Muestra el examen neurológico algún signo sensorial positivo o negativo en la zona del posible nervio afectado?	X	
La zona dolorosa está delimitada y es menor que una hoja tamaño A4	X	
Diagnóstico Confirmado	Respuestas Afirmativas: 3 → al menos Dolor Neuropático Probable 4 → al menos Dolor Neuropático Localizado	

Tabla 1: Herramienta Diagnóstica del DNL con la información del paciente.

Fuente: Mick G, Baron R, Correa-Illanes G, Hans G, Mayoral V, Frías X, et al. Is an easy and reliable diagnosis of localized neuropathic pain (LNP) possible in general practice? Development of a screening tool based on IASP criteria. *Curr Med Res Opin.* 2014;30(7):1357-66. (3).

Posteriormente se le prescribe 1 parche de lidocaína al 5% de 19h00 a 7h00 diariamente a nivel de la región axilar y otro a nivel de región inguinal izquierda por 3 meses. Lo cual resulta en alivio del dolor, que pasa de EN 8/10 a 5/10 en el día y de EN 9-10/10 a 7/10 en la noche. En vista de la persistencia del dolor severo nocturno que causa insomnio y sensación de angustia, a los 7 días se decidió aumentar pregabalina a dosis de 25 mg hora sueño, mejorando el dolor a EN 4/10. Al mes del uso de la pregabalina la paciente reporta somnolencia diurna y control total del dolor. Por tanto, se retiró la pregabalina y se mantuvo el parche de lidocaína. Al disminuir el área de alodinia e hiperalgesia se disminuyó a un parche diario a nivel de la región inguinal, completando el tratamiento, con excelente adherencia al mismo y muy buena respuesta clínica, alodinia y prurito leve de presentación ocasional, sin hiperalgesia (Figura 2). Además, refería sueño reparador, y sensación de bienestar por incorporarse a sus actividades de vida diaria. Al momento la paciente no ha reportado nuevos episodios de dolor por NPH.



Alodinia: zona demarcada con líneas blancas continuas

Dolor espontáneo: líneas intermitentes azules muy finas

Prurito: zona azul claro punteada

Intensidad leve: 1-3/10

Figura 2: Área de dolor postratamiento: intensidad leve y disminución del área de alodinia.

DISCUSION

El DNL es una forma de dolor crónico que impacta de forma negativa la calidad de vida del paciente porque causa una disminución progresiva de sus actividades diarias. Adicionalmente, se lo ha asociado a trastornos del sueño, depresión y ansiedad, tal como lo reportado por la paciente presentada⁸. El dolor representa casi el 50% de los motivos de consulta en atención primaria de salud y cerca del 20% han experimentado dolor por más de 6 meses. Se recomienda que los médicos de Atención Primaria en Salud estén capacitados para identificar los pacientes con DN e iniciar de forma precoz el tratamiento farmacológico y no farmacológico. Además, estos profesionales deben seguir los criterios para derivar aquellos pacientes que ameriten manejo por un especialista en dolor^{8,9}. Es importante enfatizar que el diagnóstico y tratamiento precoz son indispensables para disminuir los procesos de sensibilización central, es decir la amplificación de las señales dolorosas dentro del Sistema Nervioso Central que produce hipersensibilidad generalizada al dolor tanto a estímulos nocivos como inocuos¹⁰.

El diagnóstico del DNL puede ser difícil, debe sospecharse en cualquier paciente que haya sufrido una enfermedad con posible lesión del sistema somatosensorial y que presente alguno de los signos o síntomas del DN, en un área circunscrita del tamaño menor de una hoja tamaño A4 (3). El Grupo de Interés Especial en el Dolor

Neuropático de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor propuso un flujograma para el manejo del DN ^{11, 12}, basado en la historia clínica del paciente, la cual relaciona una lesión o enfermedad nerviosa significativa, con la localización del dolor desde el punto de vista neuroanatómico (Figura 3). Esto permite realizar la hipótesis de trabajo de posible DN. Luego las pruebas confirmatorias con algún signo sensorial positivo o negativo obtenido a través del examen neurológico en el territorio inervado por la estructura nerviosa dañada y extensión de la zona dolorosa indicarían un DN probable. Posteriormente éste se confirmaría con pruebas diagnósticas que determinen la lesión o la enfermedad causante de la etiología del DN. Se lo consideraría DNL si además la extensión de la zona dolorosa es consistente y circunscrita de máximo dolor en una zona de la extensión ya mencionada previamente ^{3,13}.

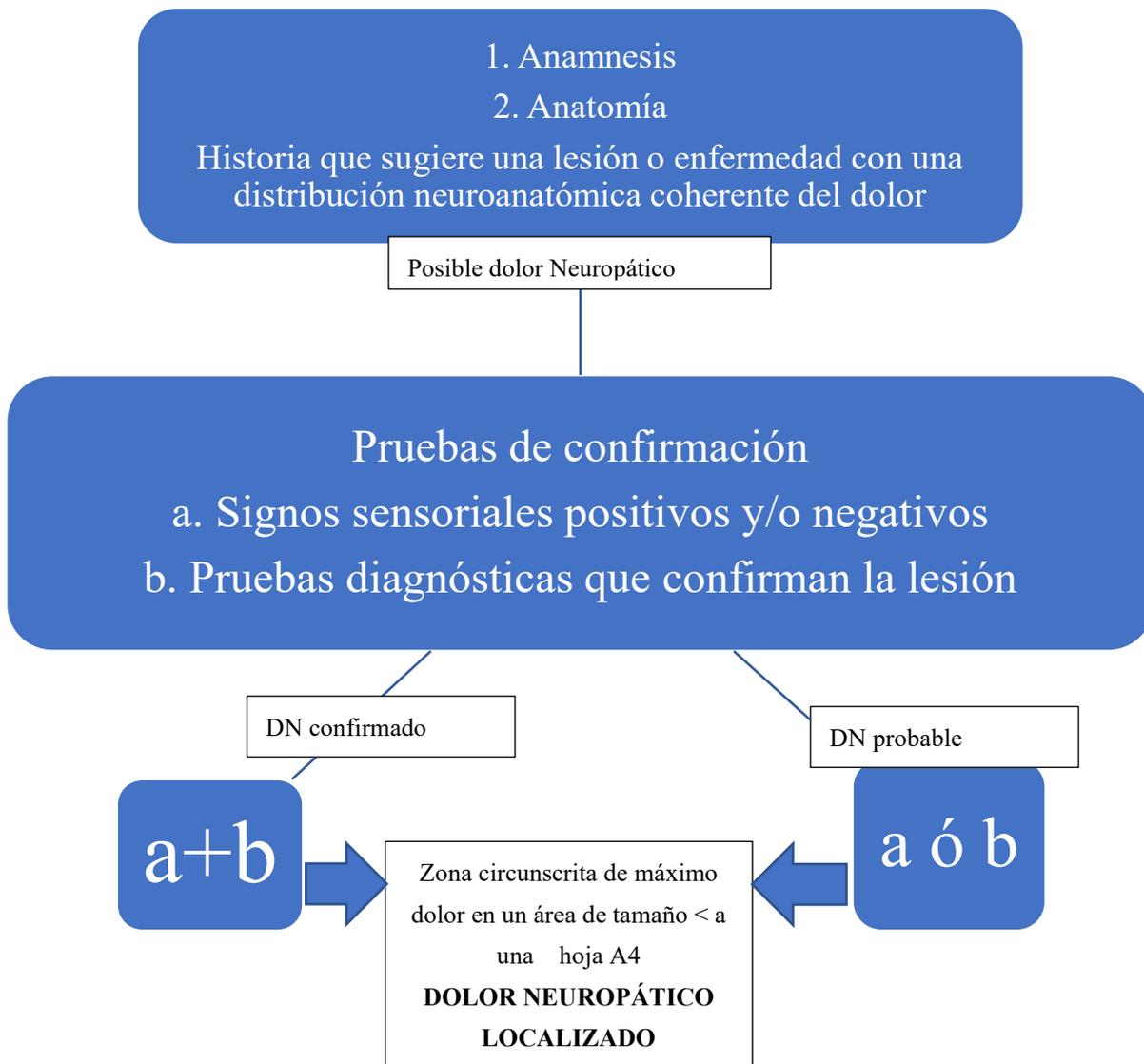


Figura 3. Flujograma de diagnóstico de Dolor Neuropático Localizado

Fuente: Adaptado de Treede et al. *Neurology* 2008 (7) y Mayoral et al. (2018)

Mick y colaboradores, construyeron una herramienta de detección rápida y de fácil implementación. Esta resulta muy útil en el ámbito de atención primaria en salud para el diagnóstico del DNL contribuyendo así al tratamiento oportuno de esta afección³.

El manejo terapéutico de los adultos mayores con dolor es complejo y se ve afectado por los cambios farmacocinéticos y farmacodinámicos relacionados con el proceso del envejecimiento, la polifarmacia y la multimorbilidad^{14,15}. Además, es necesario la educación del paciente, familiares y cuidadores, resaltando la importancia del componente espiritual y el acompañamiento en estos pacientes para lograr una mejor adherencia¹⁶ y resultados exitosos.

El tratamiento del HZ debe iniciarse dentro de las 72 horas posteriores al inicio del exantema, los antivirales como el aciclovir se recomienda en una dosis de 800 mg, 5 veces al día durante 7 a 10 días, con la finalidad de disminuir la duración de la diseminación viral, la formación de nuevas lesiones y la gravedad y duración del dolor¹⁷. Los parches de lidocaína son una de las mejores opciones de tratamiento para el control del dolor de la NPH por su excelente tolerabilidad, absorción sistémica mínima y fácil uso¹⁸. Estos deben aplicarse en la zona de alodinia e hiperalgesia por un intervalo de 12 horas diarias, se recomienda hasta 3 parches diarios por un espacio de tiempo de al menos 30 días¹⁷. Los parches actúan localmente ofreciendo grandes ventajas como disminución de efectos adversos sistémicos, interacciones farmacológicas, efectos en el sistema nervioso y sobredosis. Por consiguiente, mejoran la adherencia al tratamiento por la eficacia, tolerabilidad y seguridad¹⁸. Pueden ser utilizados como monoterapia o dentro de un esquema multimodal.

Se han recomendado los anticonvulsivantes para el manejo del DN. Sin embargo, sólo los ligando alfa 2 delta, pregabalina y gabapentina se recomiendan como primera línea de tratamiento¹⁹. Los fármacos antiepilépticos y los antidepresivos tricíclicos han demostrado su eficacia en varios tipos de DN, pero la tolerabilidad y los efectos adversos limitan su uso en la población anciana. Dentro de sus efectos secundarios se describen somnolencia, mareo, edema, visión borrosa y edema (9). Por tanto, en este grupo de pacientes se debe iniciar con la dosis más baja y mantener por el tiempo más corto posible. La carbamazepina solo está indicada en neuralgia del trigémino²⁰.

La adherencia a las pautas de medicación prescritas resulta difícil en la mayoría de los pacientes, y es especialmente problemática en los ancianos. Las alteraciones cognitivas pueden tener un impacto significativo en la capacidad de una persona para administrar los medicamentos de manera segura, aumentando el riesgo de incumplimiento involuntario y errores de medicación. La comorbilidad (muy común en este grupo poblacional), la polifarmacia y efectos colaterales propios de cada medicación puede predisponerlos a la falta de adherencia con un mal control de la enfermedad^{16,21}.

Se recomienda como primera línea de tratamiento para el DNL el uso de analgésicos por vía tópica porque son eficaces como monoterapia o terapia combinada con menor riesgo de interacciones y efectos secundarios²². (Figura 4)

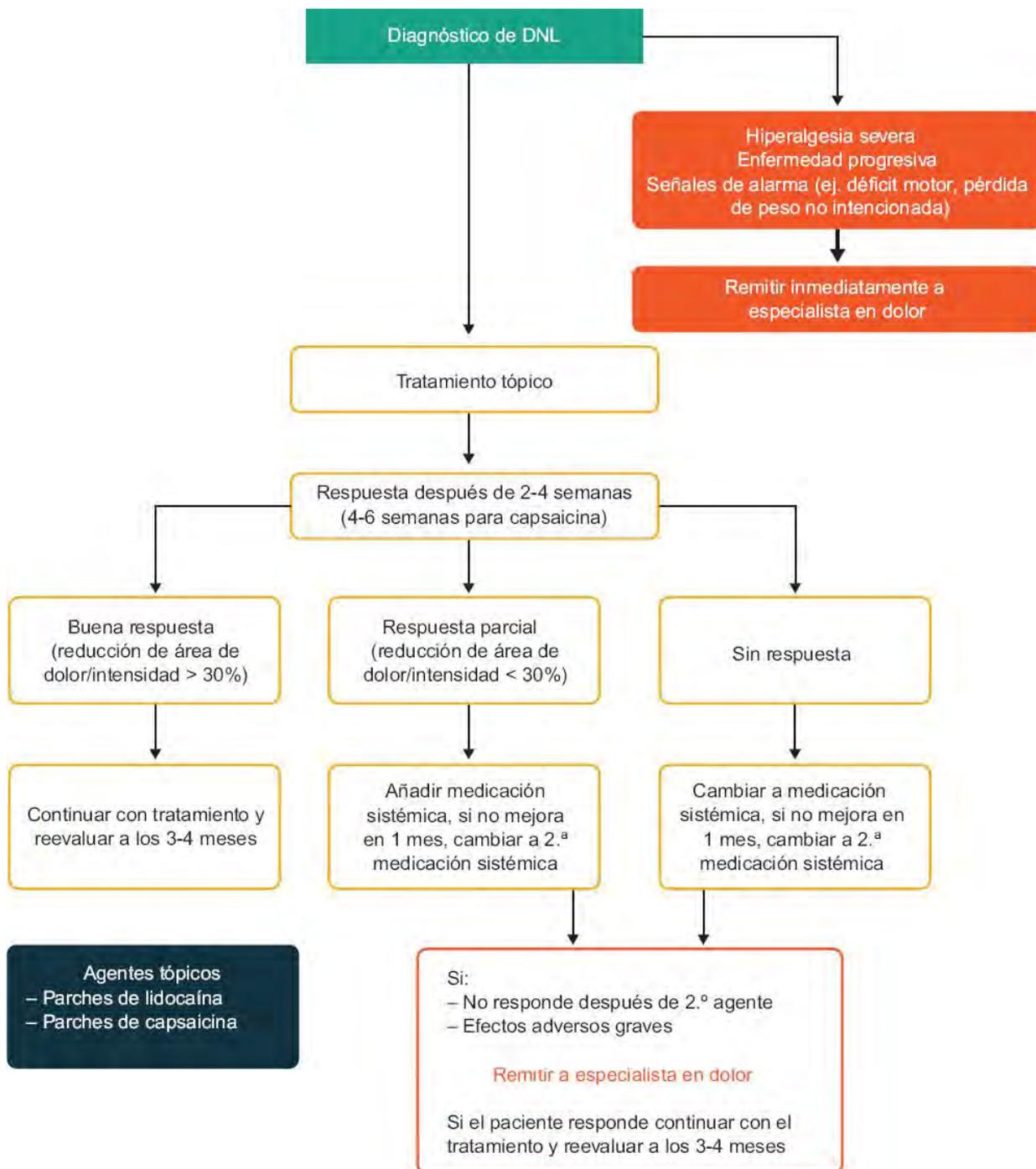


Figura 4. Algoritmo de tratamiento del Dolor Neuropático Localizado

Fuente: Traducido del original : Allegri M., Baron R., Hans G., Correa-Illanes G., Mayoral Rojals V., Mick G., Serpell M.

A pharmacological treatment algorithm for localized neuropathic pain. *Curr Med Res Opin*, 32 (2016), pp. 377-384. DOI:

10.1185/03007995.2015.1129321(22)

Por medio de una detección oportuna del DNL se podrá ofrecer el mejor tratamiento al paciente, contribuyendo a mejorar la calidad de vida.

Es menester indicar que una de las principales limitaciones del presente reporte radica en que el paciente recibió atención médica en diferentes centros de salud, lo que dificultó la recolección de los registros hospitalarios y exámenes de laboratorio realizados.

Dentro de las fortalezas del presente reporte está la documentación de la respuesta y mejoría del paciente al recibir el esquema terapéutico planteado. Ya que la paciente fue evaluada cada 15 días los primeros 2 meses y luego una vez al mes. La valoración se realizaba a través de una escala verbal numérica de 0 (ausencia del síntoma) a 10 (peor síntoma imaginable). Las variables analizadas fueron intensidad de alodinia, hiperalgesia, prurito, dolor espontáneo o paroxístico, dificultad para dormir, ansiedad y sensación de bienestar. Por tanto, resulta evidente la relevancia de la detección oportuna del DNL para ofrecer el mejor tratamiento al paciente, contribuyendo así a mejorar la calidad de vida y a una positiva adherencia terapéutica.

CONCLUSIONES

El DNL es una entidad que todavía impone un desafío diagnóstico para algunos profesionales del sector de atención primaria. El presente reporte recalca la importancia de un diagnóstico precoz para poder dar un tratamiento adecuado con el objetivo de obtener resultados satisfactorios en este grupo de pacientes de riesgo. Dentro del esquema terapéutico para el manejo del DNL por una NPH se incluye los parches de lidocaína al 5% como monoterapia o terapia combinada con otros fármacos como los gabapentinoides entre otros, a dosis bajas.

Declaración de Autoría: Los autores contribuyeron en igual proporción en la elaboración del manuscrito. Ambos autores revisaron el manuscrito, acuerdan ser plenamente responsables de garantizar la integridad y precisión del trabajo, y leyeron y aprobaron el manuscrito final.

Financiamiento: El presente estudio no tuvo financiación.

Declaración de Consentimiento Informado: El paciente proporcionó el consentimiento informado para la publicación del presente caso incluyendo las imágenes insertadas en el mismo.

Conflicto de intereses: El autor /los autores declaran /n no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

1. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17002.
2. Pickering G, Martin E, Tiberghien F, Delorme C, Mick G. Localized neuropathic pain: an expert consensus on local treatments. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:2709-18.
3. Mick G, Baron R, Correa-Illanes G, Hans G, Mayoral V, Frías X, et al. Is an easy and reliable diagnosis of localized neuropathic pain (LNP) possible in general practice? Development of a screening tool based on IASP criteria. *Curr Med Res Opin*. 2014;30(7):1357-66.

4. Lara-Solares A, Mayoral-Rojals V, Guillén-Núñez MDR, Villafaña-Tello JJS, Cantú-Brito C, Genis-Rondero M, et al. Consenso multidisciplinario de diagnóstico y tratamiento del dolor neuropático periférico y localizado en México. *Gac Med Mex.* **2019**;155(4):428-35.
5. Koshy E, Mengting L, Kumar H, Jianbo W. Epidemiology, treatment and prevention of herpes zoster: A comprehensive review. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* **2018**;84(3):251-62.
6. Mallick-Searle T, Snodgrass B, Brant JM. Postherpetic neuralgia: epidemiology, pathophysiology, and pain management pharmacology. *J Multidiscip Healthc.* **2016**;9:447-54.
7. Saguil A, Kane S, Mercado M, Lauters R. Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia: Prevention and Management. *Am Fam Physician.* **2017**;96(10):656-63.
8. Correa-Illanes G. Dolor neuropático, clasificación y estrategias de manejo para médicos generales. *Rev Méd Clín Condes.* **2014**;25(2):189-99.
9. McCarberg B, D'Arcy Y, Parsons B, Sadosky A, Thorpe A, Behar R. Neuropathic pain: a narrative review of etiology, assessment, diagnosis, and treatment for primary care providers. *Curr Med Res Opin.* **2017** Aug;33(8):1361-1369. doi: 10.1080/03007995.2017.1321532. Epub 2017 5 June. PMID: 28422517.
10. Vazquez X, Navarro-Siguero A. Identificación de la Sensibilización Central, **2018** Ed.SANED, Madrid. ISBN: 978-84-17572-17-4
11. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology.* **2008** Apr 29;70(18):1630-5. doi: 10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59. Epub 2007 14 November. PMID: 18003941.
12. Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice ASC, Treede RD. A new definition of neuropathic pain. *Pain.* **2011** Oct;152(10):2204-2205. doi: 10.1016/j.pain.2011.06.017. Epub 2011 18 July. PMID: 21764514.
13. Mayoral V, Pérez-Hernández C, Muro I, Leal A, Villoria J, Esquivias A. Diagnostic accuracy of an identification tool for localized neuropathic pain based on the IASP criteria. *Curr Med Res Opin.* **2018** Aug;34(8):1465-1473. Doi:10.1080/03007995.2018.1465905. Epub 2018 27 April. PMID: 29661030
14. Paladini A, Fusco M, Coaccioli S, Skaper SD, Varrassi G. Chronic Pain in the Elderly: The Case for New Therapeutic Strategies. *Pain Physician.* **2015** Sep-Oct;18(5):E863-76. PMID: 26431140.
15. Schneider J, Algharably EAE, Budnick A, Wenzel A, Dräger D, Kreutz R. High Prevalence of Multimorbidity and Polypharmacy in Elderly Patients With Chronic Pain Receiving Home Care are Associated With Multiple Medication-Related Problems. *Front Pharmacol.* **2021** Jun 8;12:686990. doi: 10.3389/fphar.2021.686990. PMID: 34168565; PMCID: PMC8217758.
16. Smith D, Lovell J, Weller C, Kennedy B, Winbolt M, Young C, Ibrahim J. A systematic review of medication non-adherence in persons with dementia or cognitive impairment. *PLoS One.* **2017** Feb 6;12(2):e0170651. doi: 10.1371/journal.pone.0170651. PMID: 28166234; PMCID: PMC5293218.
17. John AR, Canaday DH. Herpes Zoster in the Older Adult. *Infect Dis Clin North Am.* **2017** Dec;31(4):811-826. doi: 10.1016/j.idc.2017.07.016. PMID: 29079160; PMCID: PMC5724974.
18. Baron R, Allegri M, Correa-Illanes G, Hans G, Serpell M, Mick G, Mayoral V. The 5% Lidocaine-Medicated Plaster: Its Inclusion in International Treatment Guidelines for Treating Localized Neuropathic Pain, and Clinical Evidence Supporting its Use. *Pain Ther.* **2016** Dec;5(2):149-169. doi: 10.1007/s40122-016-0060-3. Epub 2016 7 November. PMID: 27822619; PMCID: PMC5130910.

19. Moisset X, Bouhassira D, Avez Couturier J, Alchaar H, Conradi S, Delmotte MH, et al. Pharmacological and non-pharmacological treatments for neuropathic pain: Systematic review and French recommendations. *Rev Neurol(Paris)*. **2020** May; *176*(5):325-352. doi:10.1016/j.neurol.2020.01.361. Epub 2020 Apr 7. PMID:32276788
20. Feller L, Khammissa RAG, Fourie J, Bouckaert M, Lemmer J. Postherpetic Neuralgia and Trigeminal Neuralgia. *Pain Res Treat*. **2017**; *2017*:1681765. doi: 10.1155/2017/1681765. Epub 2017 5 December. PMID: 29359044; PMCID: PMC5735631.
21. Elliott RA, Goeman D, Beanland C, Koch S. Ability of older people with dementia or cognitive impairment to manage medicine regimens: a narrative review. *Curr Clin Pharmacol*. **2015**; *10*(3):213-21. doi: 10.2174/1574884710666150812141525. PMID: 26265487; PMCID: PMC5396255.
22. Allegri M., Baron R., Hans G., Correa-Illanes G., Mayoral Rojas V., Mick G., Serpell M. A pharmacological treatment algorithm for localized neuropathic pain. *Curr Med Res Opin*. **2016**; *32*: 377-384. DOI: 10.1185/03007995.2015.1129321

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Bonilla-Sierra Patricia , Sánchez Mohamed. Dolor neuropático localizado: A propósito de un caso de neuralgia posherpética. *Revis Bionatura* 2023; *8* (4) 17. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.17>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Assessment of the microbiological quality and heavy metal risk in vegetable species marketed in outdoor fairs

Elena Coyago-Cruz ^{1*}, Gabriela Méndez ² and Daniel Acurio ²

¹ Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, Sede Quito, Campus El Girón, Grupo de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas a los Recursos Biológicos, Av. 12 de octubre N2422 y Wilson, Quito, 170109, Ecuador; ecoyagoc@ups.edu.ec . ORCID 0000-1111-2222-3333

² Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada a los Recursos Naturales, Av. 12 de octubre N2422 y Wilson, Quito, 170109, Ecuador; racurio@ups.edu.ec . ORCID ⁰⁰⁰⁰⁻⁰⁰⁰²⁻²³⁰⁵⁻⁴³⁴⁹, gmendez@ups.edu.ec. ORCID 0000-0001-5903-6735

* Correspondence: ecoyagoc@ups.edu.ec; Tel.:+593(995129321) (Quito, Ecuador)

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.18>

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the possible health risks associated with the content of heavy metals and microorganisms in the consumption of watercress, lettuce, lemon balm and taraxaco. The products were purchased in several markets in the city of Quito. In this study, the products marketed in the north and center of the town showed better size characteristics, while the soluble solids, pH and ash showed no definite behavior. In addition, due to the volcanic origin of the Ecuadorian soils in which the samples under study were grown, it could influence the lead content that varied between 0.02 ppm (taraxacum, lemon balm and lettuce) up to 2.60 ppm (watercress). This value exceeded the maximum limit allowed by the CODEX, becoming a health risk. In addition, the microbial quality of the different species under study showed high contamination with mesophilic aerobic microorganisms and parasites. These results provide valuable information that could finance food safety decisions by the government to protect health and improve the quality of life of the people of Quito.

Keywords: food safety, mesophilic aerobic, parasites, lead, Cadmium

INTRODUCTION

Vegetables are critical dietary components because they provide essential nutrients, such as vitamins, minerals and fibers, and many health benefits. Food safety has been affected since most vegetables absorb contaminants in the soil and accumulate in different foliar tissues or cell walls ¹. The risk of microbiological contamination on leafy greens is concerning.

In the United States (US) in 2009, leafy greens were identified at the top of the 10 riskiest foods regulated by the Food and Drug Administration (FDA) ², with 22% of foodborne illnesses associated with leafy greens consumption ³, and involved with significant economic losses.

Fresh vegetables and fruits can be contaminated with pathogenic bacteria and heavy metals. During pre-harvest, contact with contaminated irrigation water, soil, fecal matter of wild animals, and communication with asymptomatic human carriers can contaminate the products. At the postharvest level, the products are contaminated by contact with contaminated water, other asymptomatic human carriers, or the production process and distribution environment ⁴.

To explain how microorganisms of concern are transmitted across the food chain, we studied risk factors contributing to microbial contamination of vegetables eaten raw in markets. Edible and medicinal plant species can be obtained at fairs or wholesale markets, selling products shown not to have microbiological and bromatological controls. In general, in products that are consumed fresh, it has been found that there is the possibility of more significant contamination of microorganisms that could cause certain diseases in humans ⁵.

The food pattern in Ecuador is linked to individual economic access, religion, and ancestral and current culture. ⁶, means of surveys indicate that a person in Ecuador consumes around 183 g/day between fruits and vegetables. Nevertheless, the population in these last years has been linked to their nutritional pattern in health care; this is why, according to the FAO, in 2016, there were 28307 tons of vegetables, a figure that has been increasing since several years ago, indicating that the consumption of vegetables has spread and therefore the market offering.

Watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) is one of the most consumed vegetables in Ecuador. It has been used since ancient times as traditional medicine to calm respiratory problems and skin diseases. According to ⁷, a watercress is a plant belonging to the cruciferous family that can grow spontaneously near almost all water courses; it will always require an acceptable flood level in fresh water. The watercress contains sodium, potassium, calcium, iron, sulfur, fiber, pro-vitamin A and vitamin C ⁸. On the other hand, it has been determined that the leaves and stems of the watercress may contain small slugs that, in turn, host parasites such as *Fasciola hepatica*.

The lettuce (*Lactuca sativa* L.) is another more frequently consumed vegetable. This provides a high content of carotenoids, vitamin C, minerals, fiber, and water. It also provides an alkaline reaction to the human body, accompanied by a high cellulose content and good-quality proteins ⁹. The most common diseases in cabbage lettuce are derived from inadequate handling in the postharvest and poor control of the optimum temperature in all the production processes. According to ¹⁰, among the microorganisms that may be present are bacteria (*Coliforms*, *Pseudomonas spp.* and *Erwinia*, *Escherichia coli*), parasites (*Entamoeba histolytica*, *Giardia spp.*), viruses (Norwalk, hepatitis A) and fungi (*Botrytis*, *Fusarium*) that form products that cause diseases in the human being.

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and taraxaco (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg.) grow exposed to highly interacting microorganisms that are in symbiosis or cause physiological alterations. The genera that are most interacting with these species are *Agrobacterium spp.*, *Clavibacter spp.*, *Erwinia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Streptomyces spp.*, *Xylella spp.*, and those that infect them through cross-contamination are: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and the family *Enterobacteriaceae*. Lemon balm and taraxaco are cultivated in the Ecuadorian inter-Andean region, which has the presence of heavy metals of a geographical nature. In addition, the recurrent agricultural activity increases the presence of metals due to using fertilizers, pesticides, manure, slurry and sewage sludge ¹¹.

All the plant species already mentioned are part of a food and medicinal culture available to everyone. For this reason, the objective of this study was to evaluate the possible health risks associated with the content of heavy metals and microorganisms in the consumption of watercress, lettuce, lemon balm and taraxaco in the markets of the Metropolitan District of Quito to raise awareness of the quality and safety of these products that form a basis in Ecuadorian food.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Standards

Reagents of analytical grade as nitric acid (PumChem CID: 944), sulfuric acid (PumChem CID: 1118), sodium hydroxide (PumChem CID: 14798) and sodium chloride were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Cadmium, lead standards, cadmium standard and violet crystal were purchased from Merck (Labomera S. A., Ecuador). Peptone was obtained from BD. (Biosciences, United States).

Plant Materials

The watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and taraxaco (*Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F.H. Wigg) were purchased from an average of thirty markets of the zonal distributions of the Metropolitan District of Quito (Figure 1). The leaves were considered a sample unit, and a whole head of lettuce was regarded as one sample. Approximately 1 Kg of each species was purchased randomly from four retail sites within each market. The amount of samples was selected as described by the INEN-1750¹². After sampling, all samples were placed in sterile zipped bags and immediately stored in cooling boxes with ice packs. The refrigerated samples were taken to the Life Sciences laboratories of the Salesiana Polytechnic University (Girón-Quito). The transit time was 1 to 3 hours. The market samples were analyzed within 24 hours or immediately upon reaching the laboratory.

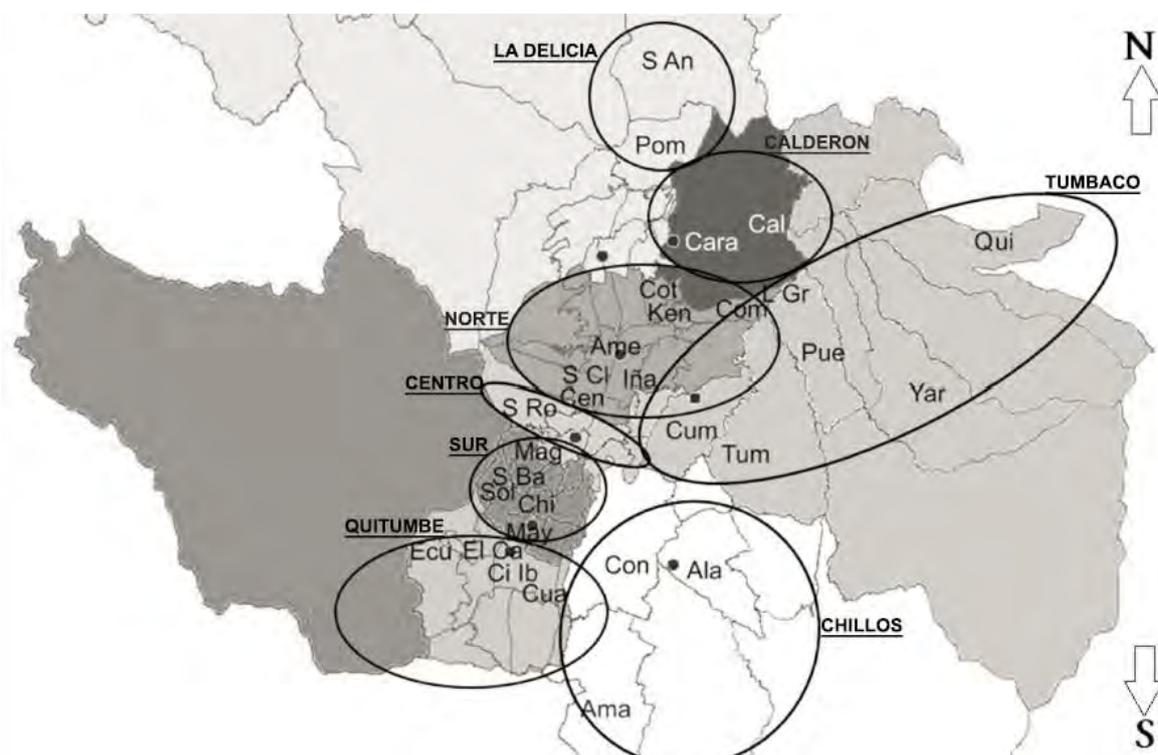


Figure 1. Location of markets in the Metropolitan District of Quito-Ecuador, S An, San Antonio; Pom, Pomasqui; Cal, Calderón; Cara, Carapungo; Cot, Cotocollao; Ken, La Kennedy; Ame, La América; S Cl, Santa Clara; Iña, Iñaquito; Cen, Centro; Qui, Quinche; L Gr, Llano Grande; Com, Comité del Pueblo; Pue, Puembo; Yar, Yaruquí; Cum, Cumbayá; Tum, Tumbaco; S Ro, San Roque; Mag, La Magdalena; S Ba, San Bartolo; Sol, Solanda; Chi, Chiriacu; May, Mayorista; Ecu, La Ecuatoriana; El Ca, El Canal; Ci Ib, Ciudadela Ibarra; Gua, Guamaní; Con, Conocoto; Ala, Alangasí; Ama, Amaguaña.

Measurements Performed on Foods

The bromatological analyses performed on the fresh watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and taraxacum (*Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F.H. Wigg) were size (equatorial and longitudinal diameter in cm, weight in g, humidity in %, ash in %, soluble solids in °Brix, titrable acidity in % and pH. The soluble solids were quantified as described by INEN-ISO-2172¹³, with a Hand-Refractometer RHC-200ATC (Huake, China), while a S40 SevenMulti pHmeter (Mettler Toledo, Belgium) was used to measure out the pH. Titrable acidity and relative density were determined as described by INEN-ISO-750¹⁴ and INEN-391¹⁵. A humidifier HB4 3-S Halogen (Mettler Toledo, Belgium) was used to measure the humidity and dry material, while the ash was measured as described by¹⁶.

Heavy Metal Analysis

Sample preparation

The samples were dried at 70 °C for 24 hours in a KBF 240 air recirculation oven (Binder, Germany). The dried samples were ground in a primary IKA 11 mill, stored in a glass bottle and hermetically sealed. The sample was treated as described by AOAC-999.10¹⁷, with modifications. Approximately 250 mg of the pulverized sample was mixed in a Teflon digester with 1.5 mL of concentrated nitric acid and 1.5 mL of sulfuric acid. The mixture was digested in a Speedwave HB43-S Digestion (Berghof, Germany) for 40 min according to the specifications of the equipment manual. The digested mixture was graduated in 25 mL with deionized water.

Atomic absorption

The calibration curve was built on the same day with concentrations of lead and cadmium standards separately from 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 ppm. Quantification was performed on a SpectrAA-55 Atomic Absorption Spectrophotometer (Varian-Agilent Technologies, United States), as described by AOAC-999.10¹⁷. The lead was quantified at 217.0 nm and the Cadmium at 228.8 nm. All the digested mixture was read three times, and the concentration was expressed in mg/kg dry weight (DW).

Microbiological and Parasitological Analysis

The most widely accepted and used techniques are those recommended by WHO for a total count of microorganisms in plant materials. According to the methodology of the WHO, 10 g of fresh sample was suspended in 90 mL of sodium chloride-peptone buffer at a pH of 7.0. A fresh sample was plated in duplicate to count total aerobic bacteria and incubated at 30-35 °C for 48 h¹⁸.

For the parasitological analysis, dilutions 10⁻¹ were made with the plant extract and sterile water, centrifuged at 3000 rpm for 5 min, and the pellet formed was removed and placed in an Eppendorf tube. After this, a slide with 0.2 µL of sample and 0.2 µL of violet crystal was placed in an optical microscope, and the presence of parasites or cysts was observed.

Statistical analysis

Statistical differences were determined by analysis of variance (simple ANOVA). The mean separation was made via a Tukey's test with 0.01 significant differences, and correlations by Pearson with a 99 % confidence level were employed to estimate the possible significance of the samples. Moreover, Principal Components Analysis (PCA) was applied to select the variables most influencing the differences between samples. The INFOSTAT 2009 software was used for statistical analyses.

RESULTS

In Tables 1 to 4 found Physicochemical properties, microbiological results, and heavy metal

Market	Pb (ppm)	Cd (ppm)	Mesophiles (UFC/g)	Parasites	pH	SS (°Brix)	Weight (g)	LD (cm)	E.D. (cm)	Dry matter (%)	Ash (%)
Alangasí	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	1.6E+07	Positive	6.22 ± 0.01	2.20 ± 0.00	1.63 ± 0.50	20.67 ± 2.08	3.83 ± 1.04	7.73 ± 0.51	2.07 ± 0.23
Amaguaña	0.23 ± 0.1	0.01 ± 0.0	3.3E+07	Positive	6.39 ± 0.06	2.20 ± 0.00	1.27 ± 0.29	25.00 ± 1.95	5.50 ± 0.85	12.63 ± 1.21	2.10 ± 0.00
América	0.23 ± 0.1	0.01 ± 0.0	3.1E+07	Positive	6.39 ± 0.02	2.20 ± 0.00	1.27 ± 0.42	23.87 ± 1.96	4.17 ± 1.61	12.17 ± 0.52	2.50 ± 0.17
Calderón	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	3.0E+07	Positive	6.47 ± 0.04	2.20 ± 0.00	1.63 ± 1.21	28.50 ± 1.35	5.50 ± 1.50	12.10 ± 0.10	2.10 ± 0.26
Carapungo	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	3.1E+07	Positive	6.37 ± 0.08	2.20 ± 0.00	1.67 ± 0.25	27.83 ± 2.08	5.83 ± 0.29	13.07 ± 0.76	2.30 ± 0.00
Carcelén	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.1E+07	Positive	6.34 ± 0.06	2.20 ± 0.00	1.20 ± 0.20	27.17 ± 1.89	5.03 ± 0.38	12.03 ± 0.71	2.20 ± 0.00
Central	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	3.3E+07	Negative	6.37 ± 0.03	2.20 ± 0.00	1.33 ± 0.61	28.47 ± 4.32	4.17 ± 1.61	10.93 ± 1.36	2.00 ± 1.04
Chiriyacu	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	1.5E+07	Positive	6.60 ± 0.02	2.20 ± 0.00	2.63 ± 0.55	28.60 ± 4.13	6.10 ± 2.97	11.73 ± 1.62	2.13 ± 0.12
Ciudadela Ibarra	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	1.6E+07	Positive	6.26 ± 0.04	2.20 ± 0.00	1.70 ± 0.46	19.17 ± 2.84	3.23 ± 0.59	13.33 ± 1.55	2.20 ± 0.10
Comité del Pueblo	0.23 ± 0.1	0.01 ± 0.0	1.4E+07	Positive	6.31 ± 0.02	2.20 ± 0.00	2.07 ± 1.08	30.63 ± 8.17	5.87 ± 1.18	15.70 ± 0.17	2.23 ± 0.06
Conocoto	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.0E+07	Negative	6.21 ± 0.02	2.20 ± 0.00	1.37 ± 0.38	21.17 ± 2.47	2.63 ± 0.78	12.67 ± 1.33	2.27 ± 0.06
Cotocollao	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	1.6E+07	Positive	6.33 ± 0.04	2.00 ± 0.00	1.87 ± 0.91	28.17 ± 6.53	4.50 ± 1.50	14.20 ± 2.94	2.17 ± 0.15
Cumbayá	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	3.3E+07	Positive	6.46 ± 0.05	2.20 ± 0.00	1.20 ± 0.10	26.53 ± 1.29	2.03 ± 0.06	18.27 ± 0.21	2.50 ± 0.46
El Calzado	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.7E+07	Positive	6.32 ± 0.04	2.20 ± 0.00	2.30 ± 0.70	34.17 ± 2.75	5.33 ± 1.15	10.77 ± 1.24	2.03 ± 0.06
Íñaquito	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.2E+07	Positive	6.42 ± 0.02	2.20 ± 0.00	2.63 ± 0.55	31.83 ± 2.25	5.30 ± 1.21	12.27 ± 0.65	2.23 ± 0.06
La Ecuatoriana	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	3.2E+07	Positive	6.70 ± 0.09	2.20 ± 0.00	2.20 ± 1.21	25.40 ± 3.86	6.17 ± 2.57	13.07 ± 1.59	2.53 ± 0.15
La Kennedy	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.0E+07	Negative	6.36 ± 0.01	2.20 ± 0.00	2.23 ± 0.61	29.93 ± 2.72	5.60 ± 0.66	12.40 ± 0.00	2.33 ± 0.25
La Magdalena	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.1E+07	Positive	6.57 ± 0.17	2.20 ± 0.00	1.40 ± 0.36	22.00 ± 3.97	4.00 ± 1.11	12.23 ± 0.12	2.27 ± 0.31
Las Cuadras	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.1E+07	Negative	6.39 ± 0.17	2.20 ± 0.00	1.87 ± 0.12	17.63 ± 2.26	4.17 ± 1.04	10.73 ± 1.19	2.40 ± 0.10
Llano Grande	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.1E+07	Negative	6.32 ± 0.03	2.20 ± 0.00	1.70 ± 0.30	27.67 ± 2.75	6.33 ± 0.58	16.53 ± 0.64	2.37 ± 0.21
Mayorista	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	1.1E+07	Positive	6.40 ± 0.07	2.20 ± 0.00	2.43 ± 1.46	30.33 ± 6.43	4.67 ± 2.08	15.10 ± 0.20	2.20 ± 0.10
Nayón	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	1.6E+07	Positive	6.33 ± 0.01	2.20 ± 0.00	1.97 ± 0.93	26.83 ± 4.25	4.67 ± 1.26	11.33 ± 0.99	2.20 ± 0.10
Pomasqui	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	1.8E+07	Positive	6.33 ± 0.03	2.20 ± 0.00	1.73 ± 0.31	29.50 ± 1.80	6.50 ± 1.32	13.73 ± 1.33	2.17 ± 0.06
Puembo	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	3.2E+07	Positive	6.40 ± 0.02	2.20 ± 0.00	1.30 ± 0.44	27.57 ± 2.27	2.27 ± 1.12	16.37 ± 2.37	2.20 ± 0.17
San Antonio de Pichincha	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	1.7E+07	Negative	6.42 ± 0.07	2.20 ± 0.00	1.43 ± 0.32	25.07 ± 2.79	4.80 ± 1.22	15.47 ± 0.35	2.43 ± 0.12
San Bartolo	0.30 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.6E+07	Positive	6.68 ± 0.12	2.20 ± 0.00	1.07 ± 0.12	16.83 ± 4.73	2.30 ± 0.89	11.40 ± 0.36	2.53 ± 0.21
San Roque	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	1.8E+07	Positive	6.41 ± 0.06	2.20 ± 0.00	3.07 ± 1.30	38.50 ± 5.41	7.33 ± 2.52	10.07 ± 0.01	2.37 ± 0.12
Santa Clara	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.2E+07	Positive	6.38 ± 0.01	2.20 ± 0.00	1.90 ± 0.53	29.33 ± 2.08	4.67 ± 0.29	12.10 ± 0.36	2.13 ± 0.15
Yolanda	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	3.2E+07	Positive	6.40 ± 0.02	2.20 ± 0.00	1.87 ± 0.32	27.33 ± 4.54	4.33 ± 1.15	9.27 ± 0.35	2.23 ± 0.06
Tumbaco Centro	0.20 ± 0.0	0.01 ± 0.0	2.7E+07	Negative	6.34 ± 0.02	2.20 ± 0.00	1.57 ± 0.65	32.07 ± 4.67	1.63 ± 0.64	15.13 ± 0.40	2.57 ± 0.12
<i>p-value</i>	***	ns	***		***	ns	*	***	***	***	ns
<i>Max. value</i>	0.30	0.01	3.29E+07		6.70	2.20	3.07	38.50	7.33	18.27	2.57
<i>Min. value</i>	0.20	0.01	1.09E+07		6.21	2.00	1.07	16.83	1.63	9.27	2.00
<i>Average</i>	0.21	0.01	2.30E+07		6.40	2.20	1.78	26.93	4.62	12.82	2.27

Table 1. Average value (FW) of parameters related to the commercial quality of taraxacum (*T. officinale*) ^a Mean values ± SD (n=13). Significance of differences is given: ns, not significant; * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. na, not available.

Market	Pb (ppm)	Cd (ppm)	Mesophiles (UFC/g)	Parasites	pH	SS (°Brix)	Weight (g)	LD (cm)	E.D. (cm)	Dry matter (%)	Ash (%)
Alangasí	0.30 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.4E+06	Positive	6.70 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.13 ± 0.00	4.23 ± 1.07	2.87 ± 0.75	14.57 ± 0.51	2.10 ± 0.23
Amaguaña	0.23 ± 0.06	0.01 ± 0.00	2.7E+06	Positive	6.77 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.27 ± 0.02	5.23 ± 1.01	3.83 ± 0.81	14.23 ± 1.21	2.10 ± 0.00
América	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.7E+06	Negative	6.90 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.17 ± 0.04	4.10 ± 1.96	2.90 ± 0.66	19.30 ± 0.52	3.10 ± 0.17
Calderón	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	3.3E+06	Positive	6.87 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.37 ± 0.01	5.90 ± 0.53	2.97 ± 0.90	18.27 ± 0.10	2.13 ± 0.26
Carapungo	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	3.4E+06	Positive	6.90 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.40 ± 0.02	6.40 ± 0.96	3.70 ± 0.26	13.70 ± 0.76	2.17 ± 0.00
Carcelén	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	3.1E+06	Positive	6.83 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.23 ± 0.02	3.97 ± 0.66	2.47 ± 1.08	20.57 ± 0.71	2.13 ± 0.00
Central	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.7E+06	Positive	6.80 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.10 ± 0.00	3.27 ± 4.32	2.30 ± 0.70	14.47 ± 1.36	2.93 ± 1.04
Chiriyacu	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.9E+06	Positive	6.83 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.43 ± 0.05	6.43 ± 1.08	4.13 ± 0.21	11.67 ± 1.62	2.93 ± 0.12
Ciudadela Ibarra	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	3.2E+06	Negative	6.87 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.23 ± 0.06	5.63 ± 0.55	4.00 ± 0.70	14.73 ± 1.55	3.03 ± 0.10
Comité del Pueblo	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.7E+07	Positive	6.70 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.17 ± 0.01	4.73 ± 0.76	3.17 ± 0.45	13.53 ± 0.17	2.13 ± 0.06
Conocoto	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.5E+06	Negative	6.70 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.13 ± 0.03	4.50 ± 1.07	3.10 ± 0.10	15.50 ± 1.33	2.83 ± 0.06
Cotocollao	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	3.1E+06	Positive	6.80 ± 0.00	2.00 ± 0.00	0.20 ± 0.01	4.07 ± 0.38	1.97 ± 0.80	18.30 ± 2.94	2.20 ± 0.15
Cumbayá	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	3.2E+06	Positive	6.90 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	3.90 ± 0.62	2.57 ± 0.12	12.83 ± 0.21	2.43 ± 0.46
El Calzado	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.3E+06	Negative	6.67 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.40 ± 0.00	5.10 ± 0.57	2.13 ± 0.32	13.30 ± 1.24	2.80 ± 0.06
Iñaquito	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.8E+06	Positive	6.93 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.27 ± 0.05	5.33 ± 0.46	4.17 ± 0.29	12.67 ± 0.65	2.20 ± 0.06
La Ecuatoriana	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.7E+06	Positive	6.80 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.47 ± 0.01	6.77 ± 0.65	4.20 ± 0.17	14.70 ± 1.59	3.17 ± 0.15
La Kennedy	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.2E+07	Positive	6.90 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.43 ± 0.01	6.50 ± 0.87	4.67 ± 0.29	11.47 ± 0.00	2.10 ± 0.25
La Magdalena	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.9E+06	Positive	6.70 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.47 ± 0.06	4.73 ± 1.95	2.20 ± 0.26	11.93 ± 0.12	2.87 ± 0.31
Las Cuadras	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.5E+07	Positive	6.90 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.33 ± 0.02	5.63 ± 0.20	3.10 ± 1.10	12.27 ± 1.19	2.93 ± 0.10
Llano Grande	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.8E+06	Positive	6.90 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.40 ± 0.00	6.70 ± 0.87	5.17 ± 0.47	13.47 ± 0.64	2.00 ± 0.21
Mayorista	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	3.0E+06	Positive	6.77 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.37 ± 0.01	4.83 ± 0.86	2.77 ± 0.67	15.50 ± 0.20	3.00 ± 0.10
Nayón	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	3.3E+06	Negative	6.90 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.40 ± 0.03	6.80 ± 0.75	5.13 ± 1.03	16.40 ± 0.99	2.10 ± 0.10
Pomasqui	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.4E+06	Positive	6.87 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.27 ± 0.00	5.23 ± 1.37	2.83 ± 0.01	11.37 ± 1.33	2.10 ± 0.06
Puembo	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.7E+06	Negative	6.87 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.20 ± 0.04	4.30 ± 0.70	2.90 ± 0.60	13.27 ± 2.37	2.60 ± 0.17
San Antonio de											
Pichincha	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.7E+06	Positive	6.80 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.23 ± 0.02	4.27 ± 0.58	1.77 ± 0.49	13.60 ± 0.35	2.17 ± 0.12
San Bartolo	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.5E+06	Positive	6.80 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.57 ± 0.02	7.00 ± 0.35	4.30 ± 0.46	14.33 ± 0.36	2.87 ± 0.21
San Roque	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	3.4E+06	Positive	6.87 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.30 ± 0.01	5.03 ± 1.29	2.97 ± 0.81	14.97 ± 0.01	2.93 ± 0.12
Santa Clara	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.8E+07	Positive	6.93 ± 0.06	2.20 ± 0.00	0.43 ± 0.03	7.03 ± 1.50	4.87 ± 1.21	11.17 ± 0.36	2.00 ± 0.15
Yolanda	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.7E+06	Positive	6.70 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.43 ± 0.02	4.03 ± 0.92	1.60 ± 0.36	11.60 ± 0.35	3.17 ± 0.06
Tumbaco Centro	0.20 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.0E+06	Positive	6.90 ± 0.00	2.20 ± 0.00	0.30 ± 0.05	6.23 ± 0.61	2.70 ± 0.61	14.80 ± 0.40	2.93 ± 0.12
p-value	***	ns	***		***	ns	*	***	***	***	ns
Max. value	0.30	0.01	1.78E+07		6.93	2.20	0.57	7.03	5.17	20.57	3.17
Min. value	0.20	0.01	1.74E+06		6.67	2.00	0.10	3.27	1.60	11.17	2.00
Average	0.20	0.01	4.49E+06		6.83	2.01	0.31	5.26	3.25	14.28	2.54

Table 2. Average value (FW) of parameters related to the commercial quality of lemon balm (*M. officinale*) ^{aa}Mean values ± SD (n=13). Significance of differences is given: ns, not significant; * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. na, not available

Market	Pb (ppm)	Cd (ppm)	Mesophiles (UFC/g)	Parasites	SS (°Brix)	pH	TA (%)	Weight (g)	LD (cm)	E.D. (cm)	Dry matter (%)	Ash (%)
Alangasí	2.35 ± 0.10	0.06 ± 0.01	5.3E+07	Positive	3.77 ± 0.15	6.30 ± 0.48	0.09 ± 0.00	0.94 ± 0.03	13.56 ± 2.85	5.40 ± 0.94	7.93 ± 1.49	1.22 ± 0.06
Amaguaña	2.25 ± 0.13	0.06 ± 0.00	5.6E+07	Positive	3.33 ± 0.29	6.78 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.63 ± 0.04	12.60 ± 4.02	4.25 ± 1.36	7.80 ± 0.99	1.20 ± 0.08
América	0.85 ± 0.10	0.03 ± 0.00	3.5E+07	Positive	3.50 ± 0.00	7.53 ± 0.19	0.08 ± 0.00	0.58 ± 0.04	11.27 ± 3.85	4.18 ± 1.32	8.16 ± 1.05	1.54 ± 0.21
Calderón	2.30 ± 0.12	0.06 ± 0.00	5.6E+07	Positive	4.33 ± 0.29	6.74 ± 0.03	0.05 ± 0.00	1.58 ± 0.08	16.64 ± 3.77	3.79 ± 1.02	7.22 ± 0.30	1.09 ± 0.07
Carapungo	0.77 ± 0.10	0.02 ± 0.00	3.8E+07	Positive	3.33 ± 0.29	7.02 ± 0.95	0.09 ± 0.00	0.91 ± 0.03	12.28 ± 2.14	6.42 ± 1.09	7.02 ± 0.86	1.07 ± 0.04
Carcelén	na	na	6.3E+07	Positive	na	na	na	na	na	na	na	na
Central	2.10 ± 0.14	0.06 ± 0.00	3.7E+07	Positive	3.93 ± 0.40	6.37 ± 0.06	0.06 ± 0.00	0.74 ± 0.03	12.38 ± 3.07	5.15 ± 1.72	8.46 ± 1.37	1.51 ± 0.19
Chiriyacu	2.12 ± 0.10	0.06 ± 0.01	4.0E+07	Positive	3.33 ± 0.29	6.38 ± 0.28	0.06 ± 0.00	1.00 ± 0.06	11.38 ± 3.65	5.02 ± 1.27	6.98 ± 0.28	1.21 ± 0.12
Ciudadela Ibarra	2.43 ± 0.10	0.06 ± 0.00	2.2E+08	Positive	3.83 ± 0.29	7.23 ± 0.56	0.07 ± 0.01	0.37 ± 0.01	10.08 ± 1.83	3.10 ± 0.82	8.22 ± 0.98	1.23 ± 0.12
Comité del Pueblo	2.30 ± 0.12	0.06 ± 0.00	3.8E+07	Positive	5.00 ± 0.00	6.55 ± 0.03	0.07 ± 0.00	0.84 ± 0.04	13.95 ± 2.22	4.50 ± 1.35	6.33 ± 0.60	1.58 ± 0.19
Conocoto	1.17 ± 0.13	0.04 ± 0.00	3.7E+07	Positive	4.67 ± 0.29	6.36 ± 0.13	0.08 ± 0.00	0.33 ± 0.01	9.51 ± 3.06	3.02 ± 1.11	6.95 ± 0.41	1.05 ± 0.04
Cotocollao	2.27 ± 0.11	0.06 ± 0.01	3.8E+07	Positive	3.20 ± 0.26	6.53 ± 0.30	0.09 ± 0.00	0.85 ± 0.04	14.38 ± 3.11	5.07 ± 0.86	6.12 ± 0.85	1.14 ± 0.06
Cumbayá	2.60 ± 0.10	0.06 ± 0.01	4.8E+07	Positive	3.67 ± 0.29	7.04 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.77 ± 0.09	12.79 ± 3.67	3.94 ± 1.49	7.52 ± 2.52	1.10 ± 0.05
El Calzado	2.32 ± 0.00	0.05 ± 0.00	3.8E+07	Positive	3.73 ± 0.25	7.25 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.82 ± 0.03	14.46 ± 2.53	4.29 ± 0.88	8.70 ± 0.57	1.23 ± 0.03
Iñaquito	2.15 ± 0.11	0.06 ± 0.00	6.0E+07	Positive	3.67 ± 0.29	7.38 ± 0.13	0.07 ± 0.01	0.57 ± 0.02	11.91 ± 2.25	3.96 ± 0.80	6.99 ± 0.46	1.35 ± 0.02
La Ecuatoriana	2.33 ± 0.10	0.06 ± 0.01	na	na	3.33 ± 0.29	6.07 ± 0.20	0.06 ± 0.00	0.78 ± 0.03	11.45 ± 2.03	6.05 ± 0.70	6.69 ± 0.40	1.57 ± 0.08
La Kennedy	2.22 ± 0.14	0.06 ± 0.02	3.9E+07	Positive	4.57 ± 0.51	6.31 ± 0.43	0.05 ± 0.00	0.93 ± 0.04	14.28 ± 3.07	5.96 ± 1.63	7.07 ± 0.40	1.18 ± 0.08
La Magdalena	2.23 ± 0.11	0.06 ± 0.01	3.8E+07	Positive	3.83 ± 0.29	6.66 ± 0.32	0.06 ± 0.01	0.65 ± 0.02	15.14 ± 2.71	4.75 ± 0.77	5.98 ± 0.34	1.08 ± 0.02
Las Cuadras	2.27 ± 0.10	0.06 ± 0.01	3.7E+07	Positive	3.70 ± 0.01	6.71 ± 0.41	0.08 ± 0.00	0.73 ± 0.03	13.47 ± 2.11	4.89 ± 1.13	7.34 ± 0.36	1.32 ± 0.09
Llano Grande	0.57 ± 0.11	0.02 ± 0.01	3.7E+07	Positive	4.50 ± 0.50	6.68 ± 0.35	0.05 ± 0.00	1.90 ± 1.00	18.62 ± 5.41	7.61 ± 1.95	7.12 ± 0.70	1.29 ± 0.33
Mayorista	2.35 ± 0.13	0.06 ± 0.01	na	na	3.17 ± 0.29	7.23 ± 0.14	0.06 ± 0.00	0.72 ± 0.02	14.99 ± 2.43	5.22 ± 0.92	5.70 ± 0.82	1.24 ± 0.16
Pomasqui	1.05 ± 0.11	0.04 ± 0.00	3.8E+07	Positive	3.27 ± 0.25	6.75 ± 0.15	0.08 ± 0.00	0.61 ± 0.01	12.82 ± 2.20	4.89 ± 1.11	6.71 ± 0.67	1.16 ± 0.08
Pueumbo	0.98 ± 0.13	0.03 ± 0.00	6.5E+07	Positive	3.00 ± 0.10	6.78 ± 0.25	0.07 ± 0.00	0.61 ± 0.02	10.92 ± 1.90	5.00 ± 0.89	6.56 ± 0.82	1.13 ± 0.03
Quinche	2.35 ± 0.10	0.06 ± 0.00	na	na	4.00 ± 0.50	6.62 ± 0.07	0.07 ± 0.00	0.64 ± 0.04	14.44 ± 2.90	4.95 ± 1.06	6.55 ± 0.43	1.37 ± 0.09
San Antonio de Pichincha	2.25 ± 0.11	0.06 ± 0.00	3.7E+07	Positive	3.50 ± 0.30	6.58 ± 0.18	0.09 ± 0.00	0.91 ± 0.03	16.90 ± 2.27	5.64 ± 0.86	8.43 ± 0.67	2.08 ± 0.03
San Bartolo	2.08 ± 0.00	0.06 ± 0.00	3.7E+07	Positive	5.00 ± 0.50	6.79 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.57 ± 0.04	10.69 ± 3.82	3.73 ± 1.23	8.40 ± 0.72	1.46 ± 0.14
San Roque	2.25 ± 0.13	0.06 ± 0.01	3.8E+07	Positive	4.33 ± 0.29	6.23 ± 0.03	0.06 ± 0.00	1.09 ± 0.05	16.06 ± 4.10	5.57 ± 0.90	7.43 ± 0.31	1.23 ± 0.06
Santa Clara	0.67 ± 0.20	0.03 ± 0.01	3.8E+07	Positive	3.17 ± 0.29	6.11 ± 0.14	0.07 ± 0.00	1.62 ± 0.09	16.03 ± 6.75	6.37 ± 1.95	7.06 ± 1.42	1.20 ± 0.17
Yolanda	2.18 ± 0.11	0.06 ± 0.01	na	na	3.77 ± 0.25	6.45 ± 0.16	0.06 ± 0.00	1.15 ± 0.06	15.03 ± 2.80	6.14 ± 1.26	6.94 ± 0.09	1.03 ± 0.04
Tumbaco Centro	1.08 ± 0.00	0.03 ± 0.00	4.8E+07	Positive	3.03 ± 0.50	6.50 ± 0.33	0.06 ± 0.00	0.70 ± 0.02	13.98 ± 2.83	5.63 ± 1.30	6.57 ± 0.33	1.19 ± 0.17
Yaruquí	2.08 ± 0.11	0.06 ± 0.00	3.9E+07	Positive	3.90 ± 0.36	6.61 ± 0.46	0.07 ± 0.00	0.58 ± 0.02	10.95 ± 2.68	4.67 ± 1.03	7.68 ± 0.11	1.38 ± 0.03
<i>p-value</i>	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***
<i>Max. value</i>	2.60	0.06	2.24E+08		5.00	7.53	0.09	1.90	18.62	7.61	8.70	2.08
<i>Min. value</i>	0.57	0.02	3.46E+07		3.00	6.07	0.04	0.33	9.51	3.02	5.70	1.03
<i>Average</i>	1.90	0.05	4.88E+07		3.78	6.68	0.07	0.84	13.43	4.97	7.22	1.28

Table 3. Average value (FW) of parameters related to the commercial quality of watercress (*N. officinale*)^a Mean values ± SD (n=13). Significance of differences is given: ns, not significant; * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$. na, not available**

Market	Pb (ppm)	Cd (ppm)	E. coli (UFC/g)	SS (°Brix)	pH	TA (%)	Weight (g)	L.D. (cm)	Dry matter (%)	Ash (%)
Alangasí	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	9.0E+05	3.33 ± 0.67	6.58 ± 0.20	0.09 ± 0.00	737.6 ± 0.20	17.60 ± 0.06	5.80 ± 0.10	0.98 ± 0.03
Amaguaña	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.0E+06	3.40 ± 0.62	6.57 ± 0.20	0.09 ± 0.00	737.6 ± 0.11	14.05 ± 0.05	4.33 ± 0.58	1.09 ± 0.02
América	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.0E+06	3.00 ± 0.10	6.88 ± 0.01	0.15 ± 0.01	423.4 ± 0.34	14.35 ± 0.53	4.40 ± 0.69	1.06 ± 0.02
Calderón	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.3E+06	3.43 ± 0.61	6.53 ± 0.02	0.09 ± 0.04	635.4 ± 0.72	16.80 ± 0.08	4.57 ± 0.98	1.05 ± 0.10
Carapungo	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.5E+06	5.17 ± 0.01	6.52 ± 0.02	0.10 ± 0.02	763.2 ± 0.01	14.07 ± 0.07	4.53 ± 0.92	1.08 ± 0.19
Central	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.0E+06	3.37 ± 0.72	6.57 ± 0.02	0.09 ± 0.00	526.6 ± 0.52	17.26 ± 0.62	4.33 ± 0.58	0.97 ± 0.01
Chiriyacu	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	3.3E+06	3.30 ± 0.61	6.57 ± 0.02	0.08 ± 0.00	670.3 ± 0.72	14.45 ± 0.45	4.57 ± 0.98	0.98 ± 0.01
Ciudadela Ibarra	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	2.0E+06	3.27 ± 0.55	6.51 ± 0.02	0.07 ± 0.00	526.0 ± 0.82	15.05 ± 0.12	4.50 ± 0.87	1.09 ± 0.02
Comité del Pueblo	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.0E+06	3.23 ± 0.49	6.53 ± 0.20	0.08 ± 0.00	378.1 ± 0.27	15.15 ± 0.37	4.43 ± 0.75	1.08 ± 0.02
Conocoto	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.2E+06	3.37 ± 0.64	6.53 ± 0.22	0.09 ± 0.00	693.4 ± 0.47	14.50 ± 0.84	4.30 ± 0.52	1.08 ± 0.02
Cotocollao	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.2E+06	3.40 ± 0.61	6.56 ± 0.02	0.09 ± 0.00	471.2 ± 0.34	14.75 ± 0.75	4.37 ± 0.64	0.88 ± 0.01
Cumbayá	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.0E+06	3.47 ± 0.57	6.47 ± 0.01	0.15 ± 0.01	650.9 ± 0.72	14.05 ± 0.27	4.50 ± 0.87	1.08 ± 0.02
El Calzado	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	2.9E+06	3.30 ± 0.69	6.50 ± 0.11	0.08 ± 0.00	676.7 ± 0.11	13.73 ± 0.74	4.60 ± 1.04	0.98 ± 0.01
Iñaquito	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.0E+06	3.27 ± 0.72	6.54 ± 0.14	0.08 ± 0.00	656.4 ± 0.42	15.15 ± 0.27	4.43 ± 0.75	0.97 ± 0.00
La Ecuatoriana	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.8E+06	3.23 ± 0.76	6.47 ± 0.10	0.08 ± 0.00	647.4 ± 0.87	13.80 ± 0.11	4.47 ± 0.81	0.96 ± 0.01
La Kennedy	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.0E+06	3.33 ± 0.67	6.54 ± 0.14	0.09 ± 0.00	403.3 ± 0.11	14.60 ± 0.27	4.30 ± 0.52	0.98 ± 0.01
La Magdalena	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	2.0E+06	3.27 ± 0.72	6.51 ± 0.11	0.08 ± 0.00	629.2 ± 0.36	14.40 ± 0.36	4.33 ± 0.58	0.97 ± 0.01
Las Cuadras	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	2.0E+06	3.30 ± 0.61	6.58 ± 0.02	0.09 ± 0.00	700.4 ± 0.75	16.70 ± 0.27	4.43 ± 0.75	1.09 ± 0.02
Llano Grande	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.8E+06	3.27 ± 0.55	6.58 ± 0.02	0.09 ± 0.00	804.3 ± 0.62	20.20 ± 0.92	4.47 ± 0.81	1.08 ± 0.02
Mayorista	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	5.0E+06	3.23 ± 0.49	6.57 ± 0.02	0.10 ± 0.00	781.3 ± 0.15	15.00 ± 0.17	4.50 ± 0.87	1.07 ± 0.02
Pomasqui	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.2E+06	3.30 ± 0.69	6.59 ± 0.01	0.09 ± 0.00	803.7 ± 0.36	18.20 ± 0.22	4.30 ± 0.52	1.08 ± 0.02
Puembo	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.0E+06	3.27 ± 0.72	6.58 ± 0.02	0.08 ± 0.01	647.0 ± 0.82	16.00 ± 0.37	4.33 ± 0.58	1.09 ± 0.02
San Antonio de Pichincha	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.4E+06	5.17 ± 0.01	6.58 ± 0.02	0.10 ± 0.01	848.9 ± 0.72	15.85 ± 0.74	4.50 ± 0.87	1.09 ± 0.02
San Bartolo	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	3.0E+06	3.30 ± 0.69	6.54 ± 0.14	0.09 ± 0.00	663.1 ± 0.36	13.60 ± 0.09	4.47 ± 0.81	0.89 ± 0.01
San Roque	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	6.1E+06	2.73 ± 0.02	6.58 ± 0.02	0.09 ± 0.00	516.7 ± 0.81	14.40 ± 0.73	1.20 ± 0.10	1.31 ± 0.01
Santa Clara	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.1E+06	3.30 ± 0.61	6.57 ± 0.18	0.09 ± 0.00	684.2 ± 0.92	14.45 ± 0.27	4.83 ± 1.44	1.07 ± 0.02
Yolanda	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	4.2E+06	3.40 ± 0.78	6.58 ± 0.02	0.09 ± 0.00	833.8 ± 0.83	14.10 ± 0.11	4.30 ± 0.52	1.09 ± 0.02
<i>p-value</i>	***	***	***	**	ns	*	***	***	**	ns

<i>Max. value</i>	0.03	0.02	6.06E+06	5.17	6.88	0.15	848.9	20.20	5.80	1.31
<i>Min. value</i>	0.01	0.01	1.00E+06	2.73	6.47	0.07	378.1	13.35	1.20	0.88
<i>Average</i>	0.02	0.02	1.84E+06	3.41	6.56	0.09	645.9	15.23	4.36	1.05

Table 4. Average value (FW) of parameters related to the commercial quality of lettuce (*L. sativa*)^{aa} Mean values \pm SD (n=13). Significance of differences is given: ns, not significant; * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$. na, not available**

DISCUSSION

Estimation of food quality

Size

The selected markets correspond to 55.5 % of the total in the Metropolitan District of Quito. The markets that presented the highest values of equatorial and longitudinal diameter were Santa Clara and Llano Grande for lemon balm, San Roque for taraxaco and Llano Grande for lettuce and watercress (Table 1 to 4). Thus, in most cases, the markets located to the north of the city showed enormous sizes; this may be because these markets are provided with products from the Pichincha province, while the markets of the center and south are supplied with products from the Cotopaxi province, marking the difference in said products. The average longitudinal diameter of lemon balm was 5.3 cm, less than reported by ¹⁹, which showed values of longitudinal diameter of 9 cm and equatorial diameter of 7 cm. On the other hand, the statistical differences shown by the analyzed samples of lemon balm indicate that at least one market has different diameters than the others, agreeing with that reported by other authors that suggest that it is sold in the markets regardless of the size of the leaf, causing maximum use of the therapeutic properties presented by the species the other hand, the longitudinal diameter (13.43 cm) and the equatorial diameter (4.97 cm) of the watercress showed values similar to those reported by other authors who indicated a length of 15 to 20 cm.

Weight

The markets that presented the highest weights of the samples under study were San Roque for taraxaco, San Bartolo for lemon balm, Llano Grande for watercress and San Antonio de Pichincha for lettuce (Table 1 to 4). On the other hand, the markets that presented the highest dry matter values were Cumbayá for taraxaco, Carcelén for lemon balm, El Calzado for watercress and Alangasí for lettuce. About the previous data, the weight values showed a relationship with the data obtained from dry matter. Thus, the markets located to the south of the city presented higher values of humidity and low weights; this again could be due to the place of origin of the samples since most of the products that reach the wholesale market located south of the city can be from the province of Cotopaxi.

The distribution of dry matter was lemon balm (14.3 %), taraxacum (12.8 %), watercress (7.2 %) and lettuce (5.8 %). The dry matter values of the watercress were similar to those reported by other authors, which showed 94.6 % humidity ^{20,21}.

The markets with the highest ash values were Tumbaco Centro for Taraxaco, La Ecuatoriana and Solanda for lemon balm, San Antonio de Pichincha for watercress and San Roque for lettuce. Thus, in most cases for taraxaco and lemon balm, the ash values exceeded that established by the Ecuadorian Technical Norm of ash of 2 % ²². This was also observed in the simple of cress obtained from San Antonio de Pichincha, who reported values of 2.08 %. The ash values of lemon balm, taraxaco and watercress showed significant differences in the place of sales, while the lettuce did not present differences.

Soluble solid (SS.)

The markets that presented higher values of SS were the Comité del Pueblo and San Bartolo for watercress, Carapungo and San Antonio de Pichincha for lettuce (Table 1 to 4). In addition, the average values for SS classified from highest to lowest for the samples under study were watercress (3.78 °Brix), lettuce (3.41 °Brix), taraxaco and lemon balm (2.20 °Brix). All samples analyzed except taraxaco and lemon balm did not show significant differences when considering all the markets under study.

On the other hand, the markets that presented the highest pH values were La Ecuatoriana for taraxaco, Iñaquito for lemon balm, and America for watercress and lettuce. In addition, the average values from highest to lowest for pH were lemon balm (6.83), watercress (6.68), lettuce (6.56), taraxaco (6.40). These values are similar to those reported by other authors ⁷. Concerning the statistical analysis of the pH, considering all the markets in the study, these showed significant differences, except the lettuce, which did not differ.

Heavy metal analysis

Lead

The markets with the highest values of Pb were San Bartolo for taraxaco, Alangasí for lemon balm, Cumbayá for watercress and several markets in the case of lettuce (Table 1 to 4). These data indicate that no specific region accumulates heavy metals; this may be due to the fact that the soils of the Sierra region are volcanic and have high amounts of heavy metals.

The taraxaco, lemon and lettuce balm showed average values of 0.02 ppm in most cases and 1.90 ppm for watercress. Thus, at least one market showed statistical differences concerning the values reported for the remaining markets under study. The concentrations of Pb for lemon balm, taraxaco and lettuce are within the limits accepted by the Ecuadorian Technical Standard that reports maximum values of 0.5 ppm²² and 0.3 ppm established by CODEX and the European Union Regulations for heavy metals²³. However, the values of watercress exceed the maximum limits, becoming a health risk since lead can replace calcium accumulating in bone tissues, as suggested by other authors²⁴.

Although taraxaco is considered a bioindicator of environmental contamination, as suggested by other authors²⁵, it has a low concentration compared to the rest of the samples under study.

Cadmium

Lemon balm and taraxaco showed a Cd value of 0.01 ppm for the studied markets. Therefore, all the needs under study did not show significant differences in the values reported. In the case of watercress and lettuce, these showed concentrations of 0.05 and 0.02 ppm, respectively, in most of the different markets under study, and these values corresponded to the maximum concentration. Cadmium, in general, should be absent in plant tissues; however, its presence may be related to the type of soil in which it is grown, which corresponds to the inter-Andean region whose areas show the presence of heavy metals of a geographical nature from the Cordillera of the Andes, as suggested by other authors²⁶. On the other hand, according to the limits established by the FAO (4.2 ppm), the CODEX and the European Union Regulation for heavy metals²³ with reference limits of 0.2 ppm, the results obtained for the samples under study did not exceed the permissible limit.

PCA analysis for food quality

Applied to our data set, PCA revealed that the first principal components explain 29.6 % of lettuce, 33.1 % of lemon balm, 37.06 % of watercress, and 44.0 % of taraxaco of total variance. A plot of the scores of the first factor (PC1) versus the second principal component (PC2), i.e., the projection of the samples along the directions identified by the first two PCs, is reported in Figure 2. PC1 was mainly linked to lead in most of the samples under study, all with positive loading values in this component.

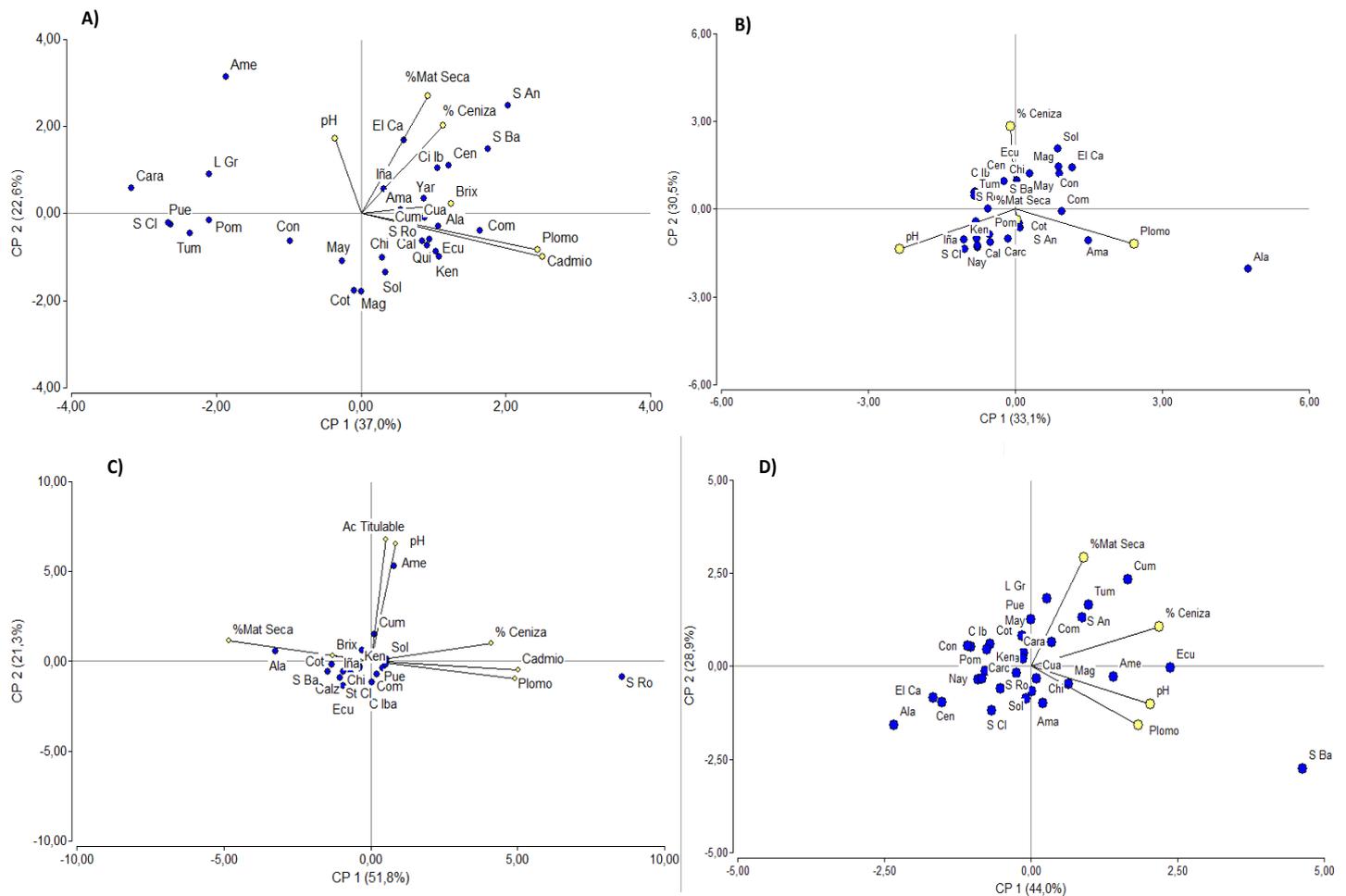


Figure 2. Scores plot of the watercress (*N. officinale*) (A), lemon balm (*M. officinalis*) (B), lettuce (*L. sativa*) (C) and taraxaco (*T. officinale*) (D) using the two first principal components obtained by PCA of weight, dry material, ash, lead, Cadmium, pH, soluble solids and titulable acidity.

Microbiological quality

Mesophilic Aerobic Microorganisms

The average of mesophilic aerobic microorganisms in all samples exceeded the values of 4 log₁₀ CFU/g (1×10⁴ CFU/g (Table 1 to 4). The results of lettuce were similar to the study of ², who reported ranged from a geometric mean of 3.50 to 8.39 log CFU/g in lettuce, parsley and radish; ²⁷ found values of >6 log CFU/g in environmentally friendly romaine lettuce, and ²⁸ presented ranges between 5 to >7 log₁₀ CFU/g for organic vegetables and 3 to >7 log₁₀ CFU/g for conventional vegetables, including ‘Looseleaf’, ‘Butterhead’, ‘Romaine’ and ‘Red looseleaf’ lettuce.

The high load of microorganisms could be due to the contamination between the transports of vegetables from the farm to the market. This possible contamination was also reported by ²⁹ who observed that the counts of indicator microorganisms increased from farm to market, for example, mean Enterobacteriaceae and *Listeria spp.* Counts were on average higher by 0.9 log CFU/g and by 0.5 log CFU/g respectively at market compared to farm, indicating that between farm and market, vegetables are either contaminated or that there are conditions that allow the growth of microorganisms.

On the other hand, the pH values for taraxaco, lemon balm, watercress and lettuce were 6.4, 6.8, 6.7 and 6.5, respectively. The pH values found could explain the high microbial quantity in the different species, as indicated ³⁰, who points out that the bacteria count may be low when pH is low (presence of acidic substances). However, at neutral or higher pH (5 to 8.5), the level of contamination of the herbal preparations may be higher.

Parasites

The present study evaluated the presence or absence of eggs and cysts of parasites in the different species. Thus, the watercress and lettuce showed the highest identification of parasites eggs or cysts, followed by lemon balm and taraxaco (Table 1 to 4). Some authors suggest that the watercress structure favors the level of contamination due to the multiple and separated leaves, which allows a greater adherence of parasites ³¹. In addition, this type of plant is developed in highly humid soil and mainly inaccessible areas that probably carry contaminated water, as suggested ³². On the other hand, the lettuce has broad leaves, firmly juxtaposed, which hinders the adhesion of protozoan cysts, eggs and helminth larvae; another hypothesis is that many helminth eggs can survive for more extended periods in the environment, which could justify the higher frequencies of parasites found in the watercress, whose cultivation requires land permanently humid, as proposed others authors ³². Also, fascioliasis risk is linked with the consumption of raw vegetables such as lettuce, suggesting contamination when washing vegetables with untreated water and in-plant cultures using natural water for irrigation, as indicated ³³.

PCA analysis for microbiological quality

The number of microorganisms for taraxacum and lemon balm according to PCA statistical analyses (Figure 3) is influenced highly by pH, with values of 0.56 and 0.42 for the first principal component, respectively, what means that at basic or neutral pH value, the growth of aerobic mesophilic microorganisms is more significant than an acid pH values. Also, the percentage of ash influences the number of mesophilic aerobic organisms in the case of taraxaco, lettuce and watercress, with values of 0.64 and 0.28 for the first principal component, respectively.

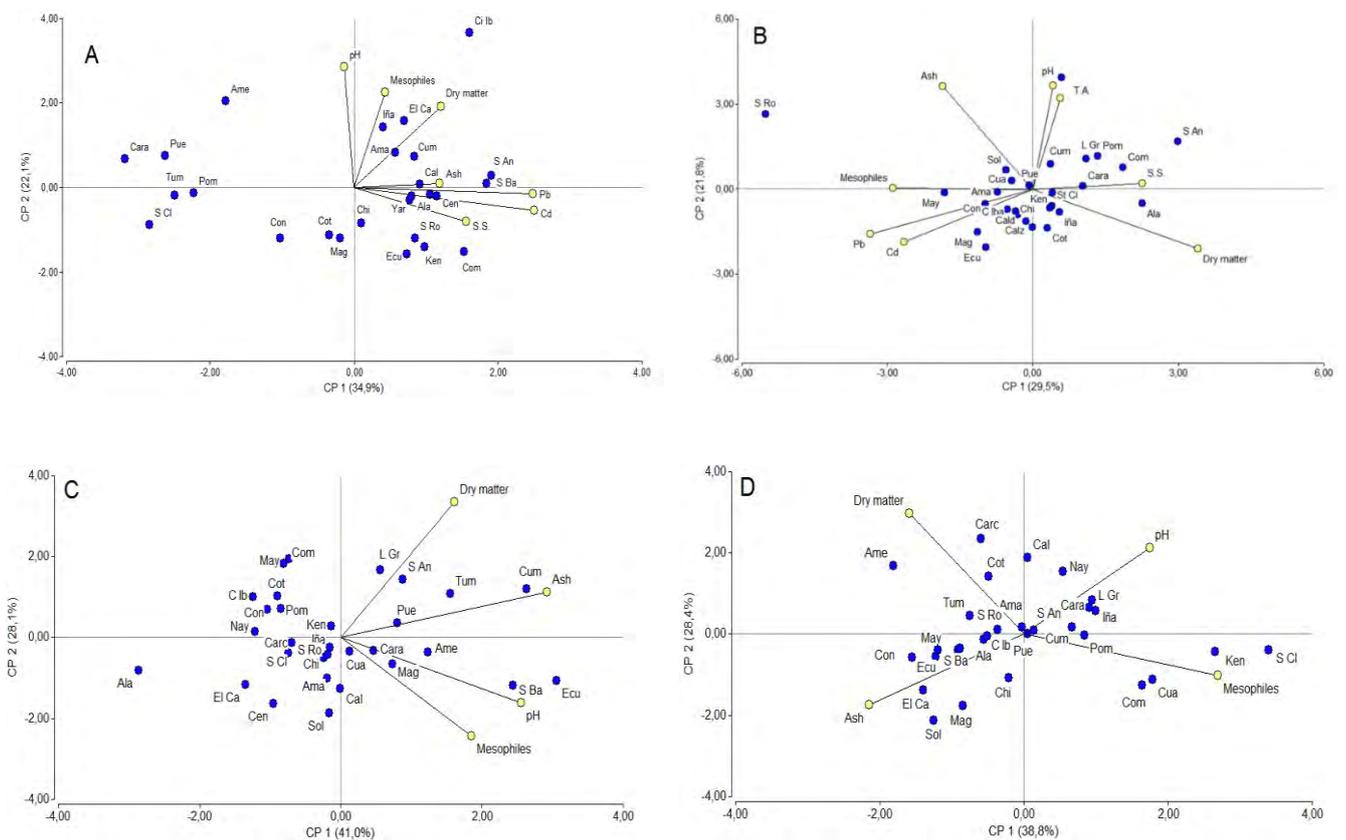


Figure 3. Scores plot of the watercress (*N. officinale*) (A), lettuce (*L. sativa*) (B), taraxacum (*T. officinale*) (C) and lemon balm (*M. Officinalis*) (D) using the two first principal components obtained by PCA of weight, dry material, ash, pH, soluble solids, titrable acidity, mesophiles and parasites.

CONCLUSIONS

The present study supports the idea that lemon balm, taraxaco, watercress and lettuce meet the bromatological, microbiological and heavy metals requirements in the Distrito Metropolitano de Quito markets. In general, the size of the products under study showed better characteristics for needs in the north and center of the city. At the same time, heavy metals did not exceed the limits allowed by Ecuadorian regulations such as CODEX and European regulations (0.3 ppm for Pb and 0.2 ppm for Cd).

On the other hand, according to our microbiological results, it is suggested that the species studied have lower quality hygiene (outside acceptable microbiological limits). The study results show that 76 to 100% of the samples commercialized in markets from Quito were contaminated with at least one parasite structure on average. Therefore, improvement is needed in sanitary conditions during the planting and distribution of vegetables to reduce the contamination and the risks to food safety to humans. Vegetables likely to be eaten raw should not be obtained from areas where these practices are known, or suspected, to be unhygienic.

Author Contributions: methodology, Coyago Elena, Méndez Gabriela; formal analysis, Acurio Daniel.; investigation, Coyago Elena.; resources, Coyago Elena.; writing—original draft preparation, Méndez Gabriela, Coyago Elena, Acurio Daniel; writing—review and editing, Coyago Elena, Acurio Daniel, Méndez Gabriela; project administration, Coyago Elena.; funding acquisition, Coyago Elena. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: "This research received no external funding."

Conflicts of Interest: "The authors declare no conflict of interest."

REFERENCES

1. Garrido ML, Veitia SA, Guillen TDA, García OC, Chacón JJ. Procedimiento analítico para la determinación de metales pesados en zanahoria y espinaca cultivadas en organopónicos urbanos. *Rev Ciencias Técnicas Agropecu.* 2013;22(1):20–6.
2. Faour-Klingbeil D, Murtada M, Kuri V, Todd E. Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East. *Food Control* [Internet]. 2016;62:125–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.024>
3. Santiago J, Atsumi C, Garcia F, Da-Silveira A, Paiao S, Carrion A, et al. Parasitological analysis of green leaf lettuce cultivated in different production systems. *Semin Agrar Londrina.* 2017;38(2):801–8.
4. Cerna-Cortes JF, Leon-Montes N, Cortes-Cueto AL, Salas-Rangel LP, Helguera-Repetto AC, Lopez-Hernandez D, et al. Microbiological quality of ready-to-eat vegetables collected in Mexico City: Occurrence of aerobic-mesophilic bacteria, fecal coliforms, and potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria. *Biomed Res Int.* 2015 Mar;2015:789508.
5. Carrillo L, Audisio C, Bejarano N, Gómez S. *Manual de microbiología de alimentos.* Aliment en España. 2001;125–32.
6. Coyago-Cruz E, Méndez G, Acurio D, Valdés L, Quishpe K, González C, et al. Microbiological and heavy metal risk in alfalfa juice (*Medicago sativa*) sold in markets. *Ital J Food Sci.* 2018;(June):25–9.
7. Vélchez H. Evaluación económica de berros (*Nasturtium officinale*) hidropónicos a través del estudio de casos de productores de la región metropolitana. Chile: Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía; 2008.
8. Mendiola M, Montalbán J. *Plantas aromáticas gastronómicas.* España: Ediciones Paraningo S.A.; 2009.
9. Guamán R. Estudio bioagronómico de 10 cultivares de lechuga de cabeza (*Lactuca sativa*), utilizando dos tipos de fertilizantes orgánicos, en el cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo. 2010.
10. Vélez Bravo AP, Ortega González JE. Determinación de coliformes totales y *E. Coli* en muestras de

- lechuga expandidas en cuatro mercados de la ciudad de Cuenca [Internet]. Cuenca; 2013. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/4301>
11. Chen J, Wei F, Zheng C, Wu Y, Adriano DC. Background concentrations of elements in soils of China. *Water Air Soil Pollut.* 1991;57–58(1):699–712.
 12. INEN1750. NTE INEN 1750:1994. Hortalizas y frutas frescas. Muestreo. Inst Ecuatoriano Norm. 2012;
 13. INEN2172. NTE INEN-ISO 2172. Jugo de Frutas-Determinación del contenido de sólidos solubles-método pícnométrico (ISO 2172:1983, IDT). Inst Ecuatoriano Norm. 2014;1–5.
 14. INEN750. NTE-INEN-ISO 750:2013 Productos vegetales y de frutas - Determinación de la acidez titulable (IDT). Inst Ecuatoriano Norm. 2013;1998:1–5.
 15. INEN391. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 391 : 2012 Segunda revisión. Conservas vegetales. Jugos de frutas. Determinación de la densidad relativa. Inst Ecuatoriano Norm. 2012;1–6.
 16. Harbers L. Ash analysis, in *Food analysis*. Aspen Publ. Indiana; 1998.
 17. AOAC999.10. AOAC Official Method 999.10 Lead, Cadmium, Zinc, Cooper, and Iron in Foods. Atomic absorption spectrophotometry after microwave digestion. *Off methods Anal AOAC Int.* 2010;17–9.
 18. WHO. Quality control methods for herbal materials. Malta: WHO Library Cataloging-in-publication Data; 1998.
 19. Tucker A, DeBaggio T. *The encyclopedia of herbs. A comprehensive reference to herbs of flavor and fragrance*. DeBaggio F, editor. London: Timber Press, Inc.; 2009.
 20. Patiño J, Ocampo J. Diseño y construcción de un equipo reductor de tamaño de berro, espinaca, zanahoria. Chimborazo; 2014.
 21. INCAP, OPS. Tabla de composición de alimentos de Centroamérica. Segunda. INCAP, editor. Panamá; 2012. 128 p.
 22. INEN2392. NTE INEN 2392. Hierbas aromaticas (requisitos). Serv Ecuatoriano Norm. 2017;4:3.
 23. Codex-Alimentarius. Informe de la 22a reunión del Comité del CODEX sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. La Haya, Países Bajos 19-24 de marzo de 1990. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Aliment Com del Codex Aliment [Internet]. 1991;1(1):2–5. Available from: <http://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/1834#page/104/mode/2up>
 24. Mahmood Q, Rashid A, Ahmad SS, Azim MR, Bilal M. Current status of toxic metals addition to environment and its consequences. In: Anjum N, Ahmad I, Pereira E, Duarte A, Umar S, Khan N, editors. *The Plant Family Brassicaceae*. 21st ed. Springer, Dordrecht; 2012. p. 35–69.
 25. Kolář J, Seňková J. Reduction of mineral nutrient availability accelerates flowering of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol.* 2008;165(15):1601–9.
 26. Pozo W, Sanfeliu T, Carrera G. Metales pesados en humedales de arroz en la cuenca baja del río Guayas. *Maskana.* 2011;2(1):17–30.
 27. Ryu JH, Kim M, Kim EG, Beuchat LR, Kim H. Comparison of the Microbiological Quality of Environmentally Friendly and Conventionally Grown Vegetables Sold at Retail Markets in Korea. *J Food Sci.* 2014;79(9):M1739–44.
 28. Maffei DF, Silveira NF de A, Catanozi M da PLM. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. *Food Control* [Internet]. 2013;29(1):226–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.013>
 29. Ssemanda JN, Reij M, Bagabe MC, Muvunyi CM, Joosten H, Zwietering MH. Indicator microorganisms in fresh vegetables from "farm to fork" in Rwanda. *Food Control* [Internet]. 2017;75:126–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.031>
 30. De-Freitas M, Bauab T. Microbial quality of medicinal plants materials. In: Isin A, editor. *Latest research into Quality Control*. Published. Croatia; 2010. p. 67–82.
 31. Célia L, Lessa T, Ramos P, Grassi R, Bombonato P, Ambrósio C. Arquitetura da árvore bronquica no sagui-de-tufo: Um modelo animal experimental para lesões do sistema respiratório. *Arch Vet Sci.* 2012;17(4):63–9.
 32. Soares B, Cantos GA. Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. *Rev Bras Ciências Farm J Pharm Sci.* 2006;42(3):455–60.

33. Zumaquero-Ríos J, Sarracent-Pérez J, Rojas-García R, Rojas-Rivero L, Martínez-Tovilla Y, Valero M, et al. Fascioliasis and intestinal parasitoses affecting schoolchildren in Atlixco, Puebla State, Mexico: Epidemiology and treatment with nitazoxanide. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(11).

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Coyago-Cruz E, Méndez G , Acurio D. Assessment of the microbiological quality and heavy metal risk in vegetable species marketed in outdoor fairs. *Revis Bionatura* 2023;8 (4)
18. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.18>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

The histomorphological appearance of the testes in Alloxan-induced diabetic rabbits

Hasanain Emran ^{1*}, Khyreia Habeeb ², Abeer Majeed ¹

¹Departments of Veterinary Surgery and Obstetrics, College of Veterinary Medicine/ University of Baghdad. Baghdad, Iraq; hassanain.j@covm.uobaghdad.edu.iq. ORCID (3-2265-0584).

²Departments of Anatomy and Histology, College of Veterinary Medicine/ University of Baghdad. Baghdad, Iraq; khayria.k@covm.uobaghdad.edu.iq. ORCID (2-2585-2192).

¹Departments of Veterinary Surgery and Obstetrics College of Veterinary Medicine/University of Baghdad. Baghdad, Iraq; abeera@covm.uobaghdad.edu.iq. ORCID (2-2672-7879)

* Corresponding author: E-mail: hassanain.j@covm.uobaghdad.edu.iq
Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.19>

ABSTRACT

This study assessed the histomorphological changes in testicular tissues due to the experimental diabetes mellitus (DM) generated in rabbits with Alloxan. Twenty-four adult male rabbits were used and allocated randomly into two equal groups (n=12 of each). The first group served as a control group and received normal saline only. The second group (diabetic group) was injected with Alloxan at a 100mg/kg IP dose. The serum glucose level was estimated at (0 min), 3 days and then (1,2 and 3 months), by aspiration of a blood sample from the jugular vein mixed with anticoagulant (EDTA) to obtain serum. The testosterone hormone was assayed from the serum obtained by centrifugation of blood samples using a special kit. Testicular biopsies were harvested through surgical castration at (1,2, and 3 months) post-administration of Alloxan. Results displayed a marked increase in glucose levels in the diabetic group starting from day three till the end of the experiment, with high differences between the two groups. Moreover, testosterone levels significantly decreased in the diabetic group compared to the control group. Our histomorphological examination confirmed that Alloxan leads to testicular damage in rabbits, represented by testicular atrophy, necrosis focusing in spermatogenic cells and separation of germinal epithelium. In conclusion, the injection of Alloxan succeeded in inducing (DM) with clear alteration in studied parameters.

Keywords: Biochemical, Testicular Parameters, Alloxan, Rabbits

INTRODUCCIÓN

Diabetes Mellitus (DM) is a prevalent chronic metabolic disorder. It is considered one of the significant diseases of our time and should not be neglected due to damage and dysfunction in multiple organ systems. It is now the seventh greatest killer of humankind due to its high prevalence and mortality¹. DM is broadly classified under two major categories, which include insulin-dependent DM (type I) due to loss or destruction of β -Langerhans islet cells of the pancreas, which leads to an absolute lack of insulin; this type affects children and young adults and non-insulin-dependent (DM) (type 2) in the adult in which β cells retain some functional ability². DM is characterized by increased blood sugar levels (hyperglycemia), glycosuria, polyuria, polyphagia, polydipsia, and abnormal lipid and protein metabolism^{3,4}. Furthermore, DM is mostly accompanied by severe complications such as macro-vascular diseases, mainly myocardial infarction, congestive cardiac failure, and arteriosclerosis⁵; and micro-vascular complications include diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, and diabetic retinopathy⁶. Moreover, several studies indicated that DM has

a detrimental effect on male sexual and reproductive functions as it lowers gonadotropins and testosterone hormones (responsible for spermatogenesis), resulting in decreased libido, delayed sexual maturation, and infertility with poor semen quality considering the central role of the testis represented by the production of testosterone and sperm which work to retain the characteristics of male and species preservation^{7,8,9}.

Experimental induction of DM can be achieved surgically through total or partial pancreatectomy¹⁰. The pharmacological induction of DM can be achieved by injecting chemical agents such as Alloxan and Streptozotocin, which are most commonly used to cause damage to β cells of the pancreas as their diabetogenic dose is usually 4 to 5 times less than their lethal dose. The dose of these agents varies among the animal species, age, and nutritional status. It can be administered IV, IP, or SC.¹¹ The present study aimed to assess the histomorphological changes in testicular tissues in diabetic rabbits to identify potential factors that will help design more targeted experiments.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimental animals

The current study was conducted on (24) normoglycemic local strain male rabbits, with an average age ranging from 12-16 months and initial weight ranging from 2000g to 2500g. The rabbits were obtained from the animal house of the faculty of Veterinary Medicine/University of Baghdad.

Management of the animals

The rabbits were kept in individual standard cages under the same managerial and hygienic conditions for three weeks before diabetes induction in the animal's house at the College of Veterinary Medicine/ University of Baghdad to become familiar with their new home and to monitor any possible abnormalities that may have happened. The cages were floored with a layer of sawdust for rabbits' urine absorption due to excess urination of rabbits after Alloxan injection. Rabbits were maintained under well-ventilated conditions with 14 hrs. light/ day, controlled temperature (23-25C°), and humidity (40- 45). They were fed standard pellets and greens feed (3 times a day) and were offered to tap water *ad libitum* throughout the experimental period. During quarantine, rabbits were screened and dewormed with a prophylactic anthelmintic drug (Ivomec1%, 0.2 mg/kg SC; India) against endo and ectoparasites. All works were conducted at the same time in the morning to avoid the effect of daily rhythm on the study results. One day before study initiation, rabbits were weighed using an electronic balance scale (China). The experimental protocols used in the current study were approved by the Institutional Animal Ethics Committee, Faculty of Veterinary Sciences and Animal Husbandry, and conform to the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals for Research. The duration of the experiment was set at three months.

Induction of Diabetes Mellitus

Rabbits (n=24) were used, and they fasted overnight before Alloxan administration; water was not withdrawn before injection of Alloxan. The ventral lateral abdominal area (lateral to the umbilicus) was prepared aseptically before injection under mild sedation (Xylazine hydrochloride 2%, 3 mg/kg BW IM; Spain).¹² A fresh solution of Alloxan monohydrate (Sigma, Germany) was prepared by dissolving it in 0.9% NaCl saline in a concentration of 10% and used immediately (since it is known to be very unstable). The rabbits were randomly and equally divided into two groups. The first group (n=12) was a standard control group, injected with only normal saline (IP) as a vehicle in a 1ml/kg BW dose. The second group (n=12) served as the Alloxaned diabetic group, in which diabetes was induced by injection of 100 mg/kg BW, Alloxan (IP) after dissolved in isotonic solution¹³, and the research was focused on this group. Before giving Alloxan, the average blood glucose levels of all rabbits were estimated. Immediately after two hours from alloxan administration, rabbits were given 20 ml of 5% glucose solution to counteract the early phase of drug-induced hypoglycemia shock. The blood glucose levels were measured three days post-Alloxan administration using a manual glucometer (Accu-Chech Active, Roche Diagnostics, Germany). Rabbits with blood glucose more than 200 mg/dl were declared diabetic and were selected for the study.

Study parameters

For estimation of glucose levels, three milliliters of blood samples were drawn from each rabbit through jugular vein puncture under aseptic condition at zero time ((base data) and then (3 days, one, two, and three months) post-Alloxan injection for control and diabetic groups. The samples were put into labeled centrifuge tubes containing anticoagulant Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid (EDTA), then centrifuged at 4000 revolutions per minute for 10 minutes to recover blood serum and stored under refrigerated condition before glucose analysis was carried out. The glucose values were recorded immediately as mg/dl.

The testosterone assay (ng/ml) was performed by collecting venous blood samples from all rabbits in the morning before access to feed and water. Sera were removed by centrifuging blood at 4000 revolutions per minute for 10 minutes and then stored at -20 C° until assayed. The serum testosterone hormone concentration was measured by radioimmunoassay (RIA) using commercial kits obtained from (Diagnostic Systems Laboratories Inc. Texas, USA). This hormone was measured before Alloxan injection (zero time) and then (one, two, and three months) post-Alloxan injection for control and diabetic groups.

Histopathological assessments of testes

All rabbits were subjected to surgical castration (orchidectomy) under the effect of mild general anesthesia represented by Medetomidine (1mg/kg) and Ketamine (100 mg/ml) combination in a dose of 0.25 mg/kg and 30 mg/kg, respectively and administered IM^{14,15}. Testicular tissue biopsies were examined monthly (for three months) (12 bucks/group) and (4 bucks/period). The biopsies were harvested and carefully trimmed to a suitable size (1cm³), fixed in bouin solution for 24 hrs. The samples were labeled and washed in running tap water before processing and then transferred to a graded series of ethanol (70%, 80%, 90%, and 100%), cleared in xylene. The tissues were infiltrated in molten paraffin wax in an oven at 58°C., after which the tissues were embedded in wax and blocked out. The paraffin-embedded biopsies were sectioned at 5µm thickness using a rotatory microtome (Semi-automated Rotary Microtome Wetzlar, Germany). The histological section was stained with Hematoxylin and Eosin (H & E)¹⁶ and observed thoroughly under a light microscope equipped with a camera (Olympus, Tokyo, Japan).

Statistical Analysis

All data generated were reported as (Mean ± SEM). In addition, Way Analysis of Variance (ANOVA) was used to test differences between the two groups, followed by Duncan's Multiple Range test. The significance level was set at P<0.05¹⁷.

RESULTADOS

Clinical signs

Three days post-Alloxan injection, there were clear signs of hyperglycemia as observed in the diabetic rabbit's group, represented by frequent urination, excessive thirst, decreased physical activity, and a tendency to lie down compared to the control rabbits group, reflecting standard behavioral patterns.

Estimation of serum glucose concentration

In Alloxan-induced diabetic rabbits, glucose concentration increased steadily (P<0.05) up to three months with the highest value (314±15.33 mg/dl) at this time compared to control group rabbits, which remained relatively stable (standard level) during all periods of observations at about (95 and 102 mg/dl). Generally speaking, there were significant differences (P<0.05) between both groups starting from day three and forward periods (Figure 1).

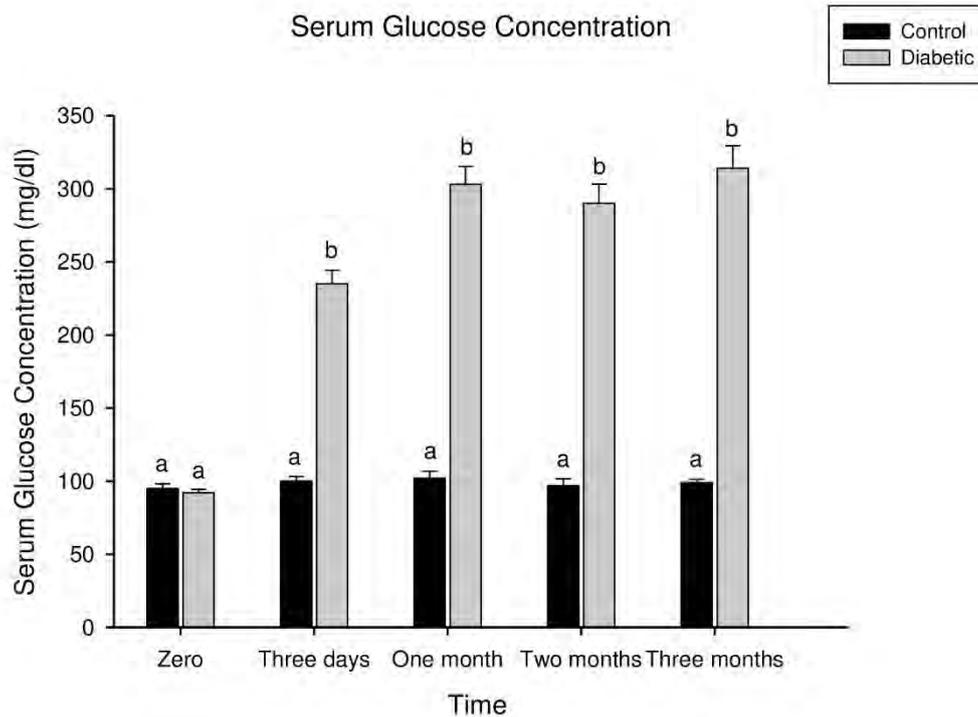


Figure 1: Mean serum glucose values (mg/dl) in two groups at different intervals. No.=12 rabbits/group. Means with different vertical superscripts represent significant differences at ($P < 0.05$) between the control and diabetic groups.

Serum testosterone assay

The testosterone values showed no significant ($P > 0.05$) difference between the control and diabetic groups at zero time. In contrast, testosterone levels decreased remarkably ($p < 0.05$) in the diabetic rabbits group with the advancement of experimental time. It was recorded (0.09 ± 0.00 ng/ml) at the end of the experiment compared to the control group (0.67 ± 0.15 ng/ml) (Figure 2).

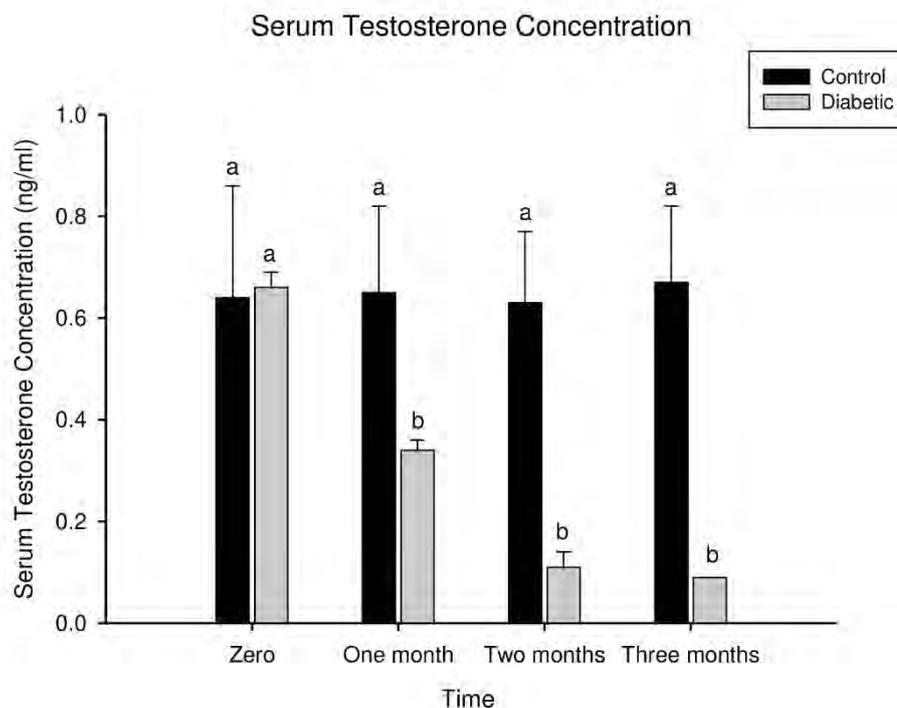


Figure 2: Mean testosterone values (ng/ml) in two groups at different intervals. No.=12 rabbits/group. Means with different vertical superscripts represent a significant difference ($P < 0.05$) between the control and diabetic groups.

Histopathological findings

Control group

Photomicrographs in control testes depict normal histo-architecture of the testes, which expresses Seminiferous Tubule (ST), which had a definite tubular basement membrane and lined by germ cells epithelium containing different types of germ cells; Spermatogonia lying on the basement membrane beneath it is the supporting Sertoli cells. The interstitial tissues found between ST contain interstitial cells or Leydig cells (Figure 3).



Figure 3: Histology in the testis of the control group shows ST lined by a basement membrane (blue arrow) containing spermatogonia (gray arrow) and Sertoli cells (black arrow), different stages of spermatozoa in the lumen (star) and interstitial tissue between the tubules containing Leydig cells (green arrow) (H&E; X400).

Diabetic group

Photomicrograph of the testis, one-month post-injection of Alloxan, showed atrophy of ST, which contains degenerated germ cells, thrombosis of tunica vasculosa with fibrosis of tunica albuginea and intertubular tissue (Figure 4). At two months, the testicular section revealed a decrease in epithelial cells of the ST and vacuolation of Sertoli cells (Figure 5) In another section, there was vacuolar degeneration of spermatogonia with the formation of intratubular multinucleated spermatid giant cells (Figure 6). At the end of the experiment (three months), the testicular section displayed necrosis of all ST with mononuclear cell infiltration around the remnant tubules (Figure 7), in addition to the configuration of ST, which devoided sperms, destruction, and sloughing of the basement membrane (Figure 8).

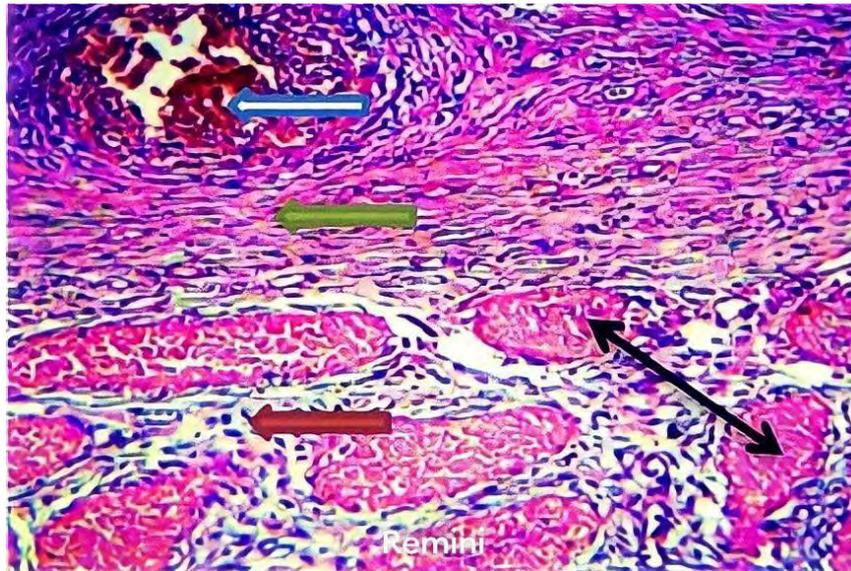


Figure 2. Photomicrograph in testis of diabetic group, one month post-injection of Alloxan show, atrophy of S.T. which contain degenerated germ cells (black arrow), thrombosis of tunica vasculosa (blue arrow) with fibrosis of tunica albuginea (green arrow) and intertubular tissue (red arrow) (H&E; X400).

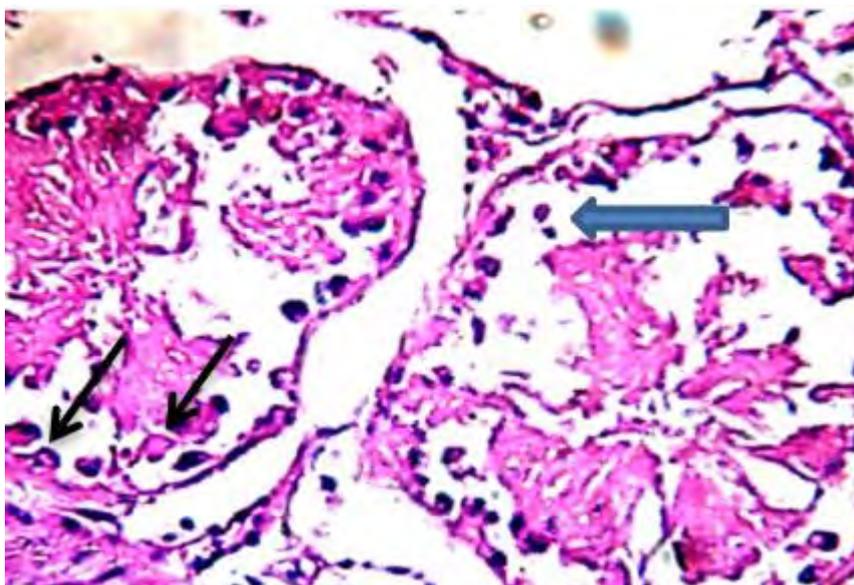


Figure 5. Photomicrographs in the testis of the diabetic group, two months post-injection of Alloxan, show a decrease in epithelial cells of the ST (blue arrows) and vacuolation of Sertoli cells (black arrows). (H&E; X400).

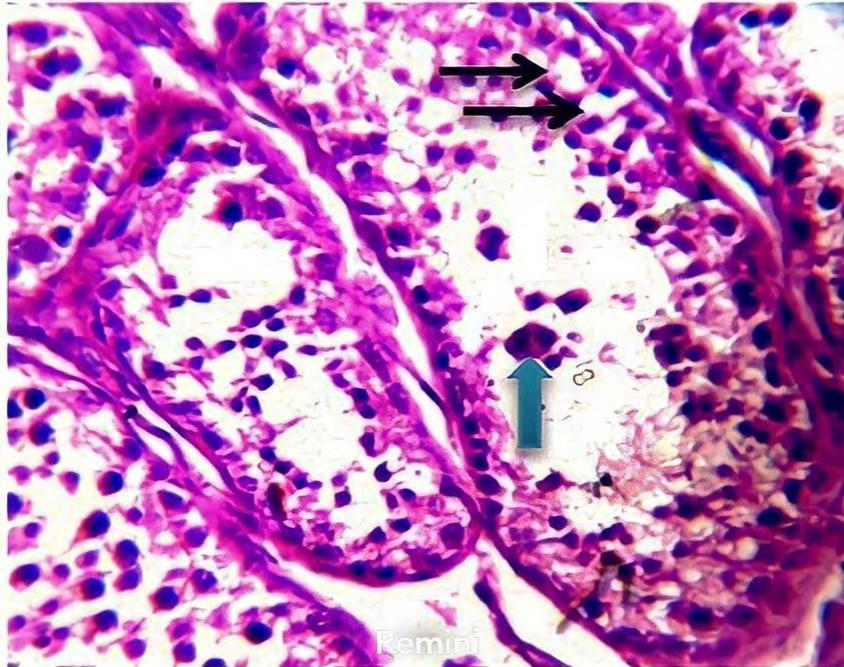


Figure 6. Photomicrograph in the testis of the diabetic group, two months post-injection of Alloxan, show vacuolar degeneration of spermatogonia (black arrows) with formation of intratubular multinucleated spermatid giant cell (blue arrow). (H&E; X400).

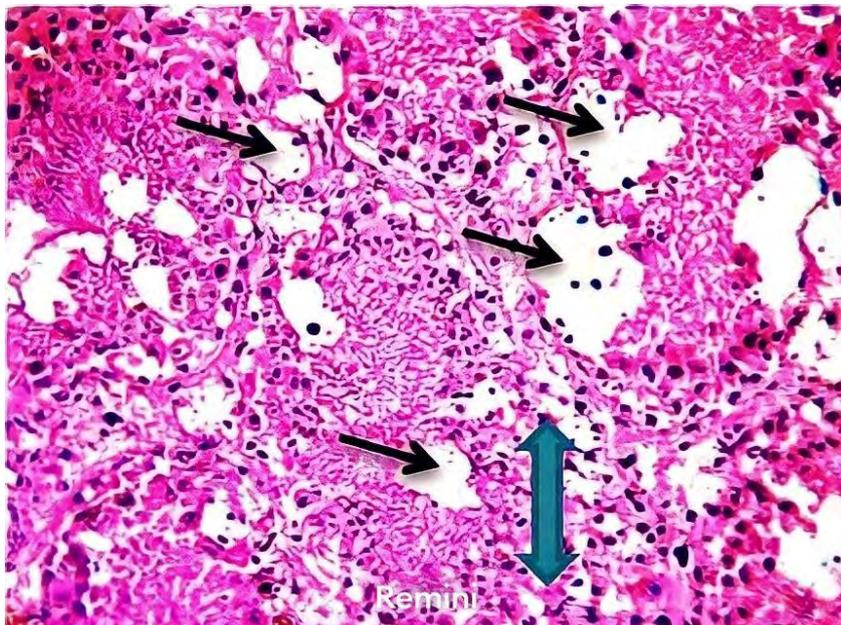


Figure 7. Photomicrographs in the testis of the diabetic group, three months post-injection of Alloxan, show necrosis of all ST (black arrows) with mononuclear cell infiltration around the remnant ST (blue arrow). (H&E; X400).



Figure 8. Photomicrograph in the testis of the diabetic group, three-month post-injection of Alloxan, shows the configuration of ST, which devoided sperms (black arrow), destruction and sloughing of the basement membrane (blue arrow) (H&E; X400).

DISCUSIÓN

The results of the present study declared that IP injection of a single dose of Alloxan induced a model of DM in rabbits. After three days, the hallmark feature was persistent hyperglycemia, which was monitored throughout the experiment in the diabetic group. These might be attributed to the specific, irreversible cytotoxic effect of Alloxan, which rapidly damages the β cells of the islets of Langerhans in the pancreas and subsequently results in a sharp reduction of insulin secretion from these cells and impairment of glucose uptake by muscle and fat cells, this interpretation was support by¹⁸ who reported that apparent increase in glucose level in Alloxan-induced diabetic rabbits was attributed to marked damage to β cells and reducing insulin secretion resulting in hyperglycemia. On the other hand, previous study¹⁹ suggested that Alloxan and its metabolites tend to concentrate in pancreatic islet tissue relative to some other tissue. The harmful effects of Alloxan, causing hyperglycemia, might be due to rapid inhibition of the insulin secretory mechanism.

Furthermore,²⁰ observed that glucose formation is promoted in insulin deficiency, partly due to increased conversion of glycogen to glucose but mainly by gluconeogenesis. Similarly, in an experimental trial in mice, Syiem reported that Alloxan is the most prominent diabetogenic chemical used in diabetes research²¹. It is a cytotoxic glucose analogue causing selective destruction of β -cells in the pancreas through the generation of reactive oxygen system (ROS), which causes severe anemia responsible for hyperglycemia and many other complications.

The clinical signs of hyperglycemia, as observed in studied rabbits, were constant with that noticed by²² when they induced diabetes in the dog at the same dose of Alloxan used in our study, which included polyuria, polyphagia, glycosuria, in-appetence, general weakness, depression and recumbency. Likewise,²³ recorded polydipsia, polyuria, and polyphagia in diabetic rats.

In the present work, it is noteworthy herein to mention that serum testosterone level was remarkably decreased in the diabetic group, which is one of the indicators of dysfunction in testicular androgen metabolism; this may be due to the diminished number of Leydig cells, which are responsible for the secretion of this hormone, evoked from the harmful effect of DM. This interpretation is fundamentally consistent with a previous study by²⁴ who noticed a decrease in testicular testosterone, which is associated with histological alterations in androgen target cells, i.e., Leydig cells. In an experimental trial,²⁵ have reported that hyperglycemia causes dysfunction of Leydig cells. Thus, these cells cannot secrete testosterone, which can cause a reduction of serum levels of this main androgenic hormone level in streptozotocin-induced diabetes in male rats.

The testis is a vital organ in the male reproductive system and is well vascularized; it is located in an "out-pocketing" of the abdominal cavity called the scrotum. Testes have dual functions, i.e., exocrine (spermatogenesis) and endocrine (synthesis of male hormones, mainly testosterone). Histologically, the testes are enclosed in a testicular tissue capsule through which blood vessels and nerves arrive and depart from the organ. The testes comprise three layers: tunica albuginea, tunica vaginalis, and tunica vasculosa²⁶.

The histological section of the normal testis in the present investigation showed cells, including spermatogonia and Sertoli cells, which were seen laying on the basement membrane of ST in addition to different stages of spermatozoa. The Leydig cells were present in between the tubules.

In our study, the diabetic group reflected atrophy of ST with aggregations of tissue debris representing dead germ cells in their lumen. Furthermore, vacuolation of Sertoli cells is a common feature of morphological injury of Sertoli cells and often accompanies generalized germinal cell degeneration/atrophy. This was indicative of the harmful effect of Alloxan. The present findings were in agreement with a study in rat²⁷.

Moreover, we noticed multi-core giant cells in the ST. Similarly, Cernochova and Kamarad observed multinucleated giant cells in some ST. At the same time, these cells were found in systemic, toxic, infectious, ischemic pathologies and in cryptorchidism, causing tubular atrophy²⁸.

Other histopathological sections in the current study in the diabetic group revealed an irregular shape of ST, which was devoid of germ cells, absence of Leydig cells, which was replaced by fibrous connective tissue containing mononuclear cells infiltration in addition to increased sloughing of germinal epithelium. This may be due to a lack of testosterone, which responds to the spermatogenesis process and finally causes histopathological damage in the testis. Monsees suggested that the decreased testosterone reflected on Sertoli cells function leads to loss of germ cells, loss of contact between them, reduction of the thickness of the seminiferous epithelium, and finally, destruction of testicular tissue²⁹. Moreover, it was speculated that the pathological changes of seminiferous epithelium may disrupt the Sertoli and germ cells and, therefore, spermatogenesis and may also lead to germ cell loss³⁰. Elshennawy and Abo Elwafa³¹ reported that spermatogonia are highly sensitive to toxicants because of their mitotic activity.

Moreover, the defects of spermatogonia will affect the development of the stages of spermatogenesis. Also, the present results declared that ST has various degrees of degeneration of spermatogonia with numerous apoptotic cells. These findings are in agreement with that were reported by Al-Damegh³².

CONCLUSIONES

In conclusion, the results of the current study reveal that DM in rabbits was successfully induced with a single dose of Alloxan via the IP route. It caused a marked elevation in serum glucose levels and a severely diminution of testosterone values. Furthermore, DM alters histomorphological parameters of testicles like testicular atrophy and degenerative changes in the testicles, which were prominent especially at the end of the experiment in the diabetic group compared to the control group and reduces sperm production in an animal model.

REFERENCIAS

1. Jerrold, M.O. Prospects for research in DM. *J. Am. Med. Assoc.*, 2001; 285:628-632.
2. Burski, K., Ueland, T., Maciejewski, R. Serum amylase activity disorders in the course of experimental diabetes in rabbits. *Vet. Med. Czech.*, 2004; 49:197-200.
3. Wong, J., Molyneaux, L., Constantio, M.I., Twing, S.M., Yue, DK. Metabolic syndrome in type 2 diabetes: *Diabet. Obes. Metabol.*, 2006; 8:690-697.
4. Bakýrel, T., Bakýrel, U., Yardibi, H. In vivo assessment of anti-diabetic and antioxidant activities in Alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol.*, 2008; 116: 64-73.

5. Hyvorinen, M., Qiao, Q., Tuomilehto, J., Laatikainen, T., Heine, R., Stegmayr, B. Hyperglycemia and stroke mortality: comparison between fasting and 2-hrs glucose criteria. *Diabetes Care*, 2009; 32:348-354.
6. Basit, A., Hydrie, M. Z., Hakeem, R., Masood, Q. Frequency of chronic complications of type II diabetes. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.*, 2004; 14:79-83.
7. Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P. Hormonal regulation of spermatogenesis *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008; 109:323-330.
8. Mohasseb, M., Ebied, S., Yehia, M.A., Hussein, N. Testicular oxidative damage and role of combined antioxidant supplementation in experimental diabetic rats. *J. Physiol. biochem.*, 2011; 67(2): 185-194.
9. Chikaodiri, H. O. Reproductive Physiology of Male Rabbits: A Key Factor in Buck Selection for Breeding. *Advances in Reprod. Sci.*, 2020; 8 (2): 37-42.
10. Misra, M., Aiman, U. Alloxan: An unpredictable drug for diabetes induction? *Indian J. Pharmacol.*, 2012; 44(4): 538-539.
11. Tripathi, V., Verma, J. Different models used to induce diabetes: a comprehensive review. *Int. J. Pharm. Sci.*, 2014; 6 (6):29-32.
12. Camkerten, I., Sindak, N., Ozkurt, G., Ipek, H., Biricik, H. S., Sahin, T. Effect of ketamine-xylazine anesthesia on some hematological and serum biochemical values of Bozova Greyhounds. *Veterinary faculty Dergisi Harran University*, 2013; 2(1): 27-31.
13. Saadla, S. A., Abdul-Hameed, K., Ghazanfar, A., Saadatull, A. K. Alloxan induced diabetes in rabbits. *Pak. J. of Pharmaco.*, 2005; 22 (2):41-45.
14. Orr, H. E., Roughan, J. V., Flecknell, P. A. Assessment of ketamine and medetomidine anesthesia in rabbits. *Vet. Anesth. Analg.*, 2005; 32: 271-275.
15. Khaleefa, M. A., Emran, H. A. Histopathological study of the effect of using repeated doses of platelet-rich plasma on articular cartilage repair in Rabbits. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 2022; 36(Supplement I): 203-210. doi: 10.33899/ijvs.2022.135928.2543
16. Chan JK. "The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology". *Int J Surg Pathol*. 2014; 22 (1): 12–32. doi:10.1177/1066896913517939. PMID 24406626.
17. Snedecor, G. W., Cochran, W. G. *Statistical Methods* 7th Ed. The Stae University Press American, Iowa 1982.
18. Arai, T., Nakamura, M., Magori, E., Fukuda, H., Sako, T. Changes in activities of enzymes related to energy metabolism in peripheral leukocytes of diabetic dogs with glycemic control by intensive insulin treatment. *Res. Vet. Sci.*, 2002; 73: 183-186.
19. Baynes, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40:405-412.
20. Kimmel, S.E., Ward, C.R., Hess, R.S. Familial insulin-dependent diabetes mellitus in dogs. *J. Am. Anim. Hospital Assoc.*, 2002; 38, 235-238.
21. Syiem, D., Syngai, G., Khup, P.Z., Khongwir, B.S., Kharbul, I. B., Kayang, H. Hypoglycemic effects of *Potentilla fulgens* L in normal and Alloxan- induced diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.*, 2002; 83(1-2): 55-61.
22. Kim, J.M., Chung, J.Y., Lee, S.Y., Young, H.Y. Hypoglycemic effects of vanadium on Alloxan induced diabetic dogs. *J. Vet. Sci.*, 2006; 7:391-395.
23. Jelodar, G., Khaksar, Z., Pourahmadi, M. Endocrine profile and testicular histomorphometry at puberty in rat offspring from diabetic mothers. *Comparative Clinical Pathology*, 2010; 19: 135-139.

24. Yang, Z. W., Kong, L. S., Guo, Y. Histological changes of the testis and epididymis in adult rats as a result of Leydig cells destruction after ethane dimethane sulfonate treatment: a morphometric study. *Asian J. of Andrology*, 2006; 8: 289-299.
25. Ogunyinka, B. I., Oyinloye, B. E., Kappo, A.P. Modulatory influence of *Parkia biglobosa* protein isolate on testosterone and biomarkers of oxidative stress in brain and testes of streptozotocin-induced diabetic in male rats. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, 2016; 8(3): 78-86.
26. Smith, L.B., Walker, W.H. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev. Biol.*, 2014; 30:2-13.
27. Anniballo, R., Ubaldi, F., Cobellis, L., Rienzi, L., Greco, E., Tesarik J. Criteria predicting the absence of spermatozoa in the Sertoli cell-only syndrome can be used to improve success rates of sperm retrieval. *Hum. Reprod.*, 2000; 15(11):2269-2277.
28. Cernochova, D., Kamarad, V. Toxic effect of lead of mice testicles after its administration with drinking water, *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae*, 1992; 133: 9-13.
29. Monsees, T. K., Franz, M., Gebhardt, S., Schill, W. B., Hayatpour, J. Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia*, 2002; 32:239-46.
30. Xie, B., Li, J., Zhu, W. Pathological changes of testicular tissue in normal adult mice: A retrospective analysis. *Exp. Ther. Med.*, 2014; 7(3): 654-656.
31. Elshennawy, W., Abo El-Wafa, H. Histological changes in mammalian testis under the effect of Hydrocortisone. *J. Am. Sci.*, 2011; 7(9): 38-48.
32. Al-Damegh, M.A. Rat testicular impairment induced by electromagnetic radiation and the protective effects of the antioxidants vitamins C and E. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012; 67:785-792.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Emran H, Habeeb K, Majeed A. The histomorphological appearance of the testes in Alloxan-induced diabetic rabbits. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 19. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.19>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Study of the protective effect of ginseng against testicular oxidative stress biomarkers and its gene expression induced by ciprofloxacin.

Haitham M. Mokhmar, Hozafa K. Elsayah, Mohamed M. Kandiel, Faten E. Elsaid, AbuBakr M. El-Mahmoudy

¹Department of Pharmacology, Benha College of Vet. Medicine, Benha, Qaliobia, Egypt.

*Corresponding author: hitthammohamed@gmail.com

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.20>

ABSTRACT

Ciprofloxacin is the first-choice member of the fluoroquinolone antibacterials for treating testicular infections, but it may harm testicular tissue because of oxidative stress. Many mechanisms are involved, like decreasing antioxidant enzymes and suppressing gene expression. This study intends to investigate the possible protective role of ginseng against ciprofloxacin-induced testicular oxidative stress and its mechanism, if any. For this purpose, 50 adult male albino rats were randomly divided into five groups, ten rats in each group. Rats in group 1 received only ciprofloxacin at a daily dose of 156.46 mg/kg. Rats in groups 2, 3 and 4 received ciprofloxacin in a daily dose of 156.46 mg/kg, ginseng in two doses of 100 and 200 mg/kg, and vitamin E as a standard in a daily dose of 100 mg/kg, respectively. Group 5 served as control and received carboxymethylcellulose in normal saline. All these treatments were applied orally during 14 14-day experimental courses. Half the animals in each group were euthanized on day 15 from the start of the treatment, while the second half was euthanized on day 60. Both testes were dissected, immediately frozen, and evaluated for oxidative stress biomarkers and gene expression antioxidant enzymes. We found that ciprofloxacin significantly ($P \leq 0.05$) increased MDA and decreased total antioxidant capacity (TAC), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) compared to the control group. Also, the drug downregulated gene expression of SOD and CAT. Compared to all groups, the co-administration of ginseng or vitamin E with ciprofloxacin almost normalized antioxidant enzymes and upregulated the tested gene expressions. It could be concluded that ginseng ameliorates the testicular adverse effect of ciprofloxacin. So, it is highly recommended to be used as an adjunct remedy during ciprofloxacin administration for its antioxidant properties.

Keywords: Ciprofloxacin, Gene expression, Ginseng, Infertility, ROS, Testicular oxidative stress, Vitamin-E.

INTRODUCCIÓN

Reactive oxygen species (ROS) potentially contribute to male infertility¹, leading to defective sperm function, metabolism and motility^{2,3}.

Oxidative stress describes when a system has imbalanced oxidation and reduction reactions leading to oxidative stress⁴, which can lead to nuclear and mitochondrial DNA damage and Y chromosomal changes⁵. Former studies reported that ciprofloxacin harmfully impacted male fertility via increasing testicular oxidative stress marked by depletion in SOD (Superoxide dismutase) and GPx (glutathione peroxidase)⁶⁻⁸. Ciprofloxacin is effective in the treatment of a wide variety of infections, particularly those caused by *Gram-negative* pathogens and is considered to be the best choice for patients with complicated urinary tract infections⁹, also frequently prescribed by fertility specialists in the therapy of many types of bacterial infections when leukocytospermia or before in vitro fertilization program⁵.

Daily 400 mg/kg of ciprofloxacin for 7 days induced elevation in oxidative stress biomarkers¹⁰. Also, high doses of ciprofloxacin and enrofloxacin increase blood oxidative stress¹¹.

Ginseng is the most frequently used herbal medicine for immune system stimulation and as an adjuvant with prescribed drugs¹². It is effective in the treatment of male infertility. It has been shown to induce testicular growth, increase the production of spermatozoa and testosterone levels, and sexual activity in animals¹³. Ginseng inhibits oxidative stress in rats, which lowers lipid peroxidation and increases antioxidant capacity¹⁴.

So, we hypothesize that ginseng as an antioxidant could protect from infertility caused by oxidative stress induced by ciprofloxacin.

The adverse effect of ciprofloxacin on testicular tissue via oxidative stress has been demonstrated to achieve this objective.

MATERIALES Y MÉTODOS

Drug preparation

Ciprofloxacin was purchased as a generic pharmaceutical preparation Serviflox® with a concentration of 750 mg of ciprofloxacin in one tablet manufactured by Novartis Pharma-Cairo, under the license of Sandoz GmbH-Australia. The tablets were crushed and diluted with CMC (carboxymethylcellulose) in NS (normal saline) to a final volume of 1ml /rat dose. Ginseng was purchased with the generic name Ginsana® with a concentration of 100 mg of ginseng in one capsule manufactured by Egyptian International Pharmaceutical Industries Company (EIPICO). The capsules were opened and diluted with CMC in NS to a final 1ml /rat dose volume. Vitamin E was purchased with the generic name vitamin-E 1000® with a concentration of 1000 mg of vitamin E in each capsule manufactured by Pharco Pharmaceuticals. The capsules were opened and diluted with sunflower oil to a final volume of 1ml /rat dose.

Animals

Fifty adult Wister albino male rats, 8 weeks old and weighing 200±20g, were used. They were obtained from Animal House, Faculty of Veterinary Medicine, Benha University. Male rats were housed at average room temperature (30°C), humidity (40-60%) and 12h/12h dark/ light cycle prior to the start of the experiment. The animals were fed laboratory formula¹⁵ and tap water *ad libitum*.

Study design

After two weeks of adaptation to a standard diet, male rats were randomly divided into five groups, with ten in each group. Rats in group 1 received ciprofloxacin in daily doses 156.46 mg/kg¹⁶. Rats in groups 2, 3 and 4 received ciprofloxacin in a daily doses of 156.46 mg/kg and ginseng in two doses of 100 and 200 mg/kg¹⁷ and vitamin E in a daily doses of 100 mg/kg, respectively. Group 5 served as control and received 1 ml carboxymethyl cellulose in normal saline. All treatments were orally administered for 14 days. Half the animals in each group were sacrificed by euthanasia using ether¹⁸ on day 15 from the start of the treatment (1st euthanasia). In contrast, the second half was sacrificed by euthanasia¹⁸ on day 60 from the start of the treatment (2nd euthanasia). Testis were immediately removed, frozen, and evaluated for oxidative stress biomarkers and gene expression antioxidant enzymes.

Sampling

Immediately after euthanasia, one testis from each animal was dissected, weighed and divided into two parts.

- 1- Testicular tissue samples for testicular oxidative stress biomarker concentrations were collected by centrifugation of the first part of the testis after homogenization with a phosphate buffer solution at pH 7.4 at 1500 xg for 5 minutes at 4° C¹⁹. The supernatant was taken out and preserved at -20° C. till used analysis of testicular oxidative stress markers: MDA (Malondialdehyde) concentration, SOD activity, total antioxidant capacity and CAT (catalase) activity.
- 2- Testicular tissue samples for testicular gene expression were collected and immediately kept at – 80° C until the expression of testicular gene expression of antioxidant enzymes was quantified. Using a Qiagen RNeasy® Mini kit, total RNA was extracted from the frozen samples following the manufacturer's protocol. RNA was determined by using Spectro star Nanodrop (BMG LABTECH®) according to the high-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Bio systems) protocol. Real-time polymerase chain reaction for each gene was carried out using (Quanti Tect SYBR Green PCR Kit, Qiagen), 1 µM of each forward and reverse primer for each gene (Table 1), and The real-time PCR equipment used the comparative CT method to calculate the changes in gene expression²⁰.

Primer	Forward sequence	Reverse sequence
B-actin	AGAAGAGCTATGAGCTGCCTGACG	CTTCTGCATCCTGTCAGCGATGC
Catalase	ACACTTTGACAGAGAGCGGA	TTTCACTGCAAACCCACGAG
GPx	GACCGACCCCAAGTACATCA	GCAGGGCTTCTATATCGGGT
SOD	GCGTCATTCACCTCGAGCAG	GGTCTCCAACATGCCTCTCT

Table 1: Primer forward and reverse sequences for gene expression analysis.

Statistical analysis

The multi-group comparisons were carried out using the one-way analysis of variance (ANOVA) technique, followed by post hoc Tukey's test for pairwise comparison at a 0.05 significance level. They were using GraphPad prism program²¹.

Ethics statement

The experiment was conducted in the Departments of Pharmacology and Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Benha University, with the ethical approval number BUFVMTM 090422.

RESULTADOS

Effect of ciprofloxacin alone and with ginseng or vitamin E on testicular oxidative stress biomarkers:

As shown in Figure 1, on the 15th day from the start of treatment, group 1, which was treated with ciprofloxacin, only showed a significant increase in MDA. However, adding ginseng or vitamin E normalized MDA compared to control. However, group 3, which received a high dose of ginseng, showed a significant decrease in MDA compared to the control. CAT, TAC (total antioxidant capacity) and SOD enzyme activity were reduced in the group treated with ciprofloxacin compared to the control group ($P < 0.05$). However, adding ginseng or vitamin E with ciprofloxacin normalizes CAT, TAC and SOD enzyme activity. However, the group treated with a high dose of ginseng showed a higher increase in SOD enzyme activity than group 4, which received vitamin E, and the control group, Figure 2A.

On the 60th day of treatment, all groups have been approximately returned to normal figures 1-2.

Effect of ciprofloxacin alone and with ginseng or vitamin E on antioxidant gene expression

As shown in Figure 3, on the 15th day of treatment, group 1, which received ciprofloxacin, showed significant downregulation of relative gene expression of CAT, GPx and SOD genes compared with all groups. However, supplementation of ginseng or vitamin E with ciprofloxacin approximately normalized the relative gene expression of CAT, GPx and SOD compared to the control group ($P < 0.05$). Also, group 3, which received a high dose of ginseng with ciprofloxacin, showed a higher significant upregulation of relative gene expression of CAT, GPx and SOD compared with group 2 and group 4.

On the 60th day from the start of treatment, all groups returned approximately to normal compared with the control group Figure 3.

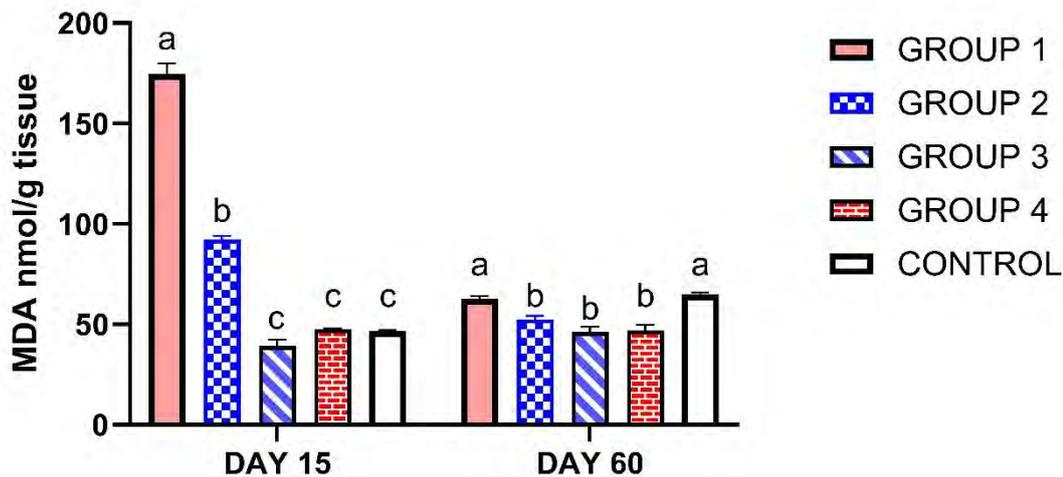


Figure 1: Influence of ciprofloxacin with or without ginseng or vitamin E administration on oxidative stress biomarker MDA obtained from rats' testis. Columns bearing different superscript letters on the same sacrifice day differ significantly at $p < 0.05$ in Tukey's multiple comparison post hoc test. (Group 1) treated with ciprofloxacin only. (Group 2) Moreover, (group 3) was treated with ciprofloxacin and ginseng at a low dose and ginseng high dose. (Group 4) treated with ciprofloxacin and vitamin E. (Group 5) serve as control. MDA: Malondialdehyde.

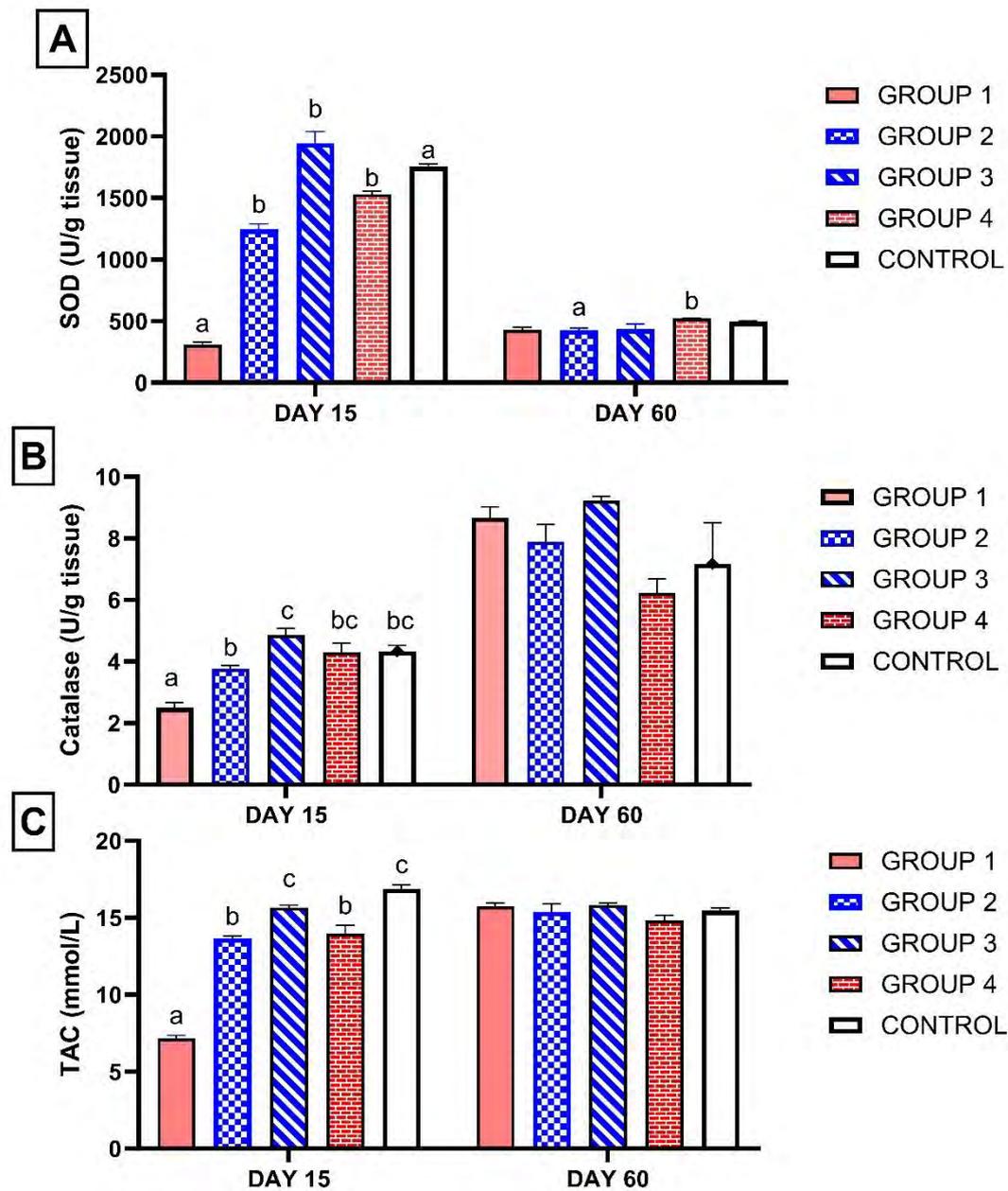


Figure 2: Influence of ciprofloxacin with or without ginseng or vitamin E administration on antioxidant enzymes SOD, Catalase, TAC obtained from rats' testis. Columns bearing different superscript letters on the same sacrifice day differ significantly at $p < 0.05$ in Tukey's multiple comparison post hoc test. (Group 1) treated with ciprofloxacin only. (Group 2) Moreover, (group 3) was treated with ciprofloxacin and ginseng at a low dose and ginseng at a high dose relatively. (Group 4) treated with ciprofloxacin and vitamin E. (Group 5) serve as control. SOD: superoxide dismutase. TAC: total antioxidant capacity.

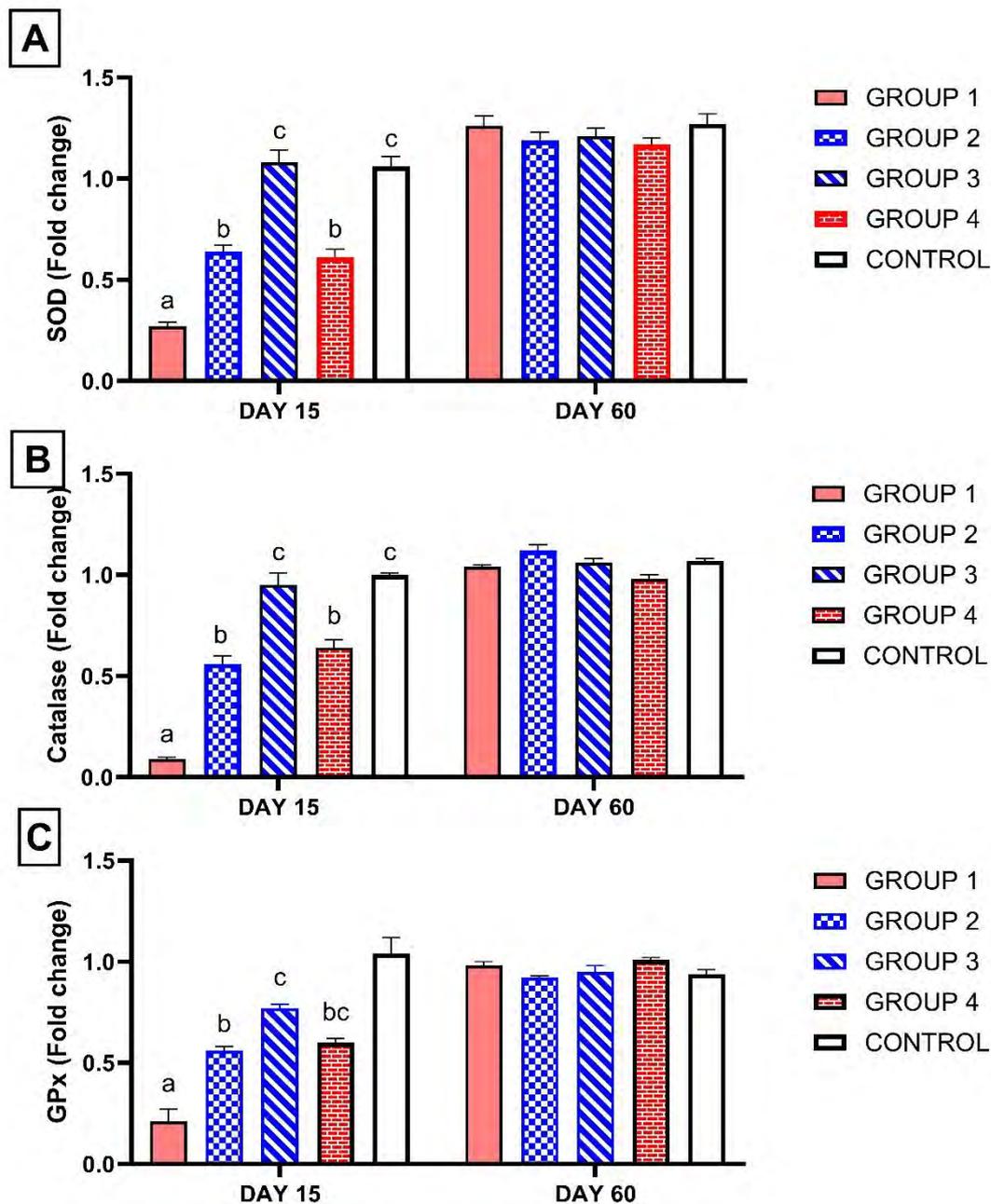


Figure 3: Influence of ciprofloxacin with or without ginseng or vitamin E administration on relative gene expression analysis of antioxidant enzymes obtained from rats' testis. Columns bearing different superscript letters on the same sacrifice day differ significantly at $p < 0.05$ in Tukey's multiple comparison post hoc test. (Group 1) treated with ciprofloxacin only. (Group 2).

Moreover, (group 3) was treated with ciprofloxacin and ginseng at a low dose ginseng high dose relatively. (Group 4) treated with ciprofloxacin and vitamin E. (Group 5) serve as control. GPx: glutathione peroxidase. SOD: superoxide dismutase.

DISCUSIÓN

The presented study is to evaluate the protective effect of ginseng against ciprofloxacin-induced oxidative stress causing male infertility. Many previous studies have demonstrated that ciprofloxacin-induced oxidative stress affects sperm parameters and function, leading to male infertility. In the present study, ciprofloxacin significantly increased MDA and decreased antioxidant enzyme activities (SOD, GPX and TAC). These

results are consistent with former reports^{6-8, 22}. Ciprofloxacin is mainly related to reactive oxygen species (ROS) generation, besides metabolism-related toxicity²³. A rise in MDA indicates testicular cell injury, accompanied by a reduction in sperm motility and sperm-oocyte fusion.^{24, 25} There are many possible mechanisms for oxidative stress causing infertility related to damage of spermatozoa because its membrane consists of polyunsaturated fatty acids, which are susceptible to lipid peroxidation²⁶. Another hypothesis is that H₂O₂ can cross the membranes into the cells and inhibit the activity of some enzymes, such as G₆PD, which leads to the accumulation of oxidized and reduced glutathione, which leads to reducing the antioxidant defenses of the spermatozoa²⁷. Also, oxidative stress is associated with reduced fertilization, miscarriage and congenital disabilities in the offspring due to several modifications leading to sperm DNA damage²⁸⁻³⁰. Ciprofloxacin also induced a significant down-regulation of antioxidant gene expression after administration of 800 mg/kg/day for 15 days³¹.

We found that groups treated with ginseng in two doses showed significant improvement in testicular function via increasing antioxidant enzyme activity (SOD, TAC and GPX) but decreasing in MDA with high dose only. These findings concern previous studies^{13, 14, 32, 33}. Furthermore, another study found a reduction in MDA besides an increase in SOD, CAT and GPX in rats supplemented with ginseng³⁴. The ginseng root contains many amino acids, vitamins A, B₂, B₁₂, C, and E and metals like sodium, potassium, calcium, phosphorus, iodine, iron, zinc, copper and selenium³⁵. This component enhanced the antioxidant protective role by decreasing MDA, the end product of lipid peroxidation and a marker for tissue damage¹⁴. The accumulation of MDA³⁶ evidenced the extensive lipid peroxidation. Also, another study reported that administering ginseng in humans for 8 weeks decreased MDA but increased SOD and CAT activities³⁷. So, a decrease in MDA indicates ginseng's antioxidant activity.

SOD defends against oxygen free radicals, which are responsible for damage to the plasma membrane and biological structures, causing an elevation in the intracellular Ca²⁺ ion concentration leading to irreversible conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase³⁸. Also, it may be due to increasing antioxidant enzyme activities by increasing scavenger of H₂O₂, preventing the formation of free radicals³⁹. So, the formation of free radicals is inhibited due to the increased activity of SOD due to ginseng administration.

Catalase and GPx are essential in detoxifying H₂O₂¹⁴ and indirectly protecting cells⁴⁰. The increase in CAT activity is thought to be due to degrade H₂O₂ produced by SOD activity. Also, ginseng enhanced sex hormone levels, testicular structure, and redox status and has more antioxidant activity than Tribulus Extracts and Pollen Grains⁴¹. Generally, these results indicated that ginseng has protective effects against ciprofloxacin-induced oxidative stress by increasing antioxidant activity and gene expression⁴². In the same respect, another study reported that ginseng induced a protective role against alcohol-induced hepatic injury in mice by upregulating the gene expression of the antioxidant enzymes⁴³. These results are also consistent with a previous study that suggested that ginseng inhibited cardiomyocyte apoptosis by inhibiting the expression of the pro-apoptotic Bax gene in rats⁴⁴.

In the present study, the group treated with ciprofloxacin beside vitamin E showed an increased antioxidant enzyme activity and upregulated its gene expression. Consistently, a study that treated 100 Parkinson's disease patients with vitamin E reported that it had a potential therapeutic target for disease-modifying treatments via activating cellular pathways involved in antioxidant and anti-inflammatory responses⁴⁵.

Furthermore, another study reported that despite ginseng 100 mg/kg/day have superior outcomes in liver protection than vitamin E 100 mg/kg/day, their antioxidant properties were similar, and this was evidenced by nearly absence of differences in liver tissue MDA, SOD or CAT levels in both treated groups⁴⁶. Also, rats treated with vitamin E or Panax ginseng concomitant with levofloxacin significantly improve biochemical and antioxidant parameters⁴⁷.

CONCLUSIONES

Ciprofloxacin causes testicular damage by increasing the oxidative stress. However, adding ginseng or vitamin E supplementary with ciprofloxacin offers significant protection from the oxidative stress induced by ciprofloxacin treatment. So, ginseng may have a protective effect against ciprofloxacin-induced gonadotoxicity.

REFERENCIAS

1. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1943;138(3):512-8.
2. Totic J, Walton A. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. *Nature*. 1946;158(4014):485-.
3. Alvarez JG, Storey BT. Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1984;30(4):833-41.
4. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian journal of andrology*. 2011;13(1):43.
5. Bui A, Sharma R, Henkel R, Agarwal A. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia*. 2018;50(8):e13012.
6. Mokhmar HM, Kandiel MM, Amin AA, Elsayah HK, El Mahmoudy AM. Ciprofloxacin and levofloxacin adversely affect male infertility indicated by pharmacological, andrological and pathological evidence. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 2020;9(2):353.
7. Albesa I, Becerra MC, Battán PC, Páez PL. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;317(2):605-9.
8. Talla V, Veerareddy P. Oxidative stress induced by fluoroquinolones on treatment for complicated urinary tract infections in Indian patients. *Journal of Young Pharmacists*. 2011;3(4):304-9.
9. Krcmery S, Naber K, German Ciprofloxacin U, Group US, Naber K, R Barth M, et al. Ciprofloxacin once versus twice daily in the treatment of complicated urinary tract infections. *International journal of antimicrobial agents*. 1999;11(2):133-8.
10. AbdEl-Aziz AA, Naguib Y, Zahran WA, Mahrous H, Khalil H, El-Nahas SA. Detection of oxidative stress induced by ciprofloxacin in immature rat. *Research Journal of Applied Biotechnology*. 2018;4(1):77-81.
11. Srinivasu M, Singh S, Ahmad A, Pathak A. Effect of enrofloxacin and ciprofloxacin on oxidative stress in rats. *Journal Of Veterinary Pharmacology And Toxicology*. 2022;21(1):80-2.
12. Choi M-K, Song I-S. Interactions of ginseng with therapeutic drugs. *Archives of pharmacal research*. 2019;42:862-78.
13. Eskandari M, Ghalyanchi Langeroudi A, Zeighami H, Rostami A, Kazemi M, Eyni H, et al. Co-administration of ginseng and ciprofloxacin ameliorates epididymo-orchitis induced alterations in sperm quality and spermatogenic cells apoptosis following infection in rats. *Andrologia*. 2017;49(3):e12621.
14. Ramesh T, Kim S-W, Hwang S-Y, Sohn S-H, Yoo S-K, Kim S-K. Panax ginseng reduces oxidative stress and restores antioxidant capacity in aged rats. *Nutrition research*. 2012;32(9):718-26.
15. Council NR. Nutrient requirements of laboratory animals: 1995. 1995.
16. Mokhmar H, Elsayah HK, Kandiel MM, Amin A, Abdallah FE, El-Mahmoudy A. The protective potential of ginseng on ciprofloxacin-induced male gonadotoxicity. *Benha Veterinary Medical Journal*. 2022;42(2):114-9.
17. Lee M, Lee S-H, Kim M-S, Ahn K-S, Kim M. Effect of Lactobacillus dominance modified by Korean Red Ginseng on the improvement of Alzheimer's disease in mice. *Journal of ginseng research*. 2022;46(3):464-72.
18. Blackshaw J, Fenwick D, Beattie A, Allan D. The behaviour of chickens, mice and rats during euthanasia with chloroform, carbon dioxide and ether. *Laboratory Animals*. 1988;22(1):67-75.
19. O'Shaughnessy P. Age-dependent differences in testicular inactivation of FSH and in inhibition of FSH binding to rat testis. *Biology of Reproduction*. 1979;20(5):1009-14.
20. Gasparino E, Del Vesco A, Voltolini D, Nascimento CD, Batista E, Khatlab A, et al. The effect of heat stress on GHR, IGF-I, ANT, UCP and COXIII mRNA expression in the liver and muscle of high and low feed efficiency female quail. *British poultry science*. 2014;55(4):466-73.
21. Swift ML. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. *Journal of chemical information and computer sciences*. 1997;37(2):411-2.

22. Becerra M, Albesa I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;297(4):1003-7.
23. Badawy S, Yang Y, Liu Y, Marawan MA, Ares I, Martinez M-A, et al. Toxicity induced by ciprofloxacin and enrofloxacin: oxidative stress and metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*. 2021;51(9):754-87.
24. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. 2005.
25. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*. 2009;16(5):449-57.
26. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility*. 2003;79(4):829-43.
27. Griveau J, Dumont E, Renard P, Callegari J, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Reproduction*. 1995;103(1):17-26.
28. Lewis S, Aitken R. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and tissue research*. 2005;322(1):33-41.
29. Bungum M, Bungum L, Lynch KF, Wedlund L, Humaidan P, Giwercman A. Spermatozoa DNA damage measured by sperm chromatin structure assay (SCSA) and birth characteristics in children conceived by IVF and ICSI. *International journal of andrology*. 2012;35(4):485-90.
30. Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*. 2016;28(2):1-10.
31. Naguib YM, Motawea SM, Ameen O. Replenishing glutathione counters ciprofloxacin-induced acute liver failure via possible gene modifying mechanism. *Bulletin of Egyptian Society for Physiological Sciences*. 2021;41(4):525-36.
32. Won Y-J, Kim B-k, Shin Y-K, Jung S-H, Yoo S-K, Hwang S-Y, et al. Pectinase-treated *Panax ginseng* extract (GINST) rescues testicular dysfunction in aged rats via redox-modulating proteins. *Experimental Gerontology*. 2014;53:57-66.
33. Lim KH, Ko D, Kim J-H. Cardioprotective potential of Korean Red Ginseng extract on isoproterenol-induced cardiac injury in rats. *Journal of Ginseng Research*. 2013;37(3):273.
34. Kim M-H, Lee E-J, Cheon J-M, Nam K-J, Oh T-H, Kim K-S. Antioxidant and hepatoprotective effects of fermented red ginseng against high fat diet-induced hyperlipidemia in rats. *Laboratory animal research*. 2016;32(4):217-23.
35. Choi M-K, Kang M-H, Kim M-H. The analysis of copper, selenium, and molybdenum contents in frequently consumed foods and an estimation of their daily intake in Korean adults. *Biological trace element research*. 2009;128(2):104-17.
36. Ali MB, Hahn EJ, Paek K-Y. Protective role of *Panax ginseng* extract on lipid peroxidation and antioxidant status in polyethylene glycol induced *Spathiphyllum* leaves. *Biochemical Engineering Journal*. 2006;32(3):143-8.
37. Kim S-H, Park K-S. Effects of *Panax ginseng* extract on lipid metabolism in humans. *Pharmacological Research*. 2003;48(5):511-3.
38. Kim H-J, Lee S-G, Chae I-G, Kim M-J, Im N-K, Yu M-H, et al. Antioxidant effects of fermented red ginseng extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ginseng Research*. 2011;35(2):129.
39. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition*. 1996;16(1):33-50.
40. Kitahara A, YAMAZAKI T, ISHIKAWA T, CAMBA EA, SATO K. Changes in activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase during chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *GANN Japanese Journal of Cancer Research*. 1983;74(5):649-55.
41. Mansour AT, Alsaqufi AS, Omar EA, El-Beltagi HS, Srour TM, Yousef MI. Ginseng, Tribulus extracts and pollen grains supplementation improves sexual state, testes redox status, and testicular histology in Nile Tilapia Males. *Antioxidants*. 2022;11(5):875.
42. Naval M, Gomez-Serranillos M, Carretero M, Villar A. Neuroprotective effect of a ginseng (*Panax ginseng*) root extract on astrocytes primary culture. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;112(2):262-70.

43. Li Y-G, Ji D-F, Zhong S, Shi L-G, Hu G-Y, Chen S. Saponins from *Panax japonicus* protect against alcohol-induced hepatic injury in mice by upregulating the expression of GPX3, SOD1 and SOD3. *Alcohol & Alcoholism*. 2010;45(4):320-31.
44. Liu Z, Li Z, Liu X. Effect of ginsenoside Re on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2/Bax gene after ischemia and reperfusion in rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2002;22(4):305-9.
45. Schirinzi T, Martella G, Imbriani P, Di Lazzaro G, Franco D, Colona VL, et al. Dietary Vitamin E as a protective factor for Parkinson's disease: clinical and experimental evidence. *Frontiers in Neurology*. 2019;10:148.
46. Abdelfattah-Hassan A, Shalaby SI, Khater SI, El-Shetry ES, Abd El Fadil H, Elsayed SA. Panax ginseng is superior to vitamin E as a hepatoprotector against cyclophosphamide-induced liver damage. *Complementary Therapies in Medicine*. 2019;46:95-102.
47. Ibrahim H, Mahmoud N, Abd El-Mottleb D, Khatab H. Ameliorative effect of vitamin e and panax ginseng against some adverse effects of levofloxacin in male rats. *J Anim Health Prod*. 2021;9(4):512-23.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Mokhimar H. M., Elsayah H. K., Kandiel M. M., Elsaid F. E., El-Mahmoudy A. M.. Study of the protective effect of ginseng against testicular oxidative stress biomarkers and its gene expression induced by ciprofloxacin. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 20. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.20>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Estado nutricional y disminución de fuerza muscular en pacientes hospitalizados Nutritional status and decreased muscle strength in hospitalized patients

Claudia P. Maza Moscoso^{1*}, Isabel Calvo Higuera², Andrea Gómez Carrillo², Tania Abril³, Evelyn Frías-Toral⁴

^{1*}Centro Médico Militar, Guatemala, Guatemala; E-mail: cmaza34@hotmail.com
ORCID ID:0000-0002-4321-9366

²Hospital General de Tijuana, México; E-mail: draisabelcalvoh@gmail.com ORCID ID:0000-0002-4321-9366; E-mail: gomezc.andrea1@gmail.com ORCID ID: 0000-0002-9844-0439

³School of Medicine. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil 090615, Ecuador; E-mail: tania.abril@cu.ucsg.edu.ec ORCID ID: 0000-0003-0214-3518

⁴ Universidad Espíritu Santo, Samborondón, 0901952, Ecuador; E-mail: evelynft@gmail.com ORCID ID: 0000-0002-2228-0141

*Correspondence: tania.abril@cu.ucsg.edu.ec Tel.: 593.999675342

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.21>

RESUMEN

Existe un alto riesgo de malnutrición en pacientes hospitalizados, sobre todo en adultos mayores o con múltiples comorbilidades. El presente estudio tuvo como objetivo describir la FPM en pacientes hospitalizados en dos centros hospitalarios de Latinoamérica. Retrospectivo y observacional. De un universo poblacional de 169 pacientes de entre 19 y 98 años, 127 conformaron la muestra estudiada. Se recolectaron datos demográficos, diagnóstico médico de base, peso, talla y FPM al ingreso y a los 14 días. Se realizó análisis estadístico con medidas de tendencia central. La edad media que prevaleció fue de $70,9 \pm 17$ años centro 1 y 55 ± 19 años centro 2. La FPM fue mayor en pacientes normo nutridos que aquellos con bajo peso en ambos centros. También fue mayor en comparación con aquellos con obesidad clase III del centro mexicano y obesidad clase I y II del centro guatemalteco. La FPM disminuyó en todos los pacientes del centro guatemalteco mientras que en el mexicano solo en aquellos con bajo peso, obesidad II y III. La FPM baja estuvo asociada a aquellos pacientes con bajo peso, pero también en aquellos con algún grado de malnutrición por exceso.

Palabras clave: Dinamometría; fuerza de presión manual; malnutrición; evaluación nutricional.

ABSTRACT

There is a high risk of malnutrition in hospitalized patients, especially in older adults or with multiple comorbidities. This study aimed to describe the HGS in patients from two hospitals in Latin America. Retrospective,

observational study carried out from February to May 2022. From a universe of 169 patients between 19 and 98 years of age, 127 comprised the sample studied. Demographic data, baseline medical diagnosis, weight, height, and HGS were collected at admission and on the 14th day. Statistical analysis was performed with measures of central tendency. The more frequent mean age was 70.9 ± 17 years at center 1 and 55 ± 19 years at center 2. The HGS was higher in normally nourished patients than those with low weight in both centers. It was also higher than those with class III obesity from the Mexican center and class I and II obesity from the Guatemalan center. The HGS decreased in all the patients of the Guatemalan center while in the Mexican only in those with low weight, obesity II and III. The low HGS was associated with patients with low weight and those with some degree of malnutrition due to excess.

Keywords: Dynamometry; hand grip strength; malnutrition; nutritional assessment.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la evidencia actual, del 30–50% de los pacientes hospitalizados con múltiples comorbilidades, se encuentran en riesgo de malnutrición. El estar malnutrido y, sobre todo, la malnutrición asociada a la enfermedad se relaciona con mayor riesgo de morbimortalidad, deterioro funcional y aumento de los días de estancia intrahospitalaria, así como costos sanitarios ¹.

Durante la hospitalización, existen varios factores contribuyen a un deterioro mayor del estado nutricional. Entre estos factores están anorexia relacionada a la inflamación, postración, respuesta inflamatoria y metabólica al estrés ².

La ingesta reducida de nutrientes lleva a un deterioro nutricional por déficit de energía y proteínas. Todo esto, junto a la inmovilización prolongada, resulta en pérdida de masa y fuerza muscular, disminución de la capacidad funcional, aumento en la susceptibilidad de complicaciones y riesgo de mortalidad ². Los criterios fenotípicos y etiológicos para el diagnóstico de la desnutrición, según los criterios La Iniciativa Global de Liderazgo en Desnutrición (GLIM), muestran una relación entre la pérdida de peso 5 %-10 % en los últimos 6 meses o 10% a 20% en más de 6 meses y el déficit de masa muscular reducida de leve a moderada ³.

Varios estudios han documentado la asociación entre anormalidades nutricionales y eventos adversos ^{4,5}. La malnutrición afecta seriamente las fibras músculo esqueléticas, incluyendo los músculos respiratorios y sistema cardiovascular ⁴. La disminución de la masa muscular y la fuerza es un hallazgo frecuente en el paciente hospitalizado lo cual se correlaciona con el estado nutricional siendo un factor de riesgo claramente establecido ^{6,7}. Otros factores asociados a una FPM reducida son antecedentes de tabaquismo, anemia, diabetes, Índice de Masa Corporal (IMC) disminuido, entre otros ⁸.

Las medidas de fuerza de diferentes músculos han sido desarrolladas para aplicación clínica y son útiles para la evaluación nutricional, pueden ofrecer ventajas como bajo costo, no son invasivas y hay poca variabilidad entre mediciones de diferentes observadores ². La FPM es un instrumento de evaluación muy utilizado como parte de la evaluación en múltiples afecciones clínicas, es un método no invasivo, económico, portátil y fácil de usar ⁹.

La FPM es una herramienta complementaria, utilizada por varias guías de práctica clínica ^{10,11} para proveer información sobre la severidad de la malnutrición. Speranza y cols., en su estudio con 207 pacientes ingresados por el área de emergencia para hospitalización en el área clínica o quirúrgica de un hospital italiano, encontró una asociación de valores disminuidos de FPM (menores a 16 en mujeres y menores a 27 en varones) con puntajes bajos según la Valoración Global Subjetiva (VGS-c) y con un Cribado de Riesgo Nutricional 2002

(NRS-2002) ≥ 3 ^{12,13}. La Iniciativa GLIM, lo incluyó como un criterio básico, para diagnosticar la desnutrición en adultos en entornos clínicos u hospitalarios. Sin embargo, aún no está claro si puede utilizarse para brindar una terapia nutricional individualizada, identificando una adecuada respuesta al tratamiento nutricional³.

La dinamometría, en conjunto con otras mediciones y/o evaluaciones, es un método de medición de la fuerza muscular que posee alta sensibilidad y especificidad en la detección precoz de variaciones en el estado nutricional⁹.

Según ASPEN la dinamometría constituye uno de los 6 criterios que ayudan a definir la malnutrición¹⁴. El Dinamómetro es un instrumento económico, portátil, no invasivo y fácil de usar, que permite valorar la fuerza muscular alcanzable y fuerte predictor de malos resultados en pacientes con hospitalización prolongada¹⁵. Por lo cual el presente estudio de investigación tiene el objetivo de describir la FPM en pacientes hospitalizados en 2 centros de salud.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente es un estudio de cohorte retrospectivo en el que se revisaron las historias clínicas de los pacientes de dos hospitales de tercer y segundo nivel de Guatemala y México. Los servicios de donde se obtuvo la información fueron servicios de cirugía, medicina interna y geriatría donde estaban ingresados pacientes adultos de ambos sexos. Del total de pacientes atendidos en dichos servicios durante el periodo de febrero de 2022 hasta mayo 2022, se incluyeron en la muestra estudiada aquellos mayores de 19 y 98 años, que pudieran usar el dinamómetro y que aceptaron participar. Los pacientes que tenían alguna limitación para los movimientos con ambos brazos o manos, alteración del estado de alerta, pacientes bajo sedación, pacientes con ventilación mecánica, desorientados en tiempo y espacio, aquellos que estuvieron hospitalizados por menos de 24 horas fueron excluidos del estudio. (Figura 1)

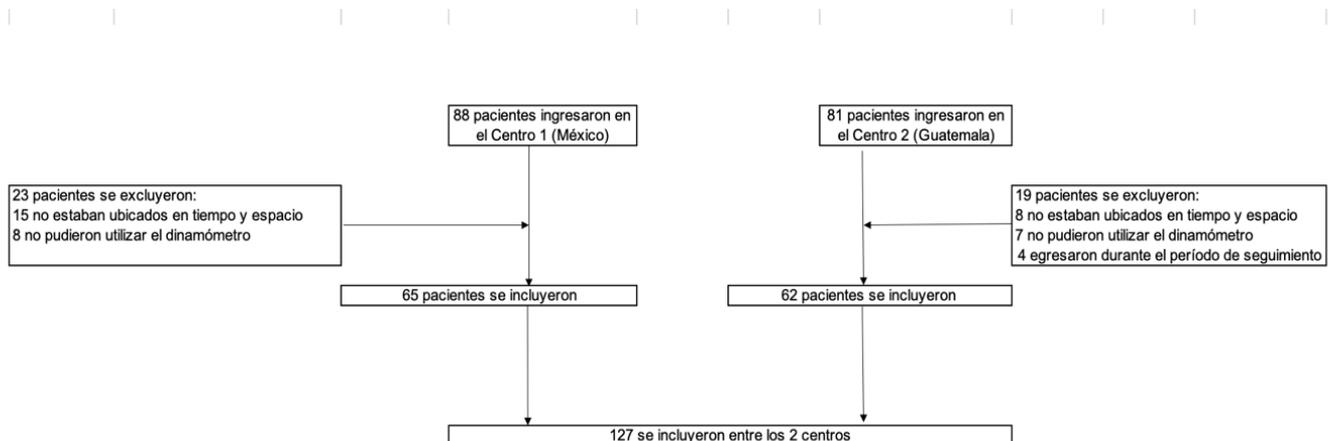


Figura 1: Flujograma de Inclusión y Exclusión de pacientes considerados en el estudio.

Del registro clínico de cada centro hospitalario se recolectaron los datos demográficos sexo, edad, diagnóstico médico de base. El peso se registró el día de la admisión hospitalaria, con el paciente vestido con bata hospitalaria, descalzo, en bipedestación sobre la parte central de la plataforma de la báscula, y en forma simétrica. En ambos centros se emplearon los mismos dispositivos para medición de peso y talla. Se utilizó una báscula Seca Healthometer digital calibrada con capacidad para 220 kg, se registraron los valores en kilos. Para el registro de la talla; el paciente estaba en bipedestación descalzo, completamente erguido, con los talones juntos y los brazos a cada lado del cuerpo. Los resultados se anotaron en centímetros.

En el centro de Guatemala se utilizó el dinamómetro hidráulico marca JAMAR® Sammons Preston Inc. y Smedley primavera como herramienta para medir la fuerza muscular a través de la fuerza de prensión. El dinamómetro hidráulico JAMAR está diseñado para el cribado de rutina, que puede ir desde la evaluación del trauma en la mano hasta las manos enfermas. Tiene un rango de prueba de 0 a 90 kilos/ 0 a 200 libras el mango ajustable se puede colocar en cinco posiciones de agarre, de 1,375" a 3,375", en incrementos de media pulgada. Su sistema hidráulico sellado presenta una lectura de doble escala que muestra la fuerza de agarre isométrica de 0 a 200 libras (el resultado también se muestra en kilos). Mientras que, en el centro mexicano, se empleó un dinamómetro de mano Smedley también diseñado para su uso diario en la práctica clínica. El rango de medición va de 0 a 220 libras, se ajusta a cualquier tamaño de mano, las escalas de medición están divididas en intervalos de cinco libras y dos kilogramos.

La evaluación del FPM se llevó a cabo con el paciente sentado en una silla, con hombro y antebrazo en posición neutral y codo en 90 grados de flexión. El participante realizaba una fuerza de prensión máxima durante 3 segundos, con reposo de 1 minuto entre cada repetición, realizando dos intentos, donde el mejor de ambos fue el que se utilizó para el estudio ¹⁶.

Análisis estadístico

Los datos se registraron en una base de datos. Se realizó un análisis descriptivo con medidas de tendencia central, desviación estándar. Los resultados se presentaron por medio de tablas y figuras.

Aspectos éticos

El estudio se diseñó y llevó a cabo según las directrices establecidas en la Declaración de Helsinki y en ambos hospitales fueron escuchados y aprobados por el Comité de Ética institucional. No se consideró necesario contar con consentimiento informado, ya que fue un estudio retrospectivo.

RESULTADOS

En el Centro 1 participaron 88 pacientes, de los cuales 62 cumplieron con los criterios de inclusión, la muestra era predominante de sexo femenino. El promedio de peso fue de 69.02 kg, talla de 1.62 metros e IMC de 26.14 kg/m² clasificado como "Sobrepeso". Los diagnósticos más frecuentes por los que ingresaron fueron enfermedades infecciosas y parasitarias, seguido de afecciones del sistema nervioso y enfermedades del sistema digestivo. Se encontró un promedio de aumento de la fuerza muscular de empuñadura de 0.49 entre la primera y segunda medición. En el Centro 2, también se registraron 62 pacientes que aceptaron participar y que cumplían criterios de inclusión. La muestra era predominantemente de sexo masculino. El promedio de peso fue de 65.92 kg, talla 1.61 mts e IMC de 25.47 kg/m², clasificado como "Sobrepeso". La mayoría de los pacientes estaban ingresados por un diagnóstico de infección, seguido por enfermedades del sistema osteomuscular. Hubo un promedio de disminución de fuerza muscular medida por dinamometría de 2 kg entre la primera y la segunda medición (Tabla 1).

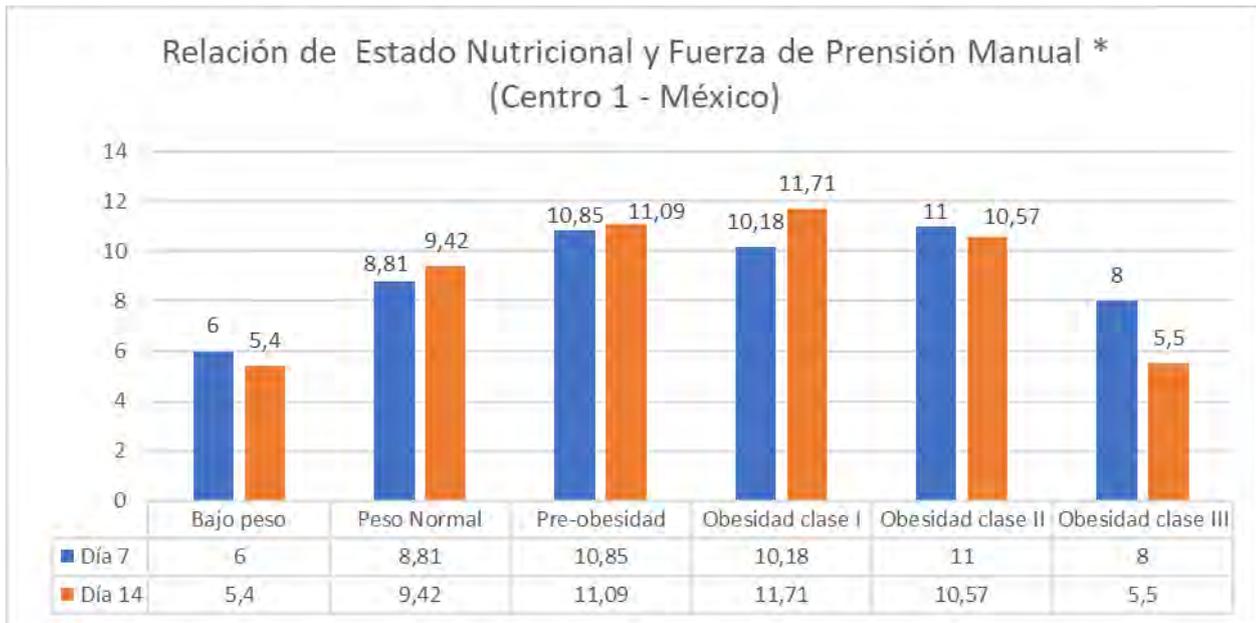
	Centro 1 (México) n: 65	Centro 2 (Guatemala)n: 62
Variable	Paciente N (%) ó (promedio ± DS) ó (mediana ± IQR)	
Edad (años)	70,86 (DS 17,01)	55 (DS 18,69)
Sexo (M/F)	25/40	34/28
Peso (kg)	69,02 (DS 15,22)	65,92 (DS 31,75)
Talla (cm)	162,18 (DS 0,092)	160,8 (DS 0,08)
IMC (kg/m ²)	26,14 (DS 5,63)	25,47 (DS 5,04)

<i>Diagnóstico de base (%)</i>		
Enfermedades infecciosas y parasitarias	18 (27,7%)	14 (22,58%)
Neoplasias	2 (3,1%)	5 (8,06%)
Afecciones hematológicas, de órganos hematopoyéticos, mecanismos inmunológicos	6 (9,2%)	3 (4,83%)
Enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas	2 (3,1%)	2 (3,23%)
Afecciones del SN	9 (13,8%)	1 (1,61%)
Enfermedades del ojo y sus anexos	0 (0,0%)	2 (3,23%)
Afecciones del Sistema Circulatorio	8 (12,3%)	10 (16,13%)
Enfermedades del Sistema Digestivo	9 (13,8%)	4 (6,45%)
Afecciones de la piel y del tejido subcutáneo	1 (1,5%)	6 (9,68%)
Enfermedades del Sistema Osteomuscular y del tejido conjuntivo	4 (6,2%)	13 (20,97%)
Afecciones del Sistema Genitourinario	6 (9,2%)	2 (3,23%)
<i>Estado nutricional según IMC</i>		
Bajo peso	1 (1,5%)	4 (6,45%)
Peso Normal	28 (43,1%)	24 (38,71%)
Pre-obesidad	17 (26,2%)	23 (37,10%)
Obesidad clase I	11 (16,9%)	9 (14,52%)
Obesidad clase II	4 (6,2%)	1 (1,61%)
Obesidad clase III	1 (1,5%)	1 (1,61%)
<i>Fuerza de prensión manual (kg)</i>		
Día 7	9,66 (DS 5,87)	23,27 (DS 14,23)
Día 14	10,15 (DS 5,32)	21,60 (DS 14,25)

Abreviaturas: SN Sistema Nervioso, IMC Índice de Masa Corporal

Tabla 1: Características demográficas de la muestra estudiada.

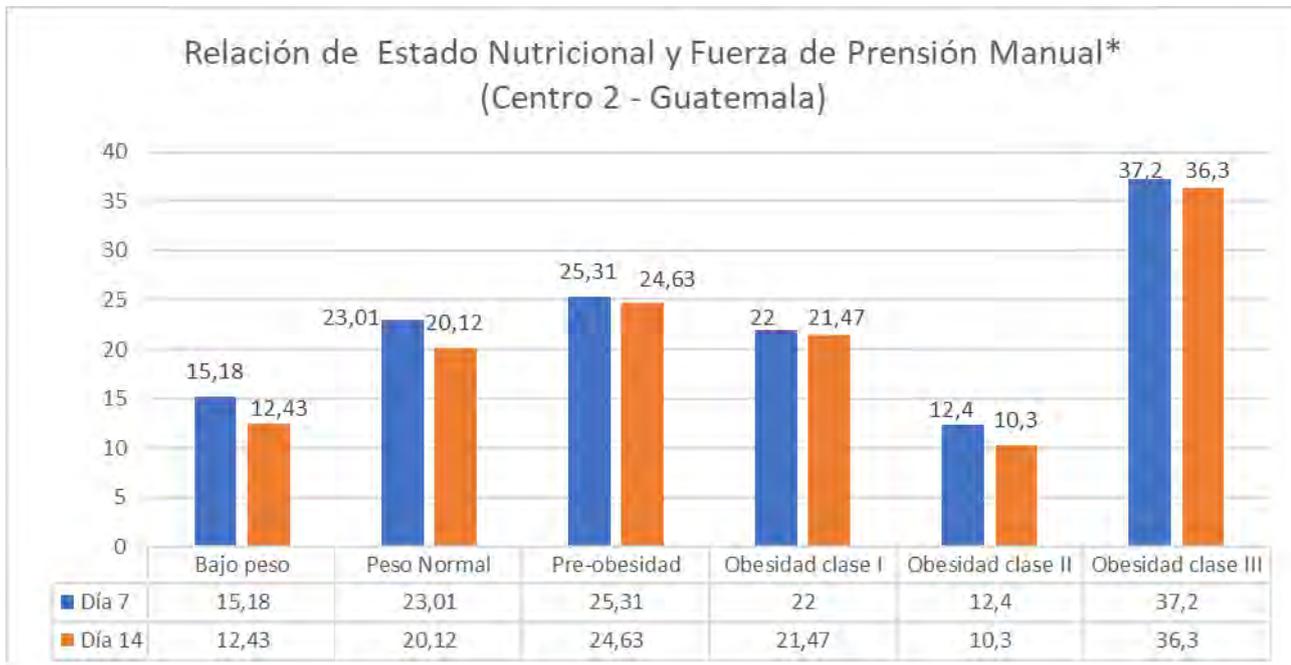
En la muestra del Centro 1, se observó entre una medición y otra, en los pacientes de bajo peso, una disminución de 0.60 kg; peso normal un aumento de 0.61 kg (Figura 2).



* Media, valor en Kg.

Figura 2: Relación de Estado Nutricional y Fuerza de Prensión Manual (Centro 1 - México).

En la muestra del Centro 2, se observó entre una medición y otra, en los pacientes de bajo peso, una disminución de 2.75 kg; peso normal 2.89 kg (Figura 3).



* Media, valor en Kg.

Figura 3: Relación de Estado Nutricional y Fuerza de Prensión Manual (Centro 1 - Guatemala).

DISCUSION

En este estudio multicéntrico se incluyeron dos centros hospitalarios de 2 países diferentes que contaban con encamamientos de medicina, cirugía y geriatría para determinar los factores de riesgo relacionados con la

disminución de la FPM en pacientes ingresados en dos centros hospitalarios ubicadas hacia el centro y norte del continente americano. El tamaño de la muestra y las edades de los pacientes fue bastante similar. Dentro de los criterios de elección de los centros participantes estaban la factibilidad de realizar el estudio, la ejecución del mismo protocolo, etc. Los autores consideraron pertinente realizar un estudio multicéntrico para completar la muestra a estudiar en menor tiempo. Sin embargo, existieron ciertas diferencias en los resultados que pueden deberse a que eran grupos de población de dos diferentes países, donde hay cierta variación en las comorbilidades, hábitos alimenticios y de ejercicio. Además, debe tomarse en cuenta que se utilizaron diferentes tipos de dinamómetros en los centros, lo que puede influir en los resultados. En el Centro 1 la muestra predominantemente fue del sexo femenino mientras que fue a predominio masculino en el Centro 2. Se debe tomar en cuenta que generalmente el sexo femenino es menos fuerte por la presencia de menos masa muscular¹⁷.

En el Centro 1 la mayoría de los pacientes tenían un estado nutricional de sobrepeso al ingreso, medido por IMC, el cual no es indicador ideal para brindar un diagnóstico nutricional adecuado¹³. Se pudo notar que los pacientes con bajo peso, seguidos por obesidad grado II y III disminuyeron su fuerza muscular. Esto indica que no se necesita tener un IMC bajo para perder fuerza muscular. La patología de base, la postración e incluso la pérdida de peso en el tiempo, pueden ser factores que contribuyen a la pérdida de fuerza muscular¹. Por el contrario, en el Centro 2 se identificaron más pacientes con un IMC normal al ingreso. Sin embargo, se pudo observar que a pesar de tener un “Estado nutricional Normal” en base a este indicador, fue en este parámetro donde más disminuyó la fuerza medida por dinamometría y donde estuvieron ubicados el 38.71% de los pacientes. Los pacientes con sobrepeso, obesidad grado 1 y 3, tuvieron una disminución de fuerza menor que el resto de los parámetros de IMC. Es importante notar que los pacientes con diagnósticos de obesidad grado I, II y III, fueron los que formaron la menor cantidad de la muestra.

De acuerdo con un estudio realizado por Benton y cols., existen resultados parecidos y a su vez diversidad entre los dinamómetros¹⁸. Los dos equipos pesan alrededor de 0,66 kg y proporcionan resultados de hasta 90 kg. No obstante, el equipo hidráulico Jamar demuestra la fuerza mediante un dial analógico con aumento de 2 kg., por lo que el investigador debe comprender las mediciones con resultados menores y discretos. En relación, el Smedley utiliza un monitor, el cual da resultados de fuerza con una exactitud de 0,1 kg, por tanto, se elimina la lectura del resultado. Ambos incluyen mangos ajustables, para variar el tamaño de la manija, aun cuando el Jamar tiene manija cóncava mientras de la empuñadura Smedley es recta. El Dinamómetro Jamar es de material metálico, por tanto, la temperatura de la superficie es más fría al tacto, comparado con el equipo Smedley que es de plástico.

Liao mostró que existe diferencia significativa de la fuerza medida por dinamometría dentro de los diferentes rangos de IMC, encontrando una correlación positiva entre la fuerza de puño y el peso y talla, mientras que el sexo fue el factor que más afectó¹⁹. Argumento que es fundamentado en un estudio realizado por Contreras y cols., donde identificó que la FPM se encontraba por debajo de los percentiles 50 y 25 en la mayoría de la población estudiada, siendo inferior al percentil 50 en 96.6% de los pacientes masculinos y el 100% del género femenino e inferior al percentil 25 en 79.7% y 96.3% para cada grupo poblacional respectivamente²⁰.

El análisis de la composición corporal es de suma importancia, para determinar el estado nutricional de un paciente, reconocer si no hay una buena cantidad de masa muscular y las repercusiones para la salud²¹. El estado nutricional debe ser diagnosticado tomando en cuenta múltiples parámetros, entre ellos, mediciones antropométricas como perímetro braquial, circunferencia muscular del brazo, circunferencia de pantorrilla, pliegues y mediciones de composición corporal que incluye no solo masa libre de grasa, masa muscular y grasa, sino también parámetros crudos como lo es el ángulo de fase²².

Reis, B mostró que el ángulo de fase de la Bioimpedancia (BIA) predijo el 29% de la varianza de la fuerza de puño, que individuos con menor ángulo de fase presentaron más probabilidad de tener menor fuerza de puño. El ángulo de fase se asoció positivamente a la fuerza de puño, sugiriendo que puede ser un predictor de fuerza muscular en pacientes hospitalizados²³. Es importante recordar que el tener más peso no significa estar más sano ni tener más fuerza. Purcell, S. mostró que la prevalencia de obesidad sarcopénica está frecuentemente asociada con la baja fuerza muscular por dinamometría en ambos sexos²⁴. Maidana y cols., llegaron a la conclusión de que existe una asociación significativa entre la fuerza de prensión y el estado nutricional, por lo

que la dinamometría podría ser útil para evaluar el estado funcional y nutricional ¹⁵.

Sería interesante conocer la correlación entre el diagnóstico médico, pérdida de fuerza muscular y porcentaje de cambio de peso. Estos parámetros no se obtuvieron por ser una revisión retrospectiva.

Es importante que los profesionales de la salud promuevan la movilidad temprana de los pacientes hospitalizados encamados, lo cual contribuiría a que variables de la composición corporal, como la masa magra, se mantengan en rangos normales. De igual manera se espera a futuro, el aporte de otros métodos de evaluación y/o herramientas que ayuden a identificar la disminución de la fuerza muscular en los pacientes hospitalizados. Así se puede lograr una detección precoz con el uso de pruebas diagnósticas, para poder establecer tratamientos tempranos con el objetivo de mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

Limitaciones

Dentro de las limitaciones presentadas, fue frecuente la dificultad para la medición de fuerza de prensión en algunos pacientes ya que presentaban alguna restricción para los movimientos con ambos brazos y manos, o presentaban alteración del estado de alerta, por lo que fueron excluidos de la muestra. Al ser un estudio retrospectivo no se pudieron registrar algunas variables importantes a considerar como estancia hospitalaria, porcentaje de cambio de peso, presencia de complicaciones en relación con el diagnóstico de ingreso, circunferencia muscular media del brazo, entre otras. Sin embargo, éstas se las pueden incluir en un siguiente estudio considerando los hallazgos preliminares identificados en el presente reporte y establecer puntos de corte de FPM específicos para las poblaciones objeto de estudio.

CONCLUSIONES

La implementación de protocolos de evaluación y soporte nutricional, son el primer paso para llegar a un diagnóstico y prevenir o retrasar el déficit de su estado nutricional durante la hospitalización y por consiguiente la disminución de masa corporal y posterior deterioro funcional.

En el presente estudio se pudo evidenciar una asociación significativa entre la pérdida de fuerza muscular, medida con el dinamómetro y el estado nutricional de los pacientes objeto de estudio. Situación que a futuro puede producir alteraciones en el estado de funcionalidad y aumento de la morbilidad.

Agradecimientos: M.Sc. Carlos Poveda por su colaboración en el análisis estadístico.

Declaración de autoría: CMM, ICH y EFT contribuyeron igualmente a la concepción y diseño de la investigación; CMM, ICH, EFT y AGC contribuyó a la adquisición y análisis de los datos; EFT y TA contribuyeron a la interpretación de los datos; y CMM, ICH, AGC, TA y EFT redactaron el manuscrito. Todos los autores revisaron el manuscrito, acuerdan ser plenamente responsables de garantizar la integridad y precisión del trabajo, y leyeron y aprobaron el manuscrito final.

Conflicto de intereses: El autor /los autores declaran /n no tener conflicto de intereses

Financiamiento: El presente estudio no tuvo financiación.

REFERENCIAS

1. Felder S, Lechtenboehmer C, Bally M, Fehr R, Deiss M, Faessler L, Kutz A, et al. Association of nutritional risk and adverse medical outcomes across different medical inpatient populations. *Nutrition*. 2015 Nov-Dec;31(11-12):1385-93. doi: 10.1016/j.nut.2015.06.007. Epub 2015 Jul 20. PMID: 26429660.
2. Merker M, Gomes F, Stanga Z, Schuetz P. Evidence-based nutrition for the malnourished, hospitalised patient: one bite at a time. *Swiss Med Wkly*. 2019 Aug 11;149: w20112. doi: 10.4414/smww.2019.20112. PMID: 31401806.
3. Cederholm T, Jensen GL, Correia MITD, Gonzalez MC, Fukushima R, Higashiguchi T, et al. GLIM Core Leadership Committee; GLIM Working Group. GLIM criteria for the diagnosis of malnutrition A consensus report from the global clinical nutrition community. *Clin Nutr*. 2019 Feb;38(1):1-9. doi: 10.1016/j.clnu.2018.08.002. Epub 2018 Sep 3. PMID: 30181091.
4. Keogh E, Mark Williams E. Managing malnutrition in COPD: A review. *Respir Med*. 2021 Jan; 176:106248. Doi: 10.1016/j.rmed.2020.106248. Epub 2020 Nov 21. PMID: 33253970.
5. Lighthart-Melis GC, Luiking YC, Kakourou A, Cederholm T, Maier AB, de van der Schueren MAE. Frailty, Sarcopenia, and Malnutrition Frequently (Co-)occur in Hospitalized Older Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Am Med Dir Assoc*. 2020 Sep;21(9):1216-1228. doi: 10.1016/j.jamda.2020.03.006. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32327302.
6. Reber E, Gomes F, Bally L, Schuetz P, Stanga Z. Nutritional Management of Medical Inpatients. *J Clin Med*. 2019 Jul 30;8(8):1130. doi: 10.3390/jcm8081130. PMID: 31366042; PMCID: PMC6722626.
7. Kramer CS, Groenendijk I, Beers S, Wijnen HH, van de Rest O, de Groot LCPGM. The Association between Malnutrition and Physical Performance in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Curr Dev Nutr*. 2022 Jan 29;6(4):nzac007. doi: 10.1093/cdn/nzac007. PMID: 35415390; PMCID: PMC8989279.
8. Araújo Amaral C, Amaral TLM, Monteiro GTR, de Vasconcellos MTL, Portela MC. Factors associated with low handgrip strength in older people: data of the Study of Chronic Diseases (Edoc-I). *BMC Public Health*. 2020 Mar 26;20(1):395. doi: 10.1186/s12889-020-08504-z. PMID: 32216788; PMCID: PMC7098144.
9. Kaegi-Braun N, Tribolet P, Baumgartner A, Fehr R, Baechli V, Geiser M, Deiss M, et al. Value of handgrip strength to predict clinical outcomes and therapeutic response in malnourished medical inpatients: Secondary analysis of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2021 Aug 2;114(2):731-740. doi: 10.1093/ajcn/nqab042. Erratum in: *Am J Clin Nutr*. 2021 Aug 2;114(2):826-827. PMID: 33829236.
10. Soriano-Moreno DR, Dolores-Maldonado G, Benites-Bullón A, Ccami-Bernal F, Fernández-Guzman D, Esparza-Varas AL, et al. Recommendations for nutritional assessment across clinical practice guidelines: A scoping review. *Clin Nutr ESPEN*. 2022 Jun; 49:201-207. doi: 10.1016/j.clnesp.2022.04.023. Epub 2022 Apr 27. PMID: 35623814.
11. Lobo DN, Gianotti L, Adiamah A, Barazzoni R, Deutz NEP, Dhatariya K, et al. Perioperative nutrition: Recommendations from the ESPEN expert group. *Clin Nutr*. 2020 Nov;39(11):3211-3227. doi: 10.1016/j.clnu.2020.03.038. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32362485.
12. Speranza E, Santarpia L, Marra M, Di Vincenzo O, Naccarato M, De Caprio C, et al. Nutritional Screening and Anthropometry in Patients Admitted From the Emergency Department. *Front Nutr*. 2022 Feb 14; 9:816167. doi: 10.3389/fnut.2022.816167. PMID: 35237641; PMCID: PMC8882738.

13. Reber E, Gomes F, Vasiloglou MF, Schuetz P, Stanga Z. Nutritional Risk Screening and Assessment. *J Clin Med*. 2019 Jul 20;8(7):1065. doi: 10.3390/jcm8071065. PMID: 31330781; PMCID: PMC6679209.
14. White JV, Guenter P, Jensen G, Malone A, Schofield M, Academy of Nutrition and Dietetics Malnutrition Work Group, et al. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: Characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). *J Acad Nutr Diet*. 2012;112(5):730-8. doi: 10.1016/j.jand.2012.03.012
15. Maidana CM, Méndez IA, De Luca M, Cortina M, Fantinelli A, Lipovetzky VL. Asociación entre fuerza de prensión y estado nutricional en pacientes adultos hospitalizados. *rncm [Internet]*. 18 de enero de 2022 [citado 15 de septiembre de 2022];5(1). Disponible en: <https://revistanutricionclinica-metabolismo.org/index.php/nutricionclinicametabolismo/article/view/296>.
16. Romero-Dapuerto Carolina, Mahn Jessica, Cavada Gabriel, Daza Rodrigo, Ulloa Víctor, Antúnez Marcela. Estandarización de la fuerza de prensión manual en adultos chilenos sanos mayores de 20 años. *Rev. méd. Chile [Internet]*. 2019 Jun [citado 2022 Ago 09]; 147(6): 741-750. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872019000600741>.
17. Rosa-Caldwell ME, Greene NP. Muscle metabolism and atrophy: let's talk about sex. *Biol Sex Differ*. 2019 Aug 28;10(1):43. doi: 10.1186/s13293-019-0257-3. PMID: 31462271; PMCID: PMC6714453.
18. Benton MJ, Spicher JM, Silva-Smith AL. Validity and reliability of handgrip dynamometry in older adults: A comparison of two widely used dynamometers. *PLoS One*. 2022 Jun 21;17(6): e0270132. doi: 10.1371/journal.pone.0270132. PMID: 35727792; PMCID: PMC9212147.
19. Liao K. Hand Grip Strength in Low, Medium, and High Body Mass Index Males and Females. *Middle East J Rehabil Health Stud*. 2016;3(1): e53229. doi: 10.17795/mejrh-33860.
20. Contreras S, Aguilar B, Dehesa E. "Utilidad de la fuerza de prensión palmar como tamizaje de desnutrición asociada a enfermedad en pacientes hospitalizados. *Rev Med UAS; Vol 11.3 (2021)*. DOI <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v11.n3.003>.
21. Ramos-Vázquez AG, Reyes-Torres CA, Castillo-Martínez L, Serralde Zúñiga AE. Body composition by bioelectrical impedance, muscle strength, and nutritional risk in oropharyngeal dysphagia patients. *Nutr Hosp*. 2021 Apr 19;38(2):315-320. English. doi: 10.20960/nh.03374. PMID: 33470121.
22. Salas-Salvadó J, Sanjaume AB, Casañas RT, Solá MES, Peláez RB. *Nutricion Y Dietética Clínica [Internet]*. 4a ed. Elsevier; 2019. 131 p. Disponible en: <https://books.google.at/books?id=agSWD-wAAQBAJ>.
23. Reis, B.C., F. de Branco, D.F. Pessoa, C.D. Barbosa, A.S. dos Reis, L.A. de Medeiros, and E.P. de Oliveira. Phase Angle Is Positively Associated With Handgrip Strength in Hospitalized Individuals. *Top Clin Nutr* 2018; 33(2): 127–33. doi: 10.1097/TIN.000000000000135.
24. Purcell SA, Mackenzie M, Barbosa-Silva TG, Dionne IJ, Ghosh S, Siervo M, Ye M, Prado CM. Prevalence of Sarcopenic Obesity Using Different Definitions and the Relationship With Strength and Physical Performance in the Canadian Longitudinal Study of Aging. *Front Physiol*. 2021 Jan 21; 11:583825. doi: 10.3389/fphys.2020.583825. PMID: 33551830; PMCID: PMC7859259.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Maza Moscoso C P, Calvo Higuera I, Gómez Carrillo A, Abril T, Frías-Toral E. Estado nutricional y disminución de fuerza muscular en pacientes hospitalizados. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 21. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.21>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Evaluación de la viabilidad, estabilidad y pureza post liofilización en diferentes modelos fúngicos de la Colección de Microorganismos de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, Colombia

Evaluation of viability, stability and purity after lyophilization in different fungal models from the Microorganisms Collection of the Escuela de Microbiología of the Universidad de Antioquia, Colombia

Daniela Montoya-Arango^{1,5}, Maria Paula Quintero-Rodriguez^{2,5}, Deisy Cristina Restrepo-Posada^{3,5}, Diana Marcela González-Gil^{4,5*}

¹ Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, calle 67 No. 53 – 108, Medellín-Colombia; daniela.montoya3@udea.edu.co. ORCID <https://orcid.org/0000-0002-8686-8710>

² Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, calle 67 No. 53 – 108, Medellín-Colombia; mpaula.quintero@udea.edu.co. ORCID <https://orcid.org/0000-0002-3130-2568>

³ Facultad de medicina, Universidad de Antioquia, Cra. 51D No. 62-29, Medellín-Colombia; deisyc.restrepo@udea.edu.co. ORCID <https://orcid.org/0000-0003-0425-7906>

⁴ Colección de Microorganismos, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, calle 67 No. 53 – 108, Medellín-Colombia; diana.gonzalez2@udea.edu.co. ORCID <https://orcid.org/0000-0003-4667-998X>

⁵ Grupo de Investigación Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA), Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, calle 67 No. 53 – 108, Medellín-Colombia

*Autor por correspondencia: diana.gonzalez2@udea.edu.co

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.22>

RESUMEN

Uno de los retos de las colecciones biológicas vivas consiste en preservar microorganismos viables, puros y estables con el empleo de diferentes métodos. Entre ellas, las colecciones de hongos cumplen un papel fundamental al resguardar y documentar la biodiversidad y el recurso genético fúngico. Los métodos que se recomiendan para cumplir con estos objetivos a largo plazo son la criopreservación y liofilización. La Colección de Microorganismos de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia requiere evaluar la liofilización para preservar hongos, dado que bajo condiciones óptimas puede mejorar algunas limitaciones de otros métodos empleados. En esta investigación se liofilizó una levadura y tres hongos filamentosos durante 24 horas empleando diferentes sustancias protectoras y se evaluó la viabilidad, pureza y estabilidad antes y después de liofilizar. Los resultados evidenciaron que en la mayoría de los hongos la viabilidad, estabilidad y pureza fue exitosa usando sacarosa al 10% con un inóculo aproximado de 10^8 células/mililitro a una temperatura de 80°C bajo cero y 6 pascales de presión. Aunque la sacarosa fue el lioprotector que presentó mejor porcentaje de viabilidad, mantuvo estables y puros a los microorganismos, y cumplió con las características físicas del producto seco, los demás lioprotectores constituyen una alternativa válida de uso.

Palabras clave: Conservación; colecciones fúngicas; hongos; levaduras; liofilización; preservación.

ABSTRACT

One of the challenges of living biological collections is to preserve viable, pure and stable microorganisms using different methods. Among these, fungal collections play a fundamental role in protecting and documenting fungal biodiversity and genetic resources. The recommended procedures to meet these long-term goals are cryopreservation and freeze-drying. The Collection of Microorganisms of the Escuela de Microbiología of the Universidad de Antioquia needs to evaluate freeze-drying for preserving fungi because it can improve some limitations of other methods used under optimal conditions. In this research, one yeast and three filamentous fungi were freeze-dried for 24 hours using different protective substances, and the viability, purity and stability were evaluated before and after freeze-drying. The results showed that viability, stability and purity were satisfactory for most fungi using 10% sucrose as a lyoprotectant with an inoculum of approximately 10^8 cells/milliliter at a temperature of 80°C below zero and 6 pascals of pressure. Although sucrose was the lyoprotectant that presented the best percentage of viability, kept the microorganisms stable and pure, and complied with the physical characteristics of the dry product, the other lyoprotectants constitute a valid alternative for its use.

Keywords: Conservation; fungal collections; fungi; yeast; freeze-drying; preservation.

INTRODUCCIÓN

El Las colecciones fúngicas cumplen un papel fundamental como reservorio de la Funga de nuestro planeta y la preservación de cepas con potencial desarrollo biotecnológico en la industria y la salud, proporcionando la base esencial, representada en recursos genéticos y biodiversidad, para industrias ecoeficientes de biotecnología emergentes. Adicionalmente, su uso en docencia e investigación cobra importancia cuando el material biológico se almacena debidamente identificado, evaluando periódicamente su pureza, viabilidad y estabilidad.¹ En nuestro caso, esto favorece el proceso de aprendizaje de más de 200 estudiantes al semestre a partir de cepas que conservan sus características originales a través del tiempo, criterio que también debe cumplirse en investigación para garantizar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados, otorgando gran relevancia a la elección de métodos de preservación adecuados. Con el objetivo de minimizar la pérdida de hongos, se sugiere almacenar cada microorganismo por dos métodos, idealmente por criopreservación o liofilización puesto que minimizan los riesgos de modificación genética.²

Actualmente, la Colección de Microorganismos de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia (CM-EM-UDEA) conserva las especies fúngicas en agua, repique seriado o por criopreservación a -80°C , sin embargo, estos métodos presentan algunas limitaciones como la viabilidad a corto y mediano plazo, el cambio de características macroscópicas y microscópicas, el riesgo biológico aumentado, contaminaciones frecuentes, poco espacio para almacenamiento y la necesidad de adquirir ultracongeladores de manera constante para garantizar un buen número de alícuotas en cada microorganismo.³ Lo anterior tiene un alto costo y una dependencia de conexión eléctrica para mantener bajas temperaturas, lo cual no es seguro en nuestro laboratorio dado que periódicamente hay inestabilidad en la energía o se debe suspender para realizar mantenimiento de la red eléctrica. En otros laboratorios, si bien no se utilizan ultracongeladores, las muestras se criopreservan en tanques de nitrógeno líquido, generando altos costos por el suministro periódico del mismo.⁴ Adicionalmente, la ultracongelación parece tener un efecto bastante lesivo en ciertos hongos dado que algunos crioprotectores resultan tóxicos y sus estructuras tienen mayor susceptibilidad a la formación de cristales durante el proceso, lo que evidencia la necesidad de establecer opciones de métodos de preservación que se adapten a cada tipo de microorganismo.⁴

A pesar de que clásicamente la preservación de hongos se ha llevado a cabo mediante subcultivos seriados, almacenamiento en aceite mineral, en agua estéril o en gel de sílice, son métodos dispendiosos, preservan a corto o mediano plazo, tienen alto riesgo de contaminación, son bioinseguros por manipular microorganismos metabólicamente activos y no garantizan la estabilidad genética.^{3,4} En contraste, la liofilización es un método de preservación a largo plazo que favorece la estabilidad genética, el transporte y el almacenamiento, y si bien se debe usar un equipo costoso, es suficiente para preservar altas cantidades y múltiples alícuotas de microorganismos. El proceso consiste en la detención del metabolismo celular mediante la ultracongelación inicial de la muestra, paso esencial para permitir que el solvente se separe de los componentes celulares y de las sustancias protectoras mediante la formación de cristales de hielo, que posteriormente será eliminado en el

segundo paso llamado sublimación, en este, la muestra inicia el secado por evaporación del agua a muy baja temperatura y presión de vacío. Finalmente, se realiza un secado definitivo para obtener una muestra desecada que mantiene la estabilidad celular y es fácilmente reconstituida.⁵ Durante las diferentes etapas de este método de preservación, las estructuras celulares pueden sufrir daños, siendo fundamental la elección y estandarización de sustancias protectoras que mitiguen dicho deterioro para alcanzar condiciones óptimas en el proceso; entre las más usadas se encuentran carbohidratos, polímeros, péptidos y sustancias antioxidantes. Las condiciones previas del microorganismo como la concentración de la muestra también tienen impacto en el resultado del proceso; previamente se ha establecido que concentraciones por encima de 1×10^8 células/ml permite una óptima recuperación celular. Así mismo, establecer un tiempo y temperatura de liofilización adecuada mejora las características del producto seco y reduce el daño celular, esto depende del tipo de producto y la concentración de la muestra, a mayor complejidad celular se requiere mayor tiempo de liofilización y menor temperatura, a menudo por debajo de -50 °C o lo más cercana a la temperatura de congelación inicial para optimizar el proceso de sublimación; no obstante, dado que la temperatura depende también de la presión de vapor dentro de la cámara de liofilización, mantener una presión de vacío menor a 10 pascales garantiza este equilibrio durante todo el proceso;⁵⁻⁷ teniendo en cuenta lo anterior y las características del liofilizador⁸ se definieron los parámetros del proceso.

Aunque la liofilización es un método ampliamente usado en bacterias, su uso en micología es menos extendido y las investigaciones en este campo tienen limitaciones metodológicas por la alta diversidad entre los hongos y, consecuentemente, una gran variabilidad de estructuras morfológicas incluso en una misma especie, lo cual puede afectar de forma importante la viabilidad y estabilidad fenotípica y genotípica.^{4,9,10} Por esta razón, seleccionamos diferentes modelos de hongos a partir de los cuales se pudieran extrapolar los resultados. *Candida albicans* es una levadura que hace parte del microbiota de piel y mucosas, también puede causar infecciones vulvovaginales, cutáneas, onicomicosis y otras infecciones sistémicas principalmente en personas inmunodeficientes, con capacidad de afectar casi cualquier órgano o sistema corporal. No obstante, también es usada en la industria para producción de biomasa, y dada su similitud con otras levaduras nuestros resultados son relevantes para aplicarlos en la preservación de levaduras de importancia en salud o de amplio uso en la industria alimentaria.¹¹ En el mismo sentido, los resultados de la preservación de *Aspergillus* sección *Nigri*, uno de los hongos filamentosos más importantes en la biotecnología industrial y en investigaciones de generación renovable de materia prima para la producción de biocombustibles, permitirá, no solo preservar sus características genéticas originales y modificadas, sino también extrapolar hacia otros hongos ambientales con importancia industrial o en investigación clínica por ser agentes de micosis profundas o productores de enzimas y productos metabólicos usados en medicina.^{12,13} Por otro lado, *Trichophyton mentagrophytes* hace parte de los hongos dermatofitos, responsables de las principales afecciones de piel, cuero cabelludo y uñas en todo el mundo, representando un alto costo para los sistemas de salud, por consiguiente, la preservación de dicho grupo clínico es de gran relevancia en docencia, investigación de tratamientos, pruebas de identificación y diagnóstico.¹⁴ Finalmente, *Rhizopus* sp. Representa los hongos filamentosos no septados, su preservación adecuada tiene relevancia en docencia e investigación clínica porque son causantes de micosis profundas e infecciones oportunistas graves en el ser humano, así como importancia en la industria alimentaria y farmacéutica.^{15,16}

Publicaciones previas, en algunas especies de hongos, han mostrado buenos resultados con la liofilización, no obstante, existe inconsistencia según las estructuras micóticas preservadas, las características evaluadas o la forma de reportar los resultados,^{10, 17-21} por lo que se requiere estandarizar un protocolo de liofilización que se pueda aplicar de forma satisfactoria y homogénea a la mayoría de los hongos que se encuentran almacenados en la CM-EM-UDEA. En este sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad, estabilidad y pureza post liofilización en *Trichophyton mentagrophytes*, *Rhizopus* spp., *Aspergillus* sección *Nigri* y *Candida albicans*, hongos de la Colección de Microorganismos de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, utilizando diferentes sustancias protectoras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos evaluados

Se evaluaron un dermatófito, un moho aseptado, un moho septado y una levadura a partir de aislados clínicos de la CM-EM-UDEA (*Trichophyton mentagrophytes*, *Rhizopus* spp. *Aspergillus* sección *Nigri*) y una cepa de referencia (*Candida albicans* ATCC 14053).

Activación de microorganismos

La activación metabólica de los hongos se hizo realizando dos repiques de manera consecutiva a partir del método de conservación. Se empleó Agar Sabouraud Dextrosa (SDA, por su sigla en inglés) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) para el primer y segundo repique para *C. albicans* y para los hongos filamentosos se usó Agar Papa Dextrosa (PDA, por su sigla en inglés) (MCD Lab, Oaxaca, México) en el segundo repique con fin de estimular la esporulación. La temperatura de incubación fue de 28 a 30 °C durante 48 horas para *C. albicans*, 96 horas para *Aspergillus* sección *Nigri* y *Rhizopus* spp., y 120 horas para *T. mentagrophytes*.

Sustancias protectoras

Se realizaron cinco evaluaciones con tres lioprotectores: leche descremada 10%, glucosa 10%, sacarosa 10%, leche descremada + glucosa 10%, leche descremada + sacarosa 10%, (% p/v).

Estandarización del inóculo

Para la levadura se realizó una curva de crecimiento en el equipo Multiskan GO (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial tardía. A partir del segundo repique de *C. albicans*, se ajustó un patrón 1 McFarland en medio líquido de infusión cerebro corazón (siglas en inglés BHI) (Merck, Bogotá, Colombia) y a partir de éste se realizó una dilución 1:10, se inocularon 200 µl en un plato Corning U-bottom y se introdujo en el equipo programado a 37°C, en agitación constante a velocidad media (parámetro del equipo), a 620 nm y con lecturas cada 30 minutos durante 24 horas. El mismo patrón McFarland diluido se replicó con mayor volumen (110 ml) en agitación constante a 200 rpm, a 37°C en simultáneo a la curva de crecimiento hasta detectar la fase exponencial tardía en el equipo. Cuando alcanzó dicha fase, se distribuyó el volumen total en 6 alícuotas iguales para ser centrifugadas a 3500 rpm durante 20 minutos. Después de retirar el sobrenadante se reconstituyó cada alícuota con 4 ml de las diferentes preparaciones de los lioprotectores y luego se distribuyeron en dos tubos, cada uno con 2 ml de suspensión para liofilizar. Un tubo adicional se reconstituyó con 2 ml de caldo BHI para evaluar el efecto de la liofilización en la levadura cuando no se adicionó una sustancia protectora; finalmente, se preparó otro tubo con 2 ml de cada lioprotector sin microorganismo como control de pureza.

Para los hongos filamentosos se aplicó el mismo protocolo (en caldo Sabouraud, a 25°C) con el fin de identificar dicha fase, sin embargo, por la reducción de conidias observadas durante el tiempo de incubación se modificó el procedimiento con el fin de favorecer la esporulación y posteriormente se estandarizó el inóculo a liofilizar mediante lavado de conidias. Para lo anterior, después del tiempo de incubación en agar PDA, se verificó la esporulación y se realizó un lavado de conidias de cada microorganismo con 2 ml de TWEEN 80 al 0.01% (Suquin, Bucaramanga, Colombia) y se ajustó al patrón 1 McFarland con caldo extracto de levadura 1% (p/v) (Merck, Bogotá, Colombia). La suspensión se dividió en 6 tubos de ensayo con 4 ml cada uno y se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 minutos; después de precipitar la biomasa se realizó el mismo procedimiento descrito para la levadura.

Los tubos a liofilizar fueron congelados en inclinación con el fin de formar una capa delgada y optimizar los resultados de la liofilización, a una temperatura de -80 °C durante un tiempo no menor a 20 horas.

Liofilización

La liofilización se llevó a cabo en un liofilizador Labconco Freezone plus 2.5 (Marshall Scientific, Hampton, USA), programado a -80 °C, a una presión de 6 pascales, durante 24 horas.

Reconstitución de los liofilizados

Después de liofilizar se reconstituyó con 2 ml de caldo BHI para *C. albicans* y 2 ml de extracto de levadura 1% para los hongos filamentosos.

Evaluación de la viabilidad

Antes y después de liofilizar se sembraron 10 µL de forma cuantitativa y por duplicado, la levadura en agar BHI, durante 48 horas a 25°C; los hongos filamentosos en SDA, incubando *Trichophyton mentagrophytes* a 30 °C; *Aspergillus* sección *Nigri* y *Rhizopus* spp. a 28 °C durante 120 horas. Tras el periodo de incubación se hizo el cálculo de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) y para el conteo de hongos filamentosos se hizo una revisión periódica cada 24 horas durante 120 horas, en ambos casos se realizó el conteo de cada replica y se calculó en número promedio. Posteriormente se calculó el porcentaje de viabilidad para cada hongo en cada lioprotector, empleando las siguientes fórmulas:¹⁹

$$UFC/ml = \frac{\text{número de UFC por placa}}{(\text{factor de dilución})(\text{volumen de muestra sembrada})} \quad (1)$$

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{X_f}{X_i} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

X_i = número de UFC / ml antes de liofilizar

X_f = número de UFC / ml después de liofilizar.

Evaluación de la estabilidad

Antes y después de liofilizar, se realizó tubo germinal a *C. albicans* y en todos los hongos, incluyendo los filamentosos, se enfatizó en la comparación de las características macroscópicas (visualización de las colonias) y microscópicas (visualización de estructuras micóticas con azul de lactofenol con objetivo microscópico de 10x y 40x), para identificar cambios fenotípicos de las cepas evaluadas que pudieran ser explicadas por el proceso de liofilización. Lo anterior, partiendo de los medios de cultivo para recuento de UFC/ml antes y después de liofilizar.

RESULTADOS

El presente proyecto de investigación detalla la información encontrada durante la estandarización del proceso de liofilización de hongos, aportando evidencia científica no solo en la viabilidad de los microorganismos, sino también sobre su estabilidad y pureza, lo cual es difícil hallar de manera unificada en estudios publicados, dado que la mayoría solo reportan viabilidad o parámetros en forma cualitativa.¹⁷⁻¹⁹

Además, los microorganismos evaluados en este estudio son modelos específicos que permiten ampliar el alcance de los resultados a otros hongos compatibles, con fisiología o estructuras micóticas similares.

En cuanto a la estabilidad de los hongos evaluados, no se observaron cambios microscópicos o macroscópicos significativos. En *C. albicans*, el tiempo para alcanzar la fase exponencial tardía necesaria para el inóculo inicial de la liofilización fue de 12 horas; antes de liofilizar se obtuvieron colonias blancas, cremosas, de borde definido y tamaño mediano (Figura 1A-B); microscópicamente se observaron levaduras de tamaño variable, unigemantes (figura 1C-D) y el tubo germinal fue positivo (figura 1E-F); ninguna de estas características se modificó tras la liofilización. Para los hongos filamentosos se mantuvieron las mismas características antes y después de liofilizar. *T. mentagrophytes* con colonias blancas, algodonosas, de borde definido (figura 2A-B); microscópicamente tenía hifas septadas hialinas delgadas, sin espirales y microconidias piriformes (figura 2C-D); *Rhizopus* spp. tuvo un crecimiento en toda la caja de cultivo, con micelio aéreo abundante y color gris oscuro (figura 3A-B), microscópicamente se observaron los característicos rizoides, esporangias esférica de pared gruesa, que al romperse daban la apariencia de sombrero chino y esporangiosporas ovaladas pigmentadas color café (figura 3C-D). Las colonias de *Aspergillus* sección *Nigri* eran negras con aspecto punteado sobre un fondo blanco en el anverso (figura 4A-B), microscópicamente se observaron cabezuelas radiadas, fértiles en toda la superficie, con bifidales, conidias globosas y equinuladas color café (figura 4C-D).

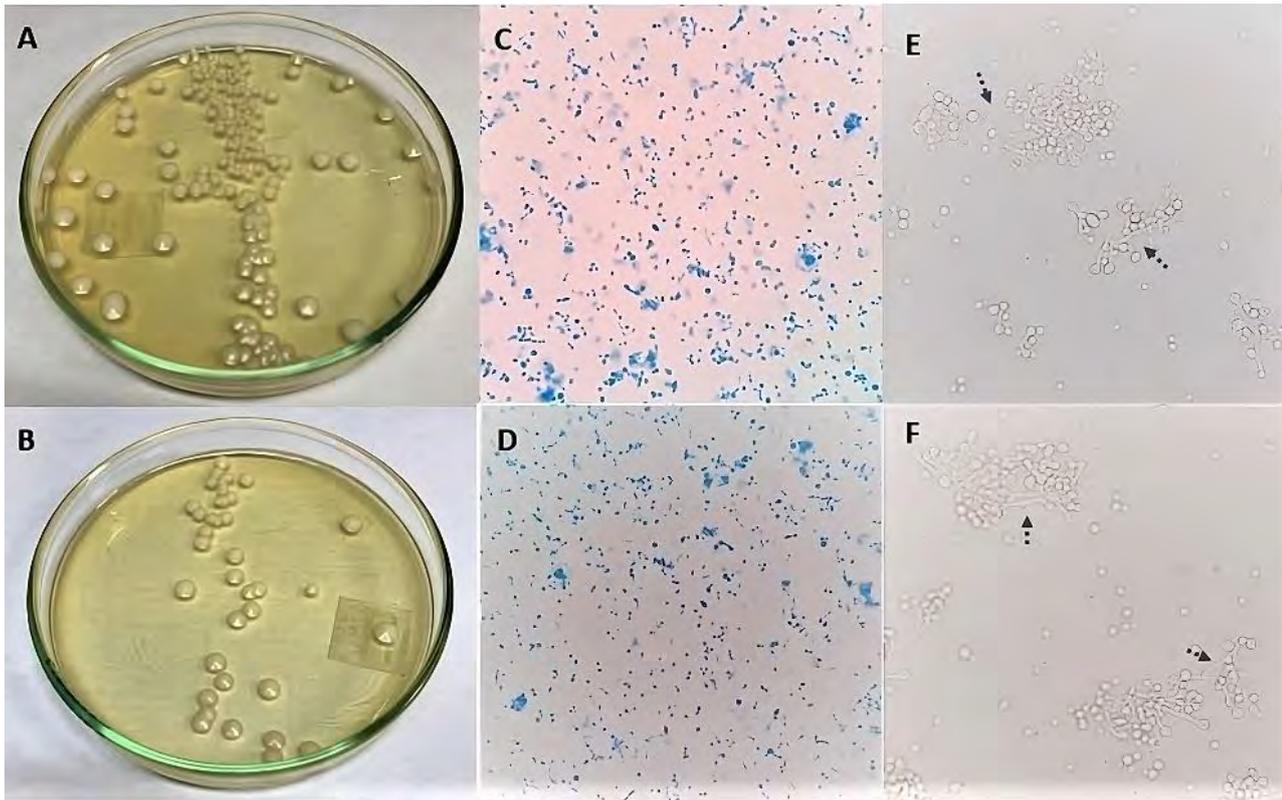


Figura 1: *Candida albicans*. Cultivo antes (A) y después de liofilizar (B). Morfología microscópica (aumento 400x) antes (C) y después de liofilizar (D), usando azul de lactofenol como colorante; tubo germinal positivo (flechas) antes (E) y después de liofilizar (F).

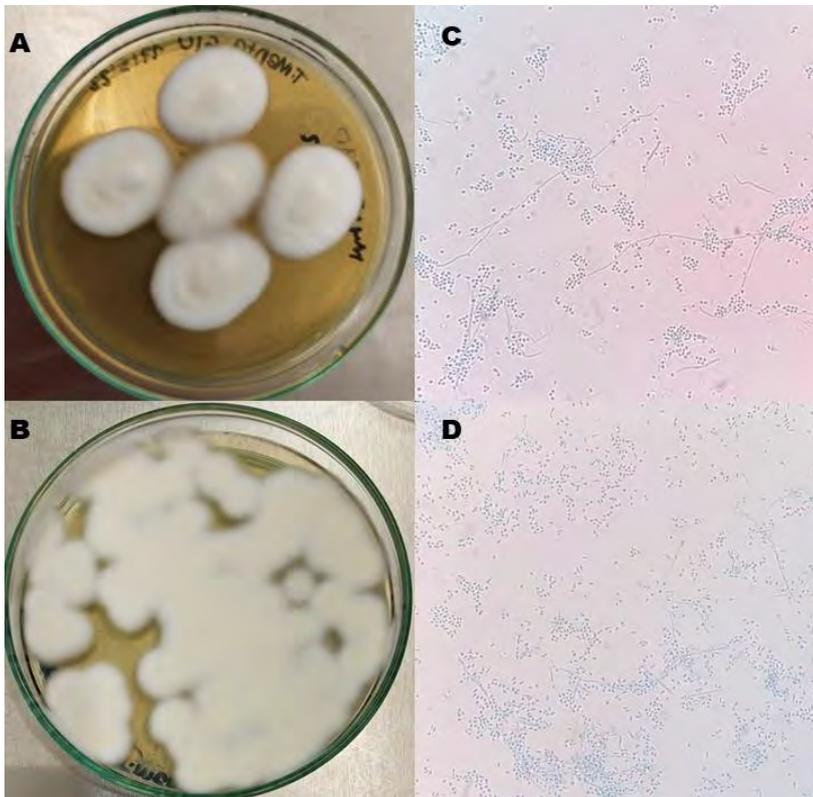


Figura 2: *T. mentagrophytes*. Morfología macroscópica antes (A) y después (B) de liofilizar. Morfología microscópica (aumento 400x) antes (C) y después de liofilizar (D), usando azul de lactofenol como colorante.

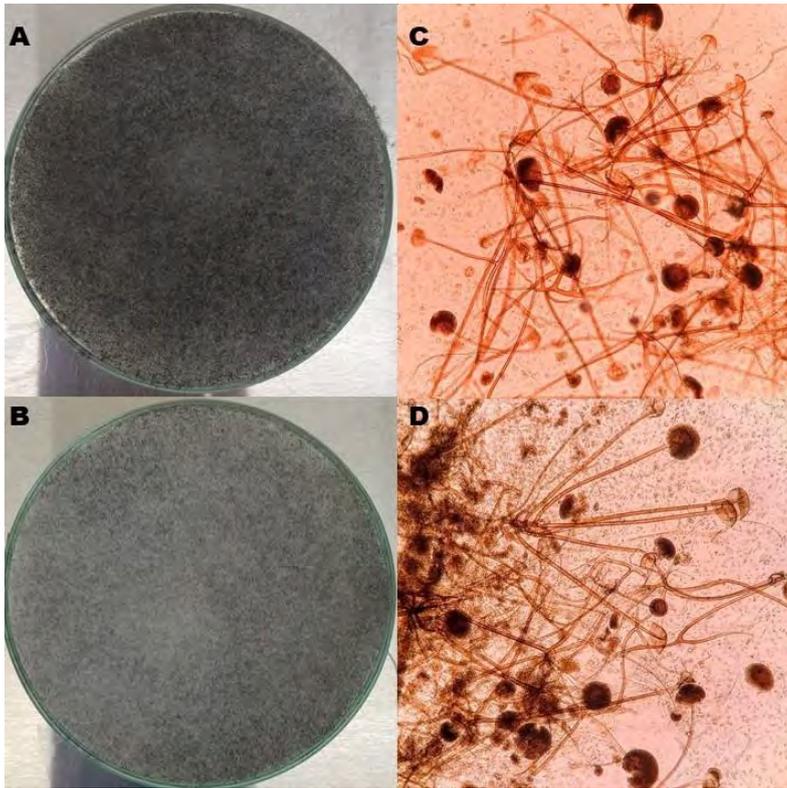


Figura 3: *Rhizopus* sp. Morfología macroscópica antes (A) y después (B) de liofilizar. Morfología microscópica (aumento 100x) antes (C) y después (D) de liofilizar.

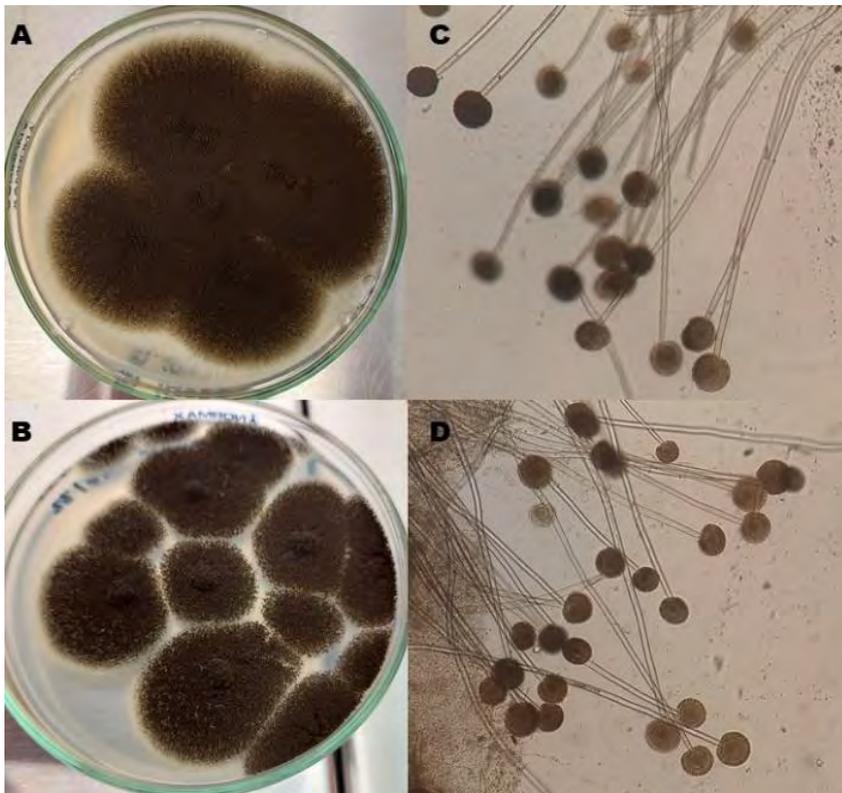


Figura 4: *Aspergillus seccioni Nigri*. Morfología macroscópica antes (A) y después (B) de liofilizar. Morfología microscópica (aumento 100x) antes (E) y después (F) de liofilizar.

Los porcentajes de viabilidad (figura 5) fueron mayores al 70% cuando se usó glucosa como lioprotector, excepto para *T. mentagrophytes* que fue alrededor del 50%, similar a la viabilidad con leche descremada para este microorganismo; de hecho, comparativamente con los demás hongos éste tuvo menor viabilidad en la

mayoría de los lioprotectores. Lo contrario se observó con *C. albicans* en la que todos los lioprotectores presentaron viabilidad del 100%, excepto leche descremada; inclusive su viabilidad fue completa cuando solo se usó caldo de cultivo durante la liofilización, resultado observado también en *Rhizopus* spp., aunque en este último es llamativo que con lioprotectores como glucosa, sacarosa y leche descremada con sacarosa, el porcentaje de viabilidad se redujo alrededor de 20% y la reducción fue mayor con las otras sustancias. En *Aspergillus* sección *Nigri*, la viabilidad fue alrededor del 70% con sacarosa y glucosa y cuando se combinaron éstos con leche descremada estuvo entre 40% y 50%, respectivamente. Cabe resaltar que no se obtuvo crecimiento en las alícuotas donde se usó sólo las sustancias protectoras evidenciando la pureza del proceso. Los lioprotectores fueron elegidos por asequibilidad, uso frecuente y efectividad.²² Como se mencionó en el párrafo anterior, la leche descremada, lioprotector ampliamente usado puesto que sus componentes inhiben la formación de cristales y protege las membranas celulares de los microorganismo liofilizados, no tuvo los altos porcentajes de viabilidad esperados en este estudio y aunque diferentes autores^{17-18,23} reportaron altos resultados de viabilidad, estabilidad y pureza cuando liofilizaron hongos con éste y otros lioprotectores, se basaron en la presencia o ausencia de crecimiento de los microorganismos, mediante ensayos por duplicado, triplicado o con una sola replica; dificultando la comparación con los resultados obtenidos en este estudio puesto que además de reportar crecimiento en todos los lioprotectores también se calculó el porcentaje de viabilidad. Para algunos hongos, el porcentaje de viabilidad mejoró cuando se combinó leche descremada con glucosa y sacarosa, aunque fue menor comparada con el uso de azúcares como lioprotectores solos; Ávila *et al.*¹⁹ reportaron resultados similares cuando se utilizó leche descremada con miel como lioprotector y Burguet *et al.*²⁴ cuando emplearon leche descremada; ambos evidenciaron una marcada disminución de la viabilidad en el tiempo, efectos no deseados que pudieran atribuirse a este lioprotector.

También fueron evaluados carbohidratos como lioprotectores, sustancias que regulan la deshidratación, aumentan la resistencia a bajas temperaturas y presiones y estabilizan las membranas celulares.²⁵ En este ensayo, los hongos presentaron mejor viabilidad con glucosa 10%, sin embargo, esta última no tuvo las propiedades físicas generales y la velocidad de reconstitución recomendadas; este resultado podría haberse presentado al sobrepasar el valor crítico de temperatura y presión para este carbohidrato, produciéndose burbujeo, deshidratación incompleta, interrupción de la sublimación, pérdida de rigidez del producto final y apariencia no satisfactoria.²⁵ Aunque no se halló ningún cambio en las características morfológicas antes y después de liofilizar, sería importante que futuros estudios evalúen el uso de la glucosa en concentraciones menores al 10%, además de las características físicas e higroscópicas durante el almacenamiento para determinar el efecto en la viabilidad, estabilidad y pureza de los microorganismos en el tiempo, variable que también debe evaluarse con los demás lioprotectores.

Con la sacarosa también se obtuvieron altos porcentajes de viabilidad para todos los hongos evaluados, obteniéndose un producto seco con las características adecuadas; todos los microorganismos se aislaron 100% puros y con un alto grado de estabilidad, por lo tanto, la sacarosa se convierte en un lioprotector promisorio para elegir en nuestra colección, máxime la comparativa costo efectividad que tiene frente a la trehalosa, con el que también se ha reportado efectos benéficos en la viabilidad micótica.^{20-21,26}

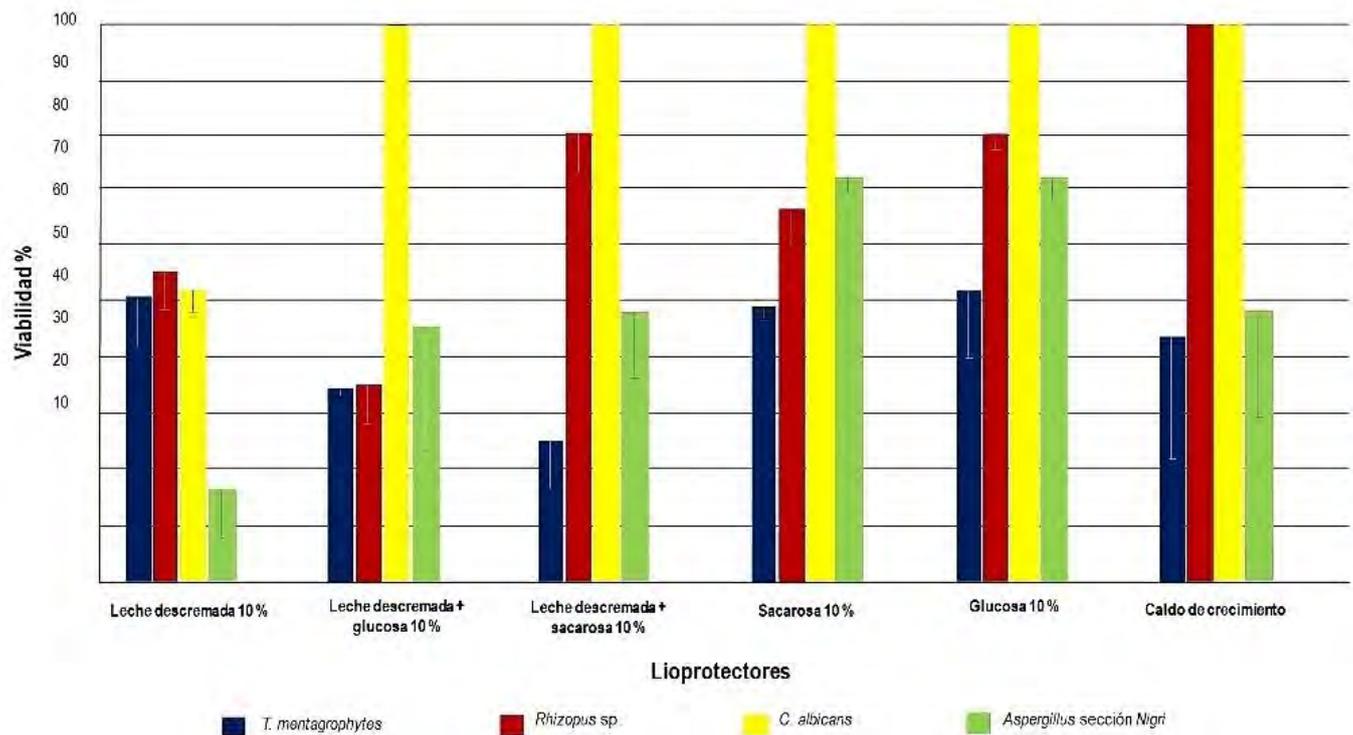


Figure 5: Porcentajes de viabilidad de los hongos con cada lioprotector evaluado.

Es llamativo que la liofilización solo con BHI y extracto de levadura conservaron adecuadamente la viabilidad de *C. albicans* y *Rhizopus* spp., respectivamente, con resultados del 100% y sin cambios fenotípicos significativos; lo que podría deberse a que estos medios de cultivos contienen componentes que se usan comúnmente como sustancias protectoras durante este proceso, evidenciando el potencial uso de estos caldos de cultivo como lioprotectores, teniendo en cuenta su relación costo-beneficio, amplia disponibilidad en los laboratorios y fácil preparación.²⁷

Durante el establecimiento de las condiciones óptimas de liofilización, no se utilizó curva de crecimiento en los mohos ya que durante el ensayo se evidenció que a medida que pasaba el tiempo de incubación se disminuía la formación de estructuras que resisten mejor el proceso de liofilización como esclerocios, conidias o esporas, resultado que no favorece el proceso.²⁸ Henao *et al.*,²⁹ también reportaron una tendencia a la disminución en el recuento de conidias durante la curva de crecimiento en medio líquido y en agitación, con aumento en la biomasa, mostrando que el medio de cultivo líquido aporta a los hongos filamentosos las condiciones nutricionales para el desarrollo vegetativo, favoreciendo en menor medida el estadio reproductivo;³⁰ en este sentido, para estos microorganismos, recomendamos priorizar la esporulación en un medio adecuado más que a la fase de crecimiento, estandarizando el inóculo para tener un protocolo controlado durante la liofilización que reduzca las variaciones.

Como limitaciones del estudio, se debe considerar que, aunque se estandarizó un protocolo que garantizó viabilidad, estabilidad y pureza después de liofilizar con las sustancias protectoras evaluadas, sería importante evaluar el efecto que tiene el almacenamiento a largo plazo en la estabilidad del producto seco y, específicamente para *C. albicans*, evaluar si el uso de caldo de extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD por sus siglas en inglés) mejora la viabilidad post liofilización, al ser un medio de cultivo ampliamente usado en hongos. Adicionalmente, incluir análisis de fisiología y métodos moleculares de estabilidad genética, además de características morfológicas, permitiría identificar con mayor precisión los cambios que puede generar el proceso de liofilización en los hongos.

CONCLUSIONES

A pesar de la naturaleza inestable de algunos hongos, este ensayo de liofilización garantizó viabilidad, estabilidad y pureza de los microorganismos evaluados, estandarizado a temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, presión de 6

pascales, densidad celular inicial aproximada de 3×10^8 UFC/ml y tiempo de liofilización de 24 horas; reportando parámetros de forma cuantitativa que permiten obtener resultados más objetivos y la comparación más precisa entre estudios de preservación fúngica.

Pese a que la glucosa fue el lioprotector que en general tuvo mayor viabilidad, sus características físicas finales hacen necesario evaluar diferentes concentraciones y junto con las demás sustancias protectoras, evaluar su impacto en el almacenamiento a largo plazo, incluyendo el desempeño de los caldos de cultivo como lioprotectores dado su favorable relación costo/beneficio, teniendo en cuenta que para la liofilización de hongos filamentosos recomendamos la utilización de un medio de cultivo que estimule la producción de conidias previo al procedimiento de preservación. Nuestros resultados evidenciaron que la sacarosa 10% fue el lioprotector que presentó mejor porcentaje de viabilidad, mantuvo estables y puros a los microorganismos, y cumplió con las características físicas del producto seco, sin embargo, los demás lioprotectores constituyen una alternativa válida según la disponibilidad y necesidades de cada laboratorio.

Conflicts of Interest: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Zhang, K., Cheng, J., Hong, Q., Dong, W., Chen, X., Wu, G., & Zhang, Z. Identificación de cambios en los compuestos volátiles de granos de café robusta durante el secado basado en análisis HS-SPME/GC-MS y E-nose con la ayuda de quimiometría. *ELSEVIER*, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113317>. 2022. p161.
2. Beltran, C. Estudio del impacto de las propiedades funcionales del café arábica (*coffea arabica*) durante las etapas post cosecha para su industrialización. Universidad Técnica De Machala, Machala, El Oro, Ecuador:, agosto de 2022.
3. Prada, Á., Vela, C., Bardález, G., & Saavedra, J. Efectividad de un Proceso de Secado de Café usando Secadores Solares con Sistema de Flujo de Aire Continuo Impulsado por Energía Fotovoltaica, en la Región San Martín, Perú. *SciELO*, 30(6), 2. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000600085>. 2019
4. Benítez, O., & Campo, D. Evaluación de la calidad el café tostado utilizando herramientas de procesamiento digital de imágenes. EBSCO, 2018. p 12.
5. Borja Velázquez, M. Principios del secado | | UPV. 2018. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=Lf4F7caSYrg>
6. Peña, M. P. Incidencia del secado artificial en las propiedades físicas y mecánicas de la madera de la especie forestal *Triplaris cumingiana* Fisch. Jipijapa, Manabí, Ecuador: Universidad Estatal del sur de Manabí. 2019.
7. Gaibor Chávez, J., Pérez Pacheco, S., Velazquez Martí, B., Nino Ruiz, Z., & Dominguez Narváez, V. Dendrometric characterization of corn cane residues and drying models in natural conditions in Bolivar Province. *Renewable Energy*. doi:doi:10.1016/j.renene.2015.09.009. 2016.
8. Quishpe, D. A. Determinación de la Cinética de Secado de una torta de lodo proveniente del tratamiento de agua de enjuague del proceso de Decapado. Quito, Pichincha, Ecuador: Universidad Central del Ecuador. 2018.
9. Flores, G. Determinación experimental de la cinética de secado de especias (*Allium schoenoprasum*, *Erygium foetidum* y *Mansoa alliacea* L). Pastaza, Ecuador: Universidad Estatal Amazónica, 2019.
10. Flórez, F. Efecto del tiempo de fermentación sobre la calidad nutricional del ensilaje de pulpa de *Coffea arabica* L. *Cienc. Tecnol. Agropecuaria*, 3(21). doi:https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1423. 2020.
11. Carretero, A. Impactos sociales, económicos y medioambientales derivados de la pérdida y el desperdicio de alimentos. *Przegląd Prawa Rolnego*, 2018, 14. doi:10.14746/ppr.2018.23.2.9 . p23(2).
12. Bolívar Fabián Mendoza Marcillo, B. F. Influencia de la cosecha de café maduro y verde sobre la calidad física y organoléptica del café (*Coffea arabica* L.). *Revista Agrosilvicultura y Medioambiente*, 2023, p 14-25.

13. Camaño, J., Rivera, A., & Zapata, J. Efecto del espesor de película y de la ubicación de la muestra en un secador solar directo, sobre la cinética de secado de ensilado de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis* sp). Scielo, 31(1), 53-66. 2011. Obtenido de doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642020000100053>
14. Martines, E., & Lira, L. Analisis y Aplicación de las expresiones del contenido de humedad en solidos. Simpicio de metrologia. 2010. Obtenido de <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp01b.pdf>
15. León, U., Muñoz, J., Vargas, G., & Pacheco, Y. Cinética de secado del coco por radiación. Tecnología en marca, 32, 115-121. doi:<https://doi.org/10.18845/tm.v32i7.4269>. 2018.
16. Salazar, M. Modelo de la cinética de secado por convección forzada de la semilla de Pajuro(*Erythrina edulis* Triana). Modelo de la cinética de secado por convección forzada de la semilla de Pajuro(*Erythrina edulis* Triana). Perú: Universidad Nacional Agraria de la selva. 2020.
17. Cengel , Y., & Ghajar, A. Fundamentos de la convección. En Transferencia de calor y masa . McGrawHill, 2011.
18. Siqueira Valdiney Cambuy, G. E. Drying Kinetics of Processed Natural Coffee with High Moisture Content. Coffee Science, 2017. p400-409.
19. Phitakwinai, Sutida S. T. Thin-layer drying of parchment Arabica coffee by controlling temperature and relative humidity. Food Science and Nutrition. 2019. p 2921–2931.
20. Bejenari, Victoria C. L. Isothermal Drying Kinetic Study of Spent Coffee Grounds Using Thermogravimetric Analysis. International Journal of Chemical Engineering, 2022.
21. Mizera C, H. D. Describing of drying curves of green coffee beans using mathematical model . 2nd Nommensen International Conference on Technology and Engineering. 2018.
22. Wanich Nilnont, S. P. Thin-layer Drying Kinetics of Robusta Coffee. International Journal of Advanced Culture Technology. 2015, p138-143.
23. Guilherme E. Alves, F. M. Influence of Different Temperatures and Airflows on Drying of. Engenharia Agricola, 2020. p 192-200.
24. Fatharani, A. Y. Drying characteristics of robusta coffee beans using YSDUNIB18 hybrid dryer based on thin-layer drying kinetics fitting model . International Journal of Agricultural Technology, 2023, 37-52.
25. Gallego Agudelo Claudia Patricia, L. C. Influencia del Proceso de Secado del Café Natural en las Características Físicas del Grano y la Calidad Sensorial. Revista Cenicafé, 2023. p94 – 110

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: García M E, Moreta T; Guerrero Luzuriaga S A, Gaibor Chávez J. Modelamiento matemático de la cinética de secado de café robusta (*Coffea canephora*). Revis Bionatura 2023;8 (4)

10. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.10>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Prediction Total Digestible Nutrient value of forage and feedstuffs from their chemical characteristics

Fiorella Sarubbi¹ *, Giuseppe Auriemma², Raffaele Pappalardo³, Giuseppe Grazioli⁴

¹ Institute for Animal Production System in Mediterranean Environment, National Research Council, P. le E. Fermi 1, 80055, Portici, Italy; fiorella.sarubbi@cnr.it. ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9241-5718>)

² Institute for Animal Production System in Mediterranean Environment, National Research Council, P. le E. Fermi 1, 80055, Portici, Italy; giuseppe.auriemma@cr.it. ORCID (<https://orcid.org/0009-0000-0981-5108>)

³ Institute for Animal Production System in Mediterranean Environment, National Research Council, P. le E. Fermi 1, 80055, Portici, Italy; raffaele.pappalardo@cnr.it ORCID (<https://orcid.org/0009-0004-6726-936X>)

⁴ Institute for Animal Production System in Mediterranean Environment, National Research Council, P. le E. Fermi 1, 80055, Portici, Italy; giuseppe.grazioli@cnr.it ORCID (<https://orcid.org/0009-0005-3683-0609>)

* Correspondence: fiorella.sarubbi@cnr.it

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.23>

ABSTRACT

Total Digestible Nutrient Value of forage and concentrate and nutritional characteristics and develop a prediction equation using the chemical composition variables as predictors. Nutrient chemical characteristics data were obtained from 278 forage and 87 feedstuffs. The data included dry and organic matter, crude protein, ether extract, ash, fiber composition, and non-fiber Carbohydrate. Stepwise regression was used to eliminate variables that did not influence variation in the model and used 0.05 as the critical probability level.

Data were then randomly divided into two parts; two-thirds of the data was used to estimate the Total Digestible Nutrient, whereas the remaining part was used to validate the estimated Total Digestible Nutrient and was analyzed by multiple linear regressions. Total Digestible Nutrient in forage was negatively correlated with Ether Extract, Acid Detergent Lignin, and Non-fibre Carbohydrate ($P < 0.01$) but positively correlated with Crude Protein ($P < 0.01$), ash, Neutral Detergent Fibre, and Acid Detergent Fiber. Total Digestible Nutrient in feedstuffs was negatively correlated with NFC ($P < 0.01$) but positively correlated with Neutral Detergent Fibre ($P < 0.01$), Acid Detergent Lignin ($P < 0.01$), Ether Extract ($P < 0.01$), Crude Protein ($P < 0.01$), ash, and Acid Detergent Fiber ($P < 0.01$). The results show that the Total Digestible Nutrient content can be accurately estimated starting from the chemical composition.

Keywords: total digestible nutrient; forage; concentrate; feed analysis.

INTRODUCTION

The available energy in feedstuff represents the most significant proportion of the total cost of ruminant production. Furthermore, the improved nutrient utilization efficiency is strongly related to enhanced economic performance and reduced environmental impact of farms.

The provision of energy for livestock is performed through feedstuff, and it substantially determines the production level. The primary nutrients that contribute to energy are carbohydrates, lipids, and protein¹.

The energy present in feeds is called gross energy (GE), but it does not reflect to which extent the energy is available for animals. To overcome such weaknesses, other energy measures are digestible energy (DE), metabolizable energy (ME), and net energy (NE).

Another critical measurement energy system has been developed: the total digestible nutrient (TDN); its value represents the utilizable energy content of a feedstuff, and 2 equations calculate it.

Traditionally, TDN is utilized as the base for estimating the NE content of feedstuff and diets.

For example, TDN levels of concentrates affect average daily gain (ADG) and intramuscular fat deposition of fattening cattle³. Therefore, it is essential to produce high-quality meat from steers. 4. Over the past 25 years, improving cow productivity has also required increased nutrient requirements, making it challenging to meet the demands of high-yielding cows by grazing alone.

In Korea, studies have been undertaken on shortening the fattening period and appropriate slaughter age to reduce feed costs and decrease the production of inedible fat⁸⁻⁹. Additionally, studies have been conducted about increasing the TDN level of concentrates to maintain the marbling score while shortening the fattening period, which has been¹⁰⁻¹¹. The papers reported that increasing the TDN levels in concentrate has improved the dry matter (DM) digestibility, energy availability, ADG, and meat quality grade¹²⁻¹³⁻¹⁴; however, feeding excessively high TDN concentrate may lead to deposition of inedible fat and cause metabolic diseases¹⁵.

The present study aimed to investigate the relationship between the chemical characteristics of forage and concentrate and develop a prediction equation using the chemical composition variables as predictors.

MATERIALS AND METHODS

Nutrient chemical characteristics data were obtained from 278 forage and 87 feedstuffs.

The chemical compositions of the experimental feed were analyzed following the standard methods of the¹⁶, neutral detergent fiber (NDF) and Lignin (ADL) were analyzed based on methods described by¹⁷, and TDN was analyzed and evaluated following the method described by².

Non-fibre Carbohydrate (NFC) is calculated as OM-(NDF+EE+CP).

The chemical composition and nutritional value of the feedstuffs are shown in Table 1.

Parameter	Forage	Feedstuffs
	$\mu \pm SD$	$\mu \pm SD$
DM	90.24 \pm 6.93	91.08 \pm 2.01
OM	84.68 \pm 4.61	86.97 \pm 4.77
CP	10.14 \pm 4.28	27.55 \pm 6.02
EE	2.07 \pm 0.52	2.14 \pm 0.49
Ash	8.64 \pm 2.81	4.11 \pm 0.84
NDF	53.04 \pm 7.70	20.16 \pm 9.53
ADL	4.71 \pm 2.18	4.03 \pm 0.83
NFC	19.62 \pm 7.64	37.13 \pm 9.98
TDN	68.33 \pm 6.53	53.05 \pm 10.16

μ =means; SD=standard deviation; DM=Dry Matter; OM=Organic Matter; CP=Crude Protein; EE=Ether extracts; NDF=Neutral Detergent Fibre; ADL= Acid Detergent Lignin; NFC=Non-fibre Carbohydrate; TDN=Total Digestible Nutrient

Table 1: Summary (means \pm standard deviation) of chemical composition (% DM) of forage (n=278) and feedstuffs (n=87) used in the database.

Statistical analysis was performed using ¹⁸. Multiple linear regressions analyzed the data to evaluate the relationship between TDN and various predictor variables. Stepwise regression was used to eliminate variables that did not influence variation in the model and used 0.05 as the critical probability level.

The correlation was performed between chemical composition and TDN for both forage and feedstuffs (Tables 2 and 3). The significance was indicated by * and ** for P<0.05 and P<0.01, respectively.

Data were then randomly divided into two parts; two-thirds was used to estimate TDN, whereas the remaining data was used to validate the estimated TDN.

The standard error of prediction was used to judge the predictive ability of a calibration equation. Equation validation was conducted to assess the predictive ability of the selected calibration equation.

Validation entails predicting an independent set of samples, i.e., from a different population than the calibration set, with known reference values, or removing a certain number of samples from the calibration set and not using them in the calibration process.

RESULTS AND DISCUSSION

The study found significant coefficients between forage chemical composition and nutrient digestibility, specifically for CP (0.993 with p<0.01) and NFC (-0.994 with p<0.01).

Regarding feed, the correlation coefficients were significant for all parameters except dry matter.

The results were as follows: NDF (0.703 p<0.01); ADL (0.464 p<0.01); NFC (-0.952 p<0.01); EE (0.657 p<0.01); CP (0.373 p<0.01); ADF (0.685 p<0.01).

Similar results were reported by ¹⁹.

High correlation values represent more excellent agreement but not necessarily greater accuracy for estimating the means.

In Table 2, we report the results of ANOVA for the regression model considered for predicting TDN in forage. Examination of the table shows the goodness of the forecast model chosen, as highlighted by the low value of the residue.

Model	Sum of Squares	Mean Square	F	Sign.
Regression	1102016.880	367338.960	11209.606	0.01
Residue	8815.134	32.770		
Total	1110832.014			
Predictor: NSC, CP, EE; R ² =0.992; SE of the Estimate=5.72451				

Table 2: ANOVA for the regression model of forage

Using NFC, CP, EE may be predicted by the following equation (1):

$$\text{TDN}_{\text{forage}} = 70.41 - 0.546\text{NFC} + 0.453\text{CP} + 0.04\text{EE} \pm \text{error} \quad (1)$$

Relatively similar coefficients between NFC and CP to estimated TDN in forage confirm the similarity of energetic values between starch and protein²⁰. (Figure 1)

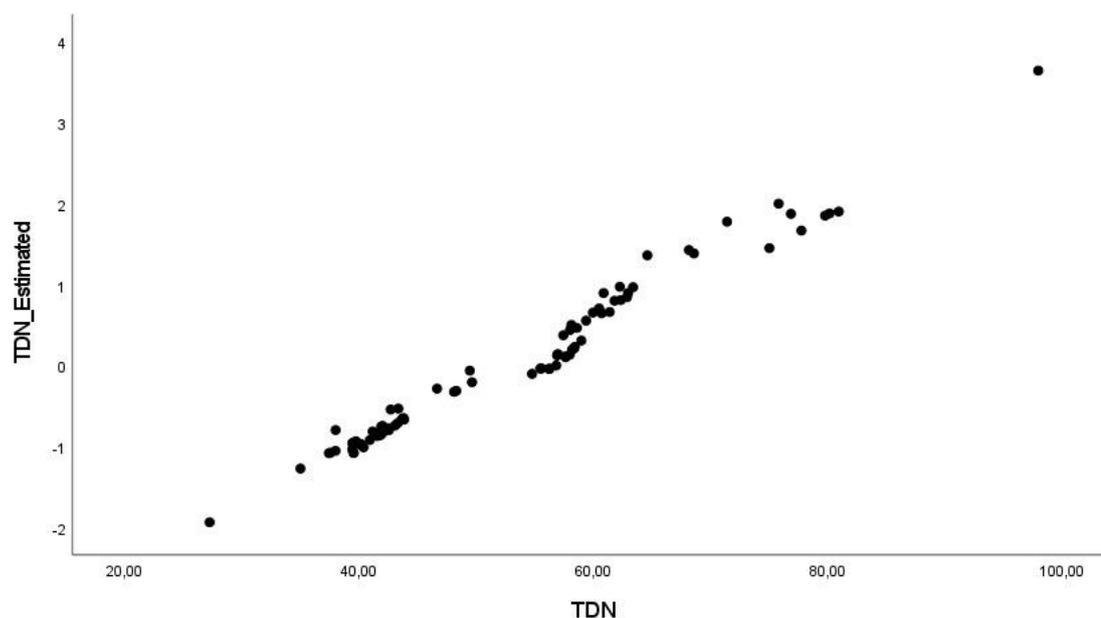


Figure 1: Values of estimated and observed TDN in forage were reported, indicating the validity of the prediction equation.

In Table 3, we report the result of ANOVA for the regression model considered for predicting TDN in feedstuffs. Examination of the table shows the goodness of the forecast model chosen, as highlighted by the low value of the residue.

Model	Sum of Squares	Mean Square	F	Sign.
Regression	14484.606	7242.303	1537.248	0.01
Residue	395.742	4.711		
Total	14880.348			

predictor: NFC, EE; R²=0.987; SE of the Estimate=2.17053

Table 3: ANOVA for the regression model of feedstuffs.

Using NFC and EE may be predicted by the following equation (2):

$$\text{TDN}_{\text{feedstuffs}} = 86.76 - 0.822\text{NFC} + 0.291\text{EE} \pm \text{error} \quad (2)$$

These prediction equations were entirely accurate, as indicated by the high values of R². The non-significant correlation of TDN with NDF for forage and the absence of this parameter in predictive equations may indicate a lower contribution to the energy available for livestock; this may be related to the negative effect of NDF, particularly lignocellulose component, on ruminal degradation and total tract digestibility²¹⁻²².

The low EE coefficient in the prediction equation for both fodder and feedstuffs is probably linked to lipids generating less energy than starch and proteins.

This result contrasts with what was reported by²³ in the study on dairy calves. (Figure 2)

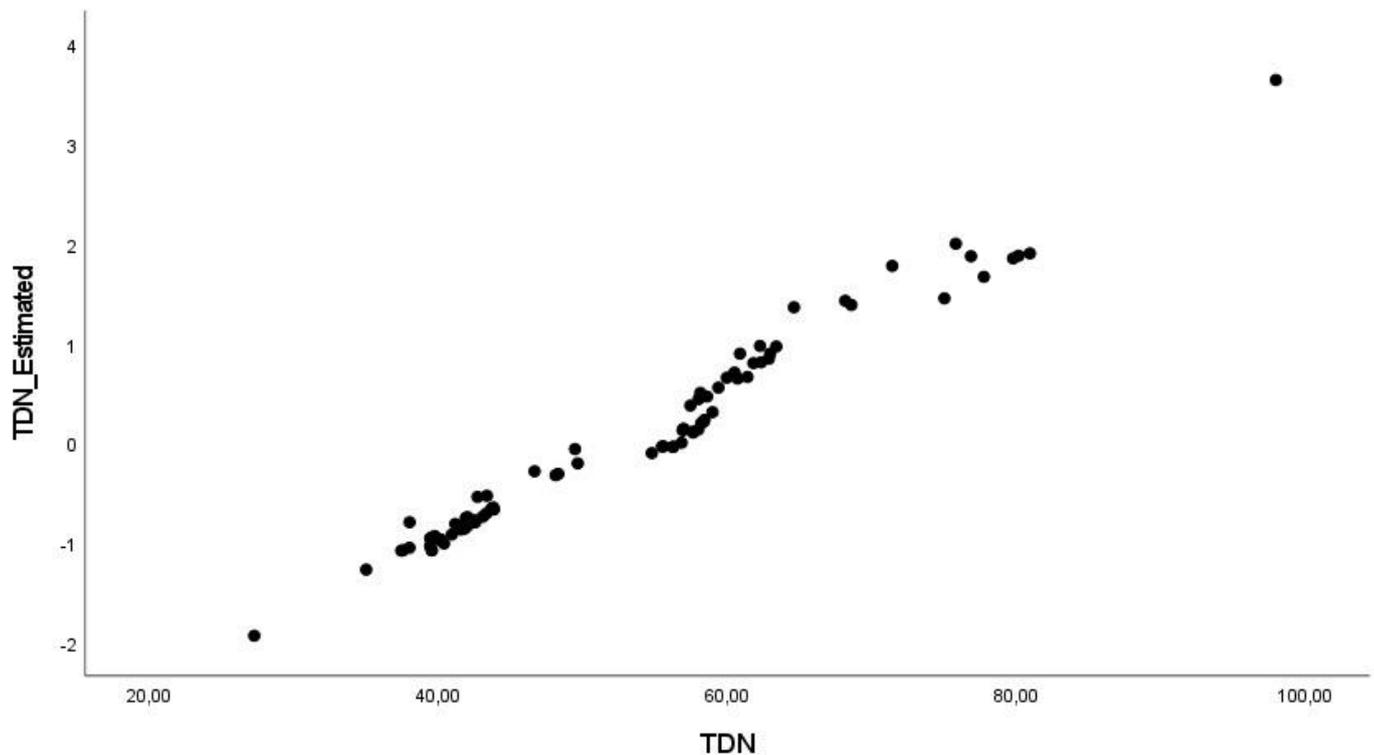


Figure 2: Estimated and observed TDN values in feedstuffs indicate the prediction equation's validity.

If you want to estimate the TDM content of a unified, as suggested by 24, it is necessary to know precisely the forage/feedstuffs ratio (F:f) to obtain the TDN value of the diet. For example, a unified with a Forage: feedstuffs ratio of 60:40, its TDN equation could be (3):

$$\text{TDN}_{\text{unifed}} = (0.6 \text{ TDM}_{\text{forage}}) + (0.4 \text{ TDM}_{\text{feedstuffs}}) \quad (3)$$

CONCLUSIONS

The impact of interactions between feed components on TDN is essential, and the continuous need to deepen our understanding of energy and metabolism concepts is evident. Building upon this, the results of this preliminary study underscore that the TDN content, whether in forages or feedstuffs, can be precisely estimated based on the chemical composition of the diet-administered foods. This contribution to the field enhances our grasp of the intricate relationships between feed composition and TDN levels, empowering accurate predictions. These findings are significant as they provide valuable insights for crafting optimal livestock diets that enhance agricultural enterprises' economic performance and environmental sustainability.

Author Contributions: Fiorella Sarubbi: Conceptualization, Methodology, Software, Writing- Original draft preparation. Giuseppe Auriemma: Visualization, Investigation, Writing- Original draft preparation. Raffaele Pappalardo: Visualization, Investigation, Writing- Original draft preparation. Giuseppe Grazioli: Visualization, Investigation, Writing- Original draft preparation.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Hall, M.B.; Eastridge, M.L. Carbohydrate and fat: Considerations for energy and more. *Prof. Anim. Sci.* **2014.** *30*, 140-149
- 2 Nutrient requirement of dairy cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC, USA. **2001.** DOI: 10.17226/9825
- 3 Jeong, J.; Seong, NI; Hwang, I.K.; Lee, S.B.; Yu, M.S.; Nam, I.S.; Lee, M.I. Effects of level of CP and TDN in the concentrate supplement on growth performances and carcass characteristics in Hanwoo steers during final fattening period. *J Anim Sci Technol.* **2010.** *52*, 305-312
- 4 Lee, C.R. Effects of energy-enriched concentrate on growth performance and carcass characteristics of Hanwoo steers. M.S. thesis, Kyungpook National University, Sangju, Korea. **2017**
- 5 Waghorn, GC; Clark, D.A. Feeding value of pastures for ruminants. *NZ. Vet. Journal.* **2004.***52*, 320-331
- 6 Ferris, C. Sustainable pasture-based dairy system- Meeting the challenges. *Can. J. Plant Sci.* **2007.** *87*, 723-738
- 7 Phuong, H.N.; Friggens N.C.; de Boer, I.J.M.; Schmidely P. Factors affecting energy and nitrogen efficiency of dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* **2013.** *96*, 7245-7259.
- 8 Hong, B.C. Analyses of optimal feeding period to improve productivity for Hanwoo cattle farm. Ph.D. dissertation, Kangwon National Univ., Chuncheon, Korea **2016.**
- 9 Yoon, J.H.; Won, JI; Lee, K.S.; Kim, J.B.; Lee, J.K. Estimation of reasonable marked month of age for Hanwoo steer. *J. Anim. Sci. Technol.* **2013.** *55*:405-416
- 10 Chung, K.Y.; Lee, S.H.; Cho, S.H.; Kwon, E.G.; Lee, J.H. Current situation and prospects for beef production in South Korea-A review. *Asian-Australias J. Anim Sci.* **2018.** *31*, 951-960
- 11 Lee, S.M.; Chang, S.S.; Jung, K.Y.; Kim, H.C.; Choi, S.H.; Kwon, E.G.; Park B.K.; Yang, B.S.; Lee, S.S.; Cho, Y.M. Effect of feeding patterns of concentrate on growth performance, blood parameters and carcass characteristics in fattening Hanwoo cows. *J. Animal Sci Technol.* **2013.** *55*, 33-39.
- 12 Chung, K.Y.; Chung, S.S.; Lee, E.M.; Kim, H.J.; Park, B.H.; Kwon, E.G. Effects of high energy diet on growth performance, carcass characteristics, and blood constituents of final fattening Hanwoo steers. *Korean. J Agric Sci.,* **2015.** *42*,261-268
- 13 Hwang, J.A.; Islam, M.M.; Ahmed, S.T.; Mun, H.S.; Kim, G.M.; Kim, Y.J.; Yang C.J. (Seamustard (*Undaria pinnatifida*) improves growth, immunity, fatty acid profile and reduces cholesterol in Hanwoo steers. *Asian-Australas J Anim Sci.* **2014.** *27*, 1114-1123.
- 14 Ki, K.S; Lim, Y.S.; Jin, Z.L.; Lee, H.J.; Kim, S.B.; Lee, W.S.; Yang, S.H.; Cho, W.M.; Kim, H.S.; Jeo, J.M.; Lee, I.D. Effect of crude protein and total digestible nutrient levels on intake, digestibility, nitrogen and energy utilization in growing dairy goats. *J Korean Soc Grassl Forage Sci,* **2009.** *29*,269-276.
- 15 Rossi, C.A.S.; Compiani, R. Ruminal acidosis of beef cattle and related diseases. *Large Anim Rev* **2016.** *22*, 273-279.
- 16 Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. Official methods of analysis of AOAC international. 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA. **2005.**
- 17 Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* **1991.***74*(10):3583-97
- 18 Statistical Package for the Social Sciences - SPSS®. ver. 24.0. SPSS Inc. Chicago, IL, USA. **2017.**
- 19 Morrison, F.B. Feed and Feeding, Abridged. 9th ed. Morrison Publ. C., Clinton, IA **1961.**
- 20 Gallardo, C.; Dadalt, J.C.; Neto, M.A.T. Nitrogen retention, energy, and amino acid digestibility of wheat bran, without or with multcarbvohydrate and phytase supplementationb, fed to broiler chickens. *J. of Anim. Sci.* **2018.** *96*, 2371-2379
- 21 Riaz, M.Q.; Südekum, K.H.; Clauss M.; Jayanegara, A. Voluntary feed intake and digestibility of four domestic ruminant species as influenced by dietary consitituent: A metaanalysis. *Livest. Sci.* **2014.** *162*, 76-85

- ²² Harahap, R.P.; Jayanegara, A.; Nahrowi; Fakhri S. Evaluation of oil palm fronds using fiber-cracking technology combined with *Indigofera* sp. In ruminant ration by Rusitec. AIP Conference Proceeding **2021**: art. No. 050008
- ²³ Ghasemi, E.; Azad-Shahraki, M.; Khorvash, M. Effect of different fat supplement on performance of dairy calvees during cold season. *Jornal of dairy science*, **2017**. *100*, 5319-5328
- ²⁴ Jayanegara, A.; Ridla, M.; Nahrowi Laconi, E.B. Estimation and validation of total digestible nutrient values of forage and concentrate feedstuffs. 9th Annual Basic Science International Conference, IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering **2019**.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citación: Sarubbi F, Auriemma G, Pappalardo R, Grazioli G, Prediction Total Digestible Nutrient value of forage and feedstuffs from their chemical characteristics. *Revis Bionatura* 2023;8 (4)
23. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.23>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Evaluación de extractos acuosos de neem (*Azadirachta indica*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) para el control del pulgón negro del cacao (*Toxoptera aurantii*)

Evaluation of neem (*Azadirachta indica*) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) aqueous extracts to control the black cocoa aphid (*Toxoptera aurantii*)

Mayra Carolina Vélez Ruiz^{1,*}, Karen Lisseth Tapia-Gualpa¹, Favio Eduardo Herrera-Eguez¹, Juan José Reyes-Pérez²

¹ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Campus “La María” km 7 Vía Quevedo-El Empalme, Mocache, Los Ríos, Ecuador; (MV) mvelez@uteq.edu.ec. ORCID: 0000-0003-4407-2965; (KT) karen.tapia2016@uteq.edu.ec :0000-0002-0855-664X; (FH) fherreae@uteq.edu.ec. ORCID:0000-0003-1376-423X.

² Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Pecuarias y Biológicas, Campus “La María” km 7 Vía Quevedo-El Empalme, Quevedo, Los Ríos, Ecuador; (JR) jreyes@uteq.edu.ec: ORCID: 0000-0001-5372-2523

* Correspondence: mvelez@uteq.edu.ec.

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.24>

RESUMEN

El pulgón negro (*Toxoptera aurantii*), es una plaga que causa daño a las hojas, flores y frutos pequeños del cacao. En la actualidad se ha incrementado el uso de extractos botánicos con propiedades insecticidas tales como, el neem (*Azadirachta indica*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*), los cuales son considerados como una alternativa en el control del pulgón del cacao, sin embargo, muy poco se conoce sobre sus efectos toxicológicos en esta plaga. En este estudio fueron evaluados los efectos insecticidas de los extractos acuosos de neem y tabaco contra *T. aurantii* en superficies de papel filtro. La mortalidad del pulgón negro fue significativamente afectada al ser expuestos a superficies tratadas con extractos de neem, tabaco o insecticida acetamiprid ($P < 0,001$) después de 6 horas del inicio del bioensayo. El extracto de neem y tabaco en concentración del 0,4 kg L⁻¹ (100%) causó la mortalidad del 100 % y 80 % de los pulgones respectivamente. El valor de la CL₅₀ para los extractos de neem fue de 0,05 kg L⁻¹, y para tabaco fue de 0,18 kg L⁻¹. Los extractos de neem y tabaco producen repelencia en los pulgones al ser expuesto a superficies tratadas con concentraciones del 100 %.

Palabras clave: mortalidad; repelencia; Aphididae; concentración letal media

ABSTRACT

The black aphid *Toxoptera aurantii* is a pest that causes damage to the leaves, flowers, and small fruits of cocoa. The use of botanical extracts with insecticidal properties such as neem (*Azadirachta indica*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) can be considered as an alternative in the control of the cocoa aphid, although very little is known about their effects on this pest. This study evaluated the insecticidal effects of aqueous neem and tobacco extracts against *T. aurantii* on paper filter surfaces. Black aphid mortality was significantly affected by exposure to surfaces treated with botanical extracts of neem, tobacco, or the insecticide acetamiprid ($P < 0.001$), after 6 hours from the beginning of the bioassay. The extract of neem and tobacco in the concentration of 0.4 kg L⁻¹ caused the mortality of 100 % and 80 % of the aphids, respectively. The LC₅₀ value for

neem extracts was 0.05 kg L⁻¹, and for tobacco, it was 0.18 kg L⁻¹. Neem and tobacco extracts produce repellency in aphids when exposed to surfaces treated with 100 % concentrations.

Keywords: mortality; repellency; Aphididae; mean lethal concentration

INTRODUCCIÓN

Para Ecuador, el cacao (*Theobroma cacao* L.) representa uno de los principales rubros agrícolas, debido a los ingresos económicos que aporta al país, así como, su aporte en la generación de empleo^{1,2}. No obstante, este cultivo presenta una baja productividad debido a razones genéticas, suelos degradados, plagas y enfermedades, lo que sitúa a los productores de cacao en dificultades socioeconómicas^{1,3}. De igual manera, los insectos plaga en el cultivo de cacao pueden limitar su desarrollo y productividad⁴. Entre las principales plagas se encuentra al pulgón negro (*Toxoptera aurantii* Boyer) (Hemiptera: Aphididae), es una especie plaga del cultivo de cacao que tiene aparato bucal chupador, succiona la savia del floema de flores, frutos pequeños y brotes vegetativos, causando daños a las plantas^{5,6}. El control con insecticidas constituye el método más rápido de control para pulgones, sin embargo, la aplicación constante de insecticidas genera desequilibrio ambiental, aumenta los costos de producción y causa problemas en la salud de los seres humanos⁷, por lo tanto, es necesario el uso de métodos alternativos que permitan el control y manejo del pulgón negro. Entre los métodos alternativos para el control de insectos plaga se encuentra el uso de extractos botánicos^{8,9}.

Algunos de los principales beneficios de los extractos botánicos son los siguientes: son seguros para aplicar (baja toxicidad para mamíferos), pueden ser fácilmente procesados y aplicados (no requiere de tecnología sofisticada) y aplicados, además de ser productos ecológicos, tienen compatibilidad con los componentes ambientales^{10,11}. La mayoría de los insecticidas botánicos contienen metabolitos secundarios como: terpenoides, alcaloides, glucósidos y fenoles, moléculas que actúan como defensa de las plantas, además, pueden afectar el comportamiento y fisiología de los insectos^{6,12,13}. Entre las plantas con potencial insecticida para el control de insectos incluyendo pulgones del género *Toxoptera* destacan el neem (*Azadirachta indica*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*)^{14,15}. Algunos compuestos que posee *A. indica* como la azadiracina pueden afectar el sistema nervioso central, sistema muscular, inmunológico y digestivo, además de causar la muerte de diversos grupos de insectos¹⁶. Otro compuesto popular conocido como agente insecticida es la nicotina, que se deriva básicamente del tabaco (*N. tabacum*), tienen efectos directos sobre el sistema nervioso de los insectos¹⁷.

En Ecuador muy poco se conoce sobre el control y manejo del pulgón negro del cacao utilizando insecticidas botánicos y mucho menos sobre sus efectos toxicológicos. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto toxicológico de los extractos botánicos de *A. indica* y *N. tabacum* sobre *T. aurantii* en el Ecuador.

MATERIALES Y METODOS

Insectos

Adultos y ninfas del *T. aurantii* fueron colectados de brotes tiernos y flores de una plantación de cacao (Clon CCN51) de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), (Los Ríos, Mocache, Ecuador) (1°04'57,6"S, 79°30'06,7"W). Para la captura de los insectos se utilizó un pincel fino con el que se colectaron ninfas y adultos de pulgón, y los cuales, fueron introducidos en recipientes plásticos. Posteriormente, ninfas y adultos fueron ubicados en jaulas de madera (50 cm x 80 cm) con plántulas de cacao y limón. Las cajas fueron recubiertas con tela transparente (organza) presentando una abertura con velcro en la parte superior. Las cajas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero (temperatura 28 ± 3 °C; 75 ± 10 % de humedad relativa y fotoperiodo 12:12 (D:O)). Los insectos permanecieron por cuatro semanas con las plántulas para su multiplicación. Una vez alcanzada la población de 350 individuos se seleccionaron diez de ellos al azar y se midió su longitud (1,09 ± 0,09 mm de largo), para verificar el estadio de desarrollo en el que se encontraban. Los individuos en

los que se tomó los datos de longitud se descartaron para las posteriores pruebas, los restantes, al alcanzar el tercer estadio ninfal fueron destinados para los bioensayos¹⁸.

Preparación de extractos botánicos

Los extractos botánicos de *A. indica* y *N. tabacum* se elaboraron según la metodología propuesta por López *et al.*, (2015)¹⁹. Se colectaron hojas frescas de *A. indica* y *N. tabacum* que se encontraban cultivadas en el campus experimental La María (UTEQ, Los Ríos, Mocache, Ecuador). El extracto de *N. tabacum* se preparó sumergiendo 400 g de hojas frescas de tabaco en 1 L de agua destilada (0,4 kg L⁻¹) en una olla de aluminio inoxidable. Se sometió la mezcla a 80 °C por 15 min y después, se realizó un proceso de filtrado con un tamiz metálico. A los residuos de las hojas de tabaco obtenidos de la primera extracción se añadió 100 mL de agua destilada y se sometió a calentamiento a una temperatura de 80 °C por 15 min. Se mezclaron 100 mL del primer proceso de extracción con los últimos 100 mL procesados. La mezcla se filtró en papel filtro (CHMLAB GROUP F2040, 85 g/m² peso, 32 cm ø, España) para eliminar el exceso de residuos.

Para la obtención del extracto de *A. indica* se utilizaron hojas frescas y se siguió el proceso antes mencionado. Los extractos obtenidos de *A. indica* y *N. tabacum* fueron considerados como el 100 % de concentración (0,4 kg L⁻¹). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (diluciones con agua destilada en la que se redujo la concentración progresivamente) para obtener las concentraciones requeridas (100 %, 50 %, 10 % y 1 %). Adicionalmente, y dependiendo de los bioensayos se utilizó un insecticida como tratamiento control positivo (Insecticida acetamiprid; Nombre comercial: Acetalaq SP, 200 g i.a./kg; Sinochem, Ningbo LTD, Zhejiang, China) y un tratamiento control negativo (agua destilada).

Bioensayos de supervivencia

Se utilizó un diseño completamente al azar con seis tratamientos por cada bioensayo y cuatro repeticiones por tratamiento. Los tratamientos consistieron en el uso de: i) Extractos de neem en las concentraciones: 100 %, 50 %, 10 % y 1 %, ii) Extractos de tabaco en las concentraciones: 100 %, 50 %, 10 % y 1 %, iii) Insecticida acetamiprid (control positivo) y iv) Agua destilada (control negativo). Cuatro grupos (repeticiones) de cinco insectos (ninfas de *T. aurantii* de tercer estadio) por tratamiento fueron ubicados usando un pincel fino en cuatro cajas Petri (9 cm de ø y 2 cm de altura) forradas en el fondo con discos de papel filtro (CHMLAB GROUP F2040, 85 g/m² peso, 9 cm ø, España) y recubierta sus paredes con talco industrial (talco sin olor, malla 325, MAGMIN, Comercializadora S.A.) para prevenir el escape de los insectos. En cada caja Petri se colocaron flores de cacao previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio comercial diluido al 0,5% para la alimentación de los insectos. Cada disco de papel filtro fue pulverizado con 1 mL de la concentración correspondiente a cada extracto botánico (neem y tabaco), insecticida (Acetamiprid, 3,14 mg (i.a./cm²) o agua destilada. La aplicación de los tratamientos se realizó utilizando un aerógrafo (Truper Modelo: AERO 35, Jilotepec, Estado de México, México) conectado a un compresor (Truper, Modelo: COMP-AERO, 1/5 HP, 58 PSI, Jilotepec, Estado de México, México). La distancia entre el aerógrafo y el papel filtro fue de aproximadamente 20 cm. Al finalizar cada aplicación de los tratamientos, se limpió y desinfectó el aerógrafo con acetona. El papel filtro tratado fue colocado sobre una estructura metálica (parrilla de nevera) para el proceso de secado bajo la campana de laboratorio por un periodo no mayor a cinco minutos a una temperatura de 27 °C. Los experimentos realizados se mantuvieron bajo condiciones controladas (temperatura 27 °C; 75 ± 10 % de humedad relativa; fotoperiodo 12:12 (L:O)).

Tiempo Letal medio (TL₅₀)

Para la evaluación de tiempo letal medio (TL₅₀), los pulgones (*T. aurantii*) se consideraron los tratamientos utilizados en los bioensayos de supervivencia. La mortalidad de cada insecto fue registrada inicialmente a partir de la media hora que estos estuvieron en contacto con los discos de papel filtro tratados. Posterior a ello se evaluó cada hora durante las primeras seis horas y una última evaluación fue realizada a las doce horas. La mortalidad de los individuos de cada tratamiento fue constatada cuando no existía señales de movimiento de los insectos a los toques realizados con un pincel fino²⁰.

Concentración Letal media (CL₅₀)

Utilizando el protocolo descrito anteriormente fueron realizadas pruebas de toxicidad (mortalidad de individuos) a las seis horas posteriores de la exposición de los pulgones (*T. aurantii*) a los extractos de neem o tabaco para determinar la concentración letal media (CL₅₀). Para este experimento se utilizaron únicamente los tratamientos con extractos botánicos y el tratamiento control negativo (agua destilada). Las concentraciones de extractos de neem y tabaco utilizadas fueron: 100 %, 50 %, 10 %, y 1 %. Las diferentes concentraciones de cada extracto fueron usadas para demostrar los efectos dependientes de la concentración con respecto a la supervivencia.

Repelencia (bioensayo de elección pareada)

Para el análisis del comportamiento de repelencia se utilizó los extractos botánicos de neem y tabaco en diferentes concentraciones (100 %, 50 %, 10 % y 1 %) y el tratamiento con insecticida (acetamiprid). Se utilizaron las mismas condiciones previamente descritas. Discos de papel filtro fueron tratados con agua destilada (tratamiento control) (CHMLAB GROUP F2040, 85 g/m² peso, 9 cm ø, España) y la mitad de otro disco fue tratado a diferentes concentraciones de extractos de neem, tabaco (100 %, 50 %, 10 % y 1 %) o insecticida. La mitad de los discos tratados con extractos o insecticida fueron fijadas sobre el disco de papel tratado con agua destilada utilizando pegamento en barra inoloro (UHU GmbH & Co. KG Herrmannstraße, Bühl/Baden, Alemania)²¹. Posteriormente fueron colocados en cajas Petri de vidrio (9 cm de ø y 2 cm de altura). Cuatro repeticiones con veinte insectos (ninfas de tercer estadio de *T. aurantii*) por cada tratamiento fueron liberadas en el centro de la caja en las que se encontraba el papel filtro tratado, con un total de ochenta insectos por cada tratamiento. El número de insectos en cada lado del papel filtro fue evaluado treinta minutos después de que fueron liberados en la caja Petri.

Análisis de datos

Los datos obtenidos en el bioensayo de tiempo letal medio fueron sometidos al análisis no paramétrico de supervivencia usando los estimadores de Kaplan-Meier para obtener las curvas de supervivencia y estimar el tiempo letal medio (TL₅₀). Además, los límites de confianza al 95% fueron establecidos para la variable TL₅₀. Para evaluar la mortalidad de los pulgones se verificó los supuestos de normalidad y homocedasticidad con las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett respectivamente. Se utilizó el programa RStudio para realizar el análisis de varianza y verificar diferencias entre el porcentaje de mortalidad de *T. aurantii* entre los tratamientos. Adicionalmente, para comparar las medias obtenidas se utilizó la prueba Post-hoc de Tukey ($P < 0,05$)²². La concentración letal media (CL₅₀) fue obtenida a través de un análisis Probit con los datos de mortalidad de los pulgones en cada tratamiento (Proc probit) utilizando el programa SAS²³. Para determinar la repelencia entre los tratamientos se contabilizó el número de insectos ubicados en las cajas Petri que se encontraban en la mitad tratada con extractos botánicos e insecticidas o en la mitad tratada con agua, los datos fueron transformados a porcentaje. Las medias del porcentaje de individuos en cada sección de la caja Petri fueron comparados usando la prueba de t pareada ($\alpha < 0,05$)²².

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tiempo de supervivencia (TL₅₀)

El análisis de supervivencia mostró, diferencias estadísticas significativas tanto para el bioensayo en el que se utilizaron concentraciones de neem (*A. indica*) y sus controles (prueba de Log-rank: $X^2 = 136,05$, df, 5, $P < 0,001$, Figura 1A) como para, el bioensayo con concentraciones de extracto de tabaco (*N. tabacum*) y sus respectivos controles (prueba de Log-rank: $X^2 = 137,29$, df, 5, $P < 0,001$, Figura 1B). Los tiempos medios de supervivencia (TL₅₀) de los insectos expuestos a superficies tratadas con extracto de neem y tabaco en las concentraciones de 100 %, 50 %, 10 %, 1 %, acetamiprid y agua con sus respectivos intervalos de confianza (95 %) son indicados en la Tabla 1. La mortalidad del pulgón negro del cacao fue significativamente afectada al ser expuestos a superficies tratadas con extractos botánicos o insecticida después de 6 h del inicio del

bioensayo ($P < 0,05$). El resultado de mortalidad en los diferentes tratamientos muestra que, los extractos de neem y tabaco en concentración de 100 % causó la mortalidad del 100 % y 80% de los individuos respectivamente después de seis horas de exposición a las superficies tratadas.

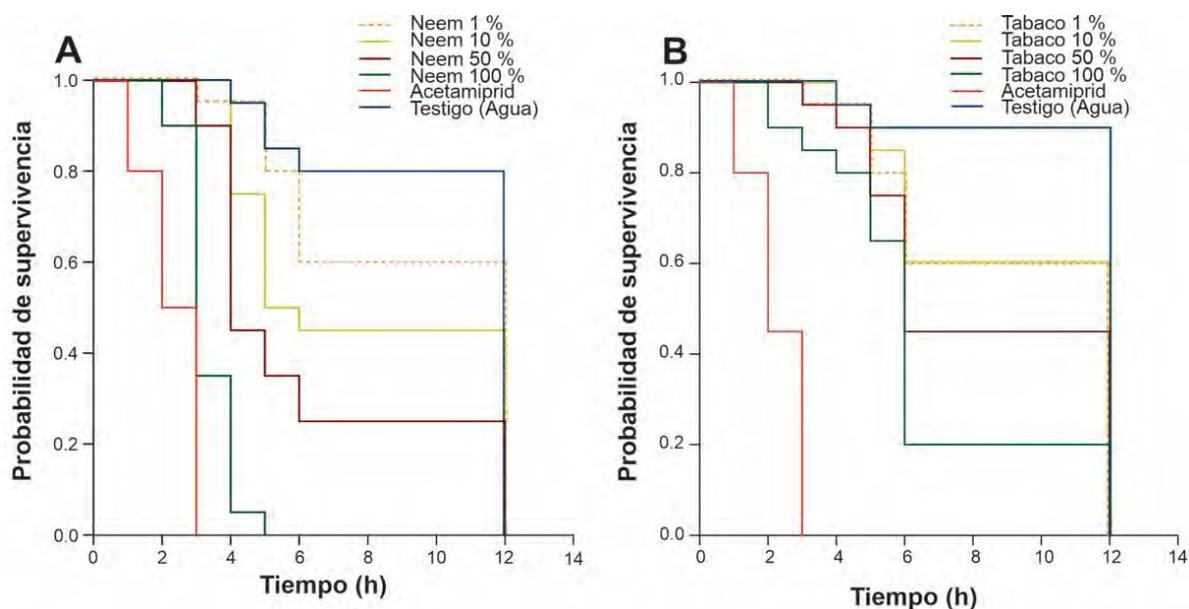


Figura 1: Curva de supervivencia (Long Rank Test) de *T. aurantii* expuestos a superficies tratadas con extractos de A) neem (*A. indica*). B) y tabaco (*N. tabacum*), insecticida acetamiprid y agua.

Tratamiento	n°	TL ₅₀ (h) 95% de límites de confianza	Desviación Standar	GL	Valor P
Neem 1%	20	12,00 (0,00-0,00)	0,00	5	<0,001
Neem 10%	20	5,00 (3,54-6,46)	0,75		
Neem 50%	20	4,00 (3,52-4,49)	0,25		
Neem 100%	20	3,00 (2,62-3,38)	0,19		
Acetamiprid	20	2,00 (1,45-2,55)	0,28		
Agua	20	12,00 (0,00-0,00)	0,00	5	<0,001
Tabaco 1%	20	12,00 (0,00-0,00)	0,00		
Tabaco 10%	20	12,00 (0,00-0,00)	0,00		
Tabaco 50%	20	6,00 (5,27-6,73)	0,37		
Tabaco 100%	20	6,00 (5,61-6,39)	0,20		
Acetamiprid	20	2,00 (1,38-2,62)	0,32		
Agua	20	12,00 (0,00-0,00)	0,00		

GL= Grados de libertad.

Tabla 1. Tiempo letal medio (TL₅₀) de *T. aurantii* expuestos a superficies tratadas con extractos de neem (*A. indica*) y tabaco (*N. tabacum*), insecticida acetamiprid y agua.

Entre los tratamientos evaluados el insecticida acetamiprid alcanzó la mortalidad más rápida de los pulgones expuestos a superficies tratadas (TL₅₀ = 2 h). Este rápido efecto sobre los pulgones se debe a que acetamiprid es un neonicotinoide que tiene un modo de acción a nivel del sistema nervioso central, actúa como agonista

de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR's) responsables de una rápida neurotransmisión excitatoria, causando parálisis y la mortalidad de los insectos^{24,25}.

El TL₅₀ a las 3 h fue obtenido con la concentración de neem al 100 %, mientras que, el extracto de tabaco alcanza este resultado a las 6 h. Aunque las concentraciones al 100 % de neem y tabaco causaron mortalidad, el tratamiento con neem tuvo un efecto más rápido. El neem, posee compuestos que demuestran su actividad insecticida en el control de más de 200 especies de insectos, incluyendo insectos chupadores tales como: *Bemissia tabaci* (Gennadius), *Myzus persicae* (Sulzer), y *T. aurantii*^{15,26,27}. Las plantas de tabaco también contienen metabolitos con potencial insecticida, uno de los principales es la nicotina²⁸ y puede actuar sobre el sistema nervioso, sobre el sistema digestivo y como repelente²⁹. El uso de esta especie botánica ha sido efectiva en el control de áfidos, trips, psílidos, tingidos, escarabajos, lepidópteros, ente otros^{29,30}.

Aunque los extractos botánicos de neem y tabaco han mostrado ser eficientes para el control de *T. aurantii*¹⁵, en este estudio se pudo identificar que el porcentaje de mortalidad y el tiempo de mortalidad varían dependiendo de la especie botánica, la concentración utilizada y el método de aplicación. Diferencias significativas fueron encontradas entre los extractos botánicos ($F_{1,41} = 5,05$; $P < 0,01$), en donde, el extracto de neem presentó un efecto en la mortalidad superior al extracto de tabaco. También, fue posible evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos en los que se utilizó concentraciones de extractos de *A. indica*, ($F_{5,18} = 9,78$; $P < 0,01$), y de *N. tabacum* ($F_{5,18} = 7,81$; $P < 0,01$) comparadas con el insecticida (acetamiprid) y agua (Tabla 2).

Tratamiento	n°	Individuos muertos	Mortalidad (%)	Desviación Standar	Valor P
Neem 1 %	20	8	40,00 a	0,82	<0,001
Neem 10 %	20	11	55,00 ab	1,71	
Neem 50 %	20	15	75,00 ab	0,96	
Neem 100 %	20	20	100,00 b	0,00	
Insecticida	20	20	100,00 b	0,00	
Agua destilada	20	4	20,00 a	1,41	<0,001
Tabaco 1 %	20	4	20,00 a	1,15	
Tabaco 10 %	20	8	40,00 abc	1,83	
Tabaco 50 %	20	11	55,00 abc	1,89	
Tabaco 100 %	20	16	80,00 bc	0,82	
Insecticida	20	20	100,00 c	0,00	
Agua destilada	20	2	10,00 a	0,58	

Letras diferentes en los valores obtenidos indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Tabla 2: Porcentaje de mortalidad de pulgones (*T. aurantii*) expuestos a superficies tratadas con extractos de neem (*A. indica*), tabaco (*N. tabacum*), acetamiprid y agua destilada.

Concentración Letal media (CL₅₀)

De acuerdo con el análisis de regresión probit el valor de la CL₅₀ (95 % de intervalo de confianza) para el extracto de neem fue de Log % = 1,07 equivalente a 11,74 % (0,05 kg L⁻¹) (Figura 2A), mientras que, para la evaluación realizada con las concentraciones de tabaco la CL₅₀ (95 % de intervalo de confianza) fue de Log % = 1,66 equivalente a 45,77 % (0,18 kg L⁻¹) (Figura 2B). En las evaluaciones realizadas fue posible evidenciar que para ambos bioensayos el coeficiente de regresión de probit es positivo. Esto indica que, en los dos casos, el porcentaje de mortalidad aumenta a mayor concentración utilizada.

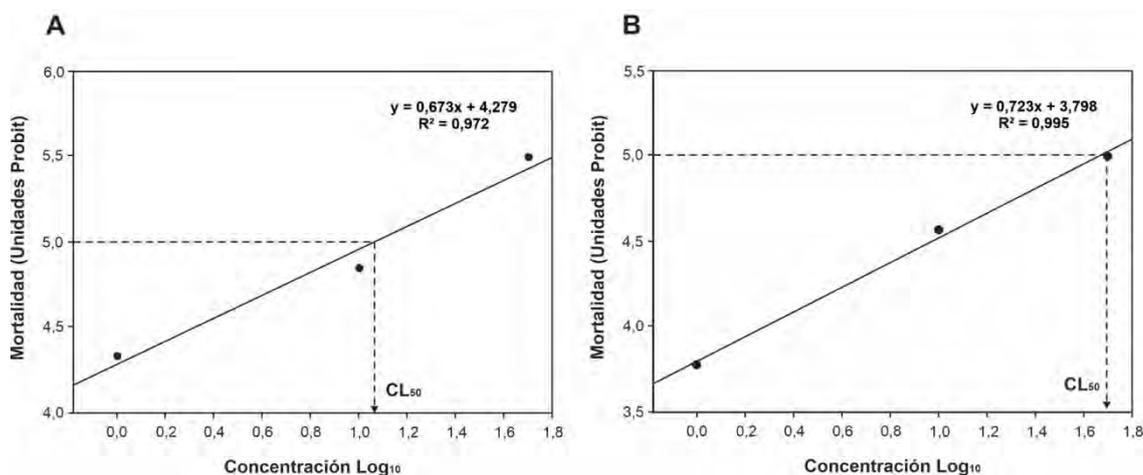


Figura 2: A) Regresión lineal entre la mortalidad en unidades probit y la concentración Log₁₀ de pulgones (*T. aurantii*) expuestos a superficies tratadas con diferentes concentraciones de extractos naturales de *A. indica* (Log 1,07) y B) *N. tabacum* (Log 1,66) después de 6 h del inicio de la exposición.

El neem (*A. indica*) ha sido utilizado como método de control de plagas y emergentemente como una alternativa viable para pequeños agricultores³¹. No existe información sobre la CL₅₀ de extractos de neem en *T. aurantii* aplicados en exposición aguda de contacto a través de superficies de papel filtro, sin embargo; en este estudio fue posible obtener un valor de CL₅₀ = 0,05 kg L⁻¹. La estimación obtenida de CL₅₀ muestra que, *T. aurantii* es susceptible al uso de extractos de neem. Esto se puede atribuir al alto contenido de azadiractina, compuesto considerado el más potente de los limonoides con actividad tóxica para los artrópodos, lo que puede contribuir al control de insectos chupadores. Como resultado, valores más bajos de CL₅₀ significan una mayor toxicidad y, en consecuencia, se requiere cantidades más pequeñas del extracto para matar al 50 % de la población que estuvo expuesta.

La CL₅₀ para pulgones expuestos a superficies de papel filtro tratadas con extractos de neem tampoco ha sido registrada anteriormente. El resultado de la CL₅₀ obtenido en este estudio es equivalente a 0,18 kg L⁻¹, mostrando que se requieren mayores concentraciones del extracto para causar la mortalidad del 50 % de individuos tratados. La aplicación de extractos tanto de neem como de tabaco sobre papel filtro simula el contacto de los pulgones sobre las superficies tratadas en la planta de cacao.

Repelencia (bioensayo de elección pareada)

El análisis de repelencia entre la proporción de pulgones (*T. aurantii*) que seleccionaron superficies tratadas con extracto de *A. indica* e insecticida (Acetamiprid) contra la superficie no tratada (agua), mostró diferencias significativas únicamente para los tratamientos en los que se utilizó insecticida (Acetamiprid) ($t_{1,3} = 17,45$; $P < 0,001$) y extracto de neem en la concentración del 100% ($t_{1,3} = 5,18$; $P < 0,001$). En estos tratamientos el 8 % y 28% de pulgones permanecieron en el lado tratado con insecticida y extracto de neem al 100% respectivamente (Figura 3A). Situación similar ocurrió para el ensayo en los que se utilizó extractos de tabaco en diferentes concentraciones e insecticida contra el lado no tratado (agua). Se encontraron diferencias entre los tratamientos en los que se utilizó insecticida ($t_{1,3} = 35,5$; $P < 0,001$) y extracto de tabaco en la concentración del 100% ($t_{1,3} = 3,21$; $P < 0,001$). En estos tratamientos el 7 % y 38% de pulgones permanecieron en el lado tratado con insecticida y extracto de neem al 100% respectivamente (Figura 3B).

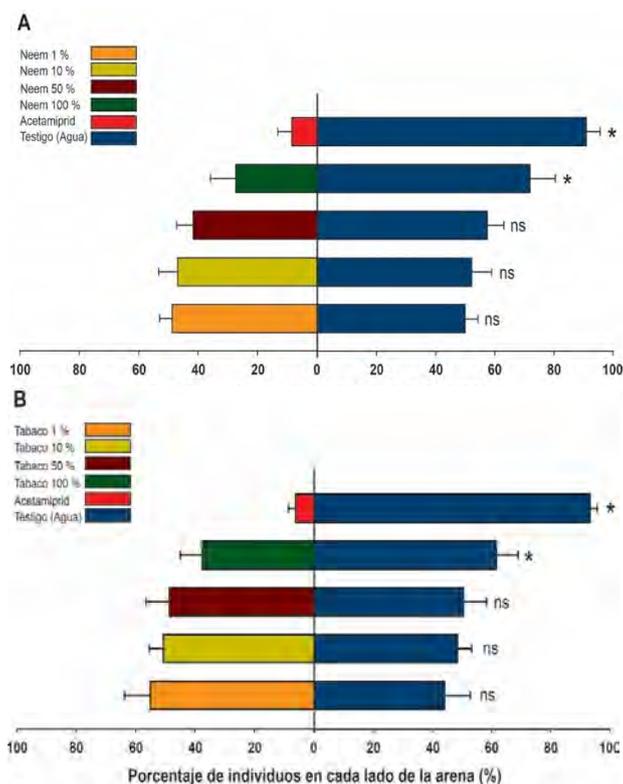


Figura 3: Pulgones (*T. aurantii*) expuestos a superficies tratadas con diferentes concentraciones de extractos naturales de A) neem (*A. indica*), B) y de tabaco (*N. tabacum*), insecticida acetamiprid y agua destilada. Las barras azules representan la mitad del papel filtro tratado con agua destilada y las barras de colores la mitad del papel filtro tratado con las concentraciones de los extractos e insecticida. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las superficies del control y los extractos o insecticida. Prueba t pareada a un nivel de significancia del 5 %.

El porcentaje de repelencia observado fue mayor en las superficies tratadas con insecticida; como fue mencionado anteriormente el acetamiprid es un compuesto que actúa sobre el sistema nervioso de los insectos; puede presentar acción de contacto u oral^{25,32}. Concentraciones de acetamiprid que son consideradas bajas son capaces de inhibir rápidamente la locomoción del insecto³³. En este estudio, tal como lo ocurrido con el tratamiento de insecticida, la concentración de 100% de extractos neem y tabaco mostró altos porcentajes de repelencia. Las hojas de neem y tabaco son repelentes para insectos debido a la presencia de compuestos como la azadiractina y la nicotina respectivamente^{34;35}. La nicotina, así como la clase de pesticidas sintéticos neonicotinoides, se dirigen al sistema nervioso de los insectos al actuar como agonistas o antagonistas con sitios de unión de nAChR³⁶, así mismo, la azadiractina, produce alteraciones en el sistema nervioso central de los insectos³⁷. Probablemente, el modo de acción de los extractos de neem y tabaco estén directamente relacionado con los resultados obtenidos. Los resultados de este estudio sugieren que la aplicación de extractos botánicos de neem y tabaco en superficies tratadas son eficientes para el control de *T. aurantii*, su uso podría tornarse en una alternativa adicional para el control de esta plaga; especialmente para los pequeños productores de cacao y considerando el enfoque ecológico de cada plantación. Estudios adicionales deben ser realizados para evaluar el uso de extractos botánicos de *A. indica* y *N. tabacum* utilizando diferentes concentraciones y formas de extracción (maceración, decocción y fermentación). Adicionalmente, es necesario considerar la aplicación de extractos acuosos de *A. indica* y *N. tabacum* directamente en las estructuras consumidas por el pulgón (brotes tiernos, flores de cacao) o sobre el propio cuerpo del pulgón en condiciones naturales.

CONCLUSIONES

El extracto de *A. indica* y *N. tabacum* en concentración del 100 % ocasiona la mortalidad del 100 % y 80 % de los pulgones expuestos a superficies tratadas respectivamente. El TL₅₀ de los pulgones expuestos a los extractos de neem o tabaco depende de la concentración usada. La CL₅₀ para extractos de neem fue de 0,05

kg L⁻¹ % y para tabaco de 0,18 kg L⁻¹. Los extractos de neem y tabaco en concentración del 100 %, causan la repelencia del pulgón (*T. aurantii*) en un 70 % y 60 % respectivamente al ser expuestos a superficies tratadas. El uso de extractos botánicos de *A. indica* y *N. tabacum* son eficientes en el control de *T. aurantii* en condiciones controladas, sin embargo; es necesario verificar sus efectos en condiciones de campo como posible alternativa para el control de esta plaga y considerando su efecto sobre otros organismos que conforman el agroecosistema de cacao.

Contribuciones de los autores: Conceptualización, M.V., K.T.G. y J.P.R.; metodología, M.V. y J.P.R., análisis formal, M.V., K.T.G. y F.H.E.; investigación, M.V., K.T.G.; curación de datos, M.V. y F.H.E.; escritura: preparación del borrador original, K.T.G y J.P.R.; escritura: revisión y edición, M.V., J.P.R y F.H.E.; supervisión, M.V.; administración del proyecto, M.V.; K.T.G.; adquisición de fondos, M.V. Todos los autores han leído y aceptado la publicación de este manuscrito.

Financiamiento: Esta investigación es apoyada por el Fondo Competitivo de Investigación Científica y Tecnológica (FOCICYT) 7^{ma} Convocatoria, a través del proyecto PFOC7-20-2020.

Agradecimientos: Al Ing. Erick García, responsable del laboratorio de Química y Bioquímica de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por el apoyo durante la ejecución de los experimentos.

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCES

1. Morales IFL, Carrillo ZMD, Ferreira NJA, Peña GMM, Briones CWR, Albán MMN. Cadena de comercialización del cacao nacional en la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Revista Ciencia y Tecnología*. 2018; 11(1):63–9. DOI:10.18779/cyt.v11i1.222
2. Alcivar CKS, Campoverde JQ, Unda SB, Montealegre VJG, Romero HC. Análisis económico de la exportación del cacao en el Ecuador durante el periodo 2014–2019. *Polo del Conocimiento: Revista científico-profesional*. 2021; 6(3):2430–44.
3. Armengot L, Ferrari L, Milz J, Velásquez F, Hohmann P, Schneider M. Cacao agroforestry systems do not increase pest and disease incidence compared with monocultures under good cultural management practices. *Crop prot*. 2020; 130:105047. DOI: 10.1016/j.cropro.2019.105047
4. Serrana JM, Ormenita LAC, Almarinez BJM, Watanabe K, Barrion AT, Amalin DM. Life history and host plant assessment of the cacao mirid bug *Helopeltis bakeri* poppius (Hemiptera: Miridae). *Phytoparasitica*. 2022; 50(1):1–12. DOI: 10.1007/s12600-021-00957-1
5. Killiny N, Harper SJ, Alfaress S, El Mohtar C, Dawson WO. Minor coat and heat shock proteins are involved in the binding of citrus tristeza virus to the foregut of its aphid vector, *Toxoptera citricida*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2016; 82(21):6294–302. DOI: 10.1128/AEM.01914-16
6. Gholamzadeh-Chitgar M, Pourmoradi S. An evaluation of the effect of botanical insecticide, palizin in comparison with chemical insecticide, imidacloprid on the black citrus aphid, *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe and its natural enemy, *Aphidius colemani* Viereck. *J. Plant Prot. Res*. 2017; 57(2). DOI: 10.1515/jppr-2017-0013
7. Yan X, Yuan H, Zhou X, Wang M, Shi X, Chen Y, et al. Control efficacy of different pesticide formulations and fan-nozzle model on wheat aphids by UAVs. *Int. J. Precis. Agric. Aviat*. 2020; 3(2).
8. Zuhra B, Ahmad K, Ali S, Hussain A, Nafees MA, Ali S, et al. Assessing the toxic potential of insecticide and indigenous botanical extract against the stored grain pest *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pol. J. Environ. Stud*. 2018; 5:2377–83. DOI: 10.15244/pjoes/79436

9. Rioba NB, Stevenson PC. Opportunities and scope for botanical extracts and products for the management of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) for smallholders in Africa. *Plants*. 2020; 9(2):207. DOI: 10.3390/plants9020207
10. Tarcaya VP, Di Leo Lira PM del R, Cufre IM, González S, Clemente SV, Broussalis AM. Ovidia andina: actividad insecticida, extracto y compuestos activos. *Rev. Latinoam. de química*. 2014; 42(1); 89–96.
11. Rahman S, Biswas SK, Barman NC, Ferdous T. Plant extract as selective pesticide for integrated pest management. *Biotec. Res. J*. 2016; 2(1):6–10.
12. Bezerra CWF, de Oliveira CRF, Cysneiros CH, Matos TGF da S, Alves JJA, Fonseca KS. Effect of *Prosopis juliflora* and *Ziziphus joazeiro* plant extracts on *Stethorus tridens* predatory behaviour on *Tetranychus bastosi*. *Bull. Insectology*. 2021; 74(2):265–71.
13. de Paula JAM, Castiglioni GL, Brito LF. Mechanical Drying of *Azadirachta indica* A. Juss. Seeds: a Tool to Keep Quality of this Eco-Friendly Bio-Insecticide. *Front., J. Soc., Technol. Environ. Sci*. 2021; 11(1), 39-44. DOI: 10.21664/2238-8869.2022v11i1.p39-44
14. Benelli G, Canale A, Toniolo C, Higuchi A, Murugan K, Pavela R, et al. Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? *Nat. Prod. Res*. 2017; 31(4):369–86. DOI: 10.1080/14786419.2016.1214834
15. Sohail A, Hamid FS, Waheed A, Ahmed N, Aslam N, Zaman Q, et al. Efficacy of different botanical materials against aphid *Toxoptera aurantii* on tea (*Camellia sinensis* L.) cuttings under high shade nursery. *J. Mater. Environ. Sci*. 2012; 3(6):1065–70.
16. Raj A. Toxicological effect of *Azadirachta indica*. *Asian J. Multidiscip. Stud*. 2014; 2(9): 29–33.
17. Islam W, Noman A, Akutse KS, Qasim M, Ali H, Haider I, Hashem M. et al. Int. J. Trop. Insect Sci. Phyto-derivatives: an efficient eco-friendly way to manage *Trogoderma granarium* (Everts)(Coleoptera: Dermestidae). 2021; 41, 915–926.
18. Firempong S. Biology of *Toxoptera aurantii* (Homoptera: Aphididae) on cocoa in Ghana. *J. Nat. Hist*. 1977; 11(4):409–16.
19. López SMC, Urbano JM, López MN. Efectos alelopáticos de extractos acuosos de arvenses sobre la germinación de trigo duro y *Lolium rigidum*. In: XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología: La Malherbología y la transferencia tecnológica (2015), p 21-28. Junta de Andalucía: Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural; 2015.
20. Asoufi HM, Al-Antary TM, Awwad AM. Green route for synthesis hematite (α -Fe₂O₃) nanoparticles: Toxicity effect on the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag*. 2018; 9:107–11. DOI: 10.1016/j.enmm.2018.01.004
21. Abdelkader H, Abdelkader B, Yahia B. Toxicity and repellency of *Eucalyptus globulus* L. essential oil against *Aphis fabae* Scopoli, 1763 (Homoptera: Aphididae). *J. Ent. Res*. 2020; 44(1):147–52. DOI: 10.5958/0974-4576.2020.00027.4
22. RStudio T. RStudio: integrated development for R. Rstudio Team, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>. 2020.
23. SAS Institute. SAS/STAT user's guide. Cary, NC: SAS Institution; 2008.
24. Salazar GE, Palomino AL, García HE. Adsorción de neonicotinoides usando estructuras tipo fullerenos: Un estudio DFT. *Nova scientia*. 2018; 10(21):326–43. DOI: 10.21640/ns.v10i21.1572

25. Cheng X, Li F, Chen J, Wang H, Mao T, Li J, et al. Mechanism of trace acetamiprid-caused reproductive disorders in silkworm, *Bombyx mori*. *Pest Manag. Sci.* 2019; 75(10):2672–81. DOI: 10.1002/ps.5373
26. Shannag HS, Capinera JL, Freihat NM. Efficacy of different neem-based biopesticides against green peach aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Int. J. Agric. Policy Res.* 2014 ;2(2):61–8.
27. Castillo-Sánchez LE, Jiménez-Osornio JJ, Delgado-Herrera MA, Candelaria-Martínez B, Sandoval-Gío JJ. Effects of the hexanic extract of neem *Azadirachta indica* against adult whitefly *Bemisia tabaci*. *J Entomol. Zool. Stud.* 2015; 5:95–9.
28. Archana Tiwari, M. M. Lakshamana Kumar & R. C. Saxena. Effect of *Nicotiana tabacum* on *Tribolium castaneum*. *Int. J. pharmacogn.* 1995; 33(4):348–50. DOI: 10.3109/13880209509065392
29. Sarker S, Lim UT. Extract of *Nicotiana tabacum* as a potential control agent of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *PLoS One.* 2018; 13(8):e0198302. DOI: 10.1371/journal.pone.0198302
30. Tavares WR, Barreto M do C, Seca AML. Aqueous and ethanolic plant extracts as bio-insecticides—Establishing a bridge between raw scientific data and practical reality. *Plants.* 2021; 10(5):920. DOI: 10.3390/plants10050920
31. Silva MS, Broglio SMF, Trindade RCP, Ferrreira ES, Gomes IB, Micheletti LB. Toxicity and application of neem in fall armyworm. *Comun. Sci.* 2015; 6(3):359–64. DOI: 10.14295/cs.v6i3.808
32. Fogel MN, Schneider MI, Desneux N, González B, Ronco AE. Impact of the neonicotinoid acetamiprid on immature stages of the predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology.* 2013; 22:1063–71. DOI: 10.1007/s10646-013-1094-5
33. Rust MK, Saran RK. Toxicity, repellency, and effects of acetamiprid on western subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.* 2008; 101(4):1360–6. DOI: 10.1603/0022-0493(2008)101[1360:traea]2.0.co;2
34. Jufri M, Irmayanti E, Gozan M. Formulation of tobacco based mosquito repellent to avoid dengue fever. *Int. J. Pharmtech. Res.* 2016; 9(7):140–5.
35. Roychoudhury R. Neem products. In: *Ecofriendly pest management for food security.* Elsevier; 2016. p. 545–562. DOI: 10.1016/B978-0-12-803265-7.00018-X
36. Gog L, Vogel H, Hum-Musser SM, Tuter J, Musser RO. Larval *Helicoverpa zea* transcriptional, growth and behavioral responses to nicotine and *Nicotiana tabacum*. *Insects.* 2014; 5(3):668–88. DOI: 10.3390/insects5030668
37. Chaudhary S, Kanwar RK, Sehgal A, Cahill DM, Barrow CJ, Sehgal R, et al. Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. *Front. Plant Sci.* 2017; 8:610. DOI: 10.3389/fpls.2017.00610

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Vélez, R.M.C.; Tapia-Gualpa, K.L.; Reyes-Pérez, J.J.; Herrera-Eguez, F.E. Evaluación de extractos acuosos de neem (*Azadirachta indica*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) para el control del pulgón negro del cacao (*Toxoptera aurantii*). *Revis Bionatura* 2023;8 (4)

24. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.24>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Antimicrobial and Antioxidant Activity of Rhamnolipids Biosurfactant is Produced by *Pseudomonas aeruginosa*

Nassir Abdullah Alyousif^{1,♥}, Wijdan H. Al-tamimi², Yasin Y. Y. Al-luaibi³

¹Department of Ecology, College of Science, University of Basrah. Basrah, Iraq.

²Department of Biology, College of Science, University of Basrah. Basrah, Iraq, wijdan.abdulsahib@uobasrah.edu.iq, <https://orcid.org/0000-0002-5474-334X>

³Department of Biology, College of Science, University of Basrah. Basrah, Iraq, yasin.yousif@uobasrah.edu.iq, <https://orcid.org/0000-0001-8380-5960>

*Corresponding author: nassir.hillo@uobasrah.edu.iq, <https://orcid.org/0000-0001-5316-7195>

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.25>

ABSTRACT

Rhamnolipids are the glycolipid biosurfactant produced by different *Pseudomonas* species; they show antimicrobial activity and antioxidant. The findings of antimicrobial activity showed the rhamnolipid biosurfactant had an antimicrobial effect against the microorganisms at different concentrations, such as toward *Bacillus cereus* and *Klebsiella pneumoniae*, while a lower inhibitory effect toward *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The rhamnolipid biosurfactant was shown to have a lower inhibitory effect against fungal strains *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. The lower minimum inhibitory concentration (MIC) values of rhamnolipid biosurfactant toward the investigated microorganisms were 2 mg/ml for *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* and 3 mg/ml for *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Rhamnolipid biosurfactant was tested as an antioxidant agent; the results showed 22.7 %, 47.4 %, 79.8 %, 85 % and 91.4 % of antioxidant activity at concentrations 5, 10, 15, 20 and 25 mg/ml, respectively. Cytotoxicity of the rhamnolipid biosurfactant was also examined at different concentrations against human erythrocytes. Hemolysis of the erythrocytes was observed at concentrations 100, 75, 50, 40 and 35 mg/ml, whereas the results exhibited no hemolysis at concentrations 25 and 15 mg/ml. The study concluded that rhamnolipid biosurfactant showed effective antioxidant activity, no hemolysis at lower concentrations and has a high antimicrobial effect. The rhamnolipid biosurfactant is a suitable and great alternative to be employed as an effective and safe therapeutic agent.

Keywords: Antimicrobial; Antioxidant; Cytotoxicity; Rhamnolipid; *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

Antibiotic abuse has led to the developing of multi-drug resistant pathogens to commercially marketed antibiotics. The combatting of resistant infections emergence is required to search for the development of novel antimicrobial drugs having broad spectrum antimicrobial activity¹. The problem of the increasing resistance by pathogens to some antimicrobial compounds has paid attention to investing in natural compounds with various mechanisms of action as suitable alternatives to existing antibiotics². Several biosurfactant compounds have exhibited antimicrobial activity against different human pathogenic bacteria, making them a suitable substitute for existing antimicrobial agents as potent therapeutic agents³.

Rhamnolipids are the glycolipid biosurfactant that is produced by different bacterial species such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plantarii*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*,

Pseudomonas fluorescens, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Serratia rubidaea* SNAU02^{4,5,6,7}.

Pseudomonas aeruginosa is a significant producer of the rhamnolipid biosurfactant, which is widely distributed in the environment and can be available in various habitats, where it survives in these habitats due to its extraordinary physiological abilities⁸. Rhamnolipids are sustainable and have excellent physicochemical properties, making them attractive for utilization in cosmetic, food, pharmaceutical, and detergent manufacturing⁹. Rhamnolipids are suitable food additives as food preservatives and texturizing agents such as antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and stabilizers that can be used in food processing¹⁰.

Remarkable inhibitory activity of rhamnolipids biosurfactants against Gram-positive bacteria and two fungi species *Chaetonium globosum* and *Penicillium funiculosum*, while no inhibition was shown effects against Gram-negative bacteria and two fungi species *Aureobasidium pullulans* and *Penicillium chrysogenum*¹¹. The antimicrobial activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *P. aeruginosa* ST5 against a variety of opportunistic and pathogenic microorganisms, including antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and the fungal pathogens including *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*¹².

The exact mechanism action of rhamnolipid biosurfactant against microbes is not entirely understood and unknown. Still, it is supposed that the plasma membrane of the cell is the target, as the rhamnolipid has an amphipathic nature that allows it to interact with the phospholipids of the plasma membrane¹³. The current study aimed to assess the antimicrobial and antioxidant activity of rhamnolipids biosurfactants formed by local *Pseudomonas aeruginosa* isolate.

MATERIALES Y MÉTODOS

The rhamnolipid biosurfactant Production

The rhamnolipid biosurfactant in the current study was produced from *Pseudomonas aeruginosa* in a previous study from hydrocarbon-contaminated soil¹⁴. The rhamnolipid biosurfactant was extracted, purified, and characterized in a previous study¹⁵.

Biological activity

Antimicrobial activity of the rhamnolipid biosurfactant

The antimicrobial effect of the rhamnolipid biosurfactant was carried out according to Nanda and Saravanan¹⁶. The antimicrobial effect was measured using the agar well diffusion method. The bacterial isolates (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) and two fungal strains include *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were activated individually on Mollar Hinton agar. The rhamnolipid biosurfactant was dissolved in DMSO to prepare the following concentrations (5, 10, 15, 20 and 25 mg/ml) using the serial rhamnolipid dilution technique. The antimicrobial effect of the rhamnolipid biosurfactant was determined by measuring the inhibition zone diameter against each strain.

Minimal Inhibition Concentration (MIC)

The rhamnolipid biosurfactant's minimal inhibition concentration (MIC) value was determined according to TC *et al.*¹⁷. MIC was determined by a serial dilution technique using the agar diffusion method. A 10 mg/ml stock solution of the rhamnolipid biosurfactant in DMSO was diluted to concentrations 1, 2, 3 and 4 mg/ml. The minimal inhibition concentration (MIC) value was determined against a panel of pathogenic isolates provided by the Department of Biology, College of Science, University of Basrah.

Antioxidant activity of rhamnolipid biosurfactant

According to Barros *et al.*¹⁸, the method was carried out with some modifications in the present study. One ml of sample at concentrations 5 and 10, 15, 20 and 25 mg/ml of Dimethylsulfoxide (DMSO) were added to 1 ml of 0.2 mM methanolic 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) of freshly prepared DPPH solution. The reduction of DPPH radicals was measured by spectrophotometer (PG, UK) at 517 nm after incubation in the dark for 30 min. Ascorbic acid was used as the positive control with the same concentration of the samples. The percentage of scavenged DPPH radical was calculated using the following formula:

DPPH radical scavenging % = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$

Where A_0 is the absorbance of the DPPH solution, and A_1 is the absorbance of the sample.

Cytotoxicity assay of rhamnolipid biosurfactant

The toxicity of rhamnolipid was tested against human erythrocytes according to a method of He *et al.*¹⁹. The blood suspension was prepared by adding 1 ml of blood into 20 ml of physiological saline. The rhamnolipid concentrations (15, 25, 35, 50, 75 and 100 mg/ml) were prepared in DMSO. The test was performed by adding 100 μ l of varying concentrations to 2 ml of blood suspension. Then, the tubes were incubated at 37 °C, and the turbidity of the solution was monitored after (3-24 h). The positive result was turning the blood solution into turbid, while the negative result was turning the blood solution into clear. Blood suspension with tap water was used as a positive control, and blood suspension with normal saline was used as the negative control in addition to the DMSO as a control. The concentrations that gave a turbid solution due to lysing of erythrocytes as an indication of the toxicity degree of rhamnolipid.

RESULTADOS

The antimicrobial activity

The results of antimicrobial activity showed that the rhamnolipid biosurfactant had an antimicrobial effect against all the tested pathogenic isolates at all concentrations (5, 10, 15, 20 and 25 mg/ml); the antimicrobial effect was proportional to the rhamnolipid biosurfactant concentrations as shown in (figure 1 and table 1). The rhamnolipid biosurfactant showed a higher inhibitory effect against *Bacillus cereus* (21/5, 23/10, 24/15, 25/20 and 25/25 mm/mg) and *Klebsiella pneumoniae* (19/5, 20/10, 22/15, 23/20 and 24/25 mm/mg), while lower inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* (15/5, 19/10, 20/15, 20/20 and 20/25 mm/mg) and *Pseudomonas aeruginosa* (16/5, 19/10, 20/15, 20/20 and 20/25 mm/mg). The rhamnolipid biosurfactant was shown to lower inhibitory effect against fungal strains *Candida albicans* (15/5, 18/10, 19/15, 19/20 and 19/25 mm/mg) and *Aspergillus niger* (14/5, 15/10, 15/15, 15/20 and 16/25 mm/mg).

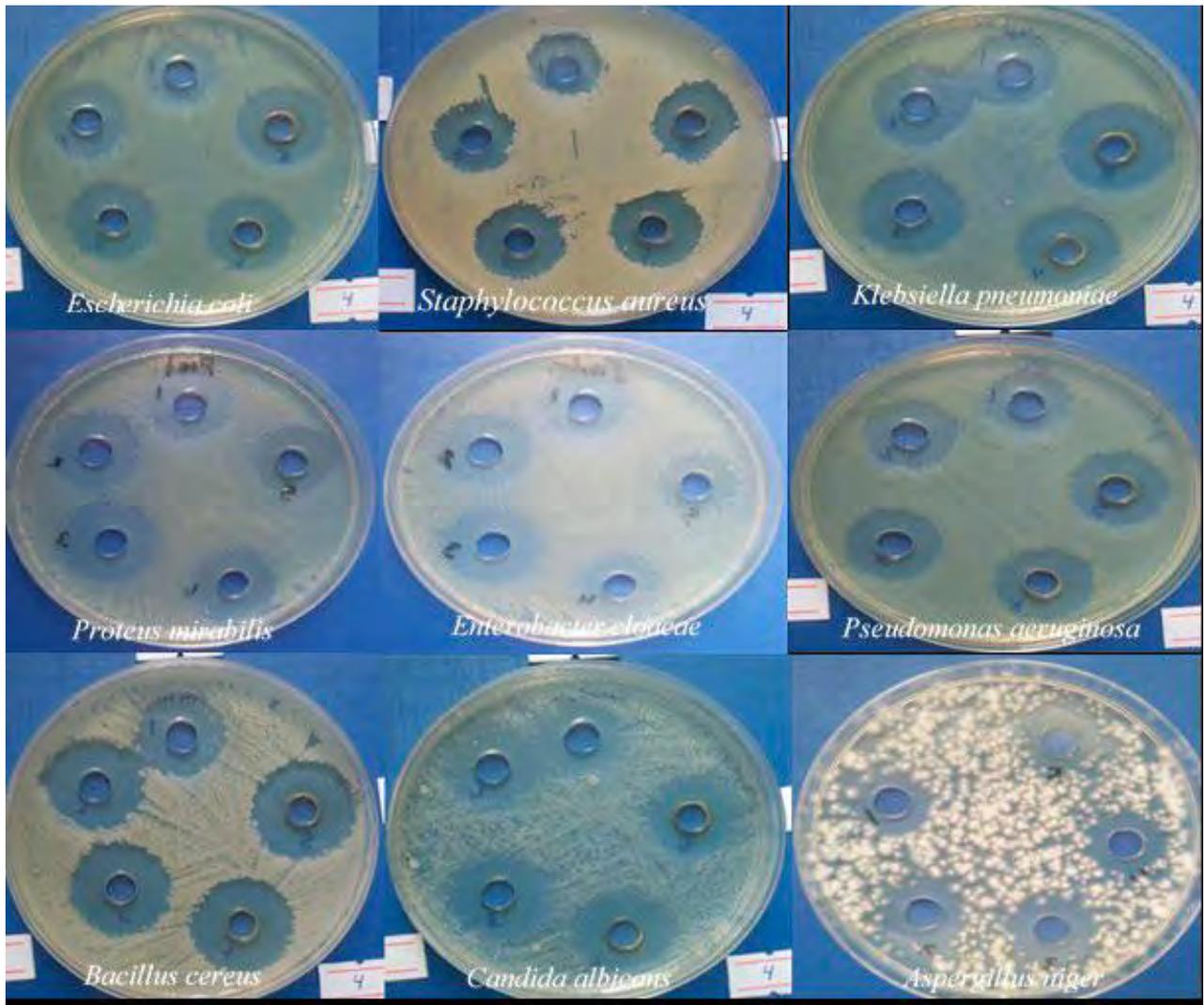


Figure 1: The antimicrobial activity of rhamnolipid biosurfactant at different concentrations (5, 10,15, 20 and 25 mg/ ml) against nine pathogenic isolates, including seven bacteria and two fungi

Microorganisms	Diameters of inhibition zone (mm). Rhamnolipid concentration mg/ml.				
	5mg	10mg	15mg	20mg	25mg
<i>E. coli</i>	16	19	21	21	22
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	19	20	20	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	20	22	23	24
<i>Proteus mirabilis</i>	19	19	22	22	15
<i>Enterobacter cloacae</i>	16	17	20	20	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	19	20	20	20
<i>Bacillus cereus</i>	21	23	24	25	25
<i>Candida albicans</i>	15	18	19	19	19
<i>Aspergillus niger</i>	14	15	15	15	16

Table 1: The antimicrobial activity of rhamnolipid biosurfactant against seven pathogenic bacteria and two pathogenic fungi.

Minimal Inhibition Concentration

The MIC values of rhamnolipid biosurfactant against pathogenic isolates are shown in Figure 2. The rhamnolipid biosurfactant showed the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) values against the

pathogenic isolates; it was 2 mg/ml for *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* and 3 mg/ml for *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* as shown in table 2.

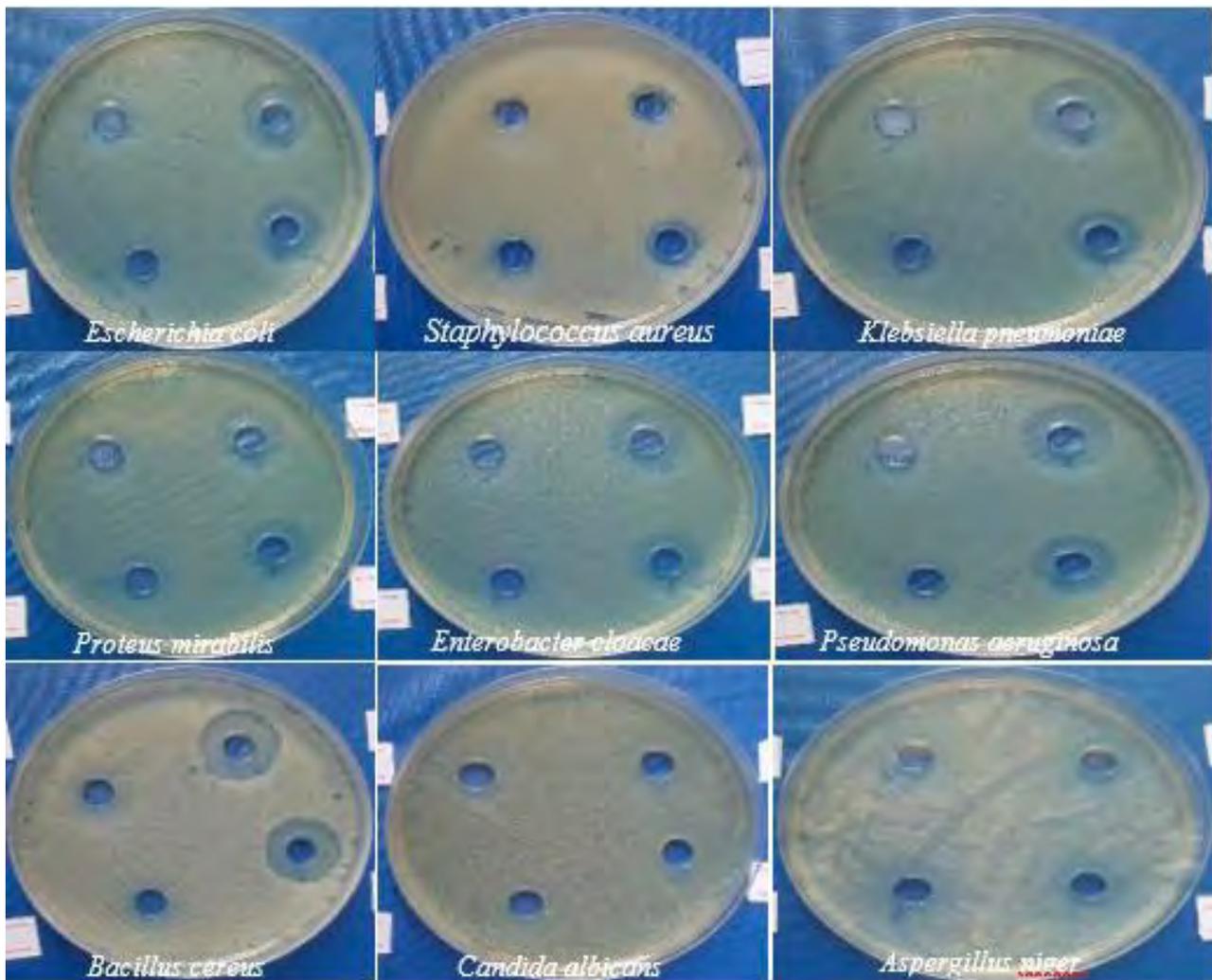


Figure 2: Minimal inhibitory concentration of rhamnolipid biosurfactant using concentrations 1, 2, 3 and 4 mg/ml against nine pathogenic isolates, including seven bacteria and two fungi.

Microorganisms	MIC mg/ml
<i>E. coli</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Bacillus cereus</i>	3
<i>Candida albicans</i>	3
<i>Aspergillus niger</i>	3

Table 2: The minimal inhibitory concentration of rhamnolipid biosurfactant against seven pathogenic bacteria and two pathogenic fungi.

Antioxidant activity

The antioxidant activity results of rhamnolipid biosurfactant showed 22.7 %, 47.4 %, 79.8 %, 85 % and 91.4 % at the concentrations (5, 10, 15, 20 and 25 mg/ml) respectively, as in Figure (3). The rhamnolipid biosurfactant revealed effective antioxidant activity toward DPPH in a concentration-dependent manner. In fact, at 25 mg/ml, the rhamnolipid biosurfactant showed a potential scavenging effect of 91.4 %, four times higher than that obtained at 5 mg/ml (22.7 %).

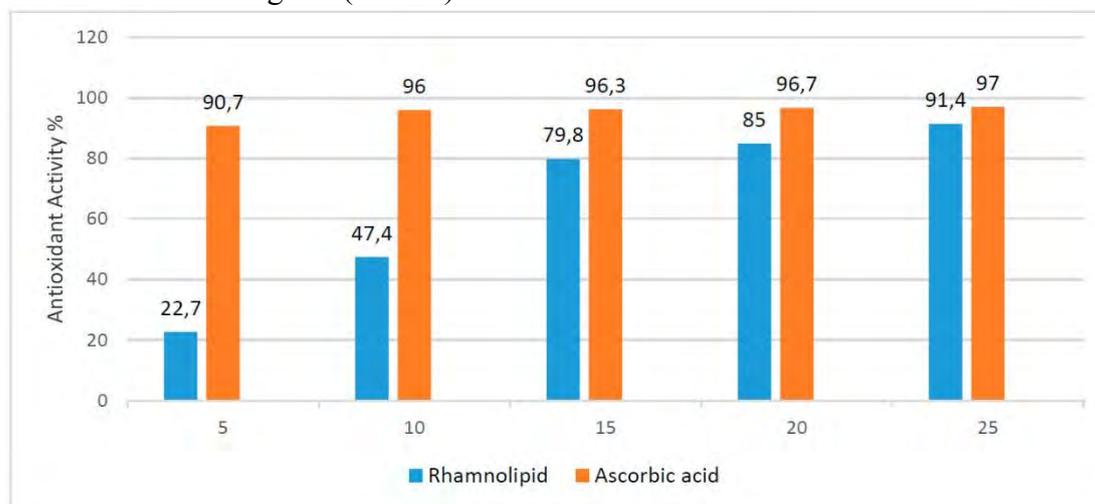


Figure 3: Antioxidant activity of different concentrations of rhamnolipid biosurfactant compared to the standard antioxidant ascorbic acid.

The solution color was changed from violet to yellow; it turned into a non-radical form after saturation of the electronic layer, leading to a loss of violet color due to lack of absorption in terms of time at a wavelength of 517 nm, as shown in figure 4.

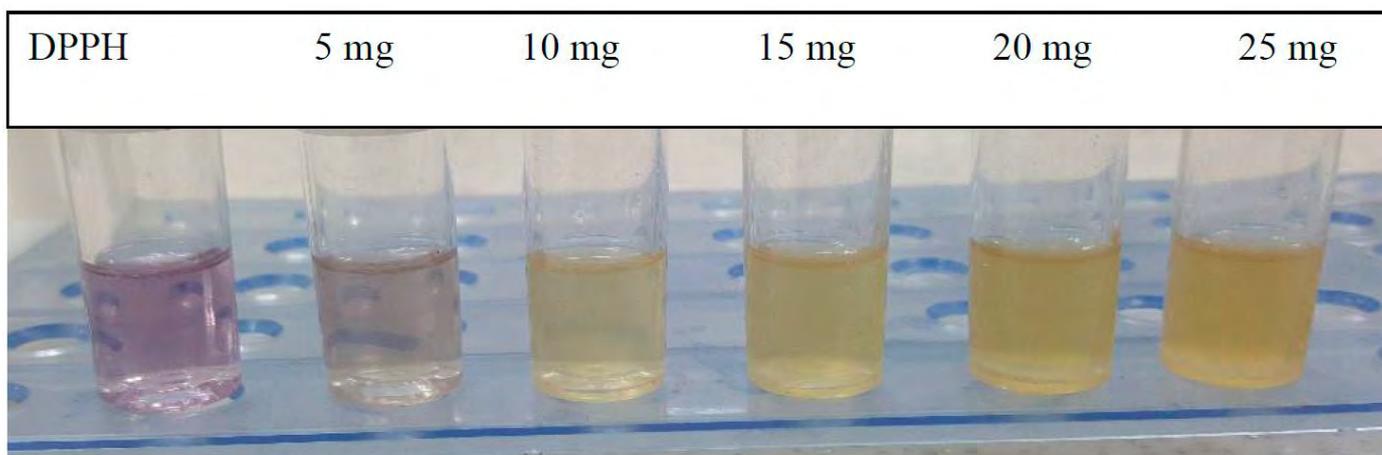


Figure 4: The antioxidant activity of different concentrations (mg/ml) of rhamnolipid biosurfactant using the DPPH method.

The antioxidant activity of rhamnolipid biosurfactant was assessed by calculating the IC_{50} value to determine the concentration of rhamnolipid biosurfactant required to inhibit 50% of free radical DPPH present in the mixture. High- IC_{50} values refer to low antioxidant activity. The IC_{50} value of rhamnolipid biosurfactant showed 10.6 mg/ml, as in Figure 5. Thus, the low IC_{50} value refers to high antioxidant activity.

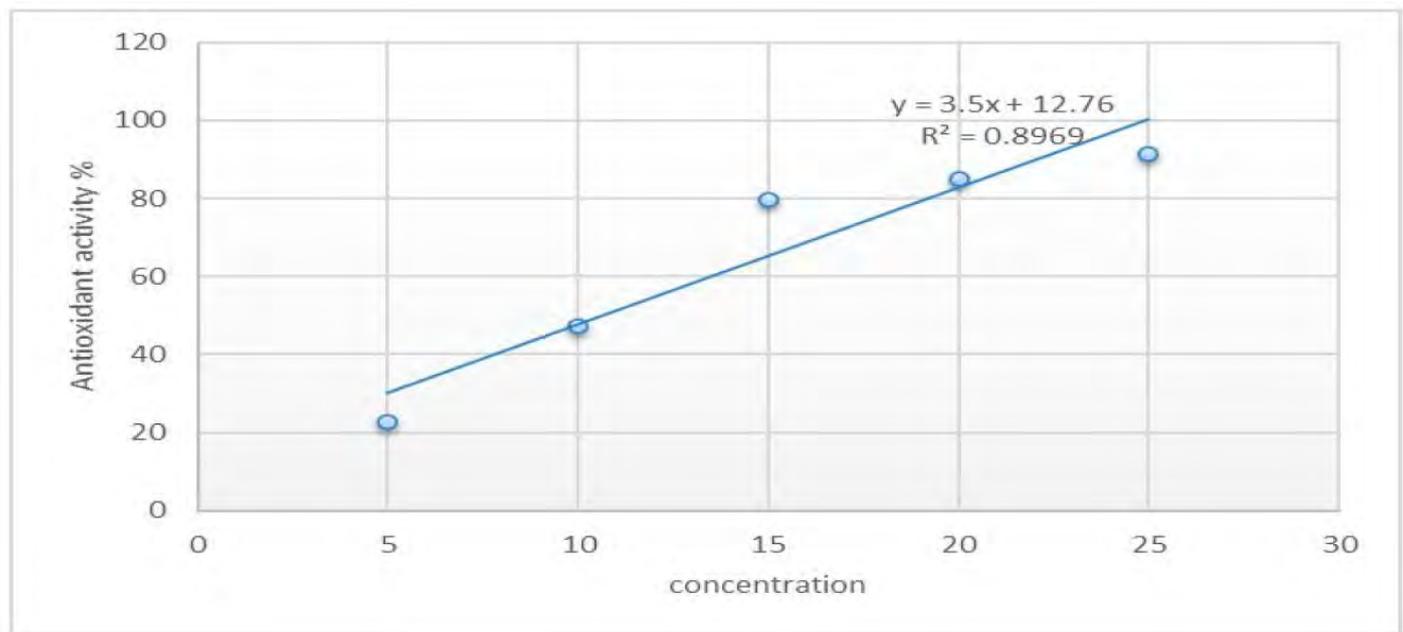


Figure 5: The curve of IC₅₀ value for rhamnolipid biosurfactant.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of the rhamnolipid biosurfactant was examined at different concentrations (15, 25, 35, 50, 75 and 100 mg/ml) against human erythrocytes. Hemolysis of the erythrocytes was observed at concentrations (100, 75, 50, 40 and 35 mg/ml) to a similar degree as in a positive control of tap water. In contrast, the results exhibited no hemolysis at concentrations (25 and 15 mg/ml) to a similar degree as in a negative control of DMSO exhibited no hemolysis as in figure 6.

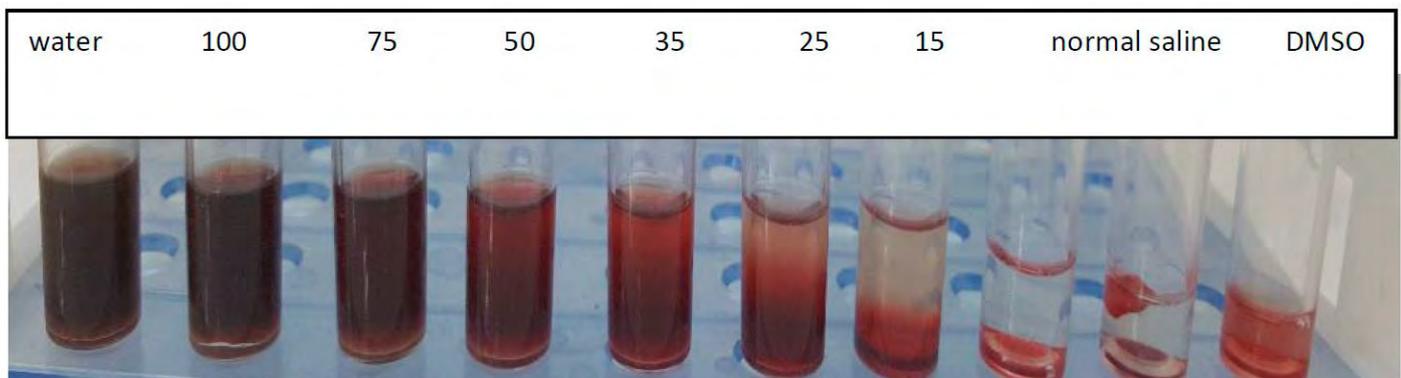


Figure 6: Cytotoxicity activity of rhamnolipid biosurfactant at different concentrations (15, 25, 35, 50, 75 and 100 mg/ml) against human erythrocytes.

DISCUSIÓN

The antimicrobial activity

The current study's findings showed that the rhamnolipid biosurfactant had an antimicrobial effect against all the tested microorganisms (bacteria and fungi) at all concentrations used. The inhibition zones against the tested microorganisms increased with increasing rhamnolipid biosurfactant concentrations. The antimicrobial mechanism action of rhamnolipid biosurfactant against microorganisms is not entirely understood, but, it is suggested that the cellular plasma membrane is the target, as the rhamnolipid has an amphipathic nature that allows it to interact with phospholipids of plasma membrane. Another suggestion about the mechanical action of the rhamnolipid was increasing the membrane permeability of microbial cells with consequent alteration of this membrane, causing cell damage¹³. Lotfabad *et al.*¹¹ reported results that exhibit the remarkable inhibitory

effects of two rhamnolipids biosurfactants against Gram-positive bacteria. At the same time, none of the two rhamnolipids biosurfactants exhibited inhibition effects on Gram-negative bacteria. The two rhamnolipids biosurfactants showed a high inhibitory effect against *Chaetonium globosum* and *Penicillium funiculosum*. In contrast, none showed inhibition effects on *Aureobasidium pullulans* and *Penicillium chrysogenum*, and two biosurfactants revealed different inhibitory behaviors against *Aspergillus niger*. Another study conducted by De Freitas Ferreira *et al.*²⁰ examined the antimicrobial activity of rhamnolipid with different pH values (from 5.0 to 9.0) against food pathogens. The antimicrobial rhamnolipid activity against the Gram-positive bacterial pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* was pH-dependent and favored at more acidic conditions. In contrast, the Gram-negative bacterial pathogens such as *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* (EHEC) revealed resistance at all pH levels studied. The rhamnolipids are anionic biosurfactants when at pH conditions of neutral or alkaline while, at acidic conditions, they behave as nonionic. The antimicrobial rhamnolipid activity can be increased in acid food, favoring the control of the Gram-positive bacteria in acidic products.

Minimal Inhibition Concentration (MIC)

The minimal inhibition concentrations (MICs) are the lowest antimicrobial compound concentrations, inhibiting the microorganism's growth after incubation. MIC depends on the types of microorganisms and the antimicrobial compound itself. The effectiveness of antimicrobial compounds by inhibiting microbial growth will increase with the increasing concentrations of antimicrobial compounds used in the experiment²¹. The antimicrobial activity of rhamnolipid biosurfactants is attributed to their effect on plasma membrane permeability. The antimicrobial activity of the crude rhamnolipids biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas poae* and *Pseudomonas libanensis*, examined against two species of Gram-negative bacteria including (*E. coli*, *Serratia marcescens*) and two species of Gram-positive bacteria including (*B. cereus*, *S. aureus*) by the conventional MIC. The rhamnolipid biosurfactant positively correlated with increasing concentrations and the inhibition zone toward test microorganisms. The rhamnolipids from *Pseudomonas libanensis* had the lowest value of MIC among the other types of rhamnolipids, which indicates its ability against the tested bacteria²².

Antioxidant activity

The antioxidant activity of the rhamnolipid biosurfactant was examined with the DPPH scavenging test. This test is based on the ability of rhamnolipid to act as a DPPH free radical scavenger, a stable free radical with an unpaired valence electron at one nitrogen atom bridge²³. It was shown in Figure 2 that the rhamnolipid biosurfactant revealed the practical activity of antioxidants against DPPH free radicals in a concentration-dependent manner. At 25 mg/ml, the rhamnolipid biosurfactant showed a potential scavenging effect of 91.4 %, which is four times higher than that obtained at 5 mg/ml (22.7 %). When the DPPH free radical encounters a substance of hydrogen-donor, the free radical is scavenged and the absorbance is reduced due to changing its color from purple to yellow, the rhamnolipid antioxidant activity was due to the free radical neutralization by transferring electrons²⁴. The potent DPPH scavenging activity of rhamnolipid biosurfactant could be attributed to the content of unsaturated fatty acids, and the reducing power of rhamnolipid biosurfactant could be increased with increasing unsaturated fatty acids content²³. The maximum antioxidant activity of rhamnolipid produced by *Marinobacter litoralis* was reported 72.6% at 5 mg/ml²⁵. Both surfactin and rhamnolipids biosurfactants had antioxidant activity, but surfactin revealed higher antioxidant activity than rhamnolipids²³. The low antioxidant activity of rhamnolipid biosurfactant produced from *P. aeruginosa* MN1 may be attributed to a lower content of unsaturated fatty acids. Antioxidant compounds are considered essential additives that are used for the preservation of different products in pharmaceutical, cosmetic and food industries by hindering oxidative rancidity of lipids and retarding their spoilage²⁶.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of the rhamnolipid biosurfactant was examined against human erythrocytes. The results exhibited that rhamnolipid biosurfactant had no hemolysis effect at concentrations 25 and 15 mg/ml, where the erythrocytes were not precipitated. The lower sediment layer appeared in red, representing the human blood, while the upper layer represented the rhamnolipid and the physiological solution; if the compound were toxic,

it would result in the degradation of the red blood cells. However, in the present study, the rhamnolipid obtained from *P. aeruginosa* showed no toxic effect at concentrations 25 and 15 mg/ ml on the erythrocytes and is considered a non-cytotoxic biosurfactant that could be used as a possible biological material in various clinical aspects. The current result agrees with Al-waely's²⁷ studies that revealed all the concentrations he used of rhamnolipid did not show any hemolysis and then did not cause any cytotoxicity towards the erythrocytes. The rhamnolipid biosurfactant is a suitable and great alternative to be employed as an effective and safe therapeutic agent.

CONCLUSIONES

The rhamnolipid biosurfactant exhibited a significant antimicrobial effect toward gram-negative bacteria, gram-positive bacteria and fungi, and it has an antioxidant effect toward DPPH in a concentration-dependent manner, with no hemolysis at lower concentrations. Based on these results, the isolated rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* could be utilized for various medical and pharmaceutical purposes. The importance of the subject lies in obtaining local bacterial isolates with the ability to produce valuable substances that are an alternative to antibiotics and to use them in various industrial and therapeutic fields.

Acknowledgments

The authors thank the Biology Department and Ecology Department, University of Basrah, Iraq, for providing facilities.

REFERENCIAS

1. Terreni, M., Tacani, M. & Pregolato, M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules*, 2021, 26: 2671. <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>.
2. Álvarez-Martínez, F.J., Barrajón-Catalán, E. & Micol, V. Tackling Antibiotic Resistance with Compounds of Natural Origin: A Comprehensive Review. *Biomedicines*, 2020, 8: 405. doi:10.3390/biomedicines8100405.
3. De Giani, A., Zampolli, J. & Di Gennaro, P. Recent trends on biosurfactants with antimicrobial activity produced by bacteria associated with human health: different perspectives on their properties, challenges, and potential applications. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12:655150. doi: 10.3389/fmicb.2021.655150.
4. Costa, SGVAO, Déziel, E & Lépine, F. Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 53:620– 627. doi:10.1111/j.1472 765X.2011.03154.x.
5. Nalini, S. & Parthasarathi, R. Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physicochemical characterization. *Bioresource Technology*, 2013, 147: 619-622.
6. Irorere, V.U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S. & Banat, IM Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, doi: 10.1007/s00253-017-8262-0.
7. Tan, Y.N. & Li, Q. Microbial production of rhamnolipids using sugars as carbon sources. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1). doi:10.1186/s12934-018-0938-3.
8. Moradali, M.F., Ghods, S. & Rehm, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7:39. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
9. Sekhon Randhawa, K.K. & Rahman, PKSM Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontier in Microbiology*, 2014, 5:454. doi: 10.3389/fmicb.2014.00454.
10. Nitsche, M. and Silva, S.S. Recent Food Applications of Microbial Surfactants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, doi: 10.1080/10408398.2016.1208635.

11. Lotfabad, T.B., Shahcheraghi, F. & Shooraj, F. Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2013, 6(1): 29-35. DOI: 10.5812/jjm.2662.
12. Ndlovu, T., Rautenbach, M., Vosloo, J.A., Khan, S. & Khan, W. Characterization and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express*, 2017, 7:108. doi: 10.1186/s13568-017-0363-8.
13. Magalhaes, L. & Nitschke, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control*, 2013, 29:138–142.
14. Alyousif, N.A., Al-Luaibi, Y.Y.Y. & Hussein, W. Distribution and molecular characterization of biosurfactant-producing bacteria. *Biodiversitas*, 2020, 21: 4034-4040. DOI: 10.13057/biodiv/d210914.
15. Alyousif, N.A., Al-Tamimi, W.H. & Al-Luaibi, Y.Y.Y. Screening, enhance production and characterization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hydrocarbon contaminated soil. *Eurasia Journal of Bioscience*, 2020, 14: 4377-4391.
16. Nanda, A. & Saravanan, M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine*, 2009, 5:452–6. doi: 10.1016/j.nano.2009.01.012.
17. TC, V., Srirama, K., Mikkili, I., Md, N.B., Dulla, J.B., Alugunulla, V.N., Sweetey, D. & Karlapudi, A.P. Estimation of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of Antimicrobial peptides of *Saccharomyces boulardii* against Selected Pathogenic Strains. *Karbala International Journal of Modern Science*, 2019, 5: (4). doi.org/10.33640/2405-609X.1219.
18. Barros, L., Baptista, P. & Ferreira, ICFR Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45: 1731-1737.
19. He, X.-G., Moceka, U., Floss, H.G., Caceres, A., Giron, L., Buckley, H, Cooney, G., Manns, J. & Wilson, B.W. An antifungal compound from *Solanum nigrescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 1994, 43(3): 173–177. doi:10.1016/0378- 8741(94)90039-6.
20. De Freitas Ferreira, J., Vieira, E.A. & Nitschke, M. The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. *Food Research International*, 2018, doi:10.1016 /j.foodres.2018.09.005.
21. Andrews, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48(suppl_1), 5–16. doi: 10.1093/jac/48.suppl_1.5.
22. Mendoza, A.R.R., Patalinghug, J.M.R., Canonigo, G.O. & Yee, J.C. Screening of rhamnolipids from *Pseudomonas* spp. and evaluation of its antimicrobial and antioxidant potential. *Bacterial Empire*, 2020, 3:(3) 46-51. doi: 10.36547/be.2020.3.3.46-51.
23. Abdollahia, S., Tofighib, Z., Babaeia, T., Shamsia, M., Rahimzadehc, G., Rezvanifara, H., Saeidia, E., Amiria, M.M., Ashtianid, Y.S. & Nasrin Samadi, N. Evaluation of Antioxidant and Anti-biofilm Activities of Biogenic Surfactants Derived from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian journal pharmaceutical Research*, 2020, 19 (2): 115-126. doi: 10.22037/IJPR.2020.1101033.
24. Jemil, N., Ayed, HB, Manresa, A., Nasri, M. & Hmidet, N. Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylophilicus* DCS1. *BMC Microbiology*, 2017, 17:144 doi: 10.1186/s12866-017-1050-2.
25. Haque, E., Kayalvizhi, K. & Saqib Hassan, S. Biocompatibility, Antioxidant and Anti-Infective Effect of Biosurfactant Produced by *Marinobacter litoralis* MB15. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2020, 10(2):173-178.
26. Ohadi, M., Forootanfar, H., Rahimi, H.R., Jafari, E., Shakibaie, M., Eslaminejad, T. & Dehghannoudeh, G. Antioxidant potential and wound healing activity of biosurfactant produced by *acinetobacter junii* B6. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2017, 18: 900-8.
27. Al-waely, W.A.S. Production, purification and characterization of rhamnolipid from a local isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Ph.D. Thesis, College of Agriculture, University of Basrah (in Arabic), 2013.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Abdullah Alyousif N, Al-tamimi W H., Al-luaibi Y Y Y. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Rhamnolipids Biosurfactant is Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Revis Bionatura 2023;8 (4) 25. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.25>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Expression of Heat Shock Protein 70 in Thyroid Gland Cancer

Haider A. Hassan¹, Saad Hasan Mohammed Ali², Athraa Y. Al-hijazi³

¹Biotechnology Department, University of Baghdad, Iraq.

² College of Medicine, University of Baghdad, Clinical Communicable Disease Research Unit, Iraq.

³Oral histology and biology, al-Mustaqbal University, Iraq.

Corresponding author: hayder.ahmed@sc.uobaghdad.edu.iq

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.26>

ABSTRACT

Heat shock protein70 (HSP70) is a crucial protein with vital biological tasks in cell continuation of life. The variation of HSP70 activation occurs due to stress, which includes temperature states, toxicity, poisoning with heavy metal, and tumor-related conditions. One of the master jobs of the HSP family is the suppression of the apoptosis signals, which are caspase-mediated. A high level of the expression of HSP70 is accountable for tumorigenesis and resistance against chemotherapeutic drugs. For this reason, the detection of HSP70 may help to diagnose cancerous diseases.

Conversely, targeting this chaperone might help treatment by maintaining late caspase-dependent events. This study was conducted to detect the presence and the location of HSP70 in Iraqi thyroid cancer tissue specimens (25 samples) and (10 samples) of normal thyroid tissue. Using an immunohistochemical study (paraffin method), the protein was detected in 100% of follicular carcinoma or follicular adenoma in addition to 77.7 % of papillary thyroid carcinoma, while in normal thyroid tissue, the presence of protein was in 10% of cases. Regarding protein location in the cells, it appeared in the nuclei and the cytoplasm of follicular carcinoma cases compared to just in the cytoplasm of other cases.

Keywords: Thyroid, cancer, Heat shock protein70, immunohistochemical expression

INTRODUCCIÓN

Thyroid cancer (T.C.) is the most frequent type of endocrine malignancy (3.4 % of all cancers diagnosed annually). The incidence rates of both males and females are five times higher in high and very high Human Development Index (HID) countries than in low and medium (HID) countries^{1,2}. Several types and subtypes with different cellular origins, characteristics and prognoses are present in thyroid cancerous lesions. Three chief histological types of T.C. were detected: differentiated (papillary and follicular) T.C., undifferentiated (poorly differentiated and anaplastic T.C.) and medullary TC³. Approximately 90 % of all T.C. originate from thyroid follicular cells, which are well-differentiated tumors (DTCs), and the type considered the most common histological type of these cancers is papillary thyroid carcinoma (PTC), followed by follicular thyroid carcinoma⁴. In terms of T.C. treatment, there are three options, which include total thyroidectomy, which means getting rid of the entire thyroid gland, therapy with iodine radioactive isotopes, and therapies that target specific molecules that inhibit the tyrosine kinase pathway. Differentiated T.C. might respond to surgical resection, radioiodine ablation (RAI), and therapy via suppression of hormones that stimulate thyroid⁵. In contrast, patients with poorly differentiated tumors that are unresponsive to conventional therapies have a worse prognosis; this subgroup of cases is obstinate to therapy with chemicals and therapy with radiation and usually develops recurrent disease and metastatic invasion⁶. Chaperone machines mediate many intracellular processes. One of the most essential chaperone machines is the heat shock protein 70 (HSP70) family, which mediates crucial processes such as protein folding, modification, translocation, and cell survival. When stress

occurs, the cell must deal with raised concentrations of unfolded or collapsed proteins when the HSP70 level increases to help in this function⁷. Commonly, HSP70 translocation occurs into nucleoli from the nucleus and cytoplasm using microtubules under kinase enzyme action. The fast translocation of Hsp70, particularly during heat shock, is thought to provide fast folding and refolding of denatured and aggregated proteins⁸. Thus, HSP70 is overexpressed in various malignancies such as prostate, lung, pancreatic, urothelial, cervical, and breast cancers⁹. HSP70 prevents protein aggregation and assists the translocation of other proteins through the membrane, which has been explored¹⁰.

Furthermore, formulation of HSP70 in the cells can interfere with different biological processes such as inhibition of both apoptosis- intrinsic and extrinsic as cell death-pathways¹¹, senescence¹², autophagy-^{13,14}. Regarding the innate immune system, HSP70 may be a danger signal promoting receptor-mediated apoptosis. HSP70 is overexpressed in cells by stress, which can cause acquired or inherent drug resistance⁷. Indeed, such overexpression may be considered for tumorigenesis and opposition chemotherapeutic agents used in treatment. This process occurs via prohibiting late caspase-dependent signal¹⁵. This work investigated the expression pattern of HSP70 in T.C. patients to clarify whether it could benefit diagnosis and treatment.

MATERIALES Y MÉTODOS

Patients' characteristics

The study comprised 25 Iraqi cases treated in Baghdad Medical City (BMC), Iraq, 19 women and 6 men. All cases were examined histologically in the pathology department in BMC, Iraq, from 2020 to 2021. Twenty-five patients with thyroid carcinoma were diagnosed. Nine patients out of 25 were diagnosed with papillary thyroid carcinoma (PTC); in addition to 10 were diagnosed as follicular carcinoma (F.C.), 6 patients were diagnosed with follicular adenoma (F.A.).

Immunohistochemically study

Immunohistochemical anti-heat shock protein antibody and Expose HRP/DAB detection IHC (mouse and rabbit) kits were supplemented by Abcam Company. U.K. Senior pathologist verified the tissue specimens to include T.C. tissue for the study group to deal with the immunohistochemical study. Ten percent formalin was used for 24 hours to fix all tissue samples, followed by treatment of the samples with 70% ethanol overnight. Dehydration of the sample was achieved using an increased graded series of alcohol (70%, 90% and 100% ethanol) for two hours for each concentration. All samples were treated with xylene for 2 hours to replace the ethanol (clearing). Melted paraffin (at 58 °C) was used for tissue embedding for 2-3 hours at 60 °C in an oven and cut into sections by a microtome for 5 µm thickness, then floated on the water bath at 50°C then transferred onto a Superfrost Plus slides for next steps. Xylene was used to remove the paraffin from the slide in three steps for 10 minutes each. According to the procedure, endogenous peroxidase activity has to be blocked. Hydrogen peroxide, three percent, was used in methanol 100% for 25 minutes. All sections were washed with triethanolamine-buffered saline (TBS) at pH 7.6 after that. Citrate buffer (pH:6) was used to submerge the sections used to submerge the sections to activate the antigen retrieving and unmasking. Ten minutes was when all samples were put in a microwave. TBS at pH 7.6 was used to rinse the sections. All nonspecific reactions must be blocked; for this, all sections are incubated in 20% swine serum (Sigma, Aldrich, Germany) for 20 min. All sections were covered with antibody (primary) (at dilution 1/150 for HSP70) and incubated for 1 hour in a humidity chamber at 37°C, followed by rinsing the sections gently in TBS. At room temperature, a secondary antibody was added for 10 Followed by washing for 10 minutes. Streptavidine-HRP antibody was added after that and Then washed to visualize the peroxide reaction. After that, hematoxylin was used to counterstain the slides for 30 seconds. Tap water was used to wash all slides, followed by dehydration. The slides were mounted with a permanent-mounting medium (DPX). The slides were examined under the optical microscope at 10 X and then at 40X magnifications. The above work steps were followed according to Basim et al., 2020¹⁶.

Immunohistochemical evaluation

An experienced head and neck pathologist verified the immunohistochemistry sections. The scoring method used in this work was according to. If the average fraction of intensely staining cells occupied more than 25% of the total slide, it will be considered positive for HSP70¹⁷.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Patients' characteristics

The study comprised 25 Iraqi patients treated in Baghdad Medical City (BMC), Iraq. Nineteen female and 6 male patients of average age of 44 years at surgery (range: 25–68 years) (Figure 1). According to the gender of patients who participated in this study, all three types of thyroid cancer were detected in female patients mainly. This may belong to certain reproductive factors, especially regarding estrogen receptor status¹⁸. In terms of age, patients between 20-29 years old (median age at diagnosis is 24.5) followed by 40-49 years old with median 44.5 years had the higher incidence of PTC.

Regarding F.C. patients, the group of 60-69 years old had the highest incidence. However, the patients group of 50-59 years old had the higher incidence of F.A.; they had the second-high incidence of F.C. (Figure 2). Follicular adenoma appeared to be the chief type in the 50-59 years group. These results might be due to the aggressive disease and the usual decline of the immune response, especially in the 60-69-year-old group. Also, the post-menopausal hormonal changes in females might play an essential role in these incidence¹⁹.

Immunohistochemistry

One of the main points in cancer pathology is understanding the mechanisms that belong to the origin of the loss of cell differentiation. Many works pointed to the role of molecular chaperones in maintaining cellular and tissue homeostasis^{20,21}. It is well known that an imbalance between cell proliferation and differentiation is crucial to ensure the correct growth and development of organisms and to maintain adult tissue and organ homeostasis. The HSP70- was determined as a present or absent antibody in the tissues. Digital camera, light microscope, and imaging computer software were used for histological analysis. Two criteria were used for the evaluation: intensity and localization of immunostaining in cells (nuclear or cytoplasmic). According to Table 1, it was 9 papillary thyroid carcinomas (PTC) cases, 10 follicular carcinoma (F.C.) and 6 follicular adenomas (F.A.) cases out of 25 T.C. patients. HSP70 protein was determined in 8 out of 10 (PTC) (Figure 3 A, B), all (F.C.) patients (10 cases) (Figure 3 C, D) and in all (F.A.) patients (six patients) (Figure 3 E, F).

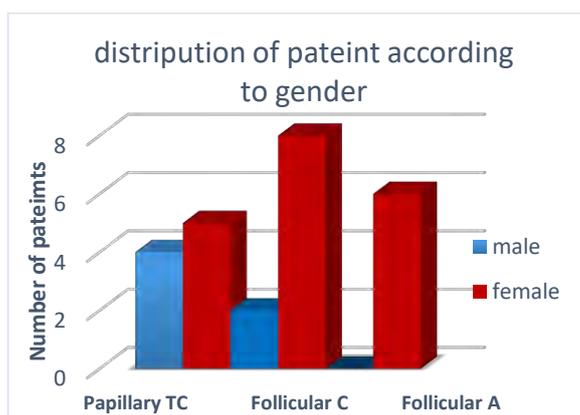


Figure 1: Distribution of patients according to gender.

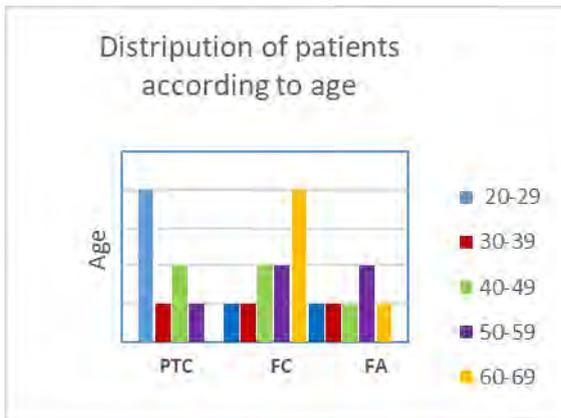
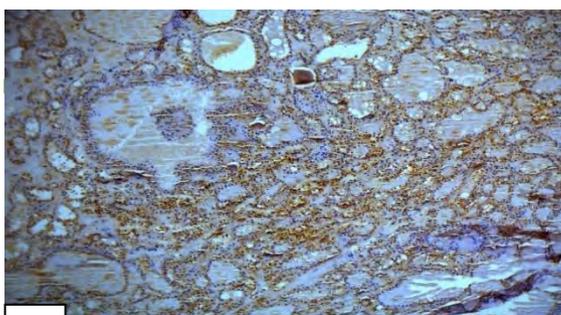


Figure 2: Distribution of patients according to age.

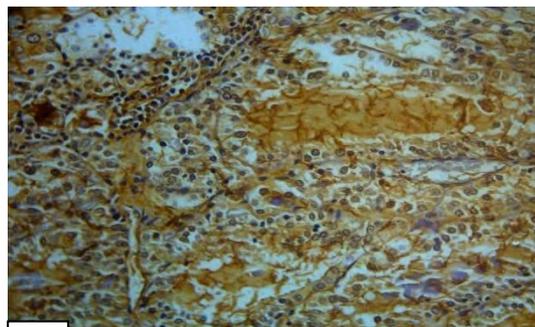
Specimen	Investigated cases (n)	HSP70 negative (n)	HSP70 positive (n)
Normal thyroid tissue	10	9 (90%)	1 (10%)
Papillary thyroid carcinoma (PTC)	9	7 (77.7%)	2 (22.2%)
Follicular carcinoma (FC)	10	0	10 (100%)
Follicular Adenoma (FA)	6	0	6 (100%)

Table 1: Expression of HSP70 between different types of thyroid cancer. The number of investigated cases and the positive and negative HSP70 percentages are shown.

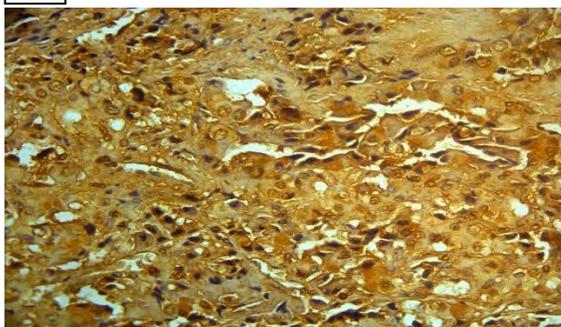
On the other side, different localization of HSP70 has been detected. It has been pointed in nuclei of F.A. (Figure 3; F) and in the cytoplasm of PTC and F.A. (Figure 4; A, B), which consist of the results²². Hsp70 protein has different localization in tumor cells²³. These results might be due to differences in the stages of the disease, which means the correlation of HSP70 protein with the prognosis of the disease:



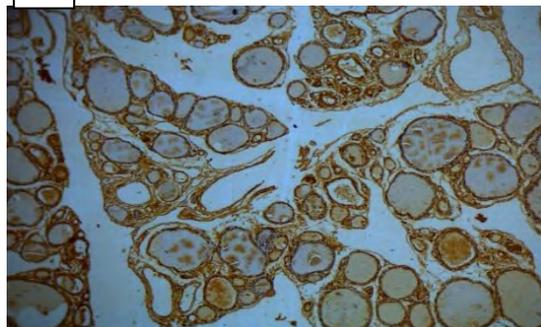
A



B



C



D

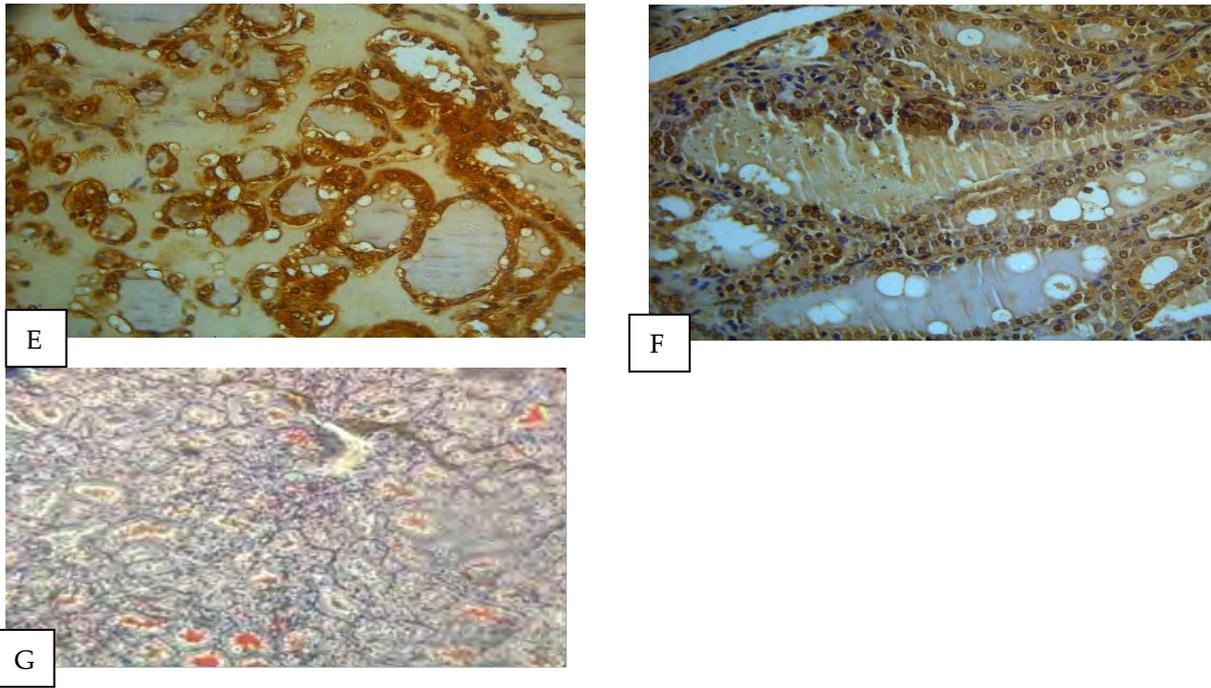


Figure 3: HSP70 immunostaining in different thyroid cancer cases 10 X. HSP70 was determined as a present or absent antibody in the tissues. A & B; PTC, C & D; FC; E&F; FA.

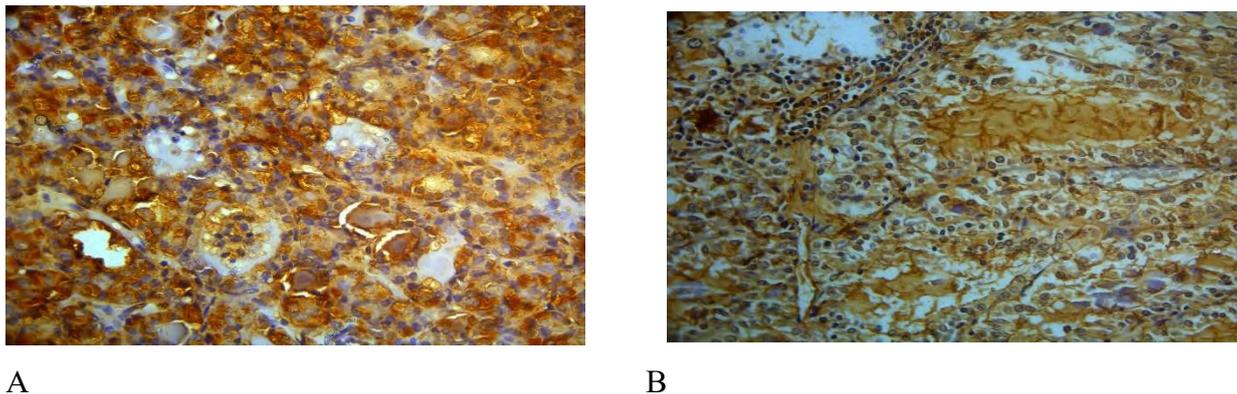


Figure 4: Expression of Hsp70 protein in thyroid cancer, Immunohistochemical analysis, (A) cytoplasmic localization, X40 (B) nuclear cytoplasmic localization, X100.

Las tasas de reducción de humedad más significativas se manifestaron en el proceso inicial del secado. Posterior se evidenció una disminución de manera constante en el tiempo, considerando así que se llegó al equilibrio., como se ha demostrado en estudios similares donde se trabajaron con materias primas vegetales¹⁸.

CONCLUSIONES

Molecular chaperones play a crucial role in maintaining cellular and tissue homeostasis. HSP70 level increase occurs in thyroid cancer types (PTC, F.C. and F.A.). This raise can be exploited to detect the grade of the tumor in addition to predicting the patients' response to the treatment. This can help to more accurate diagnosis and finally to more successful treatment. In addition, to avoid the harmful side effects of many drugs that might not work with certain types of thyroid cancer. Thus, physicians can reduce the time required to treat this type of cancer.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCIAS

1. Seib, C. D., & Sosa, J. A. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of NA*. 2018.
2. Kitahara, Cari M., and Julie A. Sosa. Understanding the Ever-Changing Incidence of Thyroid Cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, Springer US, 2020; (16): 617–618
3. Prete, Alessandro, et al. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. 2020; (March), 1–10.
4. Liu, Y., Su, L., & Xiao, H. Review of Factors Related to the Thyroid Cancer Epidemic. *International Journal of Endocrinology* 2017; 1-9.
5. Zarebczan, B., and H. Chen. Multi-Targeted Approach in the Treatment of Thyroid Cancer. *Minerva Chirurgica*, 2010; 65 (1): 59–69.
6. Patel, Kepal N., and Ashok R. Shaha. Poorly Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer. *Cancer Control*, 2006; 13 (2): 119–28.
7. Rashmi, Ramachandran, and Santhosh Kumar. Ectopic Expression of Hsp70 Confers Resistance and Silencing Its Expression Sensitizes Human Colon Cancer Cells to Curcumin-Induced Apoptosis. *Carcinogenesis* 2004; 25 (2):179–87.
8. Avdalyan, A. M., et al. The Relationship of Immunoexpression of Ki-67 and Hsp70 with Clinical and Morphological Parameters and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2020; 168 (5): 688–93.
9. Soleimani, Atena, et al. Therapeutic Potency of Heat-Shock Protein-70 in the Pathogenesis of Colorectal Cancer: Current Status and Perspectives. *Biochemistry and Cell Biology* 2019; 97 (2): 85–90.
10. Blagosklonny, Mikhail V. Re: Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001; 93 (3): 239–40.
11. Murphy, Maureen E. The HSP70 Family and Cancer. *Carcinogenesis*, 2013; 34 (6):1181–88.
12. Yaglom, Julia A., et al. High Levels of Heat Shock Protein HSP72 in Cancer Cells Suppress Default Senescence Pathways. *Cancer Research*, 2007; 67 (5): 2373–81.
13. Nylandsted, Jesper, et al. Heat Shock Protein 70 Promotes Cell Survival by Inhibiting Lysosomal Membrane Permeabilization. *Journal of Experimental Medicine*, 2004; 200(4): 425–35.
14. Daugaard, Mads, et al. Lens Epithelium-Derived Growth Factor Is an Hsp70-2 Regulated Guardian of Lysosomal Stability in Human Cancer. *Cancer Research*. 2007; 67 (6): 2559–67.
15. Juhasz, K., Lipp, A., Nimmervoll, B., Sonnleitner, A., Hesse, J., Haselgruebler, T., & Balogi, Z. The Complex Function of Hsp70 in Metastatic Cancer. *Cancers*. 2014; (6) 42–66.
16. Basim M. Khashman , Suhad K. Karim2 and Ghada Nazar Al-Jussani The oncogenic effect of EBV/HPV co-infection in a group of Iraqi women with cervical carcinoma. *Biochemical and Cellular Archives*. 2020; 20 (2): 6037–6040.
17. Syrigos, K. N., Harrington, K. J., Karayiannakis, A. J., Sekara, E., Chatziyianni, E., Syrigou, E. I., & Waxman, J.. Clinical significance of heat shock protein-70 expression in bladder cancer. *Urology*. 2003; 61(3), 677–680.
18. Liu, J., Xu, T., Ma, L., & Chang, W. Signal pathway of Estrogen and Estrogen Receptor in the development of Thyroid Cancer. *Frontiers in Oncology* 2021; Vol. 11. *Frontiers media S.A.* <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.593479>
19. MEGAN R. HAYMART. Understanding the Relationship Between Age and Thyroid Cancer. *The Oncologist*. 2009; 14:216 –221.
20. Walsh, D.; Grantham, J.; Zhu, X.O.; Lin, J.W.; Van Oosterum, M. Taylor, R.; Edwards, M. The role of heat shock proteins in mammalian differentiation and development. 1999; *Environ. Med.* 43, 79–87.

21. Barna, J.; Csermely, P.; Vellai, T. Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018; 75, 2897–2916.
22. Avdalyan, A. M., Ivanov, A. A., Lushnikova, E. L., Molodykh, O. P., & Vikhlyanov, I. V. The Relationship of Immunoexpression of Ki-67 and Hsp70 with Clinical and Morphological Parameters and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2020; 168 (5): 688–693.
23. Malusecka E, Zborek A, Krzyzowska-Gruca S, Krawczyk Z. Immunohistochemical detection of the inducible heat shock protein Hsp70: A methodological study. *J. Histochem. Cytochem.* 2006; 54(2):183-190.
24. A. M. Avdalyan, A. A. Ivanov, E. L. Lushnikova, O. P. Molodykh, and I. V. Vikhlyanov. The Relationship of Immunoexpression of Ki-67 and Hsp70 with Clinical and Morphological Parameters and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer; *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2020; Vol. 168, No. 5, ONCOLOGY.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: García M E, Moreta T; Guerrero Luzuriaga S A, Gaibor Chávez J. Modelamiento matemático de la cinética de secado de café robusta (*Coffea canephora*). *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 26.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.26>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Comparison of ocular biometry and intraocular lens power using a novel biometer and a traditional biometer

Makarem Ali Hussain Alshammari* Siham sabah Abdullah Al Muhammad

Makarem Ali Hussain Alshammari* Siham sabah Abdullah Al Muhammad

¹Optometrist at Al-Imam al-Sadiq hospital

²professor of medical physics in Al-Nahrain medicine

*Corresponding authors: Email Makaremali3@gmail.com, suhailtop2@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0004-8255-5233>, <https://orcid.org/0000-0001-5080-6254>

Mobile: +964 7829819841

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.27>

ABSTRACT

The implantation of an intraocular lens (IOL) is the procedure that is the gold standard in cataract surgery performed today. Calculating the power of the intraocular lens (IOL) has emerged as a central concern in cataract surgery over the last decade. The study aims to investigate the relationship between optical biometry and applanation ultrasound measurement of the eye's axial length. This prospective cohort study was done on 60 eyes from sixty patients undergoing phacoemulsification with primary intraocular lens implantation and scheduled for cataract surgery in the Ophthalmology Department of al-Imam al-Sadeq Hospital. Thirty eyes of patients were measured by ultrasound measurement (by A-Scan, Group 1) and the other thirty eyes by optical biometry (by IOL Master, Group 2). In Group 1 There were 14 eyes of 14 males (47%) and 16 eyes of 16 females (53%) with a mean age was 71.6 ± 4.33 years. In Group 2, there were 16 eyes of 16 males (53%) and 14 eyes of fourteen females (47%), and the mean age of the patients in this Group was 66.13 ± 8.61 years. The mean IOL of the patient in Group I was (19.96 ± 1.81) . At the same time, the mean IOL potent ion of the patient in Group II was (22.96 ± 1.66) .

Keywords: Optical Biometry, Ultrasound Biometry, Intraocular lens (IOL), IOL Master partial coherence interferometry (PCI)

INTRODUCCIÓN

Calculating the intraocular lens (IOL) is an essential step in getting the precise aim that includes the refractive outcome and is a vital objective in recent cataract surgery¹. Modern cataract surgery is a refined procedure that enables most patients to achieve high-quality postoperative vision. However, postoperative refractive outcomes remain a significant area of concern for surgeons due to advancements in surgical technique, new IOL technologies, improved biometric methods, and advanced methods of IOL power calculation².

Refractive error is no longer acceptable following cataract surgery due to improvements in technology for cataract surgery and the launch of distinctive intraocular lens implants. Consequently, precise biometric readings must be obtained for undistorted vision following surgery³.

Innovations like intraocular lens (IOL) power prediction algorithms, phacoemulsification, and ocular biometry have significantly improved the refractive result of cataract surgery during the last fifty years⁴. This result depends on precisely predicting the implanted IOL's power, which relies primarily on preoperative biometry data, IOL power calculation methods, and manufacturer IOL power quality control. The most critical step for accurately calculating the IOL power is the preoperative measurement of the ocular axial length (AL)⁵.

A-scan ultrasonography, with a reported longitudinal resolution of approximately 200 μm and an accuracy of approximately 100–150 μm , is routinely employed to measure the ocular axial length AL. However, due to varying pressures the transducer exerts on the eye during applanation ultrasonography, which is often employed for ocular biometry, ultrasound biometry necessitates physical contact between the transducer and the eye⁶. A postoperative refractive error of 0.28 diopters (D) is caused by an AL shortening of 0.1 mm in ultrasound biometry, and measurement errors in the AL have been shown to account for 54% of the expected refraction errors following IOL implantation.⁷ Recently, the IOL Master optical biometry device was created for commercial use based on the dual beam partial coherence interferometry (PCI) concept. The optical AL is measured using short-coherence infrared light (= 780 nm), and the geometric AL is then calculated using the group refractive index⁸. Additionally, it evaluates the corneal curvature, the anterior chamber depth, and the corneal diameter. Then, it determines the best IOL power using the biometry data it has collected and several IOL power calculation algorithms that are part of its computer software. The IOL master's AL measures have exceptional precision, resolution, accuracy, and consistency⁹.

In our study. We will look at the main factors that may affect the accuracy of refractive error prediction, how this residual error affects outcomes after surgery, and whether refractive outcomes improve with the new intraocular lens.

MATERIALES Y MÉTODOS

All the patients underwent the following procedures: The information was gathered throughout the history-taking process: age, gender, domicile, and particular habits of the patients or their families. Relations, major complaint (painless progressive loss of eyesight), and examination of the complaint (onset, course, and duration). The Snellen visual acuity chart was completed for every patient before surgery. Preoperatively, patients received autorefractometry, keratometry (K) and axial length measurement. Ultrasound B scans were performed on patients with dense media opacity and obscured fundus visibility. Non-cycloplegic autorefractometry and fundus inspection were also performed. Assessment from the Axial Length of the eye included: Group I (Ultrasound A scan group, 30 eyes) had axial length measurements by A-scan ultrasound and K reading by manual keratometer. An optometrist does a scan-guided biometry. An accurate keratometric measurement is the first step in predicting IOL power. Next, the axial length was measured using the contact A-scan biometry. The patients were prepared by instilling one drop of tropicamide (mydriacil) 1%, then one drop of surface anesthesia in the form of benoxinate hydrochloride 0.4% was dropped into the patient's eye. The data, including two keratometric (K1, K2) and the average axial length plus a constant of IOL, were introduced in the calculating program of the Optometrist. The intraocular lens power was based on the SRK/T formula, and all patients underwent uncomplicated cataract surgery by phacoemulsification within the bag IOL implantation through an interim precise corneal incision.

Statistical Methodology

Data analysis was carried out using the available statistical package of Statistical Packages for Social Sciences-version 25 (SPSS-25). Data were presented in simple percentages, mean, and standard deviation measures. The significance of the difference of different means (quantitative data) was tested using the student's test for the difference between two unpaired tests. Scattering distribution curve used for correlation. Statistical significance was considered whenever the p-value was equal to or less than 0.05

RESULTADOS

Group 1 (A-scan ultrasound biometry group) Included 30 eyes subjected to biometry with A-Scan ultrasound biometry. There were 14 eyes of 14 males (47%) and 16 eyes of 16 females (53%). The mean age was 71.6 ± 4.33 years. Group 2 (Optical biometry (IOL Master group)) Included 30 eyes subjected to biometry with IOL Master Optical biometry. There were 16 eyes of 16 males (53%) and 14 eyes of fourteen females (47%), and the mean age of the patients in this Group was 66.13 ± 8.61 years. Also, a total of 60 eyes of 60 patients were

enrolled in our study (eyes in 30 females (50%) and eyes in 30 males (50%)). Group I: 14 eyes of 14 males (47%) and 16 eyes of 16 females (53%), and Group II: 16 eyes of 16 males (53%) and 14 eyes of fourteen females (47%), as shown in (Table 1).

Characteristics	Ultrasound	Optical Biometric	<i>p</i> -value
Number of Patients	30 (50%)	30 (50%)	NS
Age	71.6 ± 4.33	66.13 ± 8.61	0.0365*
Gender			
Male	14 (47%)	16 (53%)	0.71500
Female	16 (53%)	14 (47%)	

* significant difference at *p*-value ≤ 0.05

Table 1: Characteristics of Patients.

The mean axial length of the patient in Group I was (22.55 ± 0.83 mm) while II was (23.021 ± 0.71 mm) Also, the mean k1 reading of the patient in Group I was (44.1 ± 1.71) Diopter. While Group II was (44.68 ± 0.88) Diopter. Additionally, group I had a mean k2 reading of the patients as (44.81 ± 1.76) Diopter, and Group II had a mean k2 reading of the patients (45.45 ± 0.83) Diopter. Group I had a mean k reading of the patient of (44.45 ± 1.72) Diopter, whereas Group II had a mean of (45.07 ± 0.82) Diopter, as shown in (Table 2).

Parameters	Ultrasound	Optical Biometry	<i>p</i> -value
Axial Length (AL) mm	22.55 ± 0.83	23.021 ± 0.71	0.01099*
Corneal Radius keratometry (K1) (D)	44.1 ± 1.71	44.68 ± 0.88	0.246851
Corneal Radius keratometry (K2) (D)	44.81 ± 1.76	45.45 ± 0.83	0.212664
Average Corneal Radius keratometry (K avr.)	44.45 ± 1.72	45.07 ± 0.82	0.223102

* Significant difference at *p*-value ≤ 0.05.

Table 2: The Axial Length and K reading distribution parameters between Ultrasound (US) and optical Biometry (OB).

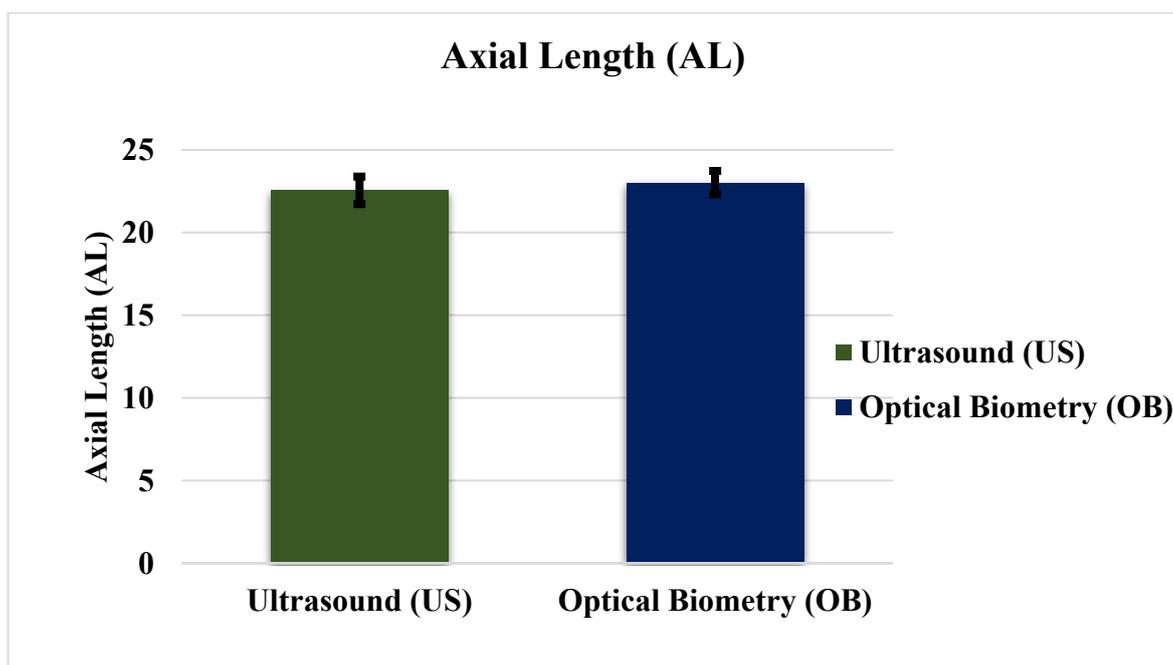


Figure 1: Comparison between ultrasound (US) and optical biometry (OB) for Axial Length (AL).

The mean ACD of the patient in Group I was (2.93 ± 0.29) while, in Group, it was (3.21 ± 0.51) Also, the mean IOL of the patient in Group I was (19.96 ± 1.81) Whereas the mean IOL strength of the patient in Group II was (22.96 ± 1.66) Also, the mean lens thickness in Group I was (3.76 ± 0.78) While in Group II was (4.31 ± 0.41).

The spherical desired refraction of the patient in Group I was (-0.74 ± 0.04), and in Group II was (-0.91 ± 0.058) and achieved refraction of the patient in Group I (-1.12 ± 0.02) Moreover, in Group II, it was (-1.05 ± 0.01), as shown in (Table 3).

Parameters	Ultrasound	Optical Biometry	<i>p</i> -value
Anterior Chamber Depth (ACD)	2.93 ± 0.29	3.21 ± 0.51	0.043759*
Lens Thickness (LT)	3.76 ± 0.78	4.31 ± 0.41	0.0148443*

* significant difference at *p*-value ≤ 0.05

Table 3: The Anterior Chamber Depth (ACD), Lens Thickness (LT), and the intraocular lens (IOL).

DISCUSIÓN

Intraocular lens (IOL) measuring is an essential step to achieve the desired refractive result, which is the primary goal of modern cataract surgery. Many technologies and formulas are currently available accurately estimating the IOL power required to achieve the desired refraction. Scan ultrasonography remains the preferred method of measuring the ocular axial length (AL) in most ophthalmic practices. Modern technology and optical biometry have significantly improved our ability to measure ocular axial length (AL)¹⁰ accurately. Our study included 60 eyes of 60 patients (eyes in 30 females) (50%) and (Eyes in 30 males) (50%) with axial lengths less than 24.50 mm with cataracts as the only ocular pathology. Postoperative Visual and Refractive Outcomes Out of 60 patients, 30 were implanted IOL calculated by IOL master and 30 by ultrasound. For IOLMaster, patients had postoperative spherical refraction in the range of (0.01 to 1.05). Ultrasonic patients had postoperative spherical refraction in the range of (0.02 to 1.12).in our study, the axial length measurements by optical biometry were 0.47 mm longer than the axial length by A-scan ultrasonography ($P < 0.001$). Other investigators have reported similar differences. The most significant contributor to this disparity is the pressure the ultrasound probe exerts on the eye. This results in the corneal indentation and the axial length (AL) shortening.¹¹ The ultrasound is reflected mainly at the internal limiting membrane (ILM). In contrast, the light of the optical biometry at the retinal pigment epithelium (RPE), thus resulting in a difference corresponding to the retinal thickness of the fovea, which is about 130 μm .in addition, the resolution improves as wavelength decreases. Light has a very short wavelength compared to sound, so laser light has better resolution. Therefore, the accuracy of axial length with ultrasound is approximately 0.10–0.12 mm compared to 0.012 mm for optical.¹² Measurement accuracy is limited by variation in retinal thickness surrounding the fovea. A precise preoperative calculation is necessary to attain the most desirable results, and an exact IOL power formula must be employed. The refractive power of the human eye depends on the strength of the cornea keratometry (K) values, the axial length of the eye (AL), and the position of the lens. The best refractive outcomes after surgery depend on accurately evaluating these factors. Patients may be left with a severe refractive error if these biometric measures and computations are wrong.

A previous investigation of ultrasound (US) biometry found that errors in AL measurements are responsible for 54% of the errors in predicted refraction after intraocular lens implantation. In comparison, keratometry error accounted for 8% of the errors, and incorrect assessment of the postoperative influential lens position (ELP) accounted for 38%. The refractive outcomes of cataract surgery had significantly improved when optical AL was used instead of ultrasonic AL.¹³ Eleftheriadis et al. reported the results of 100 consecutive cases of axial length AL that were measured by both optical biometry (IOL Master) and A-scan, where he found the axial length AL measured by the IOL Master was 0.47 mm longer which was statically significant ($P < 0.001$).⁹ GAD et al. in 2020 found that the axial length that was measured by the optical biometry was 0.34 mm longer than that measured by the A-scan, which was statically insignificant ($P = 0.2112$).¹⁴

Moon et al. 2014 reported that axial length was measured by the A-scan shorter than 24.4 mm and showed a 0.05 mean difference between the two methods, which was statistically insignificant. ($P \geq 0.001$).¹⁵ In our study, the mean average K reading (Kav) measured by keratometer used with A-scan was 44.45 ± 1.72 D. However, the mean Kav measured by the IOL Master was 45.07 ± 0.82 D. The mean difference between the two methods was -0.62 ($P = 0.0223$), which was statistically insignificant. This may be explained by the bell-shaped cornea, which flattens toward the eye's periphery. The measurements are taken with an auto-keratometer using a ring 3 millimeters in diameter centered on the cornea. However, the IOL Master uses a six-point measurement on a circle that is only 2.5 millimeters in diameter. This allows for a more central measurement and provides a corneal power for IOL calculation, producing results that are more clinically and practically relevant. In addition, the IOL Master can produce several sets relatively quickly, making it easier for the patient to collaborate effectively.¹⁴ In our study, the intraocular lens (IOL) power in optical biometry (IOL master) (22.96 ± 1.66) was significantly more substantial than the ultrasound (19.96 ± 1.81) at a p-value (0.026082). Abd Elkhalek I. Elsaadani et al. 2020 reported that (IOL) power in optical biometry was significantly more substantial than in ultrasound. ($P \leq 0.001$).¹⁰ Goyal et al. It was discovered that the A-scan provided more extraordinary IOL powers than IOL Master, with a mean difference of 1.01 D (SD 0.96 D) ($P \leq 0.001$), which was statistically significant. This difference was determined to be statistically significant.¹⁶ In our study, we used the SRK-T formula. These formulae do not use actual measurements of the ACD; they assume that short eyes will have shallower ACD and long eyes will have deeper ACD.¹⁷ The IOLMaster has made a significant contribution to the simplification of the ocular biometry procedure. It is a non-contact approach that does not need topical anesthetic, providing comfort to the patient and reducing corneal abrasions and spreading infections. Optical biometry (using Swept-source OCT) like IOL master gives a measurement based on an image that enables the operator to observe a whole longitudinal eye segment. The operator monitoring the fovea's picture will be warned that the patient is not appropriately fixating. He/she will be alerted and can notice irregular eye geometries such as lens tilt. As a direct consequence, more precise estimations of the IOL power would be carried out, ultimately resulting in an improved postoperative refractive condition. In measuring the AXL, it is now taking the place of ultrasonography. In addition, it offers rapid data capture and the ability to measure the AL along six distinct axes.¹⁸ Nevertheless, ultrasonic biometry cannot be ruled out entirely since many eyes, anywhere from 8% to 10% of cases, continue to need it. This is the case with opaque ocular media such as corneal scarring and opaque cataracts, which impede the collecting optical AXL data. Because the measurements are not taken on the visual axis, eyes that do not have optimum fixation due to age-related macular degeneration might lead to erroneous AXL measures. In addition, positioning disabled patients on the IOL Master machine will be challenging enough to need special consideration.

CONCLUSIONES

The IOL Master is simple to use, does not require eye contact, has no danger of disease transmission, and is generally well-liked by patients. It allows for accurate AXL measurement and, as a result, more accurate IOL power calculations, resulting in improved postoperative refractive condition.

REFERENCIAS

1. Committee MSA. Optical Biometry Using Partial Coherence Interferometry Prior to Cataract Surgery. Canberra Dep Heal Aging. 2005;
2. Abdelghany AA, Alio JL. Surgical options for correction of refractive error following cataract surgery. *Eye Vis.* 2014;1(1):1–7.
3. Olsen T. Calculation of intraocular lens power: a review. *Acta Ophthalmol Scand.* 2007;85(5):472–85.
4. Findl O, Drexler W, Menapace R, Heinzl H, Hitzenberger CK, Fercher AF. Improved prediction of intraocular lens power using partial coherence interferometry. *J Cataract Refract Surg.* 2001;27(6):861–7.

5. Steinert RF. Cataract surgery: Expert Consult-Online and Print. Elsevier Health Sciences; 2009.
6. Byrne SF, Green RL. Ultrasound of the eye and orbit. Mosby Incorporated; 2002.
7. Santodomingo-Rubido J, Mallen EAH, Gilmartin B, Wolffsohn JS. A new non-contact optical device for ocular biometry. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(4):458–62.
8. Gaballa SH, Allam RSHM, Abouhoussein NB, Raafat KA. IOL master and A-scan biometry in axial length and intraocular lens power measurements. *Delta J Ophthalmol*. 2017;18(1):13.
9. Eleftheriadis H. IOLMaster biometry: refractive results of 100 consecutive cases. *Br J Ophthalmol*. 2003;87(8):960–3.
10. Elsaadani AEI, Badawi NM, Elterawy AZA. Optical biometry versus ultrasound biometry. *Egypt J Hosp Med*. 2020;81(5):2088–92.
11. Alpins NA, Walsh G, Optom B. accurate biometry and intraocular lens power calculations. *Refractive Surgery Nightmares-Conquering Refractive Surgery Catastrophes*. Slack Inc; NJ; 2008. p. 581–5.
12. Drexler W, Findl O, Menapace R, Rainer G, Vass C, Hitzemberger CK, et al. Partial coherence interferometry: a novel approach to biometry in cataract surgery. *Am J Ophthalmol*. 1998;126(4):524–34.
13. Iyamu E, Osuobeni E. Age, gender, corneal diameter, corneal curvature and central corneal thickness in Nigerians with normal intraocular pressure. *J Optom*. 2012;5(2):87–97.
14. Gad MN, Mourad MS, Rehan RA, Mustafa MM. Intraocular lens Master optical biometry vs conventional ultrasonic biometry in intraocular lens power calculations in highly myopic vs emmetropic eyes. *J Egypt Ophthalmol Soc*. 2020;113(2):39.
15. Moon SW, Lim SH, Lee HY. Accuracy of biometry for intraocular lens implantation using the new partial coherence interferometer, AL-scan. *Korean J Ophthalmol*. 2014;28(6):444–50.
16. Meena DS, Sukhadia H, Goyal S, Kumar V. Compare the Accuracy of IOL Power Calculations Using Ultrasound Biometry and Partial Coherence Laser Interferometry based Optical Biometry. *Indian J Forensic Med Toxicol*. 2021;15(2):120–6.
17. Shajari M, Kolb CM, Petermann K, Böhm M, Herzog M, de’Lorenzo N, et al. Comparison of 9 modern intraocular lens power calculation formulas for a quadrifocal intraocular lens. *J Cataract Refract Surg*. 2018;44(8):942–8.
18. Ferrer-Blasco T, Domínguez-Vicent A, Esteve-Taboada JJ, Aloy MA, Adsuar JE, Montés-Micó R. Evaluation of the repeatability of a swept-source ocular biometer for measuring ocular biometric parameters. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017;255:343–9.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Hussain-Alshammari M. A.; Abdullah-Al Muhammad S. S. Comparison of ocular biometry and intraocular lens power using a novel biometer and a traditional biometer. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 27. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.27>

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Genetic map of the isolated *Cryptosporidium* parasite from children with diarrheal in the city of Mosul

Hibba Alobide^{ID}^{1,*}, Firas Alkhashab^{ID}², Hiyam Altae^{ID}³

¹ Department of Biology/ University of Mosul/ College of Education For Girls / Mosul / Iraq;

² Department of Biology/ University of Mosul/ College of Education For Girls / Mosul / Iraq;

firasalkhashab@uomosul.edu.iq

Department of Biology/ University of Mosul/ College of Science/ Mosul / Iraq;

hiyamaltaii@uomosul.edu.iq

* Correspondence: hibbaobide94@gmail.com; Tel.: +9647709998261

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.29>

ABSTRACT

The current study was conducted between the beginning of October 2022 and the end of March 2023 to identify the prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection among children under five years using microscopic and molecular methods. The study recorded 43(37.71%) infected children diagnosed using the Modified Zeihl Neelsen Stain and Gimsa stain. On the other hand, a molecular examination of stool samples using PCR showed that 25(21.92%) children out of 115 collected stool samples were infected with this parasite. DNA Sequencing was performed for specimens diagnosed with *Cryptosporidium* parasite, and the new isolates were registered for the first time in Nineveh governorate in NCBI under the accession number 757376.

Keywords: *Cryptosporidium* disease, Genetic map.

INTRODUCTION

Cryptosporidium is a single-cell protozoa parasite and is a Eukaryotic belonging to the phylum Apicomplexa¹ and includes the full development of *Cryptosporidium* on asexual reproduction and Gametogenesis and forms an oocyst containing four Sporozoites, that occurs within the same host² and is the leading cause of Cryptosporidiosis which affects the digestive and respiratory tract of types of hosts, including humans^{3,4} as well as the cause of watery or lipophilic diarrhoea with colic^{5,6} which affects the digestive and respiratory tract of the kinds of hosts, including humans⁷ as well as the cause of watery or lipophilic diarrhoea with colic, Intestinal parasite infections such as *Cryptosporidium* parasites are among the most critical problems experienced by humanity, causing diarrhea in children and the elderly, and sometimes the infection is particularly severe in people with weak immunity^{8,9,10}, Since individuals who are immune competent, the parasite will live for a short time because Cell-mediated immunity and Humoral immunity is able to resist infection¹¹ and most individuals who have immune efficiency do not show symptoms of disease Asymptomatic carrier,¹². The risk is in people who have weak immunity, such as infants as well as malnourished people infected with AIDS as well as those taking Immunosuppressive Therapy. These cases are prone to chronic infections with *Cryptosporidium* And prone to dehydration and malabsorption¹³. more than half of all diseases are water-borne¹⁴, starting with exposure to oocysts, which have the potential to survive prolonged periods in the environment because they are resistant to known household disinfectants and can travel through physical water treatment processes^{1,10}.

Collection of Stool Samples

Stool samples were collected from patients (children), male and female, who reviewed the Ibn Al-Atheer Children's Hospital in Nineveh governorate and laboratory tests for parasite detection were carried out, 114 samples were collected with a size of 15-20 g and placed in sterile plastic packages with a tight cover to maintain moisture and prevent the sample from drying out as well as the patient's name, age, gender and address were recorded and transferred to the research laboratory (Parasite Laboratory) at the Faculty of Education for Girls (University of Mosul) after which the samples were examined in kind by observing (color, texture, smell of feces, presence and absence of blood and mucus) Then go for microscopic examination in the modified Ziehl-Neelson and Giemsa stain methods to confirm the presence of the parasite. The remainder of the sample is performed using the flotation method to obtain the egg cysts and is placed in sterile tubes. It was stored in a potassium bichromate solution with a 2.5% concentration added to each ml of the feces sample and 1 ml of the solution. The samples were kept in the refrigerator at 4 ° C until the DNA parasites were isolated and the PCR chain polymerization reaction examined¹⁵.

MATERIALS AND METHODS

Microscopic examination:

The staining method by modified Ziehl-Neelson according to Henrisken and Pohlenz, Khudhair^{16,17}.



Figure 1. The staining method by modified Ziehl-Neelson stain

After the procedure of staining operation by modified Ziehl-Neelson MZN and Diagnosis of oocysts, the remainder of the stool sample Enters a Phase Flotation by Sheather's Sugar Solution according to method¹⁸.

Molecular examination

Extracting DNA from *Cryptosporidium* spp parasite

Instructions from Geneaid company directed the Assay Procedure to extract DNA installed on the Kit.

Preparation of Agarose Gel and Electrophoresis of DNA

The Agarose gel is prepared at a concentration of 1% to deploy and detect DNA. This concentration is dissolved by 0.5 g of Agarose powder in (50) ml of X1 TBE, and the addition of 3 microliters of red safe dye is done using a hot plate magnetic stirrer until boiling and left to cool to a temperature of (60-50)C. The gel solution is poured into the tray with the electrophoresis device after the special comb is installed to form Wells drilling at the gel's limbs, considering that the casting is quiet to avoid forming bubbles. If included, it is removed using the absorbent, and then the gel is left until hardened.

Then, the tray is placed in the electrophoresis device basin containing an appropriate amount of X1 TBE solution, after which the comb is quietly lifted. Relay samples are prepared by mixing (5) microliters of DNA sample with (3) microliters of loading solution. The electrophoresis device is powered by an Electric Current supply with a voltage difference (5) V/cm, which takes (2-1.5) hours. Then, the gel is filmed under ultraviolet light using the Gel Imaging Device Gel Documentation to see the DNA packages and the PCR reaction product.

The PCR reaction

The DNA concentration in all study samples was adjusted by mitigation by a TE buffer solution to obtain the required concentration for PCR interactions, which was (100) ng/microliters per sample. The Master Reaction mixture is prepared for each PCR reaction by blending the DNA sample and the unique prefix for each gene with the Pre-mix components within the 0.2 ml Eppendorf tube equipped by Biolaps English company. The reaction volume has been stabilized to 20 microliters with distilled water. The combination is discarded in the Microfuge for between (5-3) seconds to ensure that the interaction components are blended. Then, the reaction tubes are introduced into the Thermocycler to conduct the multiplier reaction using the particular program of each response. The sample was then loaded into Etch the agarose gel at 2% concentration with the addition of the Ladder DNA volume guide equipped by Biolaps in one etch. The samples are then relayed by running the electrophoresis device for between 70 and 60 minutes, after which the gel is filmed using the gel documentation device.

Molecular diagnosis of *Cryptosporidium spp* parasite based on 18S rDNA region

The presence of the enlarged area has been revealed with the addition of 4 microliters (100 nanograms) of DNA template and 1 microliter (10 picomol) from each unique prefix in the gene to the contents of the Master mix.

Primer	Sequence
Forward	5' - TGGCACCAGAATCAGCTGAA – 3'
Reverse	5' - GACAGGTTGAGTTGGAGCAGA – 3'

Table 1. The prefixes used to amplify the COWP gene to *Cryptosporidium* parasite.

Then, the reaction tubes were inserted into the Thermocycler device to perform the multiplier reaction using the particular response program.

No.	Stage	Temperature	Time	Cycle Number
1	Initial denaturation	95	6 min.	1
2	Denaturation	95	1.30 min	35
3	Annealing	60	1.30 min	35
4	Extension	72	2 min.	35
5	Final extension	72	5 min.	1

Table 2. Shows the special program of polymerase chain reaction used in the current study.

The sequence of nitrogen bases for the samples under study was determined as the products of the pre-mentioned PCR reaction of the samples were sent with the special prefixes in the resulting beam. The sequence was read for the genes based on the 3130 Genetic Analyzer device equipped by the Japanese company Hitachi.

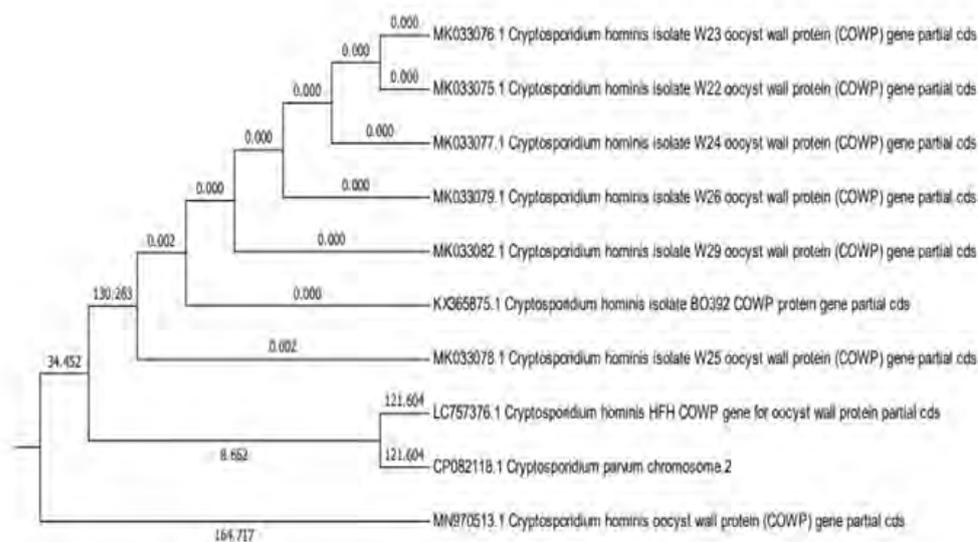


Figure 2. The evolutionary tree and the relationship between local isolates and global isolates

Gene sequences were matched with gene sequences documented at the National Center for Biotechnology Information NCBI, and the results were analyzed based on the BLAST program.

RESULTS AND DISCUSSION

Microscopy

The result of microscopic examination of the 114 stool samples in the city of Mosul. There were 43 children with *Cryptosporidium* disease (37.71%), according to the microscopic examination of modified Diehl-Neelson stain MZN, as well as Flotation operation with Sheather's Sugar Solution was the infection (31.57%).

The results of the current study Also show a difference in the rates of infection between the ages of 5 months and 5 years, when the highest incidence is recorded(3-4 years). The lowest proportion was in the age group (5

months/year), which agreed with a study by Hussein 19. The age factor plays a role in the spread of the parasite because children's immune system is incomplete. They are constantly exposed to contamination, both food contaminants and even other environmental contaminants, due to frequent movement and mixing with other children and possibly contact with stored animals and carriers of parasites, as well as the residential area in which they are located, Especially if animal husbandry abounds is a source of infection in addition to lack of hygiene and health awareness²⁰.

The discrepancy also appeared in the infection rates according to sex in children, as the percentage of males (72.09%) infected with females (30.23%). Many studies have confirmed, such as a study, that there is no relationship between sex and the rate of infection with the *Cryptosporidium* parasite. Still, the reason may be due to the type of food Or males eating exposed foods contaminated with oocysts in public places because they are in contact with external environment conditions that play a role in parasite transmission and infection, as well as smoking with break and lack of attention to personal hygiene all increase the chance of infection with *Cryptosporidium* more than females²¹.

The highest incidence of infections among children was found in November (37.2%), and the lowest rate of infections (2.32%) in February. This matched the study of Abbas & Resan²², which recorded the highest infection in winter. The reason was the rain that drifts the soil contaminated with parasite oocysts into the stool of animals and mixes with water sources such as rivers and streams, causing the *Cryptosporidium* disease.

The results indicated that the *Cryptosporidium* parasite was more prevalent in rural areas (67.44%) and less in urban areas (32.55%). This study came in agreement with several studies of which Mohanad²³ and Al-Kubaaaisy²⁴, For many reasons, including the low level of health and cultural awareness due to the lack of schools and hospitals, and the use of river water for drinking, cooking and swimming, and raising and touching animals and fertilizing crops increased.

Molecular examination

Results emerged from one package (single band) in the Agarose gel with a molecular size of 650bp in DNA extracted from samples of individuals with *Cryptosporidium*. It is considered a reference to the patient's infection. The current study showed that the infection with the *Cryptosporidium* parasite was (21.92%) close to the study of Abdul-Sada²⁵, Tahvilder & Salehi²⁶ and Gawad et al.²⁷ as (24.3%) (20.8%) (21.0%), respectively.

Genetic isolates were compared with other *Cryptosporidium parvum* by finding the genetic tree. A new type of Genotype of *Cryptosporidium parvum* was recorded in Nineveh governorate and registered in the NCBI genetic Bank with the researchers' names. DNA sequencing of 10 samples chosen from Polymerase chain reaction products was analyzed from an original sample 25 which showed a positive result for the target area of the DNA of the products with the primary sequence of the DNA of the parasite *Cryptosporidium* reference gene published in the Nitrogen base Database of the GenBank website using BLAST Program of The National Center For Biotechnology Information (NCBI) The rate of matching was high with the isolation recorded in the America, while the rate of matching was lower with other isolations registered and the ratio of match ranged from 83% _ 88% Results show that the local isolation that recorded at the Gene Bank in sequence (757376) has a high convergence rate with the American isolation that sequence (082118) of about 88% This shows the origin of an evolutionary development associated with these isolations despite the geographical location of the parasite isolation zones of the two similar strains, but studies have confirmed that travel and movement between countries have played a role in the development and transmission of isolations by infected people to many different countries, especially in recent times, He stated²⁸ that *Cryptosporidium* has become an epidemiological disease and called Traveller Diarrhea (TD), because it is transmitted among travelers

through public health facilities at the world's airports, where the parasite was found this way by 20 _ 60% in North America and Europe. The strain's emergence could be due to its transmission during the United States military's presence in Mosul after the events of 2003.

CONCLUSIONS

In conclusion, the microscopic examination of stool samples in Mosul revealed a high prevalence of *Cryptosporidium* infection among children, with the highest incidence occurring in the age group of 3-4 years. The infection rates were higher in males than females, and the highest incidence of infections was observed in November. Additionally, the study found that the *Cryptosporidium* parasite was more prevalent in rural areas, and a new genotype of *Cryptosporidium parvum* was recorded in Nineveh governorate. The genetic analysis showed a high convergence rate with American isolates, suggesting the possibility of transmission through travel and movement between countries.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: I'm incredibly grateful to the council of the University Of Mosul/ College Of Education For Girls. It would not have been possible without their support and nurturing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Ryan, U.; Paparini, A.; Monis, P.; Hijjawi, N. It's official—*Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry?. *Water Research*. 2016 Nov 15;105:305-13.
2. Cruz-Bustos, T.; Feix, A.S.; Ruttkowski, B.; Joachim, A. Sexual development in non-human parasitic apicomplexa: just biology or targets for control?. *Animals*. 2021 Oct 4;11(10):2891.
3. Fayer, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental parasitology*. 2010 Jan 1;124(1):90-7.
4. Ryan, U.N.; Fayer, R.; Xiao, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*. 2014 Nov;141(13):1667-85.
5. Chen, X.M.; Keithly, J.S.; Paya, CV; LaRusso, N.F. Cryptosporidiosis. *New England Journal of Medicine*. 2002 May 30;346(22):1723-31.
6. Kosek, M.; Alcantara, C.; Lima, A.A.; Guerrant, R.L. Cryptosporidiosis: an update. *The lancet infectious diseases*. 2001 Nov 1;1(4):262-9.
7. Wisner, MF; Nutrition and protozoan pathogens of humans: A primer. *Nutrition and infectious diseases: shifting the clinical paradigm*. 2021:165-87.
8. Platts-Mills, J.A.; Babji, S.; Bodhidatta, L.; Gratz, J.; Haque, R.; Havt, A.; McCormick, B.J.; McGrath, M.; Olortegui, M.P.; Samie, A.; Shakoor, S. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *The Lancet Global Health*. 2015 Sep 1;3(9):e564-75.
9. Khalil, I.A.; Troeger, C.; Rao, P.C.; Blacker, B.F.; Brown, A.; Brewer, T.G.; Colombara, D.V.; De Hos-tos, EL; Engmann, C.; Guerrant, R.L.; Haque, R. Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years: a meta-analyses study. *The Lancet Global Health*. 2018 Jul 1;6(7):e758-68.
10. Wang, Z.D.; Liu, Q.; Liu, H.H.; Li, S.; Zhang, L.; Zhao, Y.K.; Zhu, X.Q. Prevalence of *Cryptosporidium*, microsporidia and *Iso-spora* infection in HIV-infected people: a global systematic review and meta-analysis. *Parasites & vectors*. 2018 Dec;11:1-9.

11. Riggs, M.W. Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes and Infection*. 2002 Aug 1;4(10):1067-80.
12. Wang, Y.; Cao, J.; Chang, Y.; Yu, F.; Zhang, S.; Wang, R.; Zhang, L. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Gansu, northwest China. *Parasite*. 2020;27.
13. Hunter, P.R.; Nichols, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*. 2002 Jan;15(1):145-54.
14. Kotloff, K.L.; Nataro, J.P.; Blackwelder, W.C.; Nasrin, D.; Farag, T.H.; Panchalingam, S.; Wu, Y.; Sow, S.O.; Sur, D.; Breiman, RF; Faruque, A.S. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet*. 2013 Jul 20;382(9888):209-22.
15. Khudhair, M.S.; Al-Niaeemi, N.E. Experimental study of heat-killed oocysts of *Cryptosporidium Parvum* in Balb/c Mice. *J. Educ. Sci.* 2020 Jun 1;29(2):158-73.
16. Henriksen, S.A.; Pohlenz, J.F. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta veterinaria scandinavica*. 1981;22(3-4):594.
17. Khudhair, M.S. Experimental study of heat -killed oocysts of *Cryptosporidium parvum* in Balb/c Mice. *Journal of Education and Science (ISSN 1812 – 125X), Vol:29, No:2, 2020 (158 – 173)*.
18. Freire-Santos, F.; Oteiza-Lopez, A.M.; Vergara-Castiblanco, C.A.; Ares-Mazas, M.E. Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. *Veterinary Parasitology*. 1999 Nov 1;87(1):1-7.
19. Hussein, Z.A. Percentage of infection with *Cryptosporidium parvum* in children At Al-Zahra Maternity and children Hospital. 2011;MSc. Nursing. Collage., Al-KufaUniv.:8pp.
20. Al-Sultan, Sh.H. Diagnostic epidemiological and pathological study of *Cryptosporidium parvum* in children under five years of age in some areas of Nineveh Governorate (MSc, Education for Girls. Collage., MosulUniv.:2021; 67pp.
21. Al-Mamouri, A.K. Epidemiology of intestinal parasites and head lice in pupils of some primary school at Al-Mahaweel district, Babylon province (Doctoral dissertation, MSc. Thesis. Collge of Science. Babylon University. 2000: 122).
22. Sabri, SM Determining the spread of *Cryptosporidium* by traditional methods in Al-Diwaniyah Governorate-Iraq. *Iraqi Journal of Humanitarian, Social and Scientific Research*. 2022.
23. Mohanad, M.M. The study of *Cryptosporidium parvum* dispersal in children less than five years old in Ramadi province. *J. Al-Anbar Uni. Sci.* 2008;2(2):84-8.
24. Waqar, AL; Hassanain, A.L.; Alyaa, A.K. Intestinal parasitic diarrhea among children in Baghdad–Iraq. *Tropical biomedicine*. 2014 Sep;31(3):499-506.
25. Abdul-Sada, K.M. Molecular and Epidemiological Study of *Cryptosporidium* spp. in Mid-Euphrates Area. *Kufa Journal for Nursing Sciences*. 2015 Apr 25;5(1):167-78.
26. Tahvildar-Biderouni, F.; Salehi, N. Detection of *Cryptosporidium* infection by modified ziehl-neelsen and PCR methods in children with diarrheal samples in pediatric hospitals in Tehran. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*. 2014;7(2):125.
27. Gawad, SS; Ismail, M.A.; Imam, N.F.; Eassa, A.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic immunocompetent patients in Beni-Suef, Egypt: insight into epidemiology and diagnosis. *The Korean journal of parasitology*. 2018 Apr;56(2):113.
28. Shinta, T., Oda, T., & Arizono, N. Imported cryptosporidiosis report of a case in Japan and the literature. *Kansen, Shogaku. Zasshi.*, 2004;68(7):941945.

Received: 15 June 2023 / Accepted: 23 August 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Al-Obide, H.; Alkhashab, F. Genetic map of the isolated *Cryptosporidium* parasite from children with diarrheal in Mosul. *Revis Bionatura* 2023;8 (4)29. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.29>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Virosis en el cultivo del tabaco

Enny Ganchozo-Mendoza¹, Francisco J. Flores^{2,3}; Felipe R. Garcés-Fiallos^{4*}

¹ Instituto de Posgrado, Maestría en Sanidad Vegetal, Universidad Técnica de Manabí. Código Postal 130105, Portoviejo, Manabí, Ecuador.

² Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí 170501, Ecuador.

³ Centro de Investigación de Alimentos, CIAL, Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias, Universidad UTE, Quito, Ecuador.

⁴ Laboratorio de Fitopatología, Campus Experimental La Teodomira, Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Manabí, Santa Ana EC 131301, Ecuador.

*Corresponding author: Email: felipe.garces@utm.edu.ec Mobile: +593 939929958

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.30>

RESUMEN

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es un cultivo industrial de importancia económica y una planta modelo importante, cultivada ampliamente en muchos países. Su producción, rendimiento y calidad se han visto gravemente afectados por una serie de factores entre los que destacan las infecciones virales. Hasta el momento se han reportado más de 60 virus pertenecientes a 20 géneros que infectan y provocan pérdidas sustanciales de rendimiento en tabaco. Los genomas de estos fitopatógenos pueden ser de ADN o ARN, distribuyéndose en varias partículas virales (monopartito, bipartito o tripartito). En su gran mayoría, las infecciones virales en tabaco son ocasionadas por virus de ARN monocatenarios de sentido positivo (ARN+) como los pertenecientes al género Tobamovirus y Cucumovirus. No obstante, los Begomovirus (virus de ADN) también impactan económicamente el cultivo de tabaco. Esta revisión enlista los principales virus de ADN y ARN que infectan plantas de tabaco, así como sus vectores más relevantes. Además, se abordan las técnicas de detección y diagnóstico que se han desarrollado continuamente para identificar correctamente las enfermedades virales asociadas al cultivo de tabaco.

Palabras clave: *Nicotiana tabacum* L., virus de plantas, incidencia de virus, detección y diagnóstico viral

ABSTRACT

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is an economically significant industrial crop and an important model plant, widely grown in many countries. Its production, yield and quality have been severely impacted by a series of factors, with viral infections being prominent among them. To date, more than 60 viruses from 20 genera have been reported to infect and cause substantial yield losses in tobacco. The genomes of these phytopathogens can be either DNA or RNA, distributed in various viral particles (monopartite, bi-partite or tripartite). Predominantly, viral infections in tobacco are caused by single-stranded positive-sense RNA viruses (+RNA), such as those belonging to the Tobamovirus and Cucumovirus genera. However, Begomoviruses (DNA viruses) also economically impact the tobacco crops. This review lists the major DNA and RNA viruses infecting tobacco plants, along with their most relevant vectors. Additionally, it outlines the continuously developed detection and diagnostic techniques continuously essential for accurately identifying viral diseases associated with tobacco cultivation.

Key words: *Nicotiana tabacum* L., plant viruses, virus incidence, virus detection and diagnosis.

INTRODUCCION

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es una especie endémica de América del Sur perteneciente a la familia Solanaceae, cultivada en todo el mundo ¹. Desde el punto de vista económico, es la especie más importante del género *Nicotiana*, existiendo aproximadamente 152 variedades cultivadas ^{2,3}. Esta solanácea es atacada por un sinnúmero de fitopatógenos que afectan principalmente el área foliar, destacándose los virus. Estos agentes infecciosos son económicamente importantes y el manejo de sus enfermedades es crucial para la producción agrícola ⁴⁻⁶.

Un gran número de virus pueden infectar plantas de tabaco ya sea de forma natural o experimental. Estos agentes infecciosos están distribuidos mundialmente, reduciendo el rendimiento y calidad del cultivo, representando un factor económico importante para los tabacaleros ⁴⁻⁶. Los síntomas característicos asociados a virosis en tabaco son muy variados *i.e.* manchas anulares cloróticas y necróticas, mosaico, enanismo, moteado, estriado, arrugamiento, deformaciones, entre otros ⁷⁻¹⁰. Es esencial realizar una identificación temprana de los virus en las plantas de tabaco con el fin de minimizar los daños y pérdidas asociadas.

Entre los virus más importantes del tabaco se incluyen a Tobamovirus (como *Tobacco mosaic virus* – TMV) que es considerado uno de los agentes virales de mayor importancia económica, seguido de Cucumovirus (*Cucumber mosaic virus* – CMV), Potyvirus (*Potato virus Y* – PVY; *Tobacco vein mottling virus* – TVMV y *Tobacco etch virus* -TEV), Begomovirus (*Tobacco leaf curl virus* -TLCV), y Tospovirus (*Tomato spotted wilt orthotospovirus* – TSWV), que afectan la producción y el rendimiento de las hojas de tabaco en muchas plantaciones a nivel mundial ¹¹⁻¹⁵. Dado que los síntomas de las virosis se manifiestan en gran medida en las hojas, que constituyen el producto principal del cultivo de tabaco, resulta crucial recopilar y sintetizar el conocimiento disponible acerca de estas enfermedades virales. En este sentido, se ha llevado a cabo una revisión actualizada de los virus que afectan al cultivo de tabaco, su incidencia y daños producidos, su relación con los vectores más relevantes, así como las técnicas actuales para su detección e identificación.

Virus que afectan plantas de tabaco

El tabaco es una de las solanáceas más susceptibles a las infecciones virales, con más de 20 géneros de virus con capacidad de infectarlo de forma natural. Además, se ha demostrado experimentalmente que las plantas de tabaco pueden ser infectadas por más de un centenar de especies virales ¹⁶. Se han documentado casos de infecciones mixtas en las que coexisten dentro del mismo hospedero más de una especie o variantes genéticamente distintas de la misma especie. Los virus involucrados pueden interactuar entre sí, dando lugar a fenómenos de sinergismo, neutralismo o antagonismo ^{17,18}.

Los virus pueden presentar genomas de ADN o ARN, los cuales pueden estar contenidos en una sola o distribuidos en varias partículas virales (monopartito, bipartito o tripartito) ¹⁹. Las infecciones en plantas de tabaco en su mayoría son ocasionadas por virus de ARN monocatenarios de sentido positivo (ARN +) ²⁰. No obstante, hay un grupo importante de virus de ADN como los Begomovirus, que causan un impacto económico al cultivo. En la Tabla 1 se presentan algunas de las especies virales que infectan plantas de tabaco, así como sus vectores asociados.

Genero viral	Genoma	Vector/forma de diseminación	Referencia
Especie de virus			
Alfamovirus	(+)ssRNA		
AMV - Alfalfa mosaic virus		Semillas Áfidos (<i>Aphis gossypii</i> ; <i>Myzus persicae</i>)	21-23
Alphanecrovirus	(+)ssRNA		
TNV-A - Tobacco necrosis virus		Hongo (<i>Olpidium brassicae</i>)	24,25

Betanecrovirus	(+)ssRNA		
TNV-D - Tobacco necrosis virus D		Hongo (<i>O. brassicae</i>)	25
Alphanucleorhabdovirus	(-)ssRNA		
EMDV - Eggplant mottled dwarf nucleorhabdovirus		Saltahojas (<i>Agallia vorobjevi</i>)	26
Begomovirus	ssDNA		
HYVMV - Honeysuckle yellow vein mosaic virus RhGMV - Rhynchosia golden mosaic virus TbCSV - Tobacco curly shoot virus TbLCuCUV- Tobacco leaf curl Cuba virus TbLCJV- Tobacco leaf curl Japan virus TbLCYnV- Tobacco leaf curl Yunnan virus TbLCZV- Tobacco leaf curl Zimbabwe virus TYLCCNV- Tomato yellow leaf curl China virus TbASV -Tobacco apical stunt virus TbLCIV - Tobacco leaf curl India virus TbLRV- Tobacco leaf rugose virus TbYCV- Tobacco yellow crinkle virus TbMoLCV- Tobacco mottle leaf curl virus ChiLCV - Chili leaf curl virus CLCuMV-Hib- Cotton leaf curl Multan virus-[Hibiscus]		Mosca blanca (principal vector) (<i>Bemisia tabaci</i>)	27
Carlavirus	(+)ssRNA		
PotLV - Potato latent virus		Áfido (<i>M. persicae</i>)	28–30
Closterovirus	(+)ssRNA		
TV1 - Tobacco virusI*		Desconocido	31,32
Crinivirus	(+)ssRNA		
ToCV- Tomato chlorosis virus		Mosca blanca (<i>B. tabaci</i>)	33
Cucumovirus	(+)ssRNA		
TICV - Tomato infectious chlorosis virus – en <i>Nicotiana glauca</i>		Mosca blanca de los invernaderos (<i>Trialeurodes vaporariorum</i>)	34
CMV - Cucumber mosaic virus		Áfido (<i>M. persicae</i>)	35,36
PSV- Peanut stunt virus		Áfido (<i>M. persicae</i>)	37–39
Iarvirus	(+)ssRNA		
TSV - Tobacco streak virus		Trips	40,41

		(<i>Frankliniella schultzei</i> ; <i>Megalurothrips usitatus</i> ; <i>Microcephalothrips abdominalis</i> ; <i>Scirtothrips dorsalis</i> ; <i>Thrips palmi</i> ; <i>T. tabaci</i>) Polen Semilla Contacto	
Mastrevirus	ssDNA		
TbYDV - Tobacco yellow dwarf virus		Salta hojas (<i>Orosius orientalis</i> y <i>Thamnotettix argentata</i>)	42,43
Nepovirus	(+)ssRNA		
AYRSV - Artichoke yellow ringspot virus		Semillas	44,45
TBRV - Tomato black ring virus		Semillas Nematodos (<i>Longidorus elongatus</i> y <i>L. attenuatus</i>)	46,47
ToRSV - Tomato ringspot virus		Nematodos (<i>Longidorus</i> spp.; <i>Xiphinema</i> spp.) Polen Propagación vegetativa Semillas	48
TRSV - Tobacco ringspot virus		Nematodo (<i>X. americanum</i>) Áfidos (<i>A. glycines</i> ; <i>A. gossypii</i> ; <i>M. persicae</i>) Saltahojas (<i>Melanopus</i> sp.) Escarabajo (<i>Epitrix hirtipennis</i>) Trips (<i>T. tabaci</i>) Ácaro (<i>Tetranychus</i> sp.) Polen Semillas	49–51
Orthospovirus	(+/-)ssRNA		
TSWV - Tomato spotted wilt orthospovirus		Trips (<i>F. fusca</i> ; <i>F. occidentalis</i>)	14
TZSV - Tomato zonate spot virus		Trips (<i>F. occidentalis</i>)	52,53
CCSV - Calla lily chlorotic spot virus		Trips (<i>T. palmi</i>)	54
INSV - Impatiens necrotic spot orthospovirus		Trips (<i>F. intonsa</i> ; <i>F. occidentalis</i>)	55,56
TYRV - Tomato yellow ring virus		Trips (<i>F. occidentalis</i>)	57
TPV1 - Tobacco polerovirus 1 * TPV2 - Tobacco polerovirus 2 *		Áfido (<i>M. persicae</i>)	58,59

TVDV - Tobacco vein distorting virus		Áfido (<i>M. persicae</i>)	59,60
BrYV - Brassica Yellows Virus		Áfido (<i>M. persicae</i>)	61–63
TuYV - Turnip yellows virus		Áfido (<i>M. persicae</i>)	64,65
PepMV - Pepino mosaic virus		Contacto Semillas Polen Mosca blanca (<i>T. vaporariorum</i>) Hongo (<i>O. virulentus</i>) Abejorros (<i>B. canariensis</i> ; <i>Bombus impatiens</i> ; <i>B. terrestris</i>) Chinche (<i>Macrolophus caliginosus</i>)	66–69
PVX - Potato virus X		Contacto	70–72
Potyvirus	(+)ssRNA		
ChiVMV - Chilli veinal mottle virus		Áfidos: (<i>A. gossypii</i>)	73
PVA - Potato virus A		Contacto Áfidos (<i>A. frangulae</i> ; <i>Aphis nasturtii</i> ; <i>Brachycaudus helichrysi</i> ; <i>Macrosiphum euphorbiae</i> ; <i>M. persicae</i> ; <i>Neomyzus circumflexum</i> ; <i>Rhopalosiphum padi</i>)	74–76
PVMV - Pepper veinal mottle virus		Áfidos (<i>A. craccivora</i> ; <i>A. fabae</i> ; <i>A. gossypii</i> ; <i>A. spiraecola</i> ; <i>Hystero-neura setariae</i> ; <i>M. persicae</i> ; <i>Rhodolophium</i> spp.)	77–80
PVY - Potato virus Y		Áfidos (<i>Acyrtosiphon</i> spp.; <i>Amphorophora agathonica</i> ; <i>Anoecia</i> spp.; <i>Aulacorthum solani</i> ; <i>B. rumexicolens</i> ; <i>Calaphis betulaecolens</i> ; <i>Capitophorus</i> spp.; <i>Cavariella theobaldi</i> ; <i>Cepigillettea betulaefoliae</i> ; <i>Chaitophorus</i> spp.; <i>Cinara</i> spp.; <i>Cryptomyzus galeopsideis</i> ; <i>Drepanaphis carolinensis</i> ; <i>Eriosoma americanum</i> ; <i>Euceraaphis</i> spp.; <i>Hayhurstia atriplicis</i> ; <i>Hyperomyzus lactucae</i> ; <i>Illinoia rubicola</i> ; <i>Izyphia</i> sp.; <i>Lipaphis pseudobrassicae</i> ; <i>Macrosiphoniella</i> sp.; <i>Macrosiphum</i> spp.; <i>Metopolophium</i> spp.; <i>Nasonovia ribisnigri</i> ; <i>Nearctaphis bakeri</i> ;	81–85

		<i>Pemphigus</i> sp.; <i>Periphyllus ne-gundinis</i> ; <i>Phyllaphis fagi</i> ; <i>Pterocomma</i> sp.; <i>Rhopalosiphoninus</i> spp.; <i>Schizolachnus</i> sp.; <i>Sipha elegans</i> ; <i>Tetraneura</i> sp.; <i>The-rioaphis trifolii</i> ; entre otros)	
TEV -Tobacco etch virus		Áfidos (<i>A. glycines</i> ; <i>M. persicae</i>)	51,86–88
TVBMV -Tobacco vein banding mosaic virus		Áfidos (<i>A. gossypii</i> ; <i>M. persicae</i>)	89–91
TVMV - Tobacco vein mottling virus		Áfidos (<i>A. glycines</i> ; <i>M. persicae</i>)	51,92,93
TMosqV – Tobacco mosqueado virus		Áfidos (especies no especificadas)	94
Solendovirus	dsDNA		
TVCV - Tobacco vein clearing virus		Semillas	95
Tobamovirus	(+)ssRNA		
TMGMV - Tobacco mild green mosaic virus		Contacto	96
TMV - Tobacco mosaic virus		Semillas Contacto	97–99
NgTLV - Nigerian tobacco latent virus		No reportado	100
Tobravirus	(+)ssRNA		
TRV -Tobacco rattle virus		Principalmente por nematodos (<i>Paratrichodorus</i> spp.; <i>Paratrichodorus allius</i> ; <i>T. spp.</i> ; <i>Trichodorus primitivus</i>) Malezas	101–104
Tymovirus	(+)ssRNA		
EMV - Eggplant mosaic virus		Escarabajos (<i>Diabrotica speciosa</i> ; <i>Epitrix</i> spp.)	105
ToBMV -Tomato blistering mosaic virus		No reportado	106
Umbravirus	(+)ssRNA		
TBTV - Tobacco bushy top virus		Mecánica El áfido <i>M. persicae</i> puede transmitir TBTV solo a partir de plantas coinfectadas por TVDV, actuando como virus auxiliar y encapsidando el ARN genómico de TBTV	58–60
TMoV - Tobacco mottle virus		Los áfidos <i>Aulacorthum solani</i> y <i>M. persicae</i> transmiten TMoV a partir de plantas coinfectadas con TVDV	107
Nanovirus	(+)ssDNA		
MDV -Milk vetch dwarf virus		Áfido (<i>A. craccivora</i>)	108,109

* Nombre científico tentativo

Tabla 1. Virus y sus vectores identificados y reportados en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

Principales síntomas asociados a virus en tabaco

Las infecciones por virus pueden causar diversos síntomas en las plantas de tabaco, como atrofia, patrones de mosaico, amarillamiento, hojas enrolladas, manchas anulares, necrosis, marchitamiento y otras anomalías durante su desarrollo ¹¹⁰. TMV es uno de los virus más comunes e importantes en *N. tabacum*, presentando diferentes síntomas *i.e.* clorosis, oscurecimiento de nervaduras en hojas, moteado, manchas, mosaicos y retraso en el crecimiento ^{111–114}. Por otro lado, plantas de tabaco infectadas con el Begomovirus CMV generalmente muestran clorosis, mosaicos, necrosis, enanismo, retraso en el crecimiento y malformación foliar. La expresión cualitativa de estos síntomas en plantas de tabaco depende de la cepa de CMV ^{115–117}. Algo parecido sucede con los síntomas presentados por TEV, asociados principalmente a clorosis, deformación y reducción del crecimiento ¹¹⁸.

Otros virus como el Potyvirus PVY induce síntomas en plantas de tabaco que también dependen del tipo de cepa viral, como necrosis en las venas de hojas, clorosis, ocasionalmente también una distorsión foliar y necrosis en tallos asociados a PVYN, y moteado y mosaico causados por PVYO ^{119–121}. PVA, es otro Potyvirus que afecta tabaco y causa moteado difuso muy leve y aclaramiento de venas en hojas ⁷⁴. Finalmente, Alfamovirus como AMV induce en plantas de tabaco puntos cloróticos y manchas en hojas, pudiendo estos tejidos presentar venas pálidas, anillos blanquecinos y patrones de líneas de tejido necrótico, y deformación, e incluso a veces mostrar un patrón de mosaico brillante ¹²².

Las infecciones mixtas de dos o más virus no relacionados es un fenómeno frecuente en la naturaleza. Esta sinergia a menudo se manifiesta por un aumento notable tanto en la expresión de síntomas como en la acumulación de virus, en comparación con una sola infección. Una de estas interacciones es la de PVY con el Potyvirus PVX en tabaco, la cual puede producir desde amarillamiento en hojas hasta una necrosis severa ^{123,124}. Otro ejemplo, es la coinfección viral entre TMV y CMV; la aparición de síntomas es más temprana y grave que la monoinfección en plantas de tabaco ¹²⁵. En la Figura 1 se pueden observar algunos de los síntomas virales encontrados en plantas comerciales de tabaco.

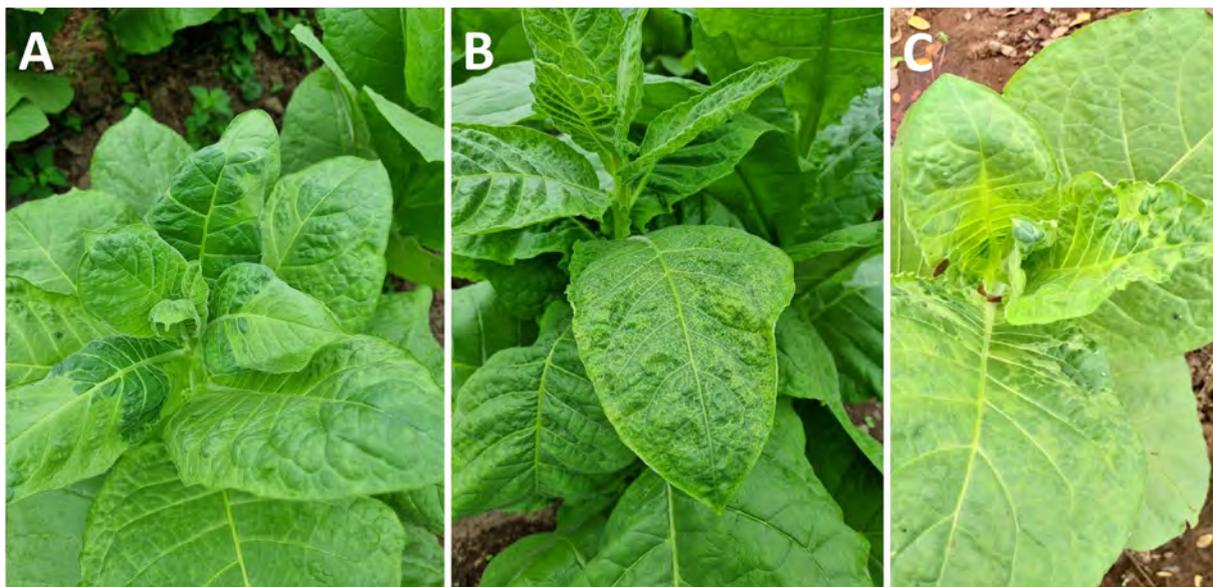


Figura 1. Plantas de tabaco con síntomas virales aparentes: (A) Mosaico y malformaciones en hojas jóvenes, (B) aclaramiento de nervaduras en hojas y reducción foliar, y (C) patrón de mosaico y reducción de crecimiento en hojas jóvenes.

Transmisión de virus en plantas de tabaco

El tabaco al igual que la mayoría de las plantas, adquieren virus a través de vectores que transmiten las partículas virales desde una planta huésped infectada. Generalmente, estos vectores son artrópodos, insectos perforadores-chupadores fitófagos (pulgones, salta hojas, moscas blancas, trips, etc.), pero también escarabajos, ácaros, nematodos, plantas parásitas, malezas, hongos y protistas. Sin embargo, la transmisión viral en tabaco también puede ocurrir por contacto mecánico, semilla botánica (sexual) y polen^{99,126–131}. Los vectores pueden transmitir virus de manera persistente, semipersistente y no persistente. Esta clasificación está dada por la localización del virus en el vector, tiempo requerido por el vector para la adquisición del virus, retención y transmisión del virus, y asociación del virus con varios órganos internos del vector^{92,131}. Además, se han identificado proteínas codificadas por diferentes virus de plantas para interactuar específicamente con sus respectivos vectores (generalmente insectos) para facilitar la transmisión de virus¹³².

En el modo no persistente, los insectos vectores retienen los virus en sus estiletes. En el modo semipersistente, los virus se transportan a los intestinos anteriores o a las glándulas salivales del vector, pero no pueden propagarse de los intestinos a las glándulas salivales o ingresar a la hemolinfa. En el modo persistente, los virus se retienen en los intestinos del vector y pueden propagarse a las glándulas salivales. En los modos no persistente y semipersistente, los virus se retienen por un corto tiempo. Contrariamente, en el modo persistente los virus son retenidos por un tiempo relativamente largo y se los pueden encontrar en la hemolinfa de los vectores¹²⁸. Los insectos, especialmente áfidos y moscas blancas son los principales vectores de virus que infectan plantas de tabaco, representando más del 50% de todos los transmisores de fitovirus¹³³. Estos vectores utilizan diversos mecanismos de transmisión, por ejemplo, los Begomovirus son transmitidos de manera persistente por moscas blancas, mientras que los Closterovirus son transmitidos por áfidos de forma semipersistente. Aunque otros virus como los Potyvirus cuentan con numerosas especies transmitidas de forma no persistente por pulgones, estos también pueden ser transmitidos por semillas e inoculación mecánica. Por otra parte, los Tobamovirus no se transmiten a través de vectores, pero pueden propagarse mediante el contacto entre plantas y, en ocasiones, a través de semillas^{19,127}.

Género viral	Principal vector	Modo de transmisión	Referencia
Alfamovirus	Áfidos	No persistente	127
Alphanecrovirus	Hongo (<i>Olpidium brassicae</i>)	Persistente	131
Betanecrovirus	Hongo (<i>O. brassicae</i>)	Persistente	131
Alphanucleorhabdovirus	Saltahojas	Persistente	134
Begomovirus	Moscas blancas	Persistente-No propagativo	127
Carlavirus	Áfidos	No persistente	135
Closterovirus	Áfidos y cochinillas	Semipersistente	135
Crinivirus	Moscas blancas	Semi-persistentes	136
Cucumovirus	Áfidos	No persistente	133
Iilarvirus	Trips	Persistente	137
Mastrevirus	Saltahojas	Persistente-No propagativo	42
Nepovirus	Nematodos	No persistente	138
Orthotospovirus	Trips	Persistente-Propagativo	139
Potyvirus	Áfidos	No persistente	92
Tobravirus	Nematodos	Semipersistente	102
Tymovirus	Escarabajos	Semipersistentes	31
Umbravirus	Áfidos	No persistente	31
Nanovirus	Áfidos	Persistente	135

Tabla 2. Géneros virales que infectan plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y son transmitidos por vectores y de otras maneras

Incidencia viral en plantas de tabaco

Se han realizado varios estudios sobre la incidencia y distribución de virus en plantaciones de tabaco como primer paso hacia la búsqueda de estrategias de manejo. En Turquía, mediante el método serológico DAS-ELISA (double-antibody sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay) se encontró una tasa de infección del 61,5% para TSWV¹⁴⁰ en hojas de tabaco. En el mismo país, se han reportado incidencias de 8,8, 5,5 y 0,2% correspondientes a CMV, TMV e infecciones mixtas TMV + CMV, respectivamente¹⁴¹. En Asia, específicamente en China, usando técnicas moleculares encontraron una incidencia entre 0,5 y 3% para ChiVMV en muestras provenientes de un cultivo comercial de tabaco¹⁴².

Es importante destacar la importancia que tiene el uso de métodos de detección o identificación de virus en plantas de tabaco. Por ejemplo, en Irán se encontró una incidencia de 79% atribuida inicialmente a la infección con TSV con base en la sintomatología observada en diferentes cultivares. Sin embargo, los análisis moleculares subsiguientes revelaron que prácticamente ninguna de las muestras albergaba una única infección de TSV. Más bien, se constató que estaban afectadas por coinfecciones de uno o varios virus, entre ellos TSWV, CMV, PVY y TMV¹⁴³. En Serbia, de un total de 26 muestras foliares de tabaco comercial y analizadas mediante técnicas serológicas y moleculares, se encontró que 25 fueron positivas para TSWV¹⁴⁴. La incidencia de las infecciones virales depende de diferentes factores como del cultivar usado, la edad de las plantas, prácticas de manejo, entre otros componentes. Al respecto, en varias áreas geográficas de Grecia se estudiaron tres cultivares de tabaco, encontrándose una incidencia viral entre 0,4 y 80 % en plántulas establecidas en semilleros de hasta el 100 % en plantas en condiciones de campo¹⁴⁵.

Aunque el uso de técnicas serológicas o moleculares son importantes en la identificación de virus en plantas de tabaco, la cuantificación de virosis en condiciones de campo también es muy importante. En El Empalme, Ecuador, evaluando la presencia de virosis en plantas comerciales de tabaco cultivares Connecticut y Sumatra durante los años 2021 y 2022, se encontraron síntomas aparentes *i.e.* mosaicos, enanismo, reducción y distorsión de la lámina foliar, necrosis, clorosis, y aclaramiento de nervaduras (Figura 2). Durante las dos campañas en esta localidad, los síntomas virales se observaron a partir de los 15 días después del trasplante (ddt). La mayor incidencia (4% en promedio) en ambos cultivares de tabaco y campañas fueron a los 28 ddt. A los 42 ddt, la incidencia de virosis comienza a disminuir coincidiendo con la floración en ambos cultivares. Cabe destacar que las plantas determinadas como infectadas se eliminaron de la parcela. Resultados como estos pueden considerarse una amenaza importante para cualquier país, teniendo en cuenta que las parcelas usadas en ese estudio fueron manejadas comercialmente, es decir, se aplicaron insecticidas, se desinfectaron herramientas y se eliminaron plantas con síntomas virales aparentes.

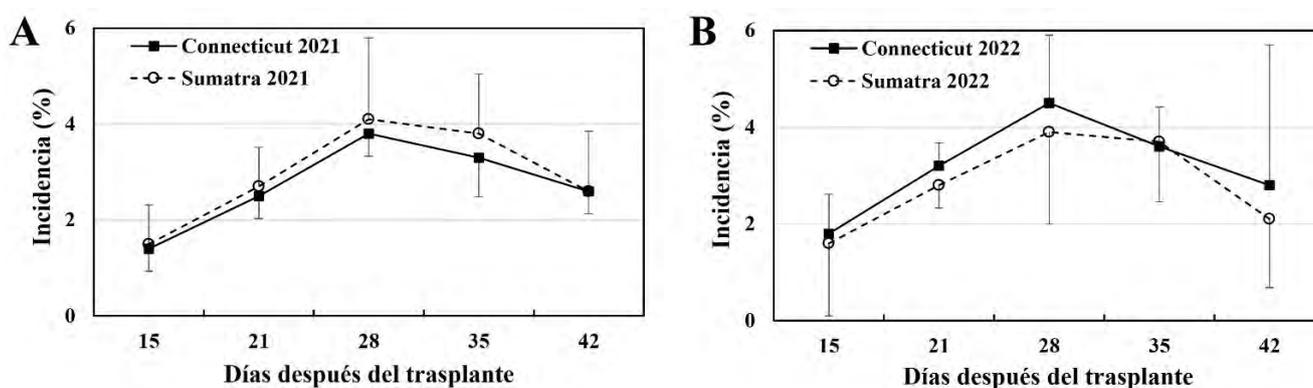


Figura 2. Incidencia de virosis en plantas comerciales de tabaco cultivares Connecticut y Sumatra durante los años 2021 (A) y 2022 (B). Las barras en cada tiempo de evaluación representan la desviación estándar. El Empalme, Guayas, Ecuador.

Identificación y caracterización de virus fitopatógenos

Contrariamente a la mayoría de fitopatógenos, los virus son parásitos obligados, dificultando su identificación y caracterización. No obstante, a través del tiempo se han desarrollado diferentes técnicas basadas en el fenotipo de los virus, incluyendo, pruebas de transmisión, técnicas bioquímicas, microscopía electrónica, y técnicas relacionadas con las proteínas de la cápside viral como ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), microscopía inmunoelectrónica, inmunotransferencia e inmunosensores de microbalanza de cristal de cuarzo. También se han desarrollado métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos como ensayos de hibridación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes (RT-PCR- Real Time, entre otras) ¹⁴⁶.

Las técnicas serológicas de ELISA y moleculares como hibridación molecular y amplificación de ADN son rápidas y específicas para la detección de fitovirus. ELISA se basa en la unión específica de proteínas virales con anticuerpos, mientras que la de hibridación molecular en la unión de ácidos nucleicos virales con sondas de ADN o ARN de secuencia específica. Estos sucesos de unión se visualizan mediante marcadores basados en colorantes fluorescentes, enzimas que producen reacciones colorimétricas o quimioluminiscentes ¹⁴⁷. El uso de cualquiera de estas técnicas es importante en la identificación de fitovirus. Por ejemplo, entre 1997 y 2000, en las principales regiones productoras de tabaco de Grecia, el empleo de la técnica ELISA permitiendo detectar algunos virus como AMV, CMV, EMDV, PVY, TMV y TSWV ¹⁴⁵.

Los métodos de detección basados en la amplificación de ácidos nucleicos más utilizados para la detección de patógenos son la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y las amplificaciones isotérmicas. La PCR es una reacción *in vitro* mediada por cebadores moleculares para amplificar secuencias de ácidos nucleicos diana, basándose en la especificidad de la hibridación y replicación del ADN o ADN complementario (ADNc) en el caso de los virus de ARN ^{148,149}. Una PCR estándar es un procedimiento de tres pasos: (1) desnaturalización a alta temperatura (90–95 °C), (2) hibridación de cebadores específicos del objetivo (45–60 °C), y (3) extensión del cebador mediante una ADN polimerasa termoestable a 72 °C, obteniendo así millones de copias de ácidos nucleicos objetivo ¹⁵⁰.

Se han desarrollado diferentes variantes de PCR para mejorar la sensibilidad y especificidad para la detección de fitovirus, reportándose entre estos a la PCR anidada (nPCR), PCR de inmunocaptura (IC-PCR), PCR multiplex (M-PCR), PCR en tiempo real, y huella digital de ADN. También, están la PCR acoplada con la transcripción inversa de ARN (RT-PCR), RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR), RT-PCR con inmunocaptura (IC-RT-PCR), y AmpliDet RNA. Todos estos métodos permiten una detección y cuantificación rápida y precisa de virus en plantas ^{151–153}. Estudios realizados para la detección de cinco especies de Tobamovirus serológicamente relacionados en *N. tabacum* y *N. benthamiana* demuestran que tanto la RT-PCR-RFLP (usando cebadores con alta homología) como la RT-PCR (usando cebadores específicos de especie) son adecuados para detectar infecciones mixtas y útiles para su diagnóstico ¹⁵⁴. De la misma manera, el uso de la RT-PCR en multiplex, ha permitido la detección simultánea de TBTv, TVDV, satellite RNA TBTv -Sat-TBTv en plantas de tabaco ¹⁵⁵.

En los últimos años se vienen utilizando otras técnicas como la amplificación isotérmica, que se puede lograr mediante dos enfoques: 1) amplificación dependiente de helicasa (HAD): utiliza una HAD para separar las hebras de dsDNA que permite la unión del cebador y la extensión mediante la ADN polimerasa a una temperatura constante aproximada de 65 °C ¹⁵⁶, 2) amplificación mediante polimerasa y recombinasa (RPA): utiliza una recombinasa, proteínas de unión a ADN monocatenario y ADN polimerasa de desplazamiento de cadena a una temperatura entre 37 y 42 °C ¹⁵⁷. Otro método isotérmico es la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA). Esta herramienta consta de una transcriptasa inversa para producir ADN a partir de las plantillas de ARN, la ARN polimerasa T7, la ARNasa H y dos cebadores de oligonucleótidos ¹⁵¹.

También pertenece a las técnicas isotérmicas, la amplificación de círculo rodante (RCA) que requiere un pequeño ADN circular monocatenario como plantilla para generar moléculas largas de ADN o ARN monocatenarias con múltiples unidades repetitivas que corresponden a la plantilla de ADN circular a 37 °C¹⁵⁸. Esta técnica se ha empleado en China para la detección del Nanovirus MVDV en plantas de tabaco⁷.

Uno de los métodos isotérmicos más empleados es la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), que se basa en el autociclado y la alta actividad de desplazamiento de la cadena de ADN mediada por la polimerasa Bst de *Geobacillus stearothermophilus*, en condiciones isotérmicas de 60 a 65 °C. Esta técnica proporciona una alta especificidad debido al uso de cuatro a seis cebadores que reconocen entre seis y ocho regiones independientes, todas ellas dirigidas a una región diana específica¹⁵⁹. Se han implementado algunas variantes de LAMP, incluida la amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP), que utiliza transcriptasa inversa combinada con ADN polimerasa para detectar secuencias de ARN^{160,161}. La técnica RT-LAMP ha demostrado ser extremadamente útil en el diagnóstico de muchos virus de ARN.

Recientemente, se han implementado nuevos métodos para el diagnóstico molecular de fitovirus. Uno de ellos es el basado en el sistema de inmunidad procariótico de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR)/genes asociados a CRISPR (Cas), que es un sistema inmunitario adaptativo que ha sido reprogramado en una tecnología de selección de genes precisa, simple y eficiente¹⁶². Esta novel tecnología ha revolucionado diversas áreas de las ciencias de la vida, la medicina y la biotecnología, donde se incluyen a la fitopatología. Aunque esta técnica molecular está siendo usada intensamente en el fitomejoramiento y desarrollo de germoplasma con rasgos beneficiosos mediante el uso de vectores virales para introducir los reactivos CRISPR/Cas en las células vegetales, también se la ha empleado en el diagnóstico molecular de fitovirus¹⁶³. Por ejemplo, utilizando el sistema CRISPR-Cas12a sensible y específico se han podido detectar en *N. benthamiana* los Geminivirus TYLCV y ToLCNDV¹⁶⁴.

La metagenómica es otra de las técnicas empleadas en la identificación de fitovirus, mediante el uso de la secuenciación de alto rendimiento. En este método, se extrae el ácido nucleico total de una muestra infectada, que incluye tanto al huésped como los patógenos virales, y luego se realiza la secuenciación de las secuencias utilizando herramientas bioinformáticas para identificar los virus presentes¹⁶⁵. Una de las ventajas que presenta la técnica, es que esta secuenciación de alto rendimiento permite la identificación y caracterización del genoma completo de un virus sin necesidad de un conocimiento previo sobre su presencia en la muestra¹⁶⁶. Este método utiliza plataformas que realizan secuenciación masiva y paralela, lo que significa que millones de fragmentos de ácidos nucleicos de una sola muestra se secuencian simultáneamente.

La aplicación de HTS en virología vegetal abarca la secuenciación, descubrimiento y detección de virus/viroides, así como estudios de ecología, epidemiología, replicación y transcripción viral. Es considerada una técnica sensible, precisa y rápida^{167,168}. No obstante, los datos generados por la HTS se convierten en grandes conjuntos de datos sin procesar, conocidos como "big data", que requieren un análisis adicional para extraer información relevante. En el análisis de secuencias, se utilizan pipelines (flujos de trabajo) de software específicos para cada etapa, siendo importante analizar la calidad de las lecturas obtenidas.

Cuando se trabaja con HTS, es importante realizar una limpieza bioinformática para eliminar lecturas y fragmentos de baja calidad. Una vez que se tienen las lecturas limpias, se lleva a cabo el ensamblaje. Este proceso implica encontrar superposiciones entre las lecturas para reconstruir secuencias de consenso o contigs (contigs) más largos. En la etapa final del análisis, se comparan los contigs obtenidos con bases de datos de secuencias virales existentes. Esto permite realizar la asignación taxonómica, es decir, identificar a qué virus pertenecen las secuencias. Se utilizan herramientas bioinformáticas (Tabla 3) especializadas que buscan

similitudes y coincidencias entre los contigs y las secuencias virales conocidas en las bases de datos, entre otras.^{166,167}

Herramientas de procesamiento de lectura			
Control de calidad	FastQC PRINSEQ multiQC	Comprueba la calidad de la secuenciación de lectura	https://www.bioinformatics.braham.ac.uk/projects/fastqc/ https://prinseq.sourceforge.net/ https://multiqc.info/
	Poretools nanoOK	Controles de calidad para lecturas largas de nanoporos	https://github.com/arq5x/poretools https://nanook.readthedocs.io/en/latest/
Preprocesamiento de lecturas sin procesar	Cutadapt Trimmomatic BBduk	Recorte de calidad, eliminación de artefactos en lecturas corta	https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/ http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic
	Nanocorrect, PoreSeq	Corrección de errores no híbridos para lecturas largas de nanoporos	https://github.com/jts/nanocorrect https://github.com/tszalay/poreseq
	Nanocorr	Corrección de errores híbridos para lecturas largas de nanoporos	https://github.com/jgurtowski/nanocorr
Herramientas de ensamblaje del genoma			
Genomas únicos	VICUNA	Produce el ensamblaje del genoma de consenso poblacional	https://www.broadinstitute.org/viral-genomics/vicuna
	IVA	Ensamblador diseñado para virus de ARN	https://sanger-pathogens.github.io/iva/
	SPAdes	Ensamblador genérico del genoma	https://github.com/ablab/spades
	Canu Miniasm	Ensambladores no híbridos para lecturas largas de nanoporos	https://github.com/marbl/canu https://github.com/lh3/miniasm
	Unicycler	Pipeline de ensamblaje híbrido para lecturas largas de nanoporos con el uso de lecturas cortas	https://github.com/rrwick/Unicycler
Metagenomas	MEGAHIT metaSPAdes Ray-meta IBDA-UD	Ensambladores optimizados para datos metagenómicos	https://github.com/voutcn/megahit https://github.com/ablab/spades https://github.com/sebhtml/ray https://github.com/lon-eknightpy/idba
	crAss	Análisis de ensamblaje cruzado de múltiples metagenomas	https://crass.sourceforge.net/

Lectura de mapas	BWA Bowtie BBmap	Alinear secuencias de lectura cortas con una referencia	https://bio-bwa.sourceforge.net/ https://bowtie-bio.sourceforge.net/manual.shtml https://github.com/BioInfo-Tools/BBMap/blob/master/bbmap-help-Biostar.md
	STAR	Alineador con reconocimiento de empalme para datos de RNA-seq	https://github.com/alexdobin/STAR
	GraphMap LAST	Alinear secuencias de lectura largas con una referencia	https://github.com/isovic/graphmap https://github.com/mcfrith/last-rna/blob/master/last-long-reads.md
Predicción genética			
	ORF Finder	Busca marcos de lectura abiertos en la secuencia proporcionada	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orf-finder/
	Prodigal	Una herramienta de software de predicción de genes codificadores de proteínas	https://github.com/hyattpd/Prodigal
	VIGOR	Programa de anotación para genomas virales pequeños	https://www.jcvi.org/research/vigor
Búsquedas de similitud			
	BLAST	Un conjunto de herramientas para encontrar regiones de similitud entre el ADN y las secuencias de proteínas	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
	HHpred	Detección de homología de proteínas sensibles, función y predicción de estructura	https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred
	HMMER	Búsqueda basada en homología	http://hmmer.org/
Alineación de secuencias múltiples			
	MAFFT ClustalW	Alineación de secuencias múltiples para secuencias de ADN y proteínas	https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/ https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw
	MUSCLE	Alineación de secuencias múltiples para secuencias de proteínas	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/
Anotación taxonómica de secuencia			

	CAT/BAT Kraken Centrifuge Kaiju	Asignar etiquetas taxonómicas a lecturas o contigs ensamblados	https://github.com/dutilh/CAT https://ccb.jhu.edu/software/kraken/MANUAL.html https://ccb.jhu.edu/software/centrifuge/manual.shtml https://kaiju.binf.ku.dk/
Filogenias			
	RaxML, PhyML	Inferencia de grandes árboles filogenéticos	https://github.com/stamatak/standard-RAxML https://github.com/stephaneguindon/phyml
	BEAST	Un paquete de software para el análisis filogenético con énfasis en árboles a escala temporal	https://beast.community/
Taxonomía y clasificación			
	GRAViTy	Clasificación de los virus eucariotas	http://gravity.cvr.gla.ac.uk
	vConTACT	Clasificación de los virus de ADN bicatenario de bacterias y arqueas	https://bitbucket.org/MAVERICLab/vcontact2/src/master/
	VICTOR	Filogenia basada en el genoma y clasificación de virus procariotas	https://ggdc.dsmz.de/victor.php
Estructuras secundarias de ARN			
	Mfold UNAFold	Predicción de la estructura secundaria del ARN	https://bio.tools/mfold http://www.unafold.org/
	ViennaRNA package	Conjunto de herramientas para realizar la predicción y comparación de estructuras de ARN	https://github.com/ViennaRNA/ViennaRNA
	LocARNA	Alineación de secuencias múltiples guiada por estructura de secuencias de ARN	https://github.com/s-will/LocARNA
Transcriptómica			
	DESeq2 Sleuth	Análisis estadístico de datos RNA-seq	https://github.com/mikelove/DESeq2 https://github.com/pachterlab/sleuth
Bases de datos			
	ViralZone	Vincular el conocimiento específico para cada familia de virus con las proteínas virales y las secuencias genómicas	https://viralzone.expasy.org/

	Virus Variation Resource	Un portal comunitario para datos de secuencias virales	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/variation/
	Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR)	Un repositorio integrado de datos y herramientas de análisis para múltiples familias de virus	https://legacy.vi-prbrc.org/brc/home.spg?decorator=vipr

Tabla 3. Lista de herramientas y recursos de software seleccionados para tareas de bioinformática de virus

CONCLUSIONES

El tabaco (*N. tabacum*) es una de las especies vegetales con mayor susceptibilidad a patógenos, encontrándose más de 60 reportes de al menos 20 géneros virales. Dentro de este grupo existen virus de importancia económica por los daños que causan al hospedante, entre los que destacan TMV (Tobamovirus), CMV (Cucumovirus), PVY, TVMV y TEV (todos tres Potyvirus), TLCV (Begomovirus), y TSWV (Tospovirus). La mayoría de los virus que afectan plantas de tabaco principalmente son transmitidos por insectos, pero también por hongos, nematodos, semillas, polen y de forma mecánica. La incidencia de estos patógenos virales parece depender de diferentes factores como del genotipo usado, la edad de las plantas, prácticas de manejo, entre otros componentes, alcanzando valores entre 0,8 y 100%. Los fitovirus son identificados o caracterizados a través de pruebas de transmisión, técnicas bioquímicas y de microscopía electrónica, así como las relacionadas a las proteínas de la cápside viral como las técnicas de ELISA, microscopía inmuno-electrónica, inmunotransferencia, e inmunosensores de microbalanza de cristal de cuarzo. También, se los puede identificar usando diferentes variantes de PCR (nPCR, IC-PCR, M-PCR, PCRrt, RT-PCR, IC-RT-PCR y AmpliDet RNA), amplificación isotérmica (HAD, RPA, NASBA, RCA, LAMP y RT-LAMP), sistema de inmunidad procariótico de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interesparadas (CRISPR), y secuenciación de nueva generación.

Conflictos de interés:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Contribución de autores

Todos los autores contribuyeron en la lectura, conceptualización, revisión y edición del manuscrito.

Financiación

Universidad Técnica de Manabí: BECA PARA EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN A TRAVÉS DE SU TITULACIÓN.

REFERENCIAS

1. Russell, E. A. & Rahman, E. *The Master Plant: Tobacco in Lowland South America. The Master Plant: Tobacco in Lowland South America* (Bloomsbury Academic, 2015). doi:10.5040/9781474220279.
2. Chiurciu, I. A., Zaharia, I. & Soare, E. Aspects of the Tobacco Market Within the European Union and a Brief Moral Reflection on Smoking. *Scientific Papers-Series Management Economic Engineering in Agriculture and Rural Development* **19**, 59–68 (2019).

3. Warner, K. E. The economics of Tobacco: myths and realities. *Tob Control* **9**, 78–89 (2000). Doi: 10.1136/tc.9.1.78.
4. Akinyemi, I. A., Wang, F., Zhou, B., Qi, S. & Wu, Q. Ecogenomic survey of plant viruses infecting Tobacco by Next generation sequencing. *Virol J* **13**, 181 (2016). Doi: 10.1186/s12985-016-0639-7.
5. Paximadis, M., Idris, A. M., Villarreal, A. & Rey, M. E. C. Characterization of tobacco Geminiviruses in the old and new world. 703–717 (1999).
6. Duke, M. Ethnicity, Well-Being, and the Organization of Labor among Shade Tobacco Workers. *Med Anthropol* **30**, 409–424 (2011). Doi: 10.1080/01459740.2011.576727
7. Kamran, A. *et al.* Full genome sequence analysis and putative host-shifting of *Milk vetch dwarf virus* infecting Tobacco (*Nicotiana tabacum*) in China. *Virol J* **16**, 1–5 (2019). Doi: 10.1186/s12985-019-1129-5
8. Takakura, Y., Udagawa, H., Shinjo, A. & Koga, K. Mutation of a *Nicotiana tabacum* L. eukaryotic translation-initiation factor gene reduces susceptibility to a resistance-breaking strain of *Potato virus Y*. *Mol Plant Pathol* **19**, 2124–2133 (2018). Doi: 10.1111/mpp.12686.
9. Wang, S., Cui, W., Wu, X., Yuan, Q., Zhao, J., Zheng, H., ... & Yan, F. Suppression of nbe-miR166h-p5 attenuates leaf yellowing symptoms of potato virus X on *Nicotiana benthamiana* and reduces virus accumulation. *Mol Plant Pathol* **19**, 2384–2396 (2018). Doi: 10.1111/mpp.12717.
10. Zellner, W., Frantz, J. & Leisner, S. Silicon delays Tobacco ringspot virus systemic symptoms in *Nicotiana tabacum*. *J Plant Physiol* **168**, 1866–1869 (2011). Doi: 10.1016/j.jplph.2011.04.002.
11. Cheng, L., Chen, X., Jiang, C., Ma, B., Ren, M., Cheng, Y., Liu, D., Geng, R. & Yang, A. High-density SNP genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping for resistance to cucumber mosaic virus in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Crop Journal* **7**, 539–547 (2019). Doi: 10.1016/j.cj.2018.11.010.
12. Dhawi, F. El-Beltagi, H. S., Abdel-Mobdy, Y, Salah, S., Ghaly, I. S., Abdel-Rahim, E. A., Mohamed, H. I. & Soliman, A. M. Synergistic impact of the pomegranate peels and its nanoparticles against the infection of tobacco mosaic virus (TMV). *Fresenius Environ Bull* **30**, 731–746 (2021).
13. Gao, R., Tian, Y. P., Wang, J., Yin, X., Li, X. D., & Valkonen, J. P. Construction of an infectious cDNA clone and gene expression vector of *Tobacco vein banding mosaic virus* (genus Potyvirus). *Virus Res* **169**, 276–281 (2012). Doi: 10.1016/j.virusres.2012.07.010.
14. Konakalla, N. C., Bag, S., Deraniyagala, A. S., Culbreath, A. K. & Pappu, H. R. Induction of plant resistance in Tobacco (*Nicotiana tabacum*) against *Tomato spotted wilt orthotospovirus* through foliar application of dsRNA. *Viruses* **13**, (2021). Doi: 10.3390/v13040662.
15. Hidayat, S. H., Chatchawankanpanich, O. & Aidawati, N. Molecular Identification and Sequence Analysis of Tobacco Leaf Curl Begomovirus from Jember, East Java, Indonesia. *Hayati* **15**, 13–17 (2008). Doi: 10.4308/hjb.15.1.13
16. Hañcinský, R., Mihálik, D., Mrkvová, M., Candresse, T. & Glasa, M. Plant viruses infecting solanaceae family members in the cultivated and wild environments: A review. *Plants* **9**, (2020). Doi: 10.4308/hjb.15.1.13.
17. Gao, F. Liu, X., Du, Z., Hou, H., Wang, X., Wang, F., & Yang, J. Bayesian phylodynamic analysis reveals the dispersal patterns of tobacco mosaic virus in China. *Virology* **528**, 110–117 (2019). Doi: 10.1016/j.virol.2018.12.001

18. Dai, J., Peng, H., Chen, W., Cheng, J. & Wu, Y. Development of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of three Potyviruses in tobacco plants. *J Appl Microbiol* **114**, 502–508 (2012). Doi: 10.1111/jam.12071.
19. Zanardo, L. G., de Souza, G. B. & Alves, M. S. Transcriptomics of plant–virus interactions: a review. *Theor Exp Plant Physiol* **31**, 103–125 (2019). Doi: 10.1007/s40626-019-00143-z.
20. Zwart, M. P. & Elena, S. F. Modeling multipartite virus evolution: The genome formula facilitates rapid adaptation to heterogeneous environments. *Virus Evol* **6**, 1–13 (2020). Doi: 10.1093/VE/VEAA022.
21. Ormeño, J., Sepúlveda, P., Rojas, R. & Araya, J. E. Datura Genus Weeds as an Epidemiological Factor of *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), and *Potato virus Y* (PVY) on Solanaceus Crops. *Agricultura Técnica* **66**, 333–341 (2006). Doi: 10.4067/S0365-28072006000400001.
22. Moury, B. & Verdin, E. Viruses of Pepper Crops in the Mediterranean Basin. in *Advances in Virus Research* vol. 84 127–162 (2012). Doi: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00004-X.
23. Xu, H. & Nie, J. Identification, characterization, and molecular detection of Alfalfa mosaic virus in Potato. *Phytopathology* **96**, 1237–1242 (2006). Doi: 10.1094/PHYTO-96-1237.
24. Gao, Z., Pu, H., Liu, J., Wang, X., Zhong, C., Yue, N., ... & Zhang, Y. Tobacco necrosis virus-AC single coat protein amino acid substitutions determine host-specific systemic infections of *Nicotiana benthamiana* and soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **34**, 49–61 (2021). Doi: 10.1094/MPMI-07-20-0184-R.
25. Varanda, C. M. R. *et al.* A degenerate pair of primers for simultaneous detection of four alpha- and betanecroviruses. *J Virol Methods* **208**, 63–65 (2014). Doi: 10.1016/j.jviromet.2014.08.004.
26. Babaei, G., Massah, A. & Koochi Habibi, M. Efficient translation of *Eggplant mottled dwarf nucleorhabdovirus* N and X genes requires both 5' and 3' UTRs. *Virol J* **18**, 1–9 (2021). Doi: 10.1186/s12985-021-01601-4.
27. Fauquet, C. M. *et al.* Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* **153**, 783–821 (2008). Doi: 10.1007/s00705-008-0037-6.
28. Goth, R. W., Ellis, P. J., De Villiers, G., Goins, E. W. & Wright, N. S. Characteristics and distribution of *Potato latent carlavirus* (*Red LaSoda virus*) in North America. *Plant Dis* **83**, 751–753 (1999). Doi: 10.1094/PDIS.1999.83.8.751.
29. Kumar Tiwari, R., Kumar, R., Kaundal, P., Sharma, S. & Chakrabarti, S. Potato viruses and their diagnostic techniques: An overview. *J Pharmacogn Phytochem* **8**, 1932–1944 (2019).
30. Loebenstein, G., Berger, P. H., Brunt, A. A. & Lawson, R. H. *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes*. Springer Science & Business Media (Springer Netherlands, 2001). Doi:10.1007/978-94-007-0842-6.
31. Sastry, K. S., Mandal, B., Hammond, J., Scott, S. W. & Briddon, R. W. *Allium ampeloprasum* var. porrum (Leek). in *Encyclopedia of Plant Viruses and Viroids* 53–57 (Springer India, 2019). Doi:10.1007/978-81-322-3912-3_26.
32. Wang, F, Qi, S., Gao, Z., Akinyemi, I. A., Xu, D., & Zhou, B. Complete genome sequence of *Tobacco virus 1*, a Closterovirus from *Nicotiana tabacum*. *Arch Virol* **161**, 1087–1090 (2016). Doi: 10.1007/s00705-015-2739-x.
33. Fiallo-Olivé, E., Martínez-Zubiau, Y., Hernández-Zepeda, C., Carrillo-Trip, J. & Rivera-Bustamante, R. Identification of New Begomoviruses in Cuba Using Rolling Circle Amplification. *Rev Prot Veg* **24**, 81–86 (2009).

34. Wisler, G. C., Duffus, J. E., Liu, H. & Li, R. H. Ecology and Epidemiology of Whitefly - Transmitted Closteroviruses. *Plant Dis* **82**, 270–280 (1998).
35. Tungadi, T., Groen, S. C., Murphy, A. M., Pate, A. E., Iqbal, J., Bruce, T. J., Cunniffe, N. J. & Carr, J. P. *Cucumber mosaic virus* and its 2b protein alter emission of host volatile organic compounds but not aphid vector settling in Tobacco. *Virol J* **14**, 1–9 (2017). Doi: 10.1186/s12985-017-0754-0.
36. Tungadi, T., Donnelly, R., Qing, L., Iqbal, J., Murphy, A. M., Pate, A. E., Cunniffe, N. J. & Carr, J. P. *Cucumber mosaic virus* 2b proteins inhibit virus-induced aphid resistance in Tobacco. *Mol Plant Pathol* **21**, 250–257 (2019). Doi: 10.1111/mpp.12892.
37. Kameya-Iwaki, M., Murakami, K., Ito, S., Hanada, K. & Tanaka, S. Semipersistency of *Myzus persicae* Transmission of Cucumoviruses Systemically Infecting Leguminous Plants. *Journal of General Plant Pathology* **66**, 64–67 (2000). Doi: 10.1007/pl00012922.
38. Ferreiro, C., Ostrówka, K., López-Moya, J. J. & Díaz-Ruíz, J. R. Nucleotide sequence and symptom modulating analysis of a peanut stunt virus-associated satellite RNA from Poland: High level of sequence identity with the American PSV satellites. *Eur J Plant Pathol* **102**, 779–786 (1996). Doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114277.
39. Obrępańska-Stęplowska, A., Budziszewska, M., Wieczorek, P. & Czerwoniec, A. Analysis of two strains of *Peanut stunt virus*: SatRNA-associated and satRNA free. *Virus Genes* **44**, 513–521 (2012). Doi: 10.1007/s11262-012-0729-6.
40. Sharman, M., Thomas, J. E. & Persley, D. M. Natural host range, thrips and seed transmission of distinct *Tobacco streak virus* strains in Queensland, Australia. *Annals of Applied Biology* **167**, 197–207 (2015). Doi: 10.1111/aab.12218.
41. Pradeep, K. K., Satya, V. K., Selvapriya, M., Vijayasamundeeswari, A., Ladhakshmi, D., Paraniharan, V., Rabindran, R., Samiyappan, R., Balasubramanian, P. & Velazhahan, R. Engineering resistance against *Tobacco streak virus* (TSV) in sunflower and Tobacco using RNA interference. *Biol Plant* **56**, 735–741 (2012). Doi: 10.1007/s10535-012-0111-5.
42. Khalid, S., Zia-ur-Rehman, M., Hameed, U., Saeed, F., Khan, F., & Haider, M. S. Transmission specificity and coinfection of Mastrevirus with Begomovirus. *Int J Agric Biol* **19**, 105–113 (2017). Doi: 10.17957/IJAB/15.0249.
43. Ashraf, M. *et al.* Influence of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, alone and in combination with diatomaceous earth and thiamethoxam on mortality, progeny production, mycosis, and sporulation of the stored grain insect pests. *Environmental Science and Pollution Research* **24**, 28165–28174 (2017). Doi: 10.1007/s11356-017-0383-6.
44. Karapetsi, L., Chatzivassiliou, E. K., Katis, N. I. & Maliogka, V. I. *Artichoke yellow ringspot virus* as the causal agent of a new viral disease of lettuce: Epidemiology and molecular variability. *Plant Pathol* **70**, 594–603 (2021). Doi: 10.1111/ppa.13309.
45. Gallitelli, D., Mascia, T. & Martelli, G. P. *Viruses in Artichoke*. *Advances in Virus Research* vol. 84 (Elsevier Inc., 2012).
46. Zarzyńska-Nowak, A., Ferriol, I., Falk, B. W., Borodynko-Filas, N. & Hasiów-Jaroszewska, B. Construction of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated *Tomato black ring virus* infectious cDNA clones. *Virus Res* **230**, 59–62 (2017). Doi: 10.1016/j.virusres.2017.01.014.
47. Šneideris, D. & Staniulis, J. Phylogenetic analysis of *Lithuanian tomato black ring virus* isolates. *Zemdirbyste-Agriculture* **101**, 193–198 (2014). Doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114277.

48. Samuitienė, M., Zitikaitė, I., Navalinskienė, M. & Valiūnas, D. Identification of *Tomato ringspot nepo-virus* by RT-PCR. **4**, 35–38 (2021).
49. Renvoisé, J. P., Chambon, F., Gleize, M., Pradeilles, N., Garnier, S., & Rolland, M. Selection, optimization and characterization of molecular tests for the detection of *Tobacco ringspot virus* (TRSV). *EPPO Bulletin* **49**, 111–121 (2019). Doi: 10.1111/epp.12554.
50. Rowhani, A., Daubert, S. D., Uyemoto, J. K., Al Rwahnih, M. & Fuchs, M. Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management. in *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* 109–126 (2017). Doi:10.1007/978-3-319-57706-7.
51. Wang, R. Y., Kritzman, A., Hershman, D. E. & Ghabrial, S. A. *Aphis glycines* as a vector of persistently and nonpersistently transmitted viruses and potential risks for soybean and other crops. *Plant Dis* **90**, 920–926 (2006). Doi: 10.1094/PD-90-0920.
52. Huang, C. *et al.* Transcriptomic profile of Tobacco in response to *Tomato zonate spot orthotospovirus* infection. *Virol J* **14**, 1–11 (2017). Doi: 10.1186/s12985-017-0821-6
53. Zheng, X., Zhang, J., Chen, Y., Dong, J. & Zhang, Z. Effects of tomato zonate spot virus infection on the development and reproduction of its vector *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Florida Entomologist* **97**, 549–554 (2014). Doi: 10.1896/054.097.0228.
54. Wu, X., Wu, X., Li, W. & Cheng, X. Molecular characterization of a divergent strain of *Calla lily chlorotic spot virus* infecting cetulce (*Lactuca sativa* var. *augustana*) in China. *Arch Virol* **163**, 1375–1378 (2018). Doi: 10.1007/s00705-018-3743-8.
55. Kuo, Y. W., Gilbertson, R. L., Turini, T., Brennan, E. B., Smith, R. F., & Koike, S. T. Characterization and epidemiology of outbreaks of *Impatiens necrotic spot virus* on lettuce in Coastal California. *Plant Dis* **98**, 1050–1059 (2014). Doi: 10.1094/PDIS-07-13-0681-RE.
56. Martínez-Ochoa, N., Csinos, A. S., Whitty, E. B., Johnson, A. W. & Parrish, M. J. First Report on the Incidence of Mixed Infections of *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in Tobacco Grown in Georgia, South Carolina, and Virginia. *Plant Health Prog* **4**, 40 (2003). Doi: 10.1094/php-2003-0417-01-hn.
57. Zarzyńska-Nowak, A., Hasiów-Jaroszewska, B., Korbecka-Glinka, G., Przybyś, M. & Borodynko-Filas, N. A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of *Tomato spotted wilt virus* and *Tomato yellow ring virus* in tomato plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* **40**, 580–586 (2018). Doi: 10.1080/07060661.2018.1503195.
58. Tan, S. T., Liu, F., Lv, J., Liu, Q. L., Luo, H. M., Xu, Y., Ma, Y., Chen, X., Lan, P., Chen, H., Cao, M. & Li, F. *et al.* Identification of two novel poleroviruses and the occurrence of *Tobacco bushy top disease* causal agents in natural plants. *Sci Rep* **11**, 1–14 (2021). Doi: 10.1038/s41598-021-99320-x.
59. Mo, X. H., Chen, Z. B. & Chen, J. P. Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of *Tobacco vein distorting virus*. *Virus Genes* **41**, 425–431 (2010). Doi: 10.1007/s11262-010-0524-1.
60. Mo, X. H., Chen, Z. B. & Chen, J. P. Molecular identification and phylogenetic analysis of a viral RNA associated with the Chinese tobacco bushy top disease complex. *Annals of Applied Biology* **158**, 188–193 (2011). Doi: 10.1111/j.1744-7348.2010.00452.x.
61. Wang, Q., Mao, J. J., Xiang, H. Y., Dong, L. H., Sun, Y. H., Liu, G. S., & Liu, H. B. First report of *Brassica yellows virus* on Tobacco in China. *Plant Dis* **99**, 1192 (2015). Doi: 10.1094/PDIS-04-15-0426-PDN.

62. Wang, Q. Xu, F. Z., An, L. L., Xiang, H. Y., Zhang, W. H., Liu, G. S., & Liu, H. B. Molecular characterization of a new recombinant *Brassica yellows virus* infecting Tobacco in China. *Virus Genes* **55**, 253–256 (2019). Doi: 10.1007/s11262-019-01636-4.
63. Zuo, D. P., He, M. J., Chen, X. R., Hu, R. J., Zhao, T. Y., Zhang, X. Y., ... & Han, C. G. A simple method for the acquisition and transmission of *Brassica yellows virus* from transgenic plants and frozen infected leaves by aphids. *Plants* **10**, (2021). Doi: 10.3390/plants10091944.
64. Milošević, D., Ignjatov, M., Marjanović-Jeromela, A., Stanković, I., Nikolić, Z., Tamindžić, G., & Krstić, B. Molecular characterization of *Turnip yellows virus*- a new pathogen of mustard in Serbia. *Ratar.Povrt.* **56**, 82–87 (2019). Doi: 10.5937/ratpov56-23514.
65. Wang, F., Wu, Q. F., Zhou, B. G., Gao, Z. L. & Xu, D. F. First Report of *Turnip yellows virus* in Tobacco in China. *Plant Dis* **99**, 1870–1870 (2015). Doi: 10.1094/PDIS-04-15-0426-PDN
66. Alcaide, C., Rabadán, M. P., Juárez, M. & Gómez, P. Long-term cocirculation of two strains of *Pepino mosaic virus* in tomato crops and its effect on population genetic variability. *Phytopathology* **110**, 49–57 (2020). Doi: 10.1094/PHYTO-07-19-0247-FI.
67. Blystad, D. R., van der Vlugt, R., Alfaro-Fernández, A., del Carmen Córdoba, M., Bese, G., Hristova, D., Pospieszny, H., Mehle, N., Ravnikar, M., Tomassoli, L., Varveri, C. & Nielsen, S. L. Host range and symptomatology of *Pepino mosaic virus* strains occurring in Europe. *Eur J Plant Pathol* **143**, 43–56 (2015). Doi: 10.1007/s10658-015-0664-1.
68. Shipp, J. L., Buitenhuis, R., Stobbs, L., Wang, K., Kim, W. S., & Ferguson, G. Vectoring of *Pepino mosaic virus* by bumble-bees in tomato greenhouses. *Annals of Applied Biology* **153**, 149–155 (2008). Doi: 10.1111/j.1744-7348.2008.00245.x.
69. Noël, P., Hance, T. & Bragard, C. Transmission of the *Pepino mosaic virus* by whitefly. *Eur J Plant Pathol* **138**, 23–27 (2014). Doi: 10.1007/s10658-013-0313-5.
70. Khan, A., Tabassum, B., Nasir, I. A., Bilal, M., Tariq, M., & Husnain, T. *Potato virus X* from Pakistan: Coat protein sequence analysis. *J Anim Plant Sci* **25**, 1016–1021 (2015).
71. Verchot, J. *Potato virus X*: A global potato-infecting virus and type member of the Potexvirus genus. *Mol Plant Pathol* **23**, 315–320 (2022). Doi: 10.1111/mpp.13163.
72. Röder, J., Dickmeis, C. & Commandeur, U. Small, smaller, nano: New applications for potato virus X in nanotechnology. *Front Plant Sci* **10**, 158 (2019). Doi: 10.3389/fpls.2019.00158
73. Rao, S., Chen, X., Qiu, S., Peng, J., Zheng, H., Lu, Y., Wu, G., Chen, J., Jiang, W., Zhang, Y. & Yan, F. Identification of Two New Isolates of *Chilli veinal mottle virus* from different regions in China: Molecular diversity, Phylogenetic and Recombination Analysis. *Front Microbiol* **11**, 1–7 (2020). Doi: 10.3389/fmicb.2020.616171.
74. Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H. & Čeřovská, N. Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Photosynthetica* **41**, 357–363 (2003). Doi: 10.1111/pce.12752.
75. Ahmadvand, R., Takács, A., Taller, J., Wolf, I. & Polgár, Z. Potato viruses and resistance genes in potato. *Acta Agronomica Hungarica* **60**, 283–298 (2012). Doi: 10.1556/AAgr.60.2012.3.10.
76. Fox, A., Collins, L. E., Macarthur, R., Blackburn, L. F. & Northing, P. New aphid vectors and efficiency of transmission of *Potato virus A* and strains of *Potato virus Y* in the UK. *Plant Pathol* **66**, 325–335 (2017). Doi: 10.1111/ppa.12561.

77. Matsumoto, K., Yasaka, R., Setoyama, T., Kawano, S. & Ohshima, K. Chilli pepper rugose mosaic disease caused by *Pepper veinal mottle virus* occurs on Ishigaki Island, Japan. *Journal of General Plant Pathology* **82**, 57–60 (2016). Doi: 10.1007/s10327-015-0634-7.
78. Moury, B., Palloix, A., Caranta, C., Gognalons, P., Souche, S., Selassie, K. G. Serological, molecular, and pathotype diversity of *Pepper veinal mottle virus* and *Chili veinal mottle virus*. *Phytopathology* **95**, 227–232 (2005). Doi: 10.1094/PHYTO-95-0227.
79. Alegbejo, M. D. & Abo, M. E. Ecology, Epidemiology and Control of Pepper Veinal mottle virus (PVMV), Genus Potyvirus, in West Africa. *Journal of Sustainable Agriculture* **20**, 5–16 (2002). Doi: 10.1300/J064v20n02_03.
80. Fajinmi, A. A. *Pepper Veinal Mottle Virus*, a Potyvirus of pepper under tropical conditions. *International Journal of Vegetable Science* **19**, 150–156 (2013). Doi: 10.1080/19315260.2012.687439.
81. Mondal, S., Ghanim, M., Roberts, A. & Gray, S. M. Different potato virus Y strains frequently co-localize in single epidermal leaf cells and in the aphid stylet. *Journal of General Virology* **102**, 001576 (2021). Doi: 10.1099/jgv.0.001576.
82. Faurez, F., Baldwin, T., Tribodet, M. & Jacquot, E. Identification of new Potato virus Y (PVY) molecular determinants for the induction of vein necrosis in Tobacco. *Mol Plant Pathol* **13**, 948–959 (2012). Doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00803.x.
83. Ren, G., Wang, X. F., Chen, D., Wang, X. W., Fan, X. J., & Liu, X. D. Potato virus Y-infected Tobacco affects the growth, reproduction, and feeding behavior of a vector aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Appl Entomol Zool* **50**, 239–243 (2015). Doi: 10.1007/s13355-015-0328-9.
84. Kirchner, S. M., Döring, T. F., Hiltunen, L. H., Virtanen, E. & Valkonen, J. P. T. Information-theory-based model selection for determining the main vector and period of transmission of *Potato virus Y*. *Annals of Applied Biology* **159**, 414–427 (2011). Doi: 10.1111/j.1744-7348.2011.00501.x.
85. Pelletier, Y., Nie, X., Giguère, M. A., Nanayakkara, U., Maw, E., & Foottit, R. A new approach for the identification of aphid vectors (Hemiptera: Aphididae) of *Potato virus Y*. *J Econ Entomol* **105**, 1909–1914 (2012). Doi: 10.1603/EC12085.
86. Agudelo-Romero, P., de la Iglesia, F. & Elena, S. F. The pleiotropic cost of host-specialization in *Tobacco etch potyvirus*. *Infection, Genetics and Evolution* **8**, 806–814 (2008). Doi: 10.1016/j.mecgid.2008.07.010.
87. Ruiz-Ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., López-Abella, D., & López-Moya, J. J. Structural analysis of Tobacco etch potyvirus HC-Pro oligomers involved in aphid transmission. *J Virol* **79**, 3758–3765 (2005). Doi: 10.1128/JVI.79.6.3758-3765.2005.
88. Lai, R., You, M., Lotz, L. A. P. (Bert) & Vasseur, L. Response of green peach aphids and other arthropods to garlic intercropped with Tobacco. *Agron J* **103**, 856–863 (2011). Doi: 10.2134/agronj2010.0404.
89. Wei, S., He, X., Wang, D., Xiang, J., Yang, Y., Yuan, S., Shang, J. & Yang, H.. Genetic structure and variability of tobacco vein banding mosaic virus populations. *Arch Virol* **164**, 2459–2467 (2019). Doi: 10.1007/s00705-019-04342-6.
90. Zhang, C. L., Gao, R., Wang, J., Zhang, G. M., Li, X. D., & Liu, H. T. Molecular variability of *Tobacco vein banding mosaic virus* populations. *Virus Res* **158**, 188–198 (2011). Doi: 10.1016/j.virusres.2011.03.031.
91. Yu, X.-Q., Lan, Y. F., Wang, H. Y., Liu, J. L., Zhu, X. P., Valkonen, J. P., & Li, X. D. The complete genomic sequence of *Tobacco vein banding mosaic virus* and its similarities with other Potyviruses. *Virus Genes* **35**, 801–806 (2007). Doi: 10.1007/s11262-007-0135-7.

92. Gadhve, K. R., Saurabh, G., Rasmussen, D. A. & Srinivasan, R. Aphid transmission of Potyvirus : The largest plant-infecting RNA virus. *Viruses* **12**, 773 (2020). Doi: 10.3390/v12070773.
93. Salvador, B., Saenz, P., Yangüez, E., Quiot, J. B., Quiot, L., Delgadillo, M. O., García, J. & SIMÓN-MATEO, C. Host-specific effect of P1 exchange between two Potyviruses. *Mol Plant Pathol* **9**, 147–155 (2008). Doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00450.x.
94. Blawid, R., Rodrigues, K. B., de Moraes Rêgo, C., Inoue-Nagata, A. K. & Nagata, T. Complete genome sequence of Tobacco mosqueado virus. *Arch Virol* **161**, 2619–2622 (2016). Doi: 10.1007/s00705-016-2956-y.
95. Nasim, N. & Dey, N. Pararetroviruses: Plant Infecting dsDNA Viruses. *Plant Mol Biol Report* **40**, 106–118 (2022). Doi: 10.1007/s11105-021-01294-7.
96. Zhao, W., Wu, S., Du, L., Li, T., Cheng, Z., Zhou, Y., & Ji, Y. Development of a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV). *J Virol Methods* **298**, 114277 (2021). Doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114277.
97. El-Gendi, H., Al-Askar, A. A., Király, L., Samy, M. A., Moawad, H., & Abdelkhalek, A. Foliar applications of *Bacillus subtilis* HA1 culture filtrate enhance tomato growth and induce systemic resistance against *Tobacco mosaic virus* Infection. *Horticulturae* **8**, 1–21 (2022). Doi: 10.3390/horticulturae8040301.
98. Abo-Zaid, G. A., Matar, S. M. & Abdelkhalek, A. Induction of plant resistance against *Tobacco mosaic virus* using the biocontrol agent *Streptomyces cellulosa* isolate Actino 48. *Agronomy* **10**, 1620 (2020). Doi: 10.3390/agronomy10111620.
99. Ellis, M. D., Hoak, J. M., Ellis, B. W., Brown, J. A., Sit, T. L., Wilkinson, C. A., Reed, T. D. & Welbaum, G. E. Quantitative real-time PCR analysis of individual flue-cured tobacco seeds and seedlings reveals seed transmission of *Tobacco mosaic virus*. *Phytopathology* **110**, 194–205 (2020). Doi: 10.1094/PHYTO-06-19-0201-FI.
100. Ladipo, J. L., Koenig, R. & Lesemann, D. E. *Nigerian tobacco latent virus*: A new Tobamovirus from Tobacco in Nigeria. *Eur J Plant Pathol* **109**, 373–379 (2003). Doi: 10.1023/A:1023557723943.
101. Mojtahedi, H., Santo, G. S., Thomas, P. E., Crosslin, J. M. & Boydston, R. A. Eliminating *Tobacco rattle virus* from viruliferous *Paratrichodorus allius* and Establishing a New Virus-Vector Combination. *J Nematol* **34**, 66–9 (2002).
102. Otulak, K., Chouda, M., Chrzanowska, M. & Garbaczewska, G. Ultrastructural effects of infection caused by *Tobacco rattle virus* transmitted by *Trichodorus primitivus* in potato and tobacco tissues. *Canadian Journal of Plant Pathology* **34**, 126–138 (2012). Doi: 10.1080/07060661.2012.665387.
103. Otulak, K., Chouda, M., Bujarski, J. & Garbaczewska, G. The evidence of *Tobacco rattle virus* impact on host plant organelles ultrastructure. *Micron* **70**, 7–20 (2015). Doi: 10.1016/j.micron.2014.11.007.
104. Elmhirst, J. F. & Forge, T. A. Winter cover crops as reservoirs of *Tobacco rattle virus* (TRV) and hosts of root-lesion, root knot and stubby-root nematodes. *Canadian Journal of Plant Pathology* **43**, 631–640 (2021). Doi: 10.1080/07060661.2020.1867898.
105. Ribeiro, S., Kitajima, E., Oliveira, C. & Koenig, R. A Strain of *Eggplant mosaic virus* isolated from naturally infected tobacco plants in Brazil. *Plant Disease (USA)* vol. 80 446–449 Preprint at (1996).
106. Megias, E. *et al.* Chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana* infected by *Tomato blistering mosaic virus*. *Protein Journal* **37**, 290–299 (2018). Doi: 10.1007/s10930-018-9775-9.

107. Syller, J. Molecular and biological features of Umbraviruses, the unusual plant viruses lacking genetic information for a capsid protein. *Physiol Mol Plant Pathol* **63**, 35–46 (2003). Doi: 10.1016/j.pmpp.2003.08.004.
108. Zhang, J., Liu, X., Li, W., Zhang, J., Xiao, Z., Zhou, Z., Liu, T., Liu, Y., Wang, F., Zhang, S. & Yang, J. Rapid detection of *Milk vetch dwarf virus* by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* **261**, 147–152 (2018). Doi: 10.1016/j.jviromet.2018.08.012.
109. Yang, J. G., Wang, S. P., Liu, W., Li, Y., Shen, L. L., Qian, Y. M., Wang, F. L. & Du, Z. G. First report of *Milk vetch dwarf virus* associated with a disease of *Nicotiana tabacum* in China. *Plant Disease* vol. 100 Preprint at <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1295-PDN> (2016). Doi: 10.1094/PDIS-11-15-1295-PDN.
110. *Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies*. (2020).
111. Ding, X. S., Liu, J., Cheng, N. H., Folimonov, A., Hou, Y. M., Bao, Y., Katagi, C., Carter, S. A. & Nelson, R. S. *The Tobacco mosaic virus 126-kDa Protein Associated with Virus Replication and Movement Suppresses RNA Silencing*. / *583 MPMI* vol. 17 (2004). Doi: 10.1094/MPMI.2004.17.6.583.
112. Höller, K., Király, L., Künstler, A., Müller, M., Gullner, G., Fatteringer, M., & Zechmann, B. Enhanced glutathione metabolism is correlated with sulfur-induced resistance in Tobacco mosaic virus-infected genetically susceptible *Nicotiana tabacum* Plants. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1448–1459 (2010). Doi: 10.1094/MPMI.
113. Das, P. P., Lin, Q. & Wong, S. M. Comparative proteomics of *Tobacco mosaic virus*-infected *Nicotiana tabacum* plants identified major host proteins involved in photosystems and plant defence. *J Proteomics* **194**, 191–199 (2019). Doi: 10.1016/j.jprot.2018.11.018.
114. Wilhelmová, N., Procházková, D., Šindelářová, M. & Šindelář, L. Photosynthesis in leaves of *Nicotiana tabacum* L. infected with *Tobacco mosaic virus*. *PHOTOSYNTHETICA* vol. 43 (2005).
115. Liu, D., Zhao, Q., Cheng, Y., Li, D., Jiang, C., Cheng, L., Li, D., Jiang, C., Cheng, L., Wang, Y. & Yang, A. Transcriptome analysis of two cultivars of Tobacco in response to *Cucumber mosaic virus* infection. *Sci Rep* **9**, (2019). Doi: 10.1038/s41598-019-39734-w.
116. Lu, J., Du, Z. X., Kong, J., Chen, L. N., Qiu, Y. H., Li, G. F., Meng, X. H. & Zhu, S. F. Transcriptome Analysis of *Nicotiana tabacum* infected by *Cucumber mosaic virus* during systemic symptom development. *PLoS One* **7**, e43447 (2012). Doi: 10.1371/journal.pone.0043447.
117. Mochizuki, T. & Ohki, S. T. *Cucumber mosaic virus*: Viral genes as virulence determinants. *Mol Plant Pathol* **13**, 217–225 (2012). Doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00749.x.
118. Velasquez, N., Hossain, M. J. & Murphy, J. F. Differential disease symptoms and full-length genome sequence analysis for three strains of *Tobacco etch virus*. *Virus Genes* **50**, 442–449 (2015). Doi: 10.1007/s11262-014-1146-9.
119. Tribodet, M., Glais, L., Kerlan, C. & Jacquot, E. Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Journal of General Virology* **86**, 2101–2105 (2005). Doi: 10.1099/vir.0.80926-0.
120. Chen, S., Li, F., Liu, D., Jiang, C., Cui, L., Shen, L., Liu, G. & Yang, A. Dynamic expression analysis of early response genes induced by *Potato virus Y* in PVY-resistant *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Rep* **36**, 297–311 (2017). Doi: 10.1007/s00299-016-2080-1.
121. Synková, H., Semorádová, Š., Schnablová, R., Müller, K., Pospíšilová, J., Ryšlavá, H., Malbeck, J. & Čerovská, N. Effects of biotic stress caused by *Potato virus Y* on photosynthesis in *ipt* transgenic and control *Nicotiana tabacum* L. *Plant Science* **171**, 607–616 (2006). Doi: 10.1016/j.plantsci.2006.06.002.

122. Mayunga, D. S. & Kapooria, R. G. *Incidence and identification of virus diseases of Tobacco in three provinces of Zambia*. (2003). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. Report
123. Gonzalez-Jara, P., Tenllado, F., Martínez-García, B., Atencio, F. A., Barajas, D., Vargas, M., Diaz-Ruiz, J. & Díaz-Ruiz, J. R. Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with *Potato virus X*. *Mol Plant Pathol* **5**, 29–35 (2004). Doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00202.x.
124. Senanayake, D. M. J. B. & Mandal, B. Expression of symptoms, viral coat protein and silencing suppressor gene during mixed infection of a N–Wi strain of *Potato virus Y* and an asymptomatic strain of *Potato virus X*. *Virusdisease* **25**, 314–321 (2014). Doi: 10.1007/s13337-014-0204-1.
125. Sheng, Y., Yang, L., Li, C., Wang, Y. & Guo, H. Transcriptomic changes in *Nicotiana tabacum* leaves during mosaic virus infection. *3 Biotech* **9**, 1–13 (2019). Doi: 10.1007/s13205-019-1740-6.
126. Sarwar, M. *Mite (Acari Acarina) vectors involved in transmission of plant viruses*. *Applied Plant Virology* (INC, 2020). Doi:10.1016/b978-0-12-818654-1.00020-7.
127. Herrbach, E. & Chesnais, Q. *Vector transmission of plant viruses*. *Encyclopedia of Virology* vol. 3 (2021). Doi: 10.1016/b978-0-12-809633-8.21349-6.
128. Shi, X., Zhang, Z., Zhang, C., Zhou, X., Zhang, D., & Liu, Y. The molecular mechanism of efficient transmission of plant viruses in variable virus–vector–plant interactions. *Hortic Plant J* **7**, 501–508 (2021). Doi: 10.1016/j.hpj.2021.04.006.
129. Singh, S., Awasthi, L. P., Jangre, A. & Nirmalkar, V. K. *Transmission of plant viruses through soil-inhabiting nematode vectors*. *Applied Plant Virology* (INC, 2020). Doi:10.1016/b978-0-12-818654-1.00022-0.
130. Nie, X., Singh, M., Chen, D., Gilchrist, C., Soqrat, Y., Shukla, M., Creelman, A., Dickison, V., Nie, B., Lavoie, J. & Bisht, V. Development of High-Resolution DNA melting analysis for simultaneous detection of *Potato mop-top virus* and its vector *Spongospora subterranea*, in Soil. *Plant Dis* **105**, 948–957 (2021). Doi: 10.1094/PDIS-06-20-1321-RE.
131. Turan, V., Verma, S., Sharma, P., Katna, S. & Dev, B. Major vectors of the plant viruses: a review. *J Entomol Zool Stud* **8**, 1365–1370 (2020).
132. Whitfield, A. E., Falk, B. W. & Rotenberg, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* **479–480**, 278–289 (2015). Doi: 10.1016/j.virol.2015.03.026.
133. Ziegler-Graff, V. Molecular insights into host and vector manipulation by plant viruses. *Viruses* **12**, (2020). Doi: 10.3390/v12030263.
134. Pinheiro-Lima, B., Pereira-Carvalho, R. C., Alves-Freitas, D. M., Kitajima, E. W., Vidal, A. H., Lacorte, C., Godinho, M. T., Fontenele, R. S., Faria, J. C., Abreu, E. F. M., Varsani, A., Ribeiro, S. G. & Melo, F. L. Transmission of the Bean-Associated Cytorhabdovirus by the Whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1. *Viruses* **12**, (2020). Doi: 10.3390/v12091028.
135. Fereres, A. & Raccach, B. Plant virus transmission by insects. *eLS* 1–12 (2015) Doi: 10.1002/9780470015902.a0000760.pub3.
136. Fiallo-Olivé, E. & Navas-Castillo, J. *Tomato chlorosis virus*, an emergent plant virus still expanding its geographical and host ranges. *Mol Plant Pathol* **20**, 1307–1320 (2019). Doi: 10.1111/mpp.12847.
137. Asadhi, S., Padmavati, S., Visvavidyalayam, M., Yeturu, S. & Usha, R. Partial Characterization of Replicase Gene of *Tobacco streak ilarvirus* in Onion (*Allium cepa*.L). *Article in International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* (2015).
138. Gaafar, Y. Z. A. *et al.* *Caraway yellows virus*, a novel Nepovirus from *Carum carvi*. *Virol J* **16**, 4–9 (2019). Doi: 10.1186/s12985-019-1181.

139. Dietzgen, R. G., Mann, K. S. & Johnson, K. N. Plant virus-insect vector interactions: Current and potential future research directions. *Viruses* **8**, 1–21 (2016). Doi: 10.3390/v8110303.
140. Güneş, N., Türkseven, S. G., Özşari, pınar, Gümüş, mustafa & Baysal Sivritepe, D. Incidence and possible sources of *Tomato spotted wilt virus* in Tobacco grown in Denizli Province, Turkey. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca* **50**, 12529 (2022). Doi: 10.15835/nbha50212529.
141. Gunay, A. & Usta, M. *First investigation of five Tobacco viruses using PCR based methods in tobacco plants grown in Adiyaman, Turkey.* (2020). Report.
142. Ding, M., Yang, C., Zhang, L., Jiang, Z. L., Fang, Q., Qin, X. Y., & Zhang, Z. K. Occurrence of *Chilli veinal mottle virus* in *Nicotiana tabacum* in Yunnan, China. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0686> **95**, 357 (2011).
143. Khateri, H., Moarrefzadeh, N., Koochi-Habibi, M., Mosahebi, G., Hosseini, A., & Hamzeh, N. High incidence of *Tobacco streak virus* in the tobacco fields of Iran. *Commun Agric Appl Biol Sci* **71**, 1213–1216 (2006).
144. Delić, D., D., Balech, B., Radulović, M., Đurić, Z., Lolić, B., Santamaria, M., & Đurić, G. Molecular identification of *Tomato spotted wilt virus* on pepper and Tobacco in Republic of Srpska (Bosnia and Herzegovina). *Eur J Plant Pathol* **150**, 785–789 (2018). Doi: 10.1007/s10658-017-1313-7.
145. Chatzivassiliou, E. K., Efthimiou, K., Drossos, E., Papadopoulou, A., Poimenidis, G., & Katis, N. I. A survey of tobacco viruses in tobacco crops and native flora in Greece. *Eur J Plant Pathol* **110**, 1011–1023 (2004). Doi: 10.1007/s10658-004-1598-1.
146. Kumlachew, A. Detection of diseases, identification and diversity of viruses: A Review. *J Biol Agric Healthc* **5**, 204–214 (2015).
147. Rubio, L., Galipienso, L. & Ferriol, I. Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution. *Front Plant Sci* **11**, 1092 (2020). Doi: 10.3389/fpls.2020.01092.
148. Fang, Y. & Ramasamy, R. P. Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors (Basel)* **5**, 537–561 (2015). Doi: 0.3390/bios5030537.
149. Mehetre, G. T. *et al.* Current developments and challenges in plant viral diagnostics: A systematic review. *Viruses* **13**, 1–31 (2021). Doi: 0.3390/bios5030537.
150. Bhat, A. I. & Rao, G. P. Polymerase Chain Reaction. in *Characterization of Plant Viruses, Springer Protocols Handbooks* 323–346 (2020). Doi:10.1007/978-1-0716-0334-5_7.
151. Serçe, Ç. U. & Ayyaz, M. Diagnosis of the casual viruses of crop plants. in *Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies* 55–67 (2020). Doi:10.1016/B978-0-12-818654-1.00004-9.
152. Kumar, R., Kaundal, P., Tiwari, R. K., Lal, M. K., Kumari, H., Kumar, R., Chandra Naga, K., Kumar, A., Singh, B., Sagar, V. & Sharma, S. Development of Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA): A methodology for quick diagnosis of Potato leafroll viral disease in potato. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 2511 **24**, 2511 (2023). Doi: 10.3390/ijms24032511.
153. Pallás, V., Sánchez-Navarro, J. A. & James, D. Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids. *Front Microbiol* **9**, 1–11 (2018). Doi: 10.3389/fmicb.2018.02087.
154. Letschert, B., Adam, G., Lesemann, D. E., Willingmann, P. & Heinze, C. Detection and differentiation of serologically cross-reacting Tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *J Virol Methods* **106**, 1–10 (2002). Doi: 10.1016/S0166-0934(02)00135-0.

155. Liu, F., Tan, G., Li, X., Chen, H., Li, R., & Li, F. Simultaneous detection of four causal agents of Tobacco bushy top disease by a multiplex one-step RT-PCR. *J Virol Methods* **205**, 99–103 (2014). Doi: 10.1016/j.jviromet.2014.05.003.
156. Chalam, V. C., Sharma, V. D., Sharma, R. & Maurya, A. K. Modern technologies for the diagnosis and assay of plants viruses. in *Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies* 69–77 (INC, 2020). Doi:10.1016/B978-0-12-818654-1.00005-0.
157. Lee, H. J., Cho, I. S., Ju, H. J. & Jeong, R. D. Rapid and visual detection of *Tomato spotted wilt virus* using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips. *Mol Cell Probes* **57**, 1–4 (2021). Doi: 10.1016/j.mcp.2021.101727.
158. Rasni, W. H. N. W., Yahaya, N. & Mohamed Rehan, M. Recombinase polymerase amplification and their application in phytopathogen detection. *Malaysian Journal of Science Health & Technology* **8**, 14–24 (2022). Doi: 10.33102/2022254.
159. Panno, S., Matic, S., Tiberini, A., Caruso, A. G., Bella, P., Torta, L., Stassi, R. & Davino, S. Loop mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology. *Plants* **9**, 1–28 (2020). Doi: 10.3390/plants9040461.
160. Soroka, M., Wasowicz, B. & Rymaszewska, A. Loop-mediated isothermal amplification (Lamp): The better sibling of PCR? *Cells* **10**, (2021). Doi: 10.3390/cells10081931.
161. Budziszewska, M., Wieczorek, P. & Obrepalska-Stepłowska, A. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of *Tomato torrado virus*. *Arch Virol* **161**, 1359–1364 (2016). Doi: 10.1007/s00705-016-2774-2.
162. Zhang, C., Liu, S., Li, X., Zhang, R. & Li, J. Virus-Induced Gene Editing and Its Applications in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms231810202> (2022).
163. Kalinina, N. O., Khromov, A., Love, A. J. & Taliansky, M. E. CRISPR applications in plant virology: Virus resistance and beyond. *Phytopathology* **110**, 18–28 (2020). Doi: 10.1094/PHYTO-07-19-0267-IA.
164. Mahas, A., Hassan, N., Aman, R., Marsic, T., Wang, Q., Ali, Z., & Mahfouz, M. M. Lamp-coupled CRISPR–CAS12a module for rapid and sensitive detection of plant DNA viruses. *Viruses* **13**, (2021). Doi: 10.3390/v13030466.
165. Rott, M., Xiang, Y., Boyes, I., Belton, M., Saeed, H., Kesanakurti, P., Hayes, S., Lawrence, T., Birch, C., Bhagwat, B. & Rast, H. Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. *Plant Dis* **101**, 1489–1499 (2017). Doi: 10.1094/PDIS-03-17-0306-RE
166. Adams, I. & Fox, A. Diagnosis of Plant Viruses Using Next- Generation Sequencing and Metagenomic Analysis. in *Current Research Topics in Plant Virology* 323–335 (2016). Doi:10.1007/978-3-319-32919-2.
167. Barba, M., Czosnek, H. & Hadidi, A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* **6**, 106–136 (2014). Doi: 10.3390/v6010106.
168. Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., & Ravnkar, M. Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: Comparison of two approaches. *Front Microbiol* **8**, 1–10 (2017). Doi: 10.3389/FMICB.2017.01998/FULL.
169. Pappas, N. *et al.* Virus Bioinformatics. in *Encyclopedia of Virology* 124–132 (Elsevier, 2021). Doi:10.1016/b978-0-12-814515-9.00034-5.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Ganchozo-Mendoza, E., Flores, F.J., Garcés-Fiallos, F.R. Virosis en el cultivo de tabaco. *Revis Bionatura* 2023; 8 (4) 30. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.30>

Additional information Correspondence should be addressed to felipe.garces@utm.edu.ec

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Diversity and enzymatic activity of some fungi isolated from agricultural soil

Nemat A. Muhsen^{1*} and Mustafa A. Al-Dossary¹

¹University of Basrah, College of Science, Department of Ecology

*Corresponding author: email: mustafa.najem@uobasrah.edu.iq

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.31>

ABSTRACT

Fungi are one of the most important groups of microorganisms in the environment, and due to their ability to produce several types of enzymes, they play an essential role in the environment. During this study, fourteen species of fungi were isolated from fifteen soil samples collected from several agricultural areas in Basrah Governorate, southern Iraq, and their enzymatic activity was tested for four extracellular enzymes (cellulase C, laccase La, lipase Lp, and manganese peroxidase Mp) on specific solid media. The isolated fungi showed good enzymatic activity, in which 12 fungal species can secrete manganese peroxidase, 11 can secrete cellulase, 9 can secrete lipase, and five can secrete laccase enzyme. *Aspergillus candidus* and *A. versicolor* showed a positive detection for all enzymes, *Cladosporium* showed positive detection for C, Lp, and Mp, while *Mucor sp.* showed negative detection for all enzymes.

Keywords: Enzymatic activity, Fungal diversity, soil.

INTRODUCTION

Fungi play an essential role in the decomposition process of organic substances by enzyme secretion, such as (cellulase, laccase, lipase, and manganese peroxidase). The microbes need to produce an extracellular enzyme to convert polymeric compounds such as cellulose, lignin, starch, pectin, and other components into smaller molecules that can be assimilated easily ¹.

Many researchers have tended to exploit these compounds to produce simple saccharides of industrial importance, such as biofuel production, beverage, confectionery, textile, and leather. They are also used in the biological treatment of organic and inorganic pollutants using the enzymes produced by fungi. There are different types of fungal enzymes involved in this process, such as cellulase enzyme, which is capable of decomposing cellulose into glucose ²; the laccase enzyme can break the lignin that gives the wood its added firmness additionally, it breaks down aromatic hydrocarbon molecules ³, lipase enzyme stimulates several chemical reactions for the hydrolysis of fats, which are crucial components of agricultural and oil waste ⁴, and manganese peroxidase enzyme which is secreted mainly by white rot fungi and play a dynamic role in the polymerization and depolymerization of lignin and the oxidation of phenolic and non-phenolic compounds ⁵. The degradation of all organic and agricultural substances depends on the presence or the absence of enzymes secreted by the microorganisms and the strength of the enzymes themselves ⁶. These extracellular enzyme systems secreted into their surrounding environment allow the fungi to grow on various natural and artificial

substrates, where they break down a variety of substrates into small molecules that may be taken up and digested by their cells⁷.

The present study investigated the diversity of fungi in some agricultural soil and evaluated their ability to secrete cellulase, lipase, laccase and manganese peroxidase enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Sampling sites

Fifteen soil samples were collected from various agricultural locations in the Basrah Governorate. These areas include Abu Al-Kasib, Garmah Ali and Alqurna. These locations have different plant types ranging from date palms to vegetables. 250 g of agricultural soil was taken from the soil each time. Each sample was taken from other locations and mixed to form one homogenized sample.

Isolation and identification of fungi

Dilution plate method⁸, was used to isolate fungi from fifteen soil samples collected from various agricultural locations in the Basrah Governorate, in which 10 g of soil were diluted in 90 ml Distilled water to make a dilution of 10⁻¹. Potato dextrose agar medium (PDA) supplemented with 250 mg/l chloramphenicol antibiotic was used for the cultivation and isolation of fungi from the diluted soil samples; it was prepared according to the direction of the manufacturing company (Hi-Media, India). The cultures were incubated at 25 °C and examined first after 3-4 days from incubation to see the fungal hyphae, and they were further set for one to two weeks.

The isolated fungi were first tested under the dissecting microscope. Then, slides were prepared from the isolated fungi and stained with lactophenol cotton blue dye to see the microscopic features of each fungal isolate under the compound microscope. The isolated fungi were identified according to the following^{9, 10, 11, 12, 13}.

The percentage of occurrence for the isolated fungi was recorded according to the following equation:

$$\text{Occurrence \%} = \frac{\text{Number of samples in which the genus or species appeared}}{\text{Total number of samples}} \times 100 \quad (1)$$

Evaluation of the enzymatic activities of the isolated fungi

The enzymatic activity was evaluated using special media; pure cultures from all fungal isolates were first activated on a PDA medium for one week at 25 °C. Then, a disk was taken by a cork borer 5 mm from the edge of each fungal isolate and used to inoculate the center of the media to study the enzymatic activity for each enzyme as follows.

Cellulase enzyme

Carboxymethyl cellulose medium (CMC) was used to evaluate the ability of the isolated fungi to secrete cellulase enzyme; this medium contained g/l: 1g K₂PO₄, 0.5g KCL, 2g NaNO₃, 0.5g MgSO₄ · 7H₂O, 2g carboxy methyl cellulose, 20g agar and 1L distilled water¹⁴. After 3-7 days of incubation at 25 °C, the plates were flooded with 0.2% aqueous Congo red solution and distained with 1M NaCl for 15 minutes. The

appearance of yellow areas around the fungal colony indicates positive activity; otherwise, the red medium shows harmful activity.¹

Lipase enzyme

Peptone agar medium was used to evaluate the ability of the isolated fungi to secrete lipase enzyme; the composition of this medium was g/l: 10g peptone, 5g NaCl, 0.1g CaCl₂·H₂O, 20g agar and 1L distilled water; pH6.0 supplemented with 1% Tween 20 separately sterilized by filtration using Millipore filter paper 0.45 μm and added to the medium. After seven days of incubation at 25 °C it was observed that some fungal isolates formed visible precipitation around the colony due to the formation of calcium salts of the lauric acid liberated by the enzyme, which indicated positive lipase activity of the fungi, while others didn't form any precipitation which means hostile activity¹.

Laccase enzyme

The ability of fungi to secrete laccase enzyme was evaluated by using Glucose yeast extract peptone agar medium containing g/l: 20g glucose, 5g yeast extract, 10g peptone, 20g agar and 1L distilled water and supplemented with 0.05g α-naphthol, pH 6.0. After seven days of incubation at 25 °C, it was observed that only the fungal isolate, which has a positive ability to secrete laccase enzyme, turns the colorless medium into dark due to the oxidation of α-naphthol by laccase enzyme¹.

Manganese peroxidase enzyme

The ability of fungi to secrete manganese peroxidase enzyme was evaluated by using Czapek-dox agar medium, which was prepared according to the direction of the manufacturing company (Hi-Media, India), and then supplemented with phenol red dye at a concentration of 0.0025%. After seven days of incubation at 25 °C, it was observed that some fungal isolates turned the color of the medium from red to yellow, which indicates a positive reaction, and the isolate can secrete manganese peroxidase enzyme; otherwise, red medium indicates negative activity¹⁵.

Statistical analysis

The ANOVA analysis was used by applying Minitab ver.16 to statistically analyze the results of the fungal enzymatic activity. The mean was tested using the least significant difference RLSD test under the probability level 0.01.

RESULTS AND DISCUSSION

Fungal identification

Fourteen isolates were counted from fifteen agricultural soil samples (table 1). These belong to 8 fungal genera in addition to sterile mycelia. Thirteen species from them, with 92.85 % percentage of occurrence, belonged to ascomycota either in their anamorphic state with 12 species or with its teleomorphic state with only one species, *Chaetomium sp.* in the second place came the zygomycota with only one species *Mucor sp.* and 7.1 % percentage of occurrence.

The appearance of the ascomycetes fungi with their anamorphic state in high percentage was due to their ability to produce many reproductive units. This allows them to spread quickly in the environment. Also, they can secrete different types of enzymes, enabling them to use other materials in the environment for growth. Besides, they can tolerate the stress in the atmosphere; these features allow them to be one of the most widespread groups of fungi in the environment^{16, 17, 18, 19}.

The number of isolated fungi in this study seems to be low compared to the other studies; this may be due to the high temperatures during the time of sample collection, which may reach 50 °C, which negatively affects the growth of fungi in the environment. In general, the differences in the percentages of appearance of fungal genera may be due to their ability to tolerate and adapt to extreme conditions, their adaptation to a wide range of temperatures and their ability to secrete different types of enzymes that enable them to decompose various materials and exploit them as a source of energy and growth, in addition to their ability to produce a large number of reproductive units which enable them to spread in the environment ²⁰.

The percentage of occurrence of species ranged from 7.1%, like *Alternaria sp.* and *Bipolaris sp.*, to 57.1 % in *Aspergillus niger*; most of the isolated species belonged to the genus *Aspergillus* with 7 species. This genus has high enzymatic activity and produces large quantities of reproductive units, which enable its species to adapt very well to their environment. It can grow and widely spread in the environment ¹².

This result is consistent with other studies in which the Ascomycetes and the genus *Aspergillus* represent the most isolated fungi ^{21,22,23, 24}.

No.	Fungal species	% of occurrence	No.	Fungal species	% of occurrence
1	<i>Alternaria sp.</i>	7.1	9	<i>Bipolaris sp.</i>	7.1
2	<i>Aspergillus candidus</i>	21.4	10	<i>Chaetomium sp.</i>	7.1
3	<i>A. flavus</i>	35.7	11	<i>Cladosporium sp.</i>	7.1
4	<i>A. fumigatus</i>	14.2	12	<i>Fusarium sp.</i>	14.2
5	<i>A. niger</i>	57.1	13	<i>Macrophomina sp.</i>	7.1
6	<i>A. terreus</i>	21.4	14	<i>Mucor sp.</i>	21.4
7	<i>A. versicolor</i>	21.4	15	Sterile mycelia	21.4
8	<i>Aspergillus sp.</i>	21.4			

Table 1. The isolated fungi with their percentage of occurrence

Enzymatic activity

The enzymatic activity of 14 fungal species isolated from agricultural soil was evaluated to study their ability to secrete cellulase, laccase, lipase and manganese peroxidase enzymes.

However, there is an evident variation between the different fungal isolates in terms of their enzymatic abilities; the results showed that there were significant differences between the other fungal species in their enzymatic activity, whether between the species belonging to one genus or between species of different genera in terms of the number of enzymes that each fungus was able to secrete and the quantity of its secretion. The isolates showed diverse levels of enzymatic activity, and this may be due to the enzymatic capacity that differs from one species to another according to its adaptation to the environment in which it lives and the inherent enzymatic activity of each fungus, in fact, in the atmosphere each fungal species possesses an enzymatic capacity that distinguishes it from other. ^{1, 25}

The results showed that the tested fungi could secrete from one to four different types of examined enzymes except the *Mucor sp.*, which was unable to secrete any enzymes. In comparison, the species *Aspergillus candidus* and *A. versicolor* were able to secrete all four types of enzymes but in varying ability.

In general, when some species appear to have a negative result, this doesn't mean they don't have any enzymatic activity. It may refer to either it producing an enzyme but doesn't liberate from the hyphae or it produces and liberates. Still, the medium limits enzyme secretion; therefore, the negative results do not represent an absolute confirmation of the species' inability to make the specific enzyme²⁶.

Most of the studied fungi were able to secrete manganese peroxidase enzyme, and 12 species of fungi were able to secrete it, but with different capabilities; it gave a positive reaction by changing the color of the medium from red to yellow due to the transformation of phenol aromatic ring. The significant change in color of the media refers to the greater secretion of this enzyme by the fungus with different capabilities of secretion rates from low as in *Alternaria sp.*, to high secretion as in *Aspergillus candidus* (Table 2, Fig.1).

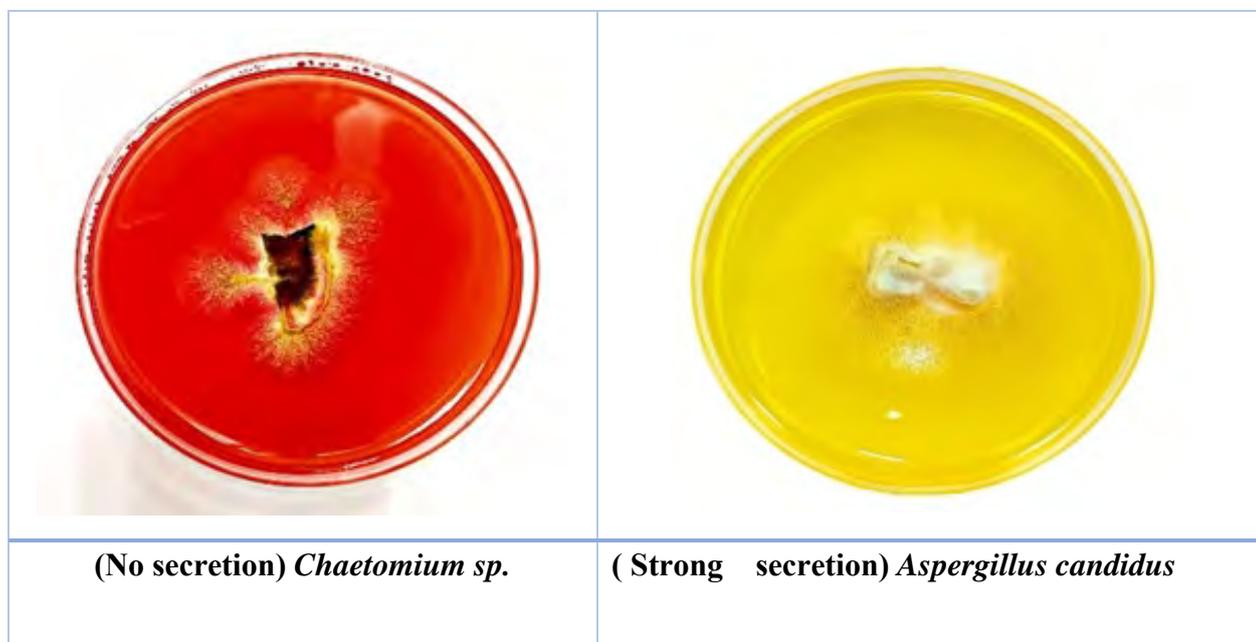


Figure 1. The ability of some fungi to secrete manganese peroxidase

The fungi that can secrete this enzyme are distinguished by their ability to decompose complex pollutants and convert them into substances used as a source of energy and carbon²⁵.

Numerous fungi possess the manganese peroxidase enzyme, a part of the ligninolytic, extracellular enzymatic system primarily responsible for degrading lignin. It can also degrade organic pollutants and is a commonly used enzyme in converting toxic environmental contaminants into less toxic ones. Therefore, the manganese peroxidase enzyme plays an essential role in the biological activity of fungi due to its ecological importance and fungi that can secrete this enzyme are distinguished by their ability to decompose complex pollutants and convert them into substances used as a source of energy and carbon²⁷. This result is consistent with the study of²⁸, who has found that most of his fungal isolates could secrete this enzyme.

No.	Fungal species	MnP enzyme activity	No.	Fungal species	MnP enzyme activity
1	<i>Aspergillus candidus</i>	+++	8	<i>A. fumigatus</i>	+
2	<i>A. flavus</i>	+++	9	<i>A. versicolor</i>	+
3	<i>A. terreus</i>	+++	10	<i>Bipolaris sp.</i>	+
4	<i>A. niger</i>	+++	11	<i>Macrophomina sp.</i>	+
5	<i>Aspergillus sp.</i>	+++	12	<i>Alternaria sp.</i>	+
6	<i>Cladosporium sp.</i>	++	13	<i>Chaetomium sp.</i>	-
7	<i>Fusarium sp.</i>	++	14	<i>Mucor sp.</i>	-

- No color change, + Simple color change, ++ Medium color change, +++ Strong color change

Table 2. Fungal enzymatic activity for manganese peroxidase enzyme

The cellulase enzyme came in second place, with 11 fungal species reacting positively by forming a yellow halo around the fungal colony due to the degradation of complex carbohydrates into simple sugars.

The widest halo refers to the ability of fungi to secrete the enzyme. The rat secretion rates went from low, as in *Macrophomina sp.*, to high secretion, as in *Cladosporium sp.* (Table 3, Fig.2). The results of statistical analysis showed significant differences ($P<0.01$) between the tested fungi in their ability to produce cellulase enzyme. A large number of microorganisms are involved in the degradation of cellulose.

However, the cellulase enzyme plays a significant role in the biological activity of fungi, and they are still one of the most essential microorganisms in cellulose degradation. It has an extracellular enzyme system that breaks down cellulose into glucose that dissolves in water and can be used as a source of energy. So, it's played an essential role in decomposing plant waste, in which cellulose forms approximately 94%²⁹. This result agrees with the study of 30, which showed nineteen species of fungi to grow on a cellulose medium.

No.	Fungal species	Cellulase enzyme activity	No.	Fungal species	Cellulase enzyme activity
1	<i>Cladosporium sp.</i>	+++	8	<i>Alternaria sp.</i>	+
2	<i>Aspergillus candidus</i>	+++	9	<i>Chaetomium sp.</i>	+
3	<i>A. terreus</i>	+++	10	<i>A. niger</i>	+/-
4	<i>Aspergillus sp.</i>	+++	11	<i>Macrophomina sp.</i>	+/-
5	<i>A. fumigatus</i>	+++	12	<i>Bipolaris sp.</i>	-
6	<i>A. versicolor</i>	+++	13	<i>Fusarium sp.</i>	-
7	<i>A. flavus</i>	++	14	<i>Mucor sp.</i>	-
RLSD = 1.6679					

-	0 mm.	No secretion
+/-	3-1 mm.	Weakly secretion
+	5-3 mm.	Medium secretion

++	8-5 mm.	Good secretion
+++	11-8 mm.	Strong secretion

Table 3. Fungal enzymatic activity for cellulase enzyme

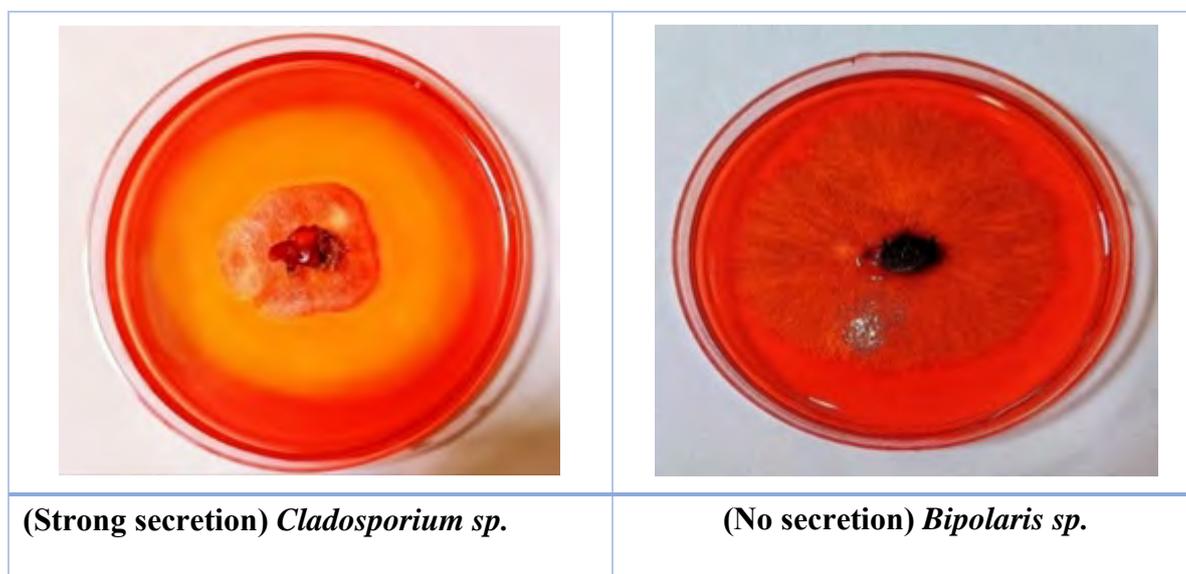


Figure 2. The ability of some fungi to secrete cellulase enzyme

The lipase enzyme came in the third level, in which nine fungal species achieved excellent efficiency in the secretion of this enzyme by forming a transparent halo around the fungal colony due to the formation of a white precipitate or white crystals.

The ability to produce lipase enzyme appears with different capabilities of secretion rates from low as in *Chaetomium sp.*, to high secretion, as in *Cladosporium sp.* (Table 4, Fig.3). The results of statistical analysis showed significant differences ($P < 0.01$) between the tested fungi in their ability to produce lipase enzyme. Several studies indicate the fungal ability isolated from agricultural soil to produce lipase enzymes like 28, 32. And many fungi can secrete this enzyme, and this may be because lipase is a fatty substance found in grains and agricultural materials and can be used by fungi easily as a nutritional source for growth, which contributed to the increase in the number of fungi that were able to produce this enzyme, soils may also contain fatty substances in the organic content of the soil, and microorganisms including fungi, have an important role in the degradation of fatty substances through the secretion of extracellular lipase enzyme ³¹.

No.	Fungal species	lipase enzyme activity	No.	Fungal species	Lipase enzyme activity
1	<i>Cladosporium sp.</i>	+++	8	<i>A. candidus</i>	+
2	<i>Aspregillus fumigatus</i>	+++	9	<i>Chaetomium sp.</i>	+
3	<i>A. versicolor</i>	+++	10	<i>A. niger</i>	-

4	<i>A. flavus</i>	+++	11	<i>A. terreus</i>	–
5	<i>Alternaria sp.</i>	+++	12	<i>Bipolaris sp.</i>	–
6	<i>Fusarium sp.</i>	+++	13	<i>Macrophomina sp.</i>	–
7	<i>Aspergillus sp.</i>	++	14	<i>Mucor sp.</i>	–
RLSD = 1.3818					

-	0 mm.	No secretion
+–	3-1 mm.	Weakly secretion
+	5-3 mm.	Medium secretion
++	8-5 mm.	Good secretion
+++	11-8 mm.	Strong secretion

Table 4. Fungal enzymatic activity for lipase enzyme

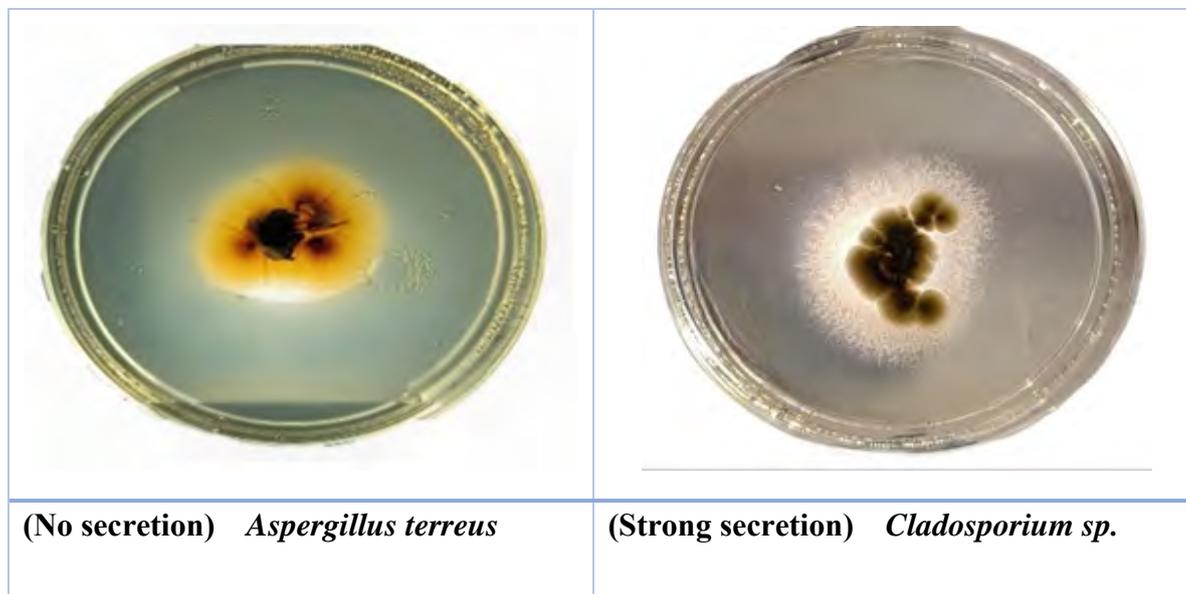


Figure 3. The ability of some fungi to secrete lipase enzyme

No.	Fungal species	laccase enzyme activity	No.	Fungal species	laccase enzyme activity
1	<i>Aspergillus candidus</i>	+++	8	<i>Alternaria sp.</i>	–
2	<i>A. terreus</i>	+++	9	<i>A. fumigatus</i>	–
3	<i>A. versicolor</i>	++	10	<i>A. niger</i>	–
4	<i>Chaetomium sp.</i>	++	11	<i>Cladosporium sp.</i>	–
5	<i>A. flavus</i>	+ _–	12	<i>Bipolaris sp.</i>	–
6	<i>Fusarium sp.</i>	–	13	<i>Macrophomina sp.</i>	–
7	<i>Aspergillus sp.</i>	–	14	<i>Mucor sp.</i>	–

RLSD = 1.2116

-	0 mm.	No secretion
+/-	3-1 mm.	Weakly secretion
+	5-3 mm.	Medium secretion
++	8-5 mm.	Good secretion
+++	11-8 mm.	Strong secretion

Table 5. Fungal enzymatic activity for laccase enzyme

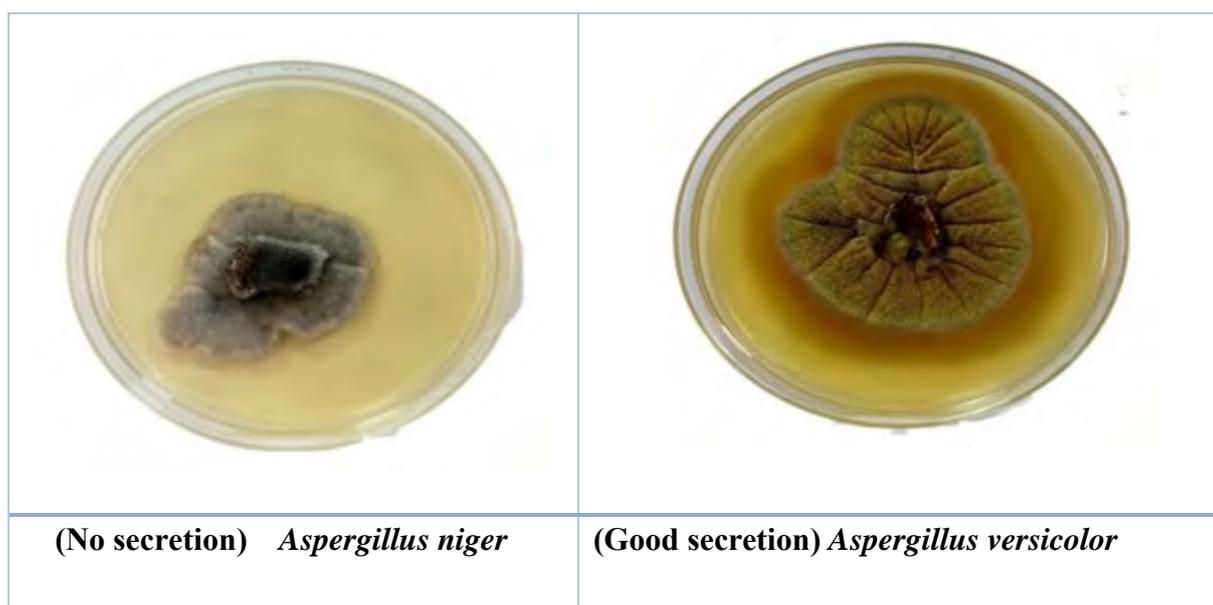


Figure 4. The ability of some fungi to secrete the Laccase enzyme

Five isolates only secrete the laccase enzyme; *Aspergillus candidus* and *A. terreus* fungi had the best secretion for this enzyme, while the other three fungi produced it in very small or medium quantities Table 5, Fig. 4. The results of statistical analysis showed significant differences ($P < 0.01$) between the tested fungi in their ability to produce laccase enzyme.

The laccase enzyme plays a key role in the degradation of pollutants in the environment due to the activity of free radicals during the oxidation of aromatic compounds, phenolic compounds and amines, and this enzyme is used in biotechnology applications as a biocatalyst and basidiomycetes are the best in its secretion³³. In recent years, some studies have shown that some anamorphic fungi could secrete this enzyme, which may be due to the mutations resulting from the nature of the environment in which the fungi live³⁴.

This is consistent with the findings of³⁵, which found that very few fungi can secrete this enzyme in his study. It also agreed with the study of 22, which found only five species of fungi can secrete laccase enzyme.

CONCLUSIONS

In conclusion, the study found that the ascomycetes fungi, particularly the genus *Aspergillus*, were the most isolated in the agricultural soil samples. These fungi have high enzymatic activity and the ability to secrete many reproductive units, allowing them to adapt well to their environment and spread widely. Additionally, the study showed that the tested fungi had varying abilities to secrete different types of enzymes, with the manganese peroxidase enzyme being the most commonly secreted, followed by cellulase, lipase, and laccase enzymes. These enzymes play important roles in the environmental degradation of pollutants and organic materials.

Conflicts of Interest: “The authors declare no conflict of interest.”

REFERENCES

1. Sunitha VH, Nirmala Devi D, Srinivas C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World J. Agric. Sci.* (2013); 9(1): 1-9.
2. Pascual AR, Martín ME. Cellulose. *Intech Open.* (2019); 22- 92.
3. Sun K, Li S, Si Y, Huang Q. Advances in laccase-triggered anabolism for biotechnology applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* (2021); 41(7): 969-993.
4. Kavitha K, Shankari K, Meenambiga S S. A review on extraction of lipase from *Aspergillus* Species and its applications. *RJPT.* (2021); 14(8):4471-4475.
5. Chowdhary P, Shukla G, Raj G, Ferreira LFR, Bharagava R N. Microbial manganese peroxidase: a ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research. *SN Appl. Sci.* (2019);1: 1-12.
6. Akhtar N, Mannan M A U. Mycoremediation expunging environmental pollutants. *Biotechnol. Rep.* (2020); 26: e00452.
7. Benguenab A, Chibani A. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by filamentous fungi (*Aspergillus ustus* and *Purpureocillium lilacinum*) isolated from used engine oil contaminated soil. *Acta Ecol. Sin.* (2021); 41(5): 416-423.
8. Wicklow D T, Whittingham W F. Soil microfungus changes among the profiles of disturbed conifer-hardwood forests. *Ecol.* (1974); 55(1): 3-16.
9. Raper K, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Sec. ed. Robert Krieger Pybl. New York. (1973): 686 pp.
10. De Hoog G S, Guarro J. Atlas of clinical fungi. CBS Netherland and university at Rovira Virgili. Spain. (1995): 720pp.
11. Sakagami Y, Watanabe R, Aoyama C, Matsunaga S, Higaki N, Fujimura K. The intelligent ASIMO: System overview and integration. *IROS.* September 2002; (3): 2478-2483.
12. Sheifert K, Jones G M, Games W, Kendrick B. The genera of hyphomycetes in Netherland. CBS-KNAW fungal biodiversity center Utrecht. 2011; pp. 485.
13. Guarro J, Gene J, Stachigel AM, Figueras J. Atlas of soil Ascomycetes in Netherland. CBS-KNAW fungal biodiversity center Utrecht. (2012); 997pp.
14. Ileri N, Hamadi B I, Wanjiru W, Kachiru R. Characterization, enzymatic activity and secondary metabolites of fungal isolates from lake Sonachi in Kenya. *J. Pharm. Biol. Sci.* (2015); 0(2):65-76.

15. Ali M I, Khalil N M, El-Ghany M N A. Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus*. *Afr. J. Microbiol. Res.* (2022); 6(16): 3783-3790.
16. Laich F, Vaca I, Chavez R. *Rhodotorula portillonensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from Antarctic shallow-water marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2013); 63(Pt_10): 3884-3891.
17. Al-Saadoon A H, Al-Dossary M N. Fungi from submerged plant debris in aquatic habitats in Iraq. *Int. J. Biodivers. Conserv.* (2014); 6(6): 468-487.
18. Alrumman S A, Standing D B, Paton G I. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *J. King Saud Univ. Sci.* (2015); 27(1): 31-41.
19. Altaee M S, Al-Dossary M A A. Evaluation of the enzymatic activity of some fungi isolated from plastic contaminated soils and their LDPE biodegradation ability. *MRS Bull.* (2021); 16(2).
20. Taylor D L, Sinsabaugh R L. The soil fungi: occurrence, phylogeny, and ecology. *Soil microbiology, Biochem. Syst. Ecol.* (2015);4: 77-109.
21. Al-Saadoon A H, Al-Dossary M A. Some fungi isolated from submerged plant debris in southern Iraq. *MRS Bull.* (2010);5(2): 207-221.
22. Ali F T, Al-Dossary M A W. Study for the enzymatic activity of some fungi isolated from agricultural soil. *MRS Bull.* (2019);14(1).
23. Al-Dossary M A W, Dahir A A. Bioethanol production from corn and barley wastes by *Aspergillus flavus*. *MRS Bull.* (2023);18(1).
24. Al-hamdani R R, Al-Dossary M A. Investigation the Degradation Capabilities of Fungal Isolate from Water and Sediment Samples to Congo Red Dye. *Asian J. Environ. Sci.*(2023);16(2).
25. Patil M G, Pagare J, Patil S N, Sidhu A K. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungi isolated from various medicinal plants. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* (2015); 4(3): 1035-1042.
26. Jaiboon K, Lertwattanasakul N, Limtong P, Limtong S. Yeasts from peat in a tropical peat swamp forest in Thailand and their ability to produce ethanol, indole-3-acetic acid and extracellular enzymes. *Mycol. Prog.* (2016);15: 755-770.
27. Usha K Y, Praveen K, Reddy B R. Enhanced production of ligninolytic enzymes by a mushroom *Stereum ostrea*. *Biotechnol. Res. Int.* 2014.
28. Steudler S, Werner A, Walther T. It is the mix that matters: Substrate-specific enzyme production from filamentous fungi and bacteria through solid-state fermentation. *Solid State Fermentation: Int. j. Eng. Res. Appl.* (2019); 51-81.
29. Maruyama C R, Bilesky-José N, de Lima R, Fraceto L F. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. *Front. Bioeng. Biotechnol.* (2020); 8: 225.
30. Jumaah E M, Al-Saadoon A H, Al-Dossary M A. Enzymatic activity of some fungi isolated from submerged plant parts in aquatic habitats southern Iraq. *MRS Bull.* (2020); 15(2).
31. Bellaouchi R, Abouloifa H, Rokni Y, Hasnaoui A, Ghabbour N, Hakkou A, Asehraou A. Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. *JGEB.* (2021); 19(1): 1-8.
32. Sopalan K, Iamtham S. Isolation and screening of extracellular enzymatic activity of endophytic fungi isolated from Thai orchids. *S. Afr. J. Bot.* (2020); 134: 273-279.
33. Benitez S F, Sadañoski M A, Velázquez J E, Zapata P D, Fonseca M I. Comparative study of single cultures and a consortium of white rot fungi for polychlorinated biphenyls treatment. *J. Appl. Microbiol.* (2021); 131(4): 1775-1786.

34. Han M, Yang J, Ma J, Wang C, Chen S, Xu M, An Q. Extracellular laccase activity among *Ganoderma* and *Coriolopsis* species grown on lignocellulosic wastes. *Bioresour. Technol.* (2022); 17(3):5049.
35. Shah H, Yusof F, Alam M Z. A new technique to estimate percentage decolorization of synthetic dyes on solid media by extracellular laccase from white-rot fungus. *J. biorem. biodegrad.* (2023); 27(1): 66-74.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Muhsen N A, Al-Dossary M A. Diversity and enzymatic activity of some fungi isolated from agricultural soil. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 31. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.31>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Evaluation of Calretinin and enumeration of mast cells in rectum tissue biopsies of Hirschsprung and non-Hirschsprung disease in neonate and infant

Rusul A. Abdul Hussein^{1*}, Sahar A. H. AL-Sharqi², Nada K. Mehdi³ and Ali E. Joda^{4,5}

^{1,2} Department of Biology, College of Science, Mustansiriyah University, Baghdad/Iraq

³ Histopathology Specialist, Central Child Teaching Hospital, Baghdad, Iraq.

⁴ Pediatrics department, College of Medicine, Mustansiriyah University, Baghdad/Iraq

⁵ Consultant pediatric surgeon, Central Child Teaching Hospital, Baghdad, Iraq

* Corresponding Author: Rusul A. Abdul Hussein, Email: rusul_abass@yahoo.com

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.32>

ABSTRACT

The Hirschsprung disease (HD) is a complex genetic congenital condition characterized by the absence of ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses of the colon and rectum, leading to functional intestinal obstruction. A study was conducted from July 2022 to December 2022. The Toluidine blue stain and calretinin immunohistochemistry were applied to 36 cases of neonates and infants who clinically presented with symptoms suspicious of having HD, And the hematological study of cell blood counts test and compared the result of the HD group with the non-HD group and control group. The study showed an increase in mast cell numbers in the rectal biopsy tissue of HD patients compared with non-HD patients using Toluidine blue stain. The Immunohistochemistry for calretinin result displayed 27 (75%) cases as HD, while the remaining 9 (25%) cases were confirmed as non-HD and showed hypertrophied nerve fiber in HD cases. at the same time, the complete blood count result was unrelated to HD. Some worrying maternal risk factors were highlighted during pregnancy were the age of the mother at conception, maternal illness, intake of drugs, type of Childbirth, and number of previous maternal abortions; all of them show a non-significant difference between the HD group and non-HD group, also consanguineous marriage was detected and shows a significant difference between the HD group and non-HD group.

Keywords: Hirschsprung, Calretinin, Toluidine blue, CBC count

INTRODUCTION

The Hirschsprung disease (HD) is a complex genetic congenital condition. The Latin name for HD is megacolon congenitum^{1,2}. According to reports, HD has a 4:1 male-to-female ratio and impacts 1 case out of every 5,000 live births globally^{3,4}. The gold standard for diagnosing HD is a rectal biopsy⁵. If a patient's clinical symptoms (failure to pass meconium, abdominal distension, constipation) and radiological findings raise suspicion of HD, the Rectal suction biopsy is obtained⁶. Calretinin is calcium signaling that involves a binding protein⁷, found in enteric neurons that project into the mucosal and submucosal layers of the gut. This protein might be used as a marker for aganglionosis in HD; it is a crucial component of how cells function and is expressed by the CALB2 gene⁸. Mast cells (MCs) are immune cells that migrate from the bone marrow and perform their primary functions in various peripheral tissues⁹. The proximity of MCs to nerve fibers, the possibility that they play a physiological role in nerve fiber growth and repair, and the fact that they produce, store, and release the nerve growth factor necessary for the growth and repair of nerve fibers all point suggest that MCs are to blame for the hyperplasia and hypertrophy of adrenergic and cholinergic nerve fibers, which are typical HD symptoms. However, the precise function of MCs in HD is still unknown. MCs can be seen thanks to the Toluidine Blue (TB) stain. The part mast cells play in HD has recently attracted much attention¹⁰. Because most specialist doctors find it challenging to diagnose HD, and the different methods of diagnosis depend on clinical signs and radiological examinations.

The study aims to establish a scientific basis for diagnosing the disease based on the Evaluation of Histopathological and Immunohistochemical (IHC) changes that occur in the layers of the colon, with

detecting changes that occur in blood cells and collecting, analyzing, and studying data, to specify diagnosis fundamentals.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The study included the histopathological, hematological, and IHC examination of 36 cases suspected of having HD. The ages of cases ranged between (1day-1year) for both sexes, 9 females and 27 males; the sample was obtained from the Central Teaching Hospital for Children and teaching laboratories at the Medical City Hospital in Baghdad from July 2022 to December 2022 .All participants agreed to provide the investigator with the specimens. The College of Science, Mustansiriyah University's ethics committee approved this work. According to the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all participants (Ref. No.: BCSMU/0622/0012Z Appendix-1).

Collection and preparation of the rectum tissue specimens

The tissue specimens were obtained from the rectum of 36 neonates and infants (27 male and 9 female) who clinically presented with symptoms suspicious of having HD after being diagnosed by specialized doctors, the cases were rectal punch biopsies as shown in Figure (1), the tissue samples were maintained in the fixative solution (formalin 10%) for histopathological study.

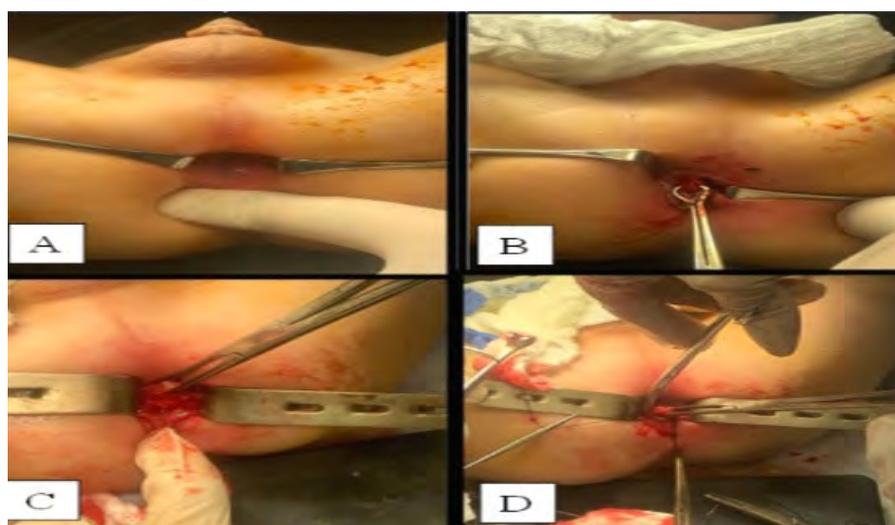


Figure 1. Image of cases in which patients showed stages of obtaining a biopsy from the rectum.

Tissue samples from the rectal biopsy were prepared for histological study using Suvara¹¹. Each tissue sample was cut into small fragments about 2- 3 cm long before fixation in a buffered isotonic solution of 10% formaldehyde for 24 hours. Each biopsy was processed for the dehydration process, which was by passing them through progressive concentrations of ethanol alcohol. They were cleared by passing them through two steps of xylene. Then, tissues were infiltrated with paraffin wax and were embedded in a metal template, and after that, the paraffin blocks were sectioned by rotary microtome into sections 5 μ in thickness. After staining with TB for MC examination, the slides were examined using a light microscope.

Enumeration of Mast Cells in the Tissue

After sections were stained with TB, the grading of MCs in rectal tissue was done using the following method of Amerada *et al.*¹²: - /+: No cells or few; +: 10 cells seen per 10 high power fields; ++: Clusters of more than

10 cells seen per 10 high power fields; +++: > 10 clusters seen in 10 per high power fields. The results were analyzed after grading.

Immunohistochemical study of Calretinin

The IHC stain for Calretinin was conducted in cases that included 36 formalin-fixed, paraffin-embedded rectal incisional biopsies from neonate and infant patients. IHC of Calretinin was graded as A total absence of staining (negative) or presence of brown staining (positive) according to the method of Leica Company from Germany.

Collection of Blood Samples

From the 36 patients and 20 controls, about 3 ml of venous blood was collected from a suitable vein and withdrawn from the cases using 3 ml disposable syringes.

The blood (3 ml) was then collected in a tube containing ethylene diamine tetra acidic acid (EDTA) as an anticoagulant with a slow mix for a hematological investigation.

Some Complete Blood Count (CBC)

In this test, 3 ml of the non-hemolyzed blood is anti-coagulated with EDTA at the collection and was examined by using an automated system Sysmex XP300 hematology analyzer, which is a computerized, highly specialized machine that counts the number of total WBCs and different types of cells such as neutrophil, lymphocyte, RBCs, HCT, and platelets in a blood sample.

Statistical analysis Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 21 is used to interpret the data. The information is given as a mean, standard deviation, and ranges. Frequencies and percentages are used to display categorical data. ANOVA was used to compare the tested mean Data expressed as mean \pm SD. Values of $p > 0.05$ were considered statically non-significant, while $p \leq 0.05$ considered significant results.

RESULTS AND DISCUSSION

Enumeration of mast cells in the rectal biopsy tissue

Enumeration of MCs in the rectal biopsies tissue of non-HD and HD cases by using a TB special stain, table (1) represents the MCs for each HD case and non-HD case, which is divided into four categories that are (Occasional cells, Few natural cells, Moderate number cells, and clumps). In the HD case, the highest grade registered for a Moderate number of cells, while the lowest was for Occasional cells. In contrast, in the non-HD case, the highest grade was reported for Occasional cells, while the lowest was for a Moderate number of cells. That could be because MC is observed in significant amounts in the digestive tract.

Grade	Non-HD No. of case	Non-HD No. of case %	HD No. of case	HD No. of case %
- /+: Occasional cells	5	55.56	3	11.11
+: Few natural cells	3	33.33	6	22.22
++: Moderate number cells	1	11.11	11	40.74
+++ : Clumps	0	0.00	7	25.93
Total	9	100	27	100

Table 1. Enumeration of mast cells in the rectal biopsies tissue of non-HD and HD cases

Results are expressed as percentage - /+: No cells or few; +: 10 cells seen per 10 high power fields; ++: Clusters of more than 10 cells seen per 10 high power fields; +++: > 10 clusters seen in 10 per high power fields In this study mast cells were seen in the submucosa and showed clump of mast cell in the muscular layer (Figure 2).

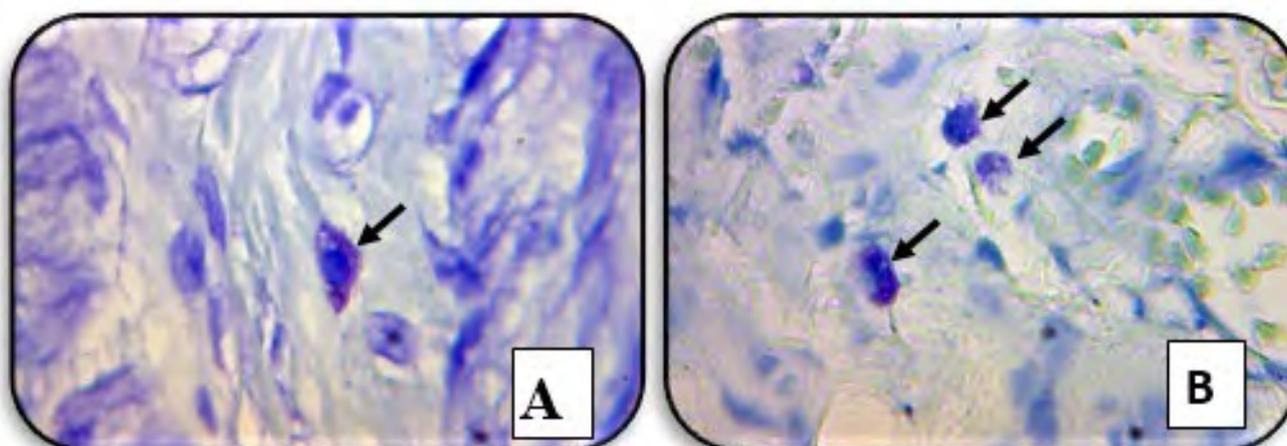


Figure 2. A cross-section of the patient's rectal biopsy tissue showed (A) a mast cell in the submucosa. (B) a clump of mast cells in the muscular layer (black arrows) (TB staining, X40).

Recently, there has been a lot of interest in the role of MCs in HD, where TB stain highlights MCs, according to ¹³. Their description of the transmural distribution of these cells in HD cases, particularly around nerve fibers and perivascular, is consistent with the findings of our study. This may be because MCs secrete a wide range of biologically active substances. MC synthesizes, stores, and releases nerve growth factor, essential for nerve fiber growth and repair ¹⁴. A similar finding was mentioned by ¹⁵. This could result from the MCs potentially having a significant impact on the regeneration and differentiation of the intestinal neural system. MCs are more prevalent in HD patients ¹⁶. However, Hermanowicz ¹⁷ carried out a study that found no statistically significant difference existed between the number of MCs in the submucosa of the HD group compared to the number of MCs in the other investigations and when comparing the mean number of MCs in the submucosa of the non-HD group in their study with a mean number of MCs in earlier ¹⁶. This study proved that the number of MCs in the submucosa of HD and non-HD groups did not differ statistically significantly. It may be caused by the MC's reaction to allergens or pathogenic pathogens rather than by their relationship with aganglionosis ^{15,18}. Other gastrointestinal conditions like acute appendicitis, ulcerative colitis, celiac disease, and gluten enteropathy have also been linked to an increase in MCs. In the case of suspected HD, this poses a problem for interpreting a rectal biopsy ¹⁹. However, one study done by ²⁰ reported an increase in MCs in the mucosa of HD but no statistically significant change in the number of MCs in the submucosa, muscularis propria, and serosa; it has been discovered that numerous inflammatory illnesses at this site are connected with an increase in MCs, which are near arteries and peripheral nerves, which may be because the MCs are primarily present in the gastrointestinal tract ²¹. Given that many of our patients have several comorbid conditions, this may be explained by the rising number of Mcs, which may not necessarily be related to HD but may instead be caused by these conditions.²²

Immunohistochemistry of Calretinin

Calretinin IHC was applied to all 36 studied cases, and 27 (75%) of the cases were identified as HD, while the remaining 9 (25%) cases were identified as non-HD Table (2). Figure (3) showed positive expression in the testis as (positive control) of IHC staining of Calretinin.

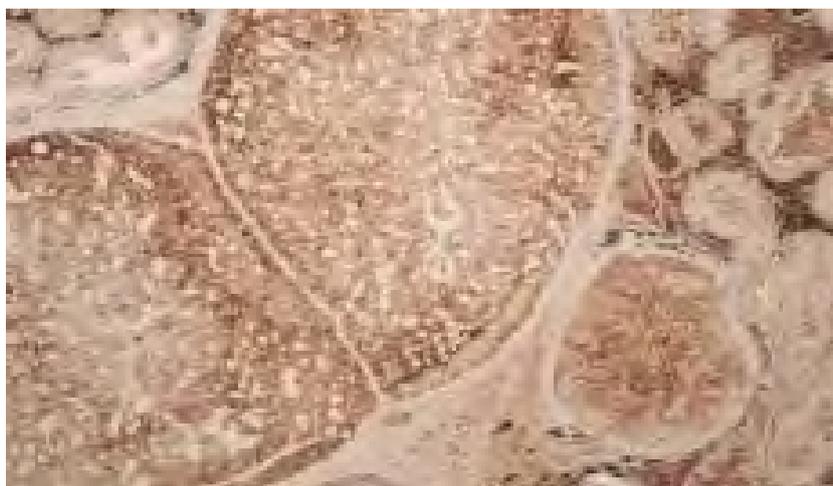


Figure 3. The immunohistochemical staining method detected Calretinin in the testis as (positive control), showing positive expression (X10).

Expression Calretinin	HD (No.)	HD (%)	Non-HD (No.)	Non-HD (%)
Negative	27	100	0	100
Positive	0	0	9	0
Total	27		9	

HD: Hirschsprung disease. Results are expressed as a percentage.

Table 2. Expression of Calretinin in the non-HD and HD cases.

The IHC for Calretinin was applied to all 36 cases after the application of Calretinin IHC; out of 36 cases, 27 (75%) cases were confirmed as HD while the remaining 9 (25%) cases were confirmed as non-HD; hence, all suspicious HD cases had been confirmed and categorized in HD and non-HD. In our study, strong calretinin immunoreactivity was observed in all ganglionic segments (non-HD cases), figure (4), showing positive expression between the two muscularis layers and positive expression in the submucosa layer.

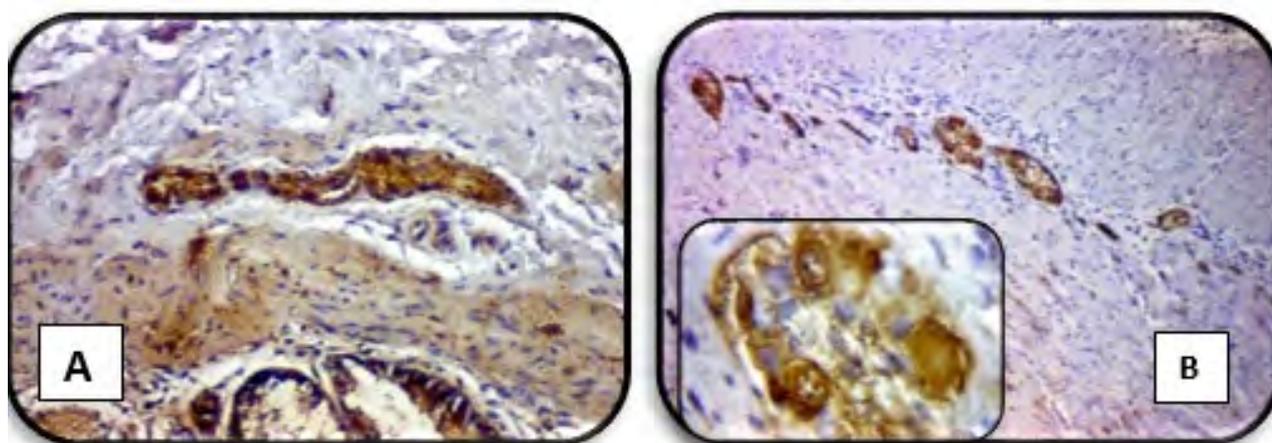


Figure 4. Immunohistochemical staining method detection of Calretinin in the rectal biopsies of non-HD case (A) showing positive expression between the two layers of muscularis (B) showing positive expression in the submucosa (Large figure: X10, small figure: X40)

Whereas any immunoreactivity was not observed in almost all aganglionic segments (HD cases), (Figure 5) shows a negative expression of Calretinin in the two layers of the muscularis layer while showing a complete absence of staining expression of Calretinin in the mucosa and submucosa layers.

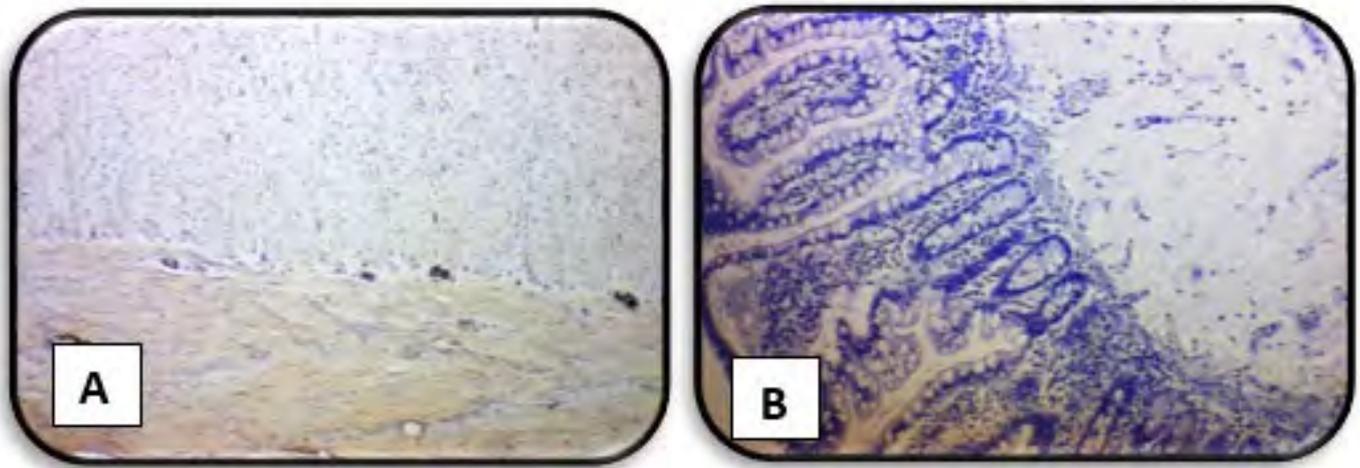


Figure 5. Immunohistochemical staining method detection of Calretinin in the rectal biopsies of HD case (A) showing negative expression of Calretinin in the two layers of muscularis layer (B) showing negative expression of Calretinin in the mucosa and submucosa layers (X4)

For HD to be pathologically diagnosed, the colonic neural plexus must be devoid of ganglion cells. Identifying tiny immature ganglion cells is made more accessible by IHC labeling of Calretinin, which causes strong ganglia staining²³. IHC expression in this study found that the calretinin IHC approach is less complicated to use, easier to interpret, and requires fewer serial sections of the microscopic rectal biopsy to detect and identify small immature ganglion cells²⁴. Aganglionic and ganglionic regions differed significantly from one another. Using Calretinin it was successful in detecting the presence of ganglia. The current results showed that Calretinin IHC has good diagnostic value and that Calretinin is an extremely valuable, sensitive, and specific marker for detecting aganglionosis in patients who are believed to have HD²⁵. This outcome is consistent with the research by²⁶. Barshack *et al.* were the first authors to report that expression of Calretinin was not observed in aganglionic areas in HD, but it was kept in ganglionic areas. They also concluded that aganglionic segments showed negative calretinin expression while positive in all rectal biopsies with ganglionic cells. Various research has reported that Calretinin is a good marker in displaying ganglia in HD, as Musa ZA *et al.* in Iraq revealed in 2017²³, Calretinin is a perfect and trustworthy diagnostic aid to histological examination of HD, where claimed sensitivity and specificity are 100%.

Various research have reported that Calretinin is a good marker for displaying HD ganglia. The presence of hypertrophic submucosal nerve bundles is a beneficial positive finding because HD is diagnosed based on the absence of a histological characteristic, namely the ganglion cells²⁴. many large nerves are usually present in Submucosal nerve hypertrophy, shown in the aganglionic rectal submucosa of a patient with HD cases in (Figure 6).

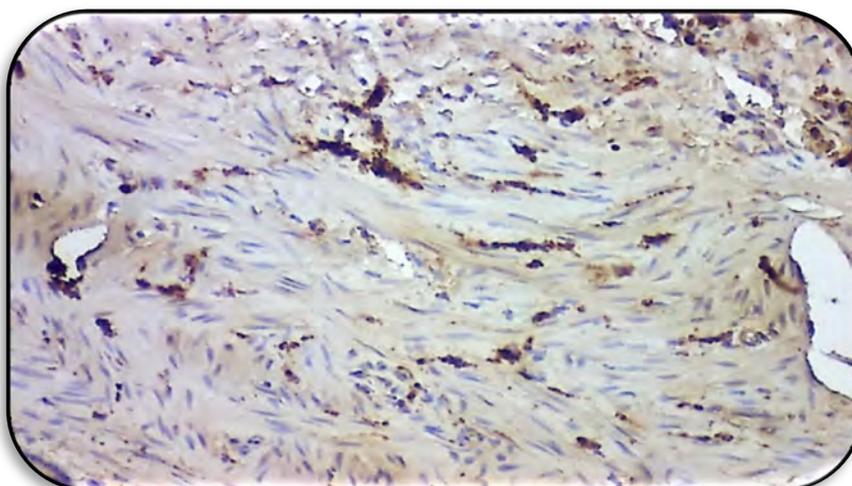


Figure 6. The immunohistochemical staining method detection of Calretinin in the rectal biopsies of the HD case showed hypertrophied nerve fiber (brown color) and no ganglion cells in the submucosa layers (X10).

According to ²⁷, aberrant nerves and aganglionosis are linked to hypertrophied submucosal nerve trunks. Nine (32.1%) of the 28 patients in their study who lacked ganglionic cells had hypertrophied nerve trunks. The diagnosis can be made without additional testing in a state where no ganglion cells are seen, and overt submucosal nerve hypertrophy is present. Unfortunately, some biopsies lack this unmistakable diagnostic evidence or exhibit aberrant traits that require further investigation. The presence of hypertrophic submucosal nerve bundles is a beneficial positive finding for HD because HD is diagnosed based on the absence of a histological characteristic, namely the GCs²⁴. When GCs are absent, the affected part of the colon cannot contract and relax in a coordinated manner. As a response, the nerve fibers present in the affected part of the colon increase in size and number. This increase, known as hypertrophy, is a compensatory mechanism. The purpose is to circumvent the dysfunctional or missing GCs and stimulate the contraction of the intestinal muscles.

The Hematological Study

Our study is the first to address the complete blood cell (CBC) count in HD and compare HD patients with non-HD patients and control, as shown in (table 3).

Test type cell/ml	Control group No. (20)	HD patients group No. (27)	Non-HD patients group No. (9)	p-value
WBC total	7.29 ± 0.34	11.54 ± 1.00	14.29 ± 2.08	0.001
Neutrophils	5.12 ± 0.42	4.58 ± 1.03	4.84 ± 2.68	NSIG
Lymphocyte	2.66 ± 0.17	2.38 ± 0.76	2.20 ± 0.87	NSIG
MONO	0.86 ± 0.03	0.95 ± 0.33	2.18 ± 0.21	0.05
EOS	0.17 ± 0.11	0.05 ± 0.02	0.15 ± 0.07	0.01
BASO	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	NSIG
RBC	4.62 ± 0,09	4.18 ± 0,16	5,23 ±0,24	NSIG
HCT	39.61 ± 1,29	38.54 ± 1,43	40.32 ± 2,68	NSIG
HGB	12.84±0.33	11.65±0.48	13.69±1.11	NSIG
Platelets	295.90±18.29	427.37± 30.14	368.33±36.32	0.001

Table 3. CBC counts in HD, non-HD and control cases.

The result above showed a significant difference ($p < 0.05$) in Mean \pm SE of WBC total, platelets, eosinophil and monocyte between HD patients, non-HD patients and the control group. Meanwhile, the results of neutrophil, lymphocyte, basophil, RBC, and HGB revealed no significant difference between HD patients, non-HD, and control groups. CBC test is usually obtained to ensure the preoperative hematocrit and platelet count are suitable for surgery²⁸. In most cases, values were within the reference ranges. Usually, it is a standard or nonspecific finding, but the surgeon specialist completes a blood cell (CBC) count if enterocolitis is suspected. Elevating the white blood cell (WBC) count or a pandemic should raise concern for enterocolitis²⁹. According to disease stage, patient condition, and complications of HD, our results find Leukocytosis; the current findings generally agree with earlier research that demonstrated a substantial difference in WBC total, the primary blood indication of overall inflammation^{30,31}. The result also showed a significant difference ($p < 0.05$) in Mean \pm SE of blood eosinophil and monocyte percentage. The multifunctional leukocytes known as eosinophils are crucial to the beginning and controlling inflammation³², and increases in monocytes indicate that the body is working to combat certain diseases³³.³³ High circulating monocyte levels are thought to facilitate the fast migration of many cells into damaged tissues in response to inflammatory signals³⁴. Monocytes rapidly undergo phenotypic cell changes as they enter peripheral tissue after migrating from the circulation³⁵. According to the current finding, HD patients' platelet counts significantly increased ($p > 0.05$) compared to a non-HD group. In addition to their critical functions in hemostasis and thrombosis, platelets also play key roles in microbial host defense, wound healing, and angiogenesis³⁶, and their involvement in inflammatory pathways, which has been shown in several studies, as well as their involvement in inflammatory illnesses.³⁷³⁸ The 39 found a cute inflammatory disorders, chronic infections, and inflammatory diseases, such as connective tissue disorders and inflammatory bowel disease, both result in changes in platelet indices. As a consequence of the disease coupled with enterocolitis, failure to diagnose early HD can also result in iron deficiency anemia, hypoproteinemia, and hypoalbuminemia due to protein-losing enteropathy; this may also be the cause of the change in CBC⁴⁰. Additionally, viral diseases like rotavirus and cytomegalovirus can cause hematological changes⁴¹ In extremely few instances, intractable anemia may be detected on a patient's CBC as one of HD's clinical symptoms⁴², consistent with the recent findings. While the results of lymphocytes, neutrophils, basophils, RBC count, HGB, and HCT in the blood did not differ significantly ($p > 0.05$) between HD patients, non-HD patients, and the control group, it was clear that the disease had no impact on these cells because there was no change in their counts.

Prenatal causes

In a recent study, some worrying maternal risk factors were highlighted during pregnancy were the age of the mother at conception, shown in Table (4), maternal illness, intake of drugs, type of Childbirth, and number of previous maternal abortions, all of them offer a non-significant difference ($p > 0.05$) between the HD group and non-HD group. Still, consanguineous marriage was detected and showed a significant difference ($p < 0.05$) between the HD group and non-HD group shown in table (5).

Mothers Age	10-19 N (%)	20-29 N (%)	30-39 N (%)	P value
HD (Total 27)	5(18.5)	8(29.6)	14(51.9)	N SIG
non HD (Total 9)	1(11.1)	6(66.7)	2(22.2)	
chi-square statistic is 3.93. The <i>p</i> -value is 0.13The result is <i>not</i> significant at <i>p</i> < 0 .05				

Table 4. Mother's age of the studied groups.

Parameters		Non-HD No.(9)	HD No. (27)	Odd ratio	95% CI	P VALUE
Maternal illness	Yes	2	17	2.8	- 0,80 9,94	0.1 (NSIG)
	No	7	10			
Mather's intake of the drugs	Yes	1	11	3.6	-0,54 24,59	1.3 (NSIG)
	No	8	16			
Consanguineous marriage	Yes	5	20	1.3	- 1.27 2,49	0.03 (SIG)
	No	4	7			
Childbirth	Vaginal birth	2	11	1.8	-0.49 6,75	0.3 (NSIG)
	Cesarean section	7	16			
	No	0	27			
Number of previous maternal abortions		1	11	3.6	- 0,54 24,59	1.3 (NSIG)
		8	16			

Table 5. Mother's signs of the studied groups.

The result above found non-significant associations between the mother's age at Childbirth and the development of HD; this result is consistent with the results of a study by ⁴³. Although not statistically significant, some studies associated maternal age with HD frequency; these studies found HD was more common in infants with mothers aged ≥ 30 years at Childbirth. However, ⁴⁴ found no significant association between mothers' age and HD frequency.

Numerous studies have found that the risk of congenital disabilities rises with maternal age, especially in moms older than 35 years. At the same time, ⁴⁵ could not discover a connection between congenital abnormalities and maternal age in their investigation. The development of HD is influenced by several risk factors, including Down syndrome (trisomy 21). They anticipated that longer maternal ages would result in a more significant proportion of newborns with HD since pregnant women over the age of 35 have a higher probability of having a baby with trisomy 21 ⁴⁶. Aganglionosis of the colon diagnosed during pregnancy is highly uncommon; just two cases have been documented in the literature, and both of them had polyhydramnios and dilated bowel loops. ^{47,48}. Where the mother-to-be displayed several symptoms related to her prenatal illnesses, such as Polyhydramnios. Apart from noninvasive ultrasound, prenatal diagnosis of HD has been attempted, but with limited success, by measuring amniotic fluid disaccharides activity in the amniotic fluid ⁴⁹. The study of ⁵⁰ antenatal ultrasounds of a term male newborn at 33 weeks revealed decreased growth and Polyhydramnios. Following delivery, testing revealed the infant had HD and other abnormalities. Some authors say Polyhydramnios appears to be a little more common (9% in their cohort vs. 1% in the general population). Additionally, the mothers in the current study, in some instances, had Covid-19, Toxoplasmosis, Rubella, Asthma, Anemia, Diabetes and Hypertension, where numerous writers have provided evidence suggesting that viruses may have long-lasting adverse effects on the fetus. High levels of maternal inflammation during viral infection can affect all facets of fetal brain development and result in extensive neurological aftereffects ^{51,52}.

Concerns about spreading the virus and damaging fetuses by vertical transmission ⁵³ exist. According to other investigators, the danger of vertical transmission was minimal, and neither antenatal nor postnatal evaluations revealed any congenital disabilities ⁵⁴. Panahi ⁵⁵ findings do not point to a significant increase in the probability of abortion or genetic abnormalities in newborns in COVID-19-infected mothers. According to ⁵⁶, SARS infection has been linked to a higher incidence of intrauterine development retardation but not SARS-CoV-2 infection. Since the infection is novel, monitoring COVID-19-positive pregnant women is therefore essential to prevent negative maternal and fetal consequences ⁵⁴. Congenital abnormalities, stillbirth, and increased fetal growth remain the most severe adverse consequences of diabetic pregnancy, according to a prior study ⁵⁷.

Congenital anomalies were described by ⁵⁸. It is undeniably connected between more significant risks of congenital abnormalities and poor glycemic control at the time of conception and during the first trimester. The ⁵⁹ investigated the impact of chronic hypertension on fetal growth and concluded that it increased the likelihood of intrauterine growth restriction. No, HD-causing prenatal illness exists. According to the findings of the study ⁶⁰, 9% and 6% of the population, respectively, had gestational hypertension and diabetes. Similar rates (10% and 4%, respectively) have been recorded for the general population. In their article, ⁶¹ describes how maternal asthma during pregnancy affects fetal growth and development, which may impair the future health of the offspring. Although many expectant mothers abstain from taking any medications while they are pregnant, frequent asthma attacks may lower the amount of oxygen in the mother's blood, which in turn reduces the amount of oxygen in the fetus and causes issues with the fetus's development. When using the asthma medications as directed.

According to a recent systematic analysis, iron deficiency during the first and second trimesters increases maternal morbidity and the likelihood of unfavorable pregnancy outcomes, such as low birth weight preterm, or intrauterine growth restriction ⁶². Fetal hazards result from low fetal iron levels, which can be caused by maternal anemia or pregnancy complications that impair the transfer of fetal iron from the mother ⁶³. Several findings state that there is no connection between maternal Hb levels and growth retardation ⁶⁴. Furthermore, ⁶⁵ found a link between low maternal Hb levels and unfavorable pregnancy outcomes, including preterm, low birth weight, fetal death, and other medical anomalies. According to the study's questionnaire, some pregnant mothers did not take any medications other than some vitamins and were under medical supervision. Still, some of them admitted to taking medications for diseases they experienced during pregnancy, some of which were taken under medical supervision, and others were self-medication. Because it is simple to obtain medicines from pharmacies or drug stores without a prescription, time savings, the lengthy wait times for medical services, the perception that their sickness was not severe, and the lower cost of self-medication may also be contributing factors ⁶⁶. They concluded that taking a medication that is contraindicated during pregnancy does not necessarily represent a high-risk situation; however, other authors supported the idea that taking drugs that are illegal while pregnant poses a risk to both the mother and the fetus because drug exposure during this time is likely to result in congenital malformations ⁶⁷. Others consumed herbs. There are no studies or studies that are similar to this topic. Still, there are studies on the effects of using herbs indiscriminately while pregnant, which puts the mother and fetus at risk because these herbs contain substances that may be hazardous to the mother and fetus ⁶⁸, and this may be a valid reason for their children to have many diseases and congenital malformations.

Additionally, the results of the recent study did not discover a connection between congenital disabilities and the kind of pregnancy or prior abortions. This differs from other studies ^{69,70}. Previous research in Iraq has linked prior abortions to congenital abnormalities ⁷¹. In our study, from the maternal risk factors, only Consanguinity shows a significant difference ($p < 0.05$) between the HD group and non-HD group. Consanguinity and HD: The prevalence of consanguineous marriages—marriages between close biological relatives—varies greatly worldwide, from less than 1% in North America and most of Europe to over 50% in some areas of Asia and the Middle East. The prevalence of HD in the offspring of consanguineous parents has not been widely recorded in these places. However, Consanguinity between parents is frequent in the Middle East and several nations in Asia ⁷². According to a study looking at HD in Oman ⁷³, parents of HD patients had a consanguinity rate of 75% compared to 33% in the general community. According to a more recent study from Bangladesh, parents of HD babies had a 16% consanguinity rate compared to a 10% rate in the general community. Twelve percent (15/129) of the families were consanguineous, according to a more recent study from China ⁷⁴. It is advised to avoid consanguineous marriage because it appears to be a risk factor for HD. It has been shown that Consanguinity increases the likelihood that a husband and wife may have a gene that originated from a common ancestor. Numerous studies have shown that children of such a marriage are more likely to be homozygous for a dangerous gene and subsequently have autosomal recessive genetic diseases ⁷⁵⁻⁷⁷. Other researchers, however, examined seven (25%) children with consanguineous parents who had HD ($P = 1.000$) and found no evidence of a connection between the two.

Additionally, Consanguinity between parents is quite common in the Middle East, and consanguineous marriage is also quite common there. As a result, a future study that includes cases from all regional communities could be conducted to look into the genetic predisposition of HD and the significance of [Clinical Biotec, Universidad Católica del Oriente \(UCO\) and Universidad Nacional Autónoma de Honduras \(UNAH\)](#)

consanguinity⁷⁸. Nevertheless, these publications provide compelling evidence that a maternal risk factor harms fetal growth and pregnancy outcomes. However, referring to some risk variables as potentially dangerous rather than as an adequate appraisal clearly demonstrating a harmful effect on the fetus would be preferable. Furthermore, it is crucial to note that risk factors are frequently linked to other pathologic disorders, making it difficult to determine if a risk factor for the mother directly causes or even contributes to an increase in HD.

CONCLUSION

The current results showed that TB stain can quickly be done for diagnosis of HD; the MCs count in the submucosa is a significant criterion in HD and inflammation. Calretinin immunostaining is a reliable and beneficial test for the diagnostic of HD, aid in histopathological examination of suspected HD, and detect hypertrophic nerve bundles, which may aid in the diagnosis of HD. Submucosal nerve bundle hypertrophy is considered an adjuvant histological criterion for detecting HD. Finally, the result of the CBC count was not related to HD.

Acknowledgments: We thank the Department of Biology, College of Science, Mustansiriyah University (<http://uomustansiriyah.edu.iq/>), and Baghdad for advice and support.

REFERENCES

1. Klein M, Varga I. Hirschsprung's disease-recent understanding of embryonic aspects, etiopathogenesis and future treatment avenues. *Medicina (Kaunas)* ^{Internet}. 2020; 56(11):611. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/medicina56110611>.
2. Gustafson E, Larsson T, Danielson J. Controlled outcome of Hirschsprung's disease beyond adolescence: a single center experience. *Pediatr Surg Int* ^{Internet}. 2019;35(2):181–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00383-018-4391-5>.
3. Holschneider AM, Meier-Ruge W, Ure BM. Hirschsprung's disease and allied disorders--a review. *Eur J Pediatr Surg* ^{Internet}. 1994;4(5):260–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1066115>.
4. Gorbatyuk OM. Current approaches to diagnosis and treatment of Hirschsprung disease in newborns and infants (literature review and first-hand experience). *Wiad Lek* ^{Internet}. 2022;75(4):1026–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.36740/wlek20220420120>.
5. Bahrami A, Joodi M, Moetamani-Ahmadi M, Maftouh M, Hassanian SM, Ferns GA, et al. Genetic background of hirschsprung disease: A bridge between basic science and clinical application. *J Cell Biochem* ^{Internet}. 2018;119(1):28–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.26149>.
6. Kapur RP, Ambartsumyan L, Smith C. Are we underdiagnosing hirschsprung disease? *Pediatric and Developmental Pathology. Pediatric and Developmental Pathology: The Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* ^{Internet}. 2020;23(1):60–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1093526619889434>.
7. Lim KH, Wan WK, Lim TKH, Loh AHL, Nah SA, Chang KTE. Primary diagnosis of Hirschsprung disease-Calretinin immunohistochemistry in rectal suction biopsies, with emphasis on diagnostic pitfalls. *World Journal of Pathology*. 2014;3(3).
8. Rytting H, Dureau ZJ, Vega JV, Rogers BB, Yin H. Autopsy study of calretinin immunohistochemistry in the anorectal canal in young infants and potential implications for rectal biopsy approach in the neonatal period. *Pediatr Dev Pathol* ^{Internet}. 2021;24(6):542–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/10935266211030172>.
9. Ravanbakhsh N, Kesavan A. The role of mast cells in pediatric gastrointestinal disease. *Ann Gastroenterol* ^{Internet}. 2019;32(4):338–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.20524/aog.2019.0378>.
10. Yasseen HA. Toluidine blue stain and crystal violet stain versus H and E stain in the diagnosis of Hirschsprung's disease: A study in Sulaimani city in Kurdistan/Iraq. *Ann Pathol Lab Med*. 2015;2:A54-61.

11. Suvara K. Bancrofts theory and practic of histological techniques. Eight Edtion. Churchill Livingstone Elsevier; 2019.
12. Anuradha GP, Anita A, Seemant SK, Pratima S. t cell profile in appendicitis. Indian Journal of Pathology and Oncology. 2017;4(4):555–9.
13. Kobayashi H, Yamataka A, Fujimoto T, Lane GJ, Miyano T. Mast cells and gut nerve development: implications for Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. J Pediatr Surg ^{Internet}. 1999;34(4):543–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3468\(99\)90069-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3468(99)90069-6).
14. Li W-T, Luo Q-Q, Wang B, Chen X, Yan X-J, Qiu H-Y, et al. Bile acids induce visceral hypersensitivity via mucosal mast cell-to-nociceptor signaling that involves the farnesoid X receptor/nerve growth factor/transient receptor potential vanilloid 1 axis. FASEB J ^{Internet}. 2019;33(2):2435–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.201800935RR>.
15. Yadav AK, Mishra K, Mohta A, Agarwal S. Hirschsprung's disease: Is there a relationship between mast cells and nerve fibers? World J Gastroenterol ^{Internet}. 2009;15(12):1493. Available from: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.15.1493>.
16. Demirbilek S, Ozardali HI, Aydm G. Mast-cells distribution and colonic mucin composition in Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. Pediatr Surg Int ^{Internet}. 2001;17(2–3):136–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s003830000467>.
17. Hermanowicz A, Debek W, Dzienis-Koronkiewicz E, Chyczewski L. Topography and morphometry of intestinal mast cells in children with Hirschsprung's disease. Folia Histochem Cytobiol ^{Internet}. 2008;46(1):65–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.2478/v10042-008-0008-5>.
18. Do Carmo Neto JR, Braga YLL, Da Costa AWF, Lucio FH, Do Nascimento TC, Reis MA, et al. Biomarkers and their possible functions in the intestinal microenvironment of chagasic megacolon: an overview of the (neuro) inflammatory process. Journal of Immunology Research. 2021.
19. Nanagas VC, Kovalszki A. Gastrointestinal manifestations of hypereosinophilic syndromes and mast cell disorders: A comprehensive review. Clin Rev Allergy Immunol ^{Internet}. 2019;57(2):194–212. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12016-018-8695-y>
20. Kini U. Pathology of the gut motility disorders: Hirschsprung's disease. In: Surgical Pathology of the Gastrointestinal System. Singapore: Springer Singapore; 2022. p. 339–74.
21. Singh SK, Rajoria K. Ayurvedic management of chronic constipation in Hirschsprung disease-A case study. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine. 2018;9(2):131–5.
22. Olivera A, Beaven MA, Metcalfe DD. Mast cells signal their importance in health and disease. J Allergy Clin Immunol ^{Internet}. 2018; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2018.01.034>.
23. Musa ZA, Qasim BJ, Ghazi HF, Al Shaikhly AWAK. Diagnostic roles of Calretinin in hirschsprung disease: A comparison to neuron-specific enolase. Saudi J Gastroenterol ^{Internet}. 2017;23(1):60–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/1319-3767.199118>.
24. Green N, Smith CA, Bradford MC, Ambartsumyan L, Kapur RP. Rectal suction biopsy versus incisional rectal biopsy in the diagnosis of Hirschsprung disease. Pediatr Surg Int ^{Internet}. 2022;38(12):1989–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00383-022-05246-4>.
25. Naimi A, Shegeft E. Evaluation of the Diagnostic Value of Calretinin Immunohistochemistry Assay in the Superficial Rectal Biopsy of Children Suspected of Hirschsprung's Disease. Iranian Journal of Neonatology. 2022;13(1).
26. Barshack I, Fridman E, Goldberg I, Chowers Y, Kopolovic J. The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung's disease. J Clin Pathol ^{Internet}. 2004;57(7):712–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2004.016030>.
27. Alizai NK, Batcup G, Dixon MF, Stringer MD. Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: what is the optimum method? Pediatr Surg Int ^{Internet}. 1998;13(2–3):121–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s003830050264>.
28. Umesh G, Bhaskar SB, Harsoor SS, Dongare PA, Garg R, Kannan S, et al. Preoperative investigations: Practice guidelines from the Indian society of anaesthesiologists. Indian J Anaesth ^{Internet}. 2022;66(5):319–43. Available from: http://dx.doi.org/10.4103/ija.ija_335_22.
29. Frykman PK, Kim S, Wester T, Nordenskjöld A, Kawaguchi A, Hui TT. & HAEC Collaborative Research Group. Critical evaluation of the Hirschsprung-associated enterocolitis (HAEC) score: a

- multicenter study of 116 children with Hirschsprung disease. *Journal of pediatric surgery*. 2018;53(4):708–17.
30. Alkarzae M, Alsanosi A, Alharbi M, Altamimi F, Alzendi N. Role of infection in post-tonsillectomy secondary haemorrhage-an experience at King Abdulaziz University Hospital. *Glob J Otolaryngol*. 2017;6.
 31. Lefta AS, Daway HG, Jouda J. Red Blood Cells detecting depending on binary conversion at multi threshold values. *Al-Mustansiriyah J Sci* ^{Internet}. 2022;33(1):69–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.23851/mjs.v33i1.1079>.
 32. Diny NL, Rose NR, Čiháková D. Eosinophils in autoimmune diseases. *Front Immunol* ^{Internet}. 2017; 8:484. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00484>.
 33. Lichtman MA, Beatler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology*. The McGrawHill Companies. 2010;
 34. Arol C, Yona S. Origins and tissuecontext dependent fates of blood monocytes. *Immunology and cell biology*. 2009;87(1):30–8.
 35. Al-Sarray ZA, Hussein RH, Al-Hafidh AH, Al-Rayahi IA. Vitamin D deficiency associates with disease severity in rheumatoid arthritis patients. *Al-Mustansiriyah J Sci* ^{Internet}. 2023;33(5):33–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.23851/mjs.v33i5.1310>.
 36. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* ^{Internet}. 2015;29(3):153–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>.
 37. Kostakis ID, Angelidou M, Kambouri K, Gardikis S, Cholidou GK, Gioka T, et al. Hematological diagnostic markers of acute appendicitis in children. *Hell Cheirourgike* ^{Internet}. 2018;90(3):127–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13126-018-0457-z>.
 38. Semple JW, Freedman J. Platelets and innate immunity. *Cell Mol Life Sci* ^{Internet}. 2010;67(4):499–511. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0205-1>.
 39. Schafer AI. Thrombocytosis and thrombocythemia. *Blood Rev* ^{Internet}. 2001;15(4):159–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1054/blre.2001.0162>.
 40. Sun X, Chu J, Li C, Deng Z. Hirschsprung's disease presenting as intractable anemia: a report of two cases and review of the literature. *BMC Pediatr* ^{Internet}. 2020;20(1):525. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12887-020-02423-z>
 41. Urrechaga E, Aguirre U, España PP, De Gadiana LG. Complete blood counts and cell population data from Sysmex XN analyser in the detection of SARSCoV-2 infection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2021;59(2):e57–60.
 42. Al-Shamaileh T, Hashem H, Farhoud E, Al-Edwan A, Alomari MS, Levitt MA. MDelayed diagnosis of Hirschsprung disease presenting initially as anemia: A case report. *Journal of Pediatric Surgery Case Reports*. 2023.
 43. Sukarelawanto AVR, Ritana A, Balela N, Putri WJK, Sirait DN, Paramita VMW. & Makhmudi, A. Postoperative enterocolitis assessment using two different cut-off values in the HAEC score in Hirschsprung patients undergoing Duhamel and Soave pull-through. *BMC pediatrics*. 2020;20(1):1–6.
 44. Granström L, Svenningsson A, Hagel A. Maternal risk factors and perinatal characteristics for Hirschsprung disease. *Pediatrics*. 2016;138.
 45. Ajao AE, Adeoye IA. Prevalence, risk factors and outcome of congenital anomalies among neonatal admissions in OGBOMOSO, Nigeria. *BMC Pediatr* ^{Internet}. 2019;19(1):88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12887-019-1471-1>.
 46. Demehri FR, Halaweish IF, Coran AG. Hirschsprungassociated enterocolitis: pathogenesis, treatment and prevention. *Pediatr Surg Int*. 2013; 29:873–81.
 47. Wroblewski D, Wesselhoeft C. Ultrasonic diagnosis of prenatal intestinal obstruction. *J Pediatr Surg* ^{Internet}. 1979;14(5):598–600. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3468\(79\)80146-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3468(79)80146-3).
 48. Vermesh M, Mayden KL, Confino E, Giglia RV, Gleicher N. Prenatal sonographic diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Ultrasound Med* ^{Internet}. 1986;5(1):37–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.7863/jum.1986.5.1.37>.

49. Aldaffaa M, Mahfouz A, Alaqeel S, Alakeel HA, Al Naamshan M. Hirschsprung's disease in a genetically diagnosed Cri-du-chat syndrome baby. *J Pediatr Surg Case Rep* ^{Internet}. 2023;91(102600):102600. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.epsc.2023.102600>.
50. Broch A, Trang H, Montalva L, Berrebi D, Dauger S, Bonnard A. Congenital central hypoventilation syndrome and Hirschsprung disease: A retrospective review of the French National Registry Center on 33 cases. *J Pediatr Surg* ^{Internet}. 2019;54(11):2325–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2019.02.014>.
51. Cornish EF, Filipovic I, Ásenius F, Williams DJ, McDonnell T. Innate immune responses to acute viral infection during pregnancy. *Front Immunol* ^{Internet}. 2020; 11:572567. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.572567>.
52. Leung KKY, Hon KL, Yeung A, Leung AKC, Man E. Congenital infections in Hong Kong: an overview of TORCH. *Hong Kong Med J* ^{Internet}. 2020;26(2):127–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.12809/hkmj198287>.
53. Lebel C, MacKinnon A, Bagshawe M, Tomfohr-Madsen L, Giesbrecht G. Elevated depression and anxiety symptoms among pregnant individuals during the COVID-19 pandemic. *J Affect Disord* ^{Internet}. 2020; 277:5–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2020.07.126>.
54. Mascio D, Sen C, Saccone G, Galindo A, Grünebaum A, Yoshimatsu J, et al. Risk factors associated with adverse fetal outcomes in pregnancies affected by Coronavirus disease (COVID-19): a secondary analysis of the WAPM study on COVID19. *Journal of perinatal medicine*. 2019;48(9):950–8.
55. Panahi L, Amiri M, Pouy S. Risks of novel Coronavirus disease (COVID-19) in pregnancy; A narrative review. *Arch Acad Emerg Med*. 2020;8(1):e34.
56. Salem D, Katranji F, Bakdash T. COVID-19 infection in pregnant women: Review of maternal and fetal outcomes. *Int J Gynaecol Obstet* ^{Internet}. 2021;152(3):291–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ijgo.13533>.
57. Schaefer-Graf U, the Diabetic Pregnancy Study Group, Napoli A, Nolan CJ. Diabetes in pregnancy: a new decade of challenges ahead. *Diabetologia* ^{Internet}. 2018; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-018-4545-y>.
58. Zabihi S, Loeken MR. Understanding diabetic teratogenesis: where are we now and where are we going? *Molecular Causes of Diabetic Teratogenesis. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* ^{Internet}. 2010;88(10):779–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/bdra.20704>.
59. Haelterman E, Breart G, Paris-Liado J, Dramaix M, Tchobrosky C. Effect of uncomplicated chronic hypertension on the risk of smallfor gestational age birth. *Am J Epidemiol*. 1997;145:689–95.
60. Broch A, Trang H, Montalva L, Berrebi D, Dauger S, Bonnard A. Congenital central hypoventilation syndrome and Hirschsprung disease: A retrospective review of the French National Registry Center on 33 cases. *J Pediatr Surg* ^{Internet}. 2019;54(11):2325–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2019.02.014>.
61. Meakin AS, Saif Z, Seedat N, Clifton VL. The impact of maternal asthma during pregnancy on fetal growth and development: a review. *Expert Rev Respir Med* ^{Internet}. 2020;14(12):1207–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17476348.2020.1814148>
62. Ru Y, Pressman EK, Guillet R, Katzman PJ, Vermeylen F, O'Brien KO. Umbilical cord hepcidin concentrations are positively associated with the variance in iron status among multiple birth neonates. *J Nutr* ^{Internet}. 2018;148(11):1716–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jn/nxy151>.
63. Monk C, Georgieff MK, Xu D, Hao X, Bansal R, Gustafsson H, et al. Maternal prenatal iron status and tissue organization in the neonatal brain. *Pediatr Res* ^{Internet}. 2016;79(3):482–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2015.248>.
64. Kaltreider DF, Kohl S. Epidemiology of preterm delivery. *Clin Obstet Gynecol* ^{Internet}. 1980;23(1):17–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00003081-198003000-00005>.
65. Garn SM, Ridella SA, Petzold AS, Falkner F. Maternal hematologic levels and pregnancy outcomes. *Semin Perinatol*. 1981;5(2):155–62.
66. Hoeltzenbein M, Slimi S, Fietz A-K, Stegherr R, Onken M, Beyersmann J, et al. Increasing use of newer antiseizure medication during pregnancy: An observational study with special focus on lacosamide. *Seizure* ^{Internet}. 2023; 107:107–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2023.02.015>.

67. Black RA, Hill DA. Over-the-counter medications in pregnancy. *Am Fam Physician*. 2003;67(12):2517–24.
68. Bruno LO, Simoes RS, de Jesus Simoes M, Girão MJBC, Grundmann O. Pregnancy and herbal medicines: An unnecessary risk for women's health-A narrative review. *Phytother Res* ^{Internet}. 2018;32(5):796–810. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6020>.
69. Ronya R, Gupta D, Ghosh SK, Narang R, Jain KB. Spectrum of congenital surgical malformations in newborns. *J Indian Med Assoc*. 2002;100(9):565–6.
70. Cherian AG, Jamkhandi D, George K, Bose A, Prasad J, Minz S. Prevalence of congenital anomalies in a secondary care hospital in South India: A cross-sectional study. *J Trop Pediatr* ^{Internet}. 2016;62(5):361–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/tropej/fmw019>.
71. Ameen SK, Alalaf SK, Shabila NP. Pattern of congenital anomalies at birth and their correlations with maternal characteristics in the maternity teaching hospital, Erbil city, Iraq. *BMC Pregnancy Childbirth* ^{Internet}. 2018;18(1):501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12884-018-2141-2>.
72. Puri P, Nakamura H. Familial Hirschsprung's Disease. In: *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 115–9.
73. Rajab A, Freeman NV, Patton MA. Hirschsprung's disease in Oman. *J Pediatr Surg* ^{Internet}. 1997;32(5):724–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3468\(97\)90015-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3468(97)90015-4).
74. Xiao J, Hao L-W, Wang J, Yu X-S, You J-Y, Li Z-J, et al. Comprehensive characterization of the genetic landscape of familial Hirschsprung's disease. *World J*
75. Mobarak AM, Chaudhry T, Brown J, Zelenska T, Khan MN, Chaudry S, et al. Estimating the health and socioeconomic effects of cousin marriage in south Asia. *J Biosoc Sci* ^{Internet}. 2019;51(3):418–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1017/S0021932018000275>.
76. Al-Hamed MH, Alsahan N, Tulbah M, Kurdi W, Ali W, Sayer JA, et al. Fetal anomalies associated with novel pathogenic variants in TMEM94. *Genes (Basel)* ^{Internet}. 2020;11(9):967. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/genes11090967>.
77. Najafi K, Mehrjoo Z, Ardalani F, Ghaderi-Sohi S, Kariminejad A, Kariminejad R, et al. Identifying the causes of recurrent pregnancy loss in consanguineous couples using whole exome sequencing on the products of miscarriage with no chromosomal abnormalities. *Sci Rep* ^{Internet}. 2021;11(1):6952. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-86309-9>.
78. Al-Taher R, Daradkeh HT, Hadadin H, Obiedat A, Hijazein Y, Hijazein L, et al. Children with Hirschsprung disease in a developing country: A cohort study of the predictors of a positive rectal biopsy result. *Medicine (Baltimore)* ^{Internet}. 2022;101(46):e31601. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000031601>.

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Abdul Hussein R A., H. AL-Sharqi S A, Mehdi N K., Joda A E. Evaluation of Calretinin and enumeration of mast cells in rectum tissue biopsies of Hirschsprung and non-Hirschsprung disease in neonate and infant. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 32. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.32>

Additional information Correspondence should be addressed to rusul_abass@yahoo.com

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

[Clinical Biotec](#), [Universidad Católica del Oriente \(UCO\)](#) and [Universidad Nacional Autónoma de Honduras \(UNAH\)](#)

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Nucleic acid amplification testing (NAT) impact on blood safety compared to Immunoassays in blood banks: A Review

Santiago Cadena-Ullauri ¹, Anibal Gaviria ^{2,3}, Patricia Guevara-Ramirez ¹, Viviana A. Ruiz-Pozo ¹,
Rafael Tamayo-Trujillo ¹, Elius Paz-Cruz ¹, Ana Karina Zambrano ^{1*}.

¹ Centro de Investigación Genética y Genómica, Facultad de Ciencias de la Salud Eugenio Espejo, Universidad UTE, Quito, Ecuador; santiago.cadena@ute.edu.ec, alexandra.guevara@ute.edu.ec, viviana.ruiz@ute.edu.ec, victor.tamayo@ute.edu.ec, elius.paz@ute.edu.ec, anazambrano17@hotmail.com,

² Laboratorio de Genética Molecular, Centros Médicos Especializados Cruz Roja Ecuatoriana, Quito, Ecuador; anibalgaviria@hotmail.com.

³ Hemocentro Nacional, Cruz Roja Ecuatoriana, Quito, Ecuador; anibalgaviria@hotmail.com.

*Correspondence: anazambrano17@hotmail.com; Tel.: (02) 2 990 800

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.33>

ABSTRACT

Blood transfusions are fundamental to clinical procedures; however, many people worldwide cannot access safe blood. Blood product safety must be essential in each country's national health policies. Several aspects of the blood donation process are carefully performed, including laboratory testing comprising blood type determination, antigen-antibody analyses, and nucleic acid amplification testing (NAT); however, NAT is not mandatory in all countries. The traditional screening method is based on antigen-antibody binding techniques, such as ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), with high sensitivity and specificity. Nevertheless, these methods have a seroconversion window period (WP), in which antigen-antibody testing cannot detect the pathogen and has not caused any symptoms yet. NAT is a sensitive molecular method based on viral nucleic acid amplification and detection. Moreover, its use in blood banks is increasing worldwide because it narrows the window period. For example, Huang et al. in 2017 reported the detection of 22 samples reactive only by nucleic acid testing for either HIV, HBV, or HCV compared with ELISA.

The present article shows how blood safety has improved by implementing NAT as a routine method for viral nucleic acid detection, highlighting the importance of this technique as evidenced by the findings presented herein. Moreover, these results are highly significant, demonstrating the relevance of NAT and advocating for its application on a global scale in blood management protocols. This development could be particularly beneficial for regions with a high viral infection prevalence, including many countries.

Keywords: Nucleic acid amplification, Immunoassay, viral infection, blood bank.

INTRODUCTION

Blood transfusions are fundamental to clinical procedures; however, many people worldwide, especially in low-income countries, cannot access safe blood ¹⁻³. Blood product safety must be ensured in each country's national health policies ^{4,5}. Blood safety starts with a pre-donation survey to identify risky behaviors that could lead to viral or bacterial infections, endangering the people receiving the blood transfusion ^{4,6,7}. Similarly, several aspects of the blood donation process should be carefully performed, including blood collection,

labeling and handling each blood component, blood transfusion, and laboratory testing^{4,7,8}. Laboratory testing is comprised of blood type determination, antigen-antibody analyses, and nucleic acid amplification testing (NAT); however, in all countries, NAT is mandatory¹. For instance, in Latin America, Nicaragua, Costa Rica, Venezuela, and Uruguay do not perform NAT on blood donations.

The World Health Organization (WHO) promotes efforts to improve screening methods worldwide⁴. The traditional screening method is based on antigen-antibody binding techniques, such as ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), CLIA (chemiluminescence immunoassay), or ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay), which have high sensitivity and specificity, ranging from 95% to 99%, and from 90% to 99%, respectively⁹⁻¹². Nevertheless, these methods have a seroconversion window period (WP), which varies according to the virus and the patient^{13,14}. A window period refers to the early stages of an infectious disease, in which antigen-antibody testing cannot detect the pathogen and has not caused any symptoms yet. However, the host could be infectious and transmit the disease; most transfusion transmission infections occur because of WP¹³⁻¹⁸. For example, in Germany before NAT, 1,500 hemophiliacs were infected with HIV in 1993 due to transfusion transmission infections. Similarly, in the USA, the situation was very similar, with 10,000 people infected by contaminated blood products⁹.

NAT is a sensitive molecular method that could be used for viral or bacterial nucleic acid amplification and detection. Moreover, its use in blood banks is increasing because it narrows the window period of HIV, HBV, and HCV infections, providing an extra layer of safety^{9,18,19}. However, NAT also has limitations; for instance, NAT reactions are performed in pools; therefore, if a pool is reactive, each sample must be processed individually. Furthermore, NAT requires specialized infrastructure, consumables, and equipment.

The present review describes the screening methods used in blood banks, including immunoassays and NAT, to detect the presence of viruses in blood products. Moreover, it highlights the importance of NAT implementation by describing studies that have reported infections only detected by NAT. In conclusion, NAT reduces the window period, detects occult infections, and ultimately increases blood safety.

IMMUNOASSAYS

Immunoassays are used in many clinical settings; their use includes the detection of antigens, autoantibodies, tumor markers, hormone levels, drugs, and antibodies against pathogens, such as viruses or bacteria. Immunoassays detect the concentration or presence of a molecule by using an antigen or antibody for its detection²⁰⁻²². In humans, for example, the immune system can generate a response to a foreign body; they do so by synthesizing proteins (antibodies) that will recognize the invader (antigen)^{20,23,24}. In this technique, those antibodies generated in the immune response will be detected.

There are five classes of antibodies, depending on their structure and biological function: Immunoglobulin (Ig) G, IgA, IgE, IgM, and IgD; among these, IgG is the antibody with the highest availability and concentration²⁵. The structure of IgG is presented in Figure 1. The antibody is composed of two heavy chains and two light chains. Moreover, there are two main regions, the Fab region that is specific and will bind to the antigen, and the Fc region that interacts with cell surface receptors^{20,26}.

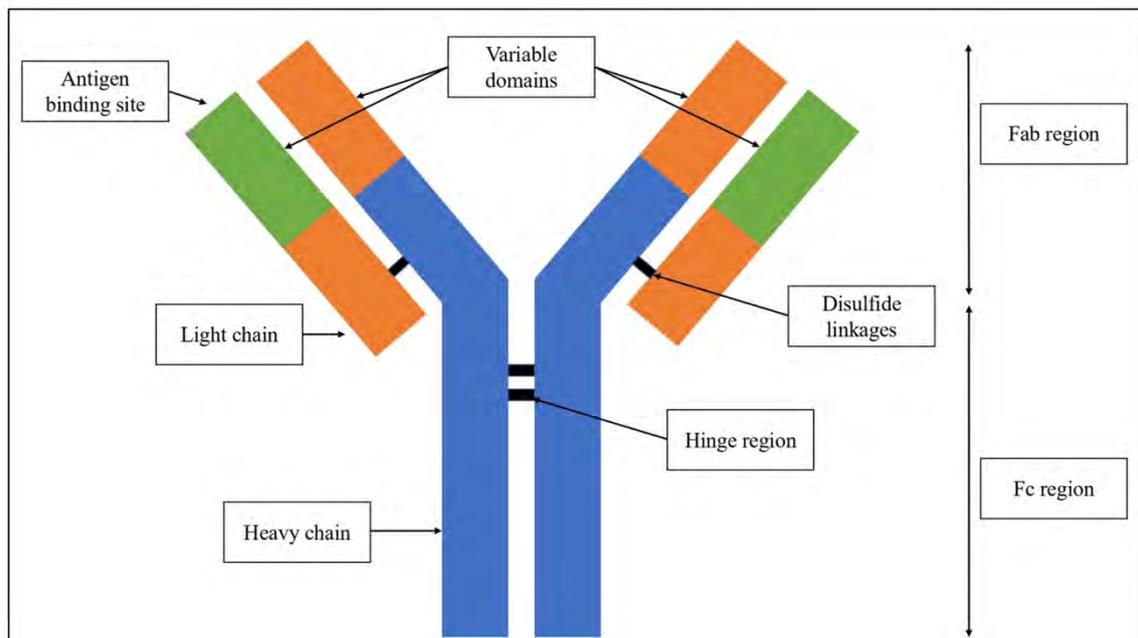


Figure 1. Immunoglobulin G structure.

Some factors that could interfere with the test include contamination, binding affinity, quality of the wells, buffer pH, and cross-reactivity^{27,28}. However, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is considered the gold standard of immunoassays²⁹; it is used to detect and quantify proteins, hormones, glycoproteins, antibodies, and antigens. ELISAs require 96-well polystyrene plates, primary or secondary antibodies, antigen/analyte, enzymes, and chromogen/substrate³⁰.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISAs steps, generally, are^{30,31}: First, antigen or antibody plate coating, followed by the addition of the samples. The next step is blocking, usually with bovine serum albumin (BSA). Then, the detection by using conjugated antibodies and substrates, typically horseradish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP). Finally, the results are read by spectrophotometry to determine the presence of the analyte of interest. Moreover, there are different types of ELISAs. The major ELISA types are direct, indirect, sandwich, and competitive³¹.

Direct ELISA

This type of test (Figure 2. A) starts by adding the sample to the wells in the plate, where the antigen of interest will bind. Next, blocking and washing steps are followed by adding an enzyme-conjugated primary antibody, which will bind to the antigen of interest. Then, a substrate is added, and finally, the reaction is detected, displaying the results. The analyte concentration is proportional to the intensity of the signal. The disadvantage of this technique is a lower sensitivity compared to other types of ELISAs³²; however, one advantage is that it only requires one antibody, which eliminates the secondary antibody cross-reactivity^{30,31}.

Indirect ELISA

The indirect ELISA (Figure 2. B) is very similar to a direct ELISA; the main difference is that indirect ELISA requires two antibodies³³. The primary antibody will bind directly to the protein of interest, and a secondary antibody will be used to detect the primary antibody. The secondary antibody is usually conjugated with an enzyme that hydrolyzes or oxidates the substrate, resulting in a color change³³. The main disadvantage of this technique is the risk of cross-reactivity; however, the advantages are lower costs and higher sensitivity^{30,31}.

Sandwich ELISA

Two antibodies will be used in this type of ELISA (Figure 2. C). A capture antibody and an enzyme-conjugated antibody. In the first step of this technique, the plate is coated with a capture antibody. Then, the sample containing the proteins of interest is added. The next step involves using an enzyme-conjugated antibody that will bind to the proteins. The process ends with adding a substrate, resulting in a color change. The disadvantage of this technique is the high cost and time; however, this type of ELISA has the most heightened sensitivity^{30,31}.

Competitive ELISA

Antibodies will compete for antigen binding in the competitive ELISA (Figure 2. D). In the first step, the plates are coated with an antigen. Then, the sample will be tested to determine if it contains the antibodies of interest, and an enzyme-conjugated antibody will be added to the plates; both antibodies will compete for antigen binding. The concentration of each antibody will determine which antibody will 'win' the competition. If the sample has the highest concentration, no color change will be detected; however, if the enzyme-conjugated antibody has the highest concentration, a color change will occur. The disadvantage of this technique is its low specificity, whereas an advantage is that it offers low variability and multiple antigens could be used^{30,34}.

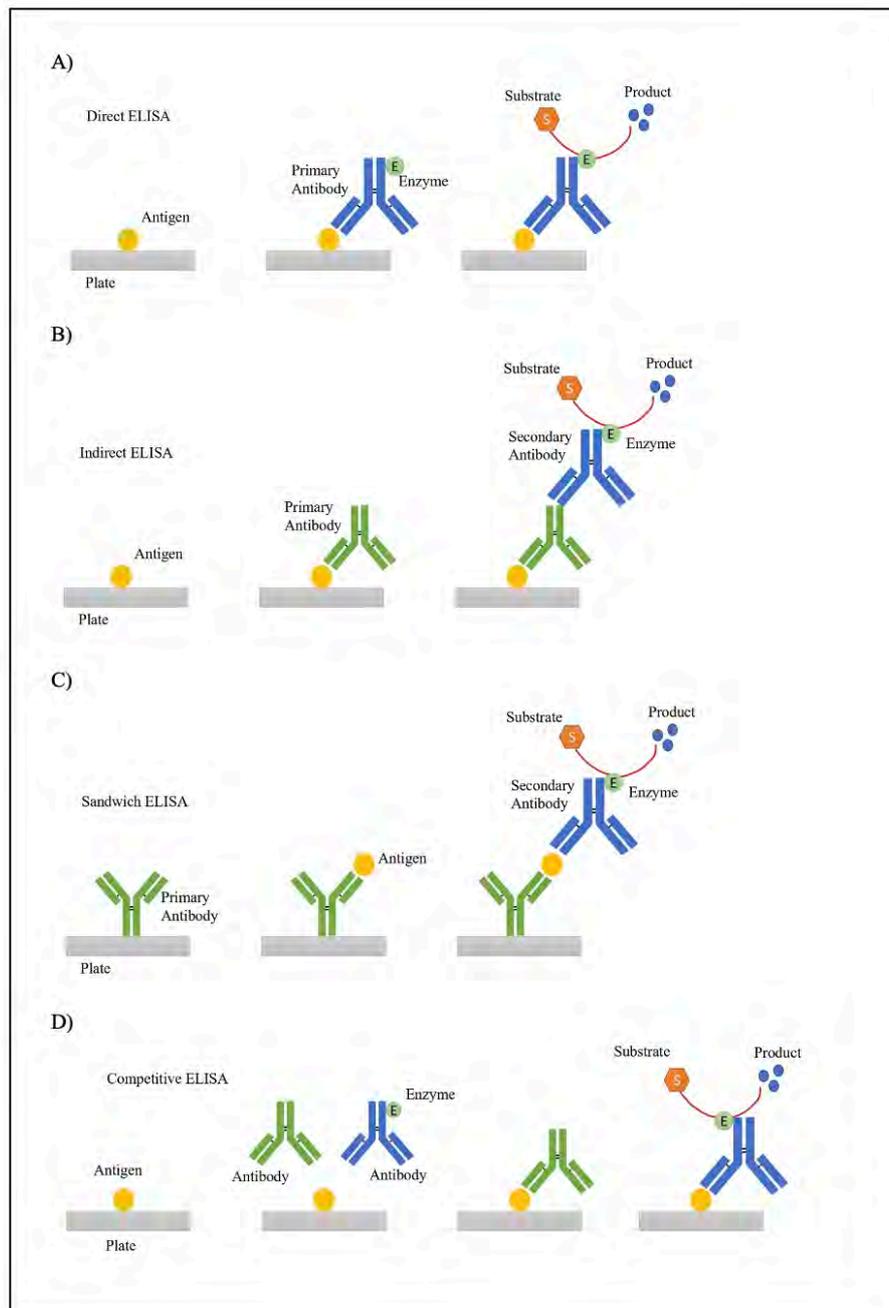


Figure 2. Overview of different ELISA types A) Direct ELISA B) Indirect ELISA C) Sandwich ELISA D) Competitive ELISA.

Chemiluminescent immunoassay (CLIA)

CLIA is an assay developed to determine the analyte's concentration on a sample using the luminescence intensity of a chemical or enzymatic reaction^{12,21}. Luminescence is the emission of visible radiation with wavelengths of 300-800nm³⁵. CLIA offers several advantages, including high specificity and sensitivity, simple equipment, short time, low cost, simplicity, and high throughput^{36,37}. CLIA is similar to ELISA, as it is also based on immunoreactions. However, the main difference is that in CLIA, the results are measured as absolutes according to luminescence intensity, while in ELISA, the results are relative and determined from the substrate's color change^{35,36}.

Different types of CLIA exist, including direct and indirect approaches, which could be competitive or non-competitive. The direct method uses luminophore markers such as ruthenium and acridinium esters, whereas the indirect system enzyme markers like alkaline phosphatase and horseradish peroxidase utilize luminol as substrate (Figure 3) ^{35,38}.

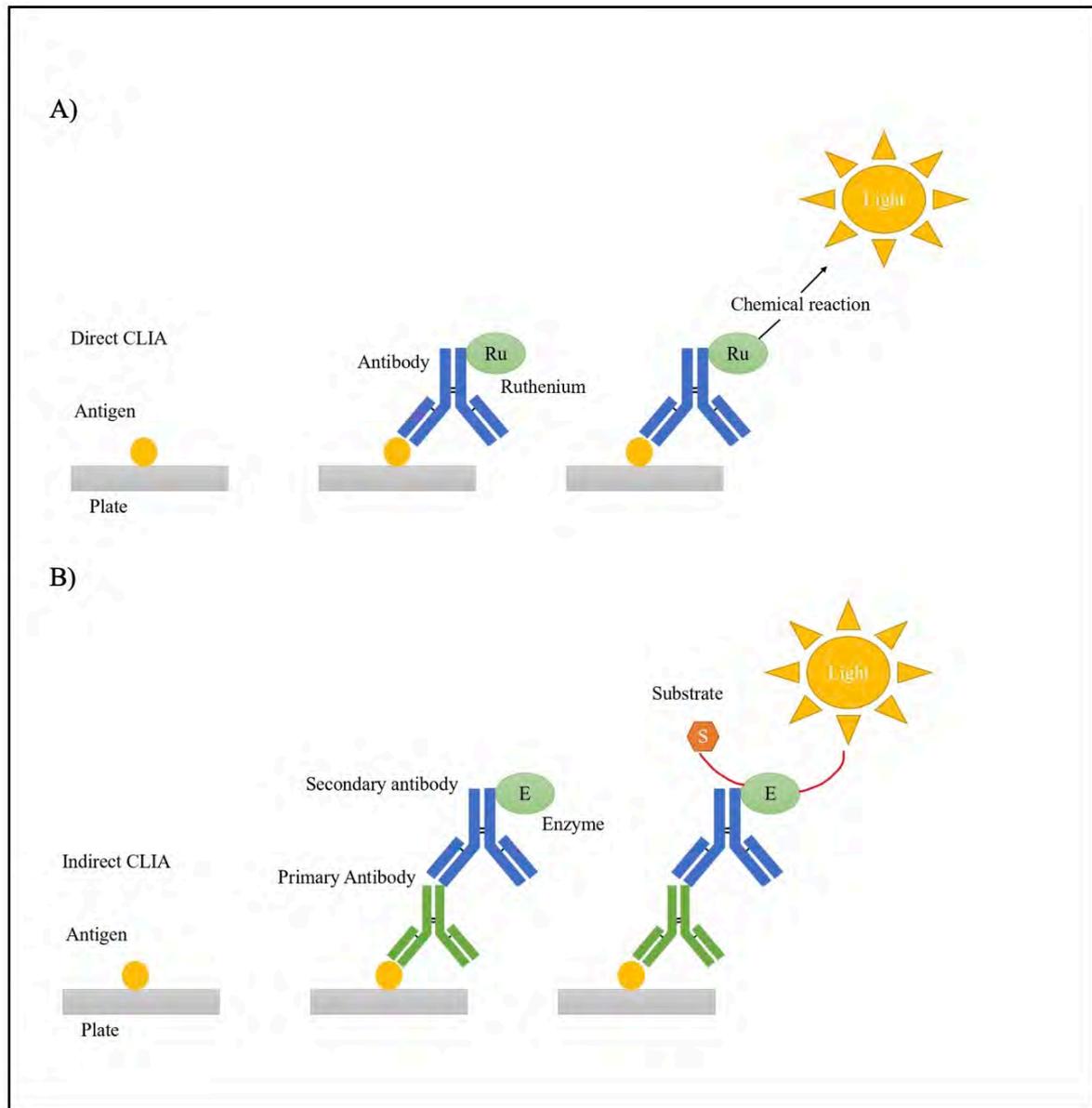


Figure 3. A) Direct CLIA and B) Indirect CLIA overview.

Nucleic acid amplification testing (NAT):

Nucleic acid testing is a molecular technique for viral nucleic acid detection with sensitivity and specificity values ranging from 92.5% to 100% and from 99.8 to 100%, respectively, ³⁹⁻⁴¹. The basis of this technique consists of the amplification and detection of viral RNA or DNA ^{9,42,43}. One example of a NAT assay is the reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), which starts with retrotranscribing the viral RNA into cDNA, followed by several cycles of denaturation, primer annealing, and extension. Lastly, the fragments of interest are detected and quantified (Figure 4) ⁴⁴. Furthermore, NAT offers several advantages compared with other screening methods, such as ELISA and CLIA; these include minimizing the risk of

contamination, the possibility of multiplexing, identifying different viruses, and reducing the window period^{9,45-47}. NAT's impact on blood safety is significant; for instance, Roth et al. (2008) reported that out of more than 300 million donations, 2,808 virus-contaminated donations were identified by NAT only⁹. Moreover, NAT could also be developed and used to detect other viruses, such as West Nile Virus, the SARS-CoV-2^{48,49}, and emerging viruses; the only requirement would be to identify the viral genome sequence⁹.

Limitations of this approach include that NAT reactions are performed in pools of different numbers, for example, 96 samples per reaction. If a pool is reactive, each sample will be processed individually, increasing the cost and time of the process. Furthermore, NAT requires specialized infrastructure, consumables, and equipment. Moreover, studies have found that pool NAT could miss infections with low viral loads, which could only be detected in individual tests^{39,50}.

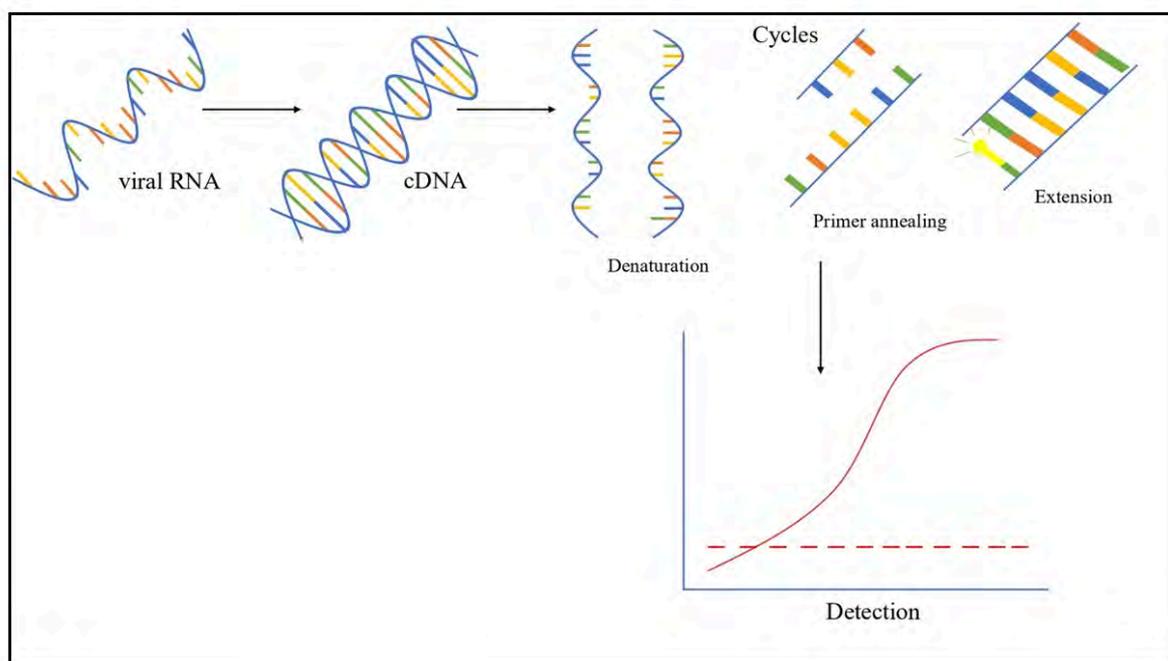


Figure 4. RT-qPCR overview.

Comparison between NAT and immunoassays for viral detection

HIV

In HIV, the window period in antigen/antibody testing could be 18 to 28 days, whereas, in NAT, the window period shortens by 8 to 20 days (Figure 5)¹⁶. For example, in 2017, Huang, W. et al. compared ELISA and NAT methods in a hospital in China between 2015 and 2016, where for HIV, they found 605 cases of NAT(+) and Immunoassay (+)¹⁶. However, they also found 21 cases of NAT(+) and Immunoassay(-), followed up on one of the cases and when testing one week later, found that it was a window period case. In addition, 143 cases of NAT(-) and Immunoassay (+) were found, possibly due to false positives and insufficient ELISA specificity¹⁶. Furthermore, Table 1 presents more studies with similar cases of window period infections.

HCV

In HCV, the window period could range from 20 to 36 days^{15,51}. In contrast, by using NAT, the viral RNA can be detected as soon as two days after exposure (Figure 5)^{51,52}. For example, Hourfar et al. in 2008 analyzed the performance of NAT vs. serological methods. They found that 23 donations were NAT-reactive only for HCV, which could be attributed to an infection in the window period phase⁵³. Similarly, Velati, C. et al. reported in 2008 the detection of 27 NAT(+) CLIA(-) donations out of 10,776,228 units. During a follow-up, it was found that the infections in all 27 patients were in the window period, and later, NAT(+) CLIA(+) 17 was tested. Similarly, Stramer et al. 2004 found that 170 donations, out of approximately 40 million, were reactive only for NAT⁵⁴. Table 1 presents more studies comparing NAT and Immunoassays.

HBV

HBV's window period can range from 30 to 50 days⁵⁵. In addition, there is a risk of an occult hepatitis B infection with undetectable HBsAg levels⁵⁶. On the other hand, by using NAT, the virus can be detected within one week of infection, thus shortening the window period. Moreover, NAT can detect the presence of the virus even in its hidden infection state (Figure 5)⁵⁵. For example, Keechilot, et al. in 2016 analyzed 24,338 donations, 24,214 of these were negative for all serological markers (HIV, HBV, HCV, malaria, and syphilis). However, 5 NAT-only reactive samples for HBV were identified. The authors attributed this to occult or window period infections⁵⁶. Similarly, Hourfar, et al. in 2008 reported that out of 31,524,571, 22 samples were reactive only for NAT, indicating infections during their window period⁵³. Minegishi, et al. in 2003 conducted a study on over 11 million samples and identified that out of 181 HBV-NAT-positive samples, 172 were negative by immunoassays⁵⁷. Similar studies are presented in Table 1.

Moreover, the sensitivity and specificity of ELISA tests can be determined through a comparative analysis of the studies mentioned above and using NAT as the gold standard. The sensitivity stands at 92%, whereas the specificity is 99%. Even though these values are relatively high, infections may not be detected, which could lead to severe health consequences.

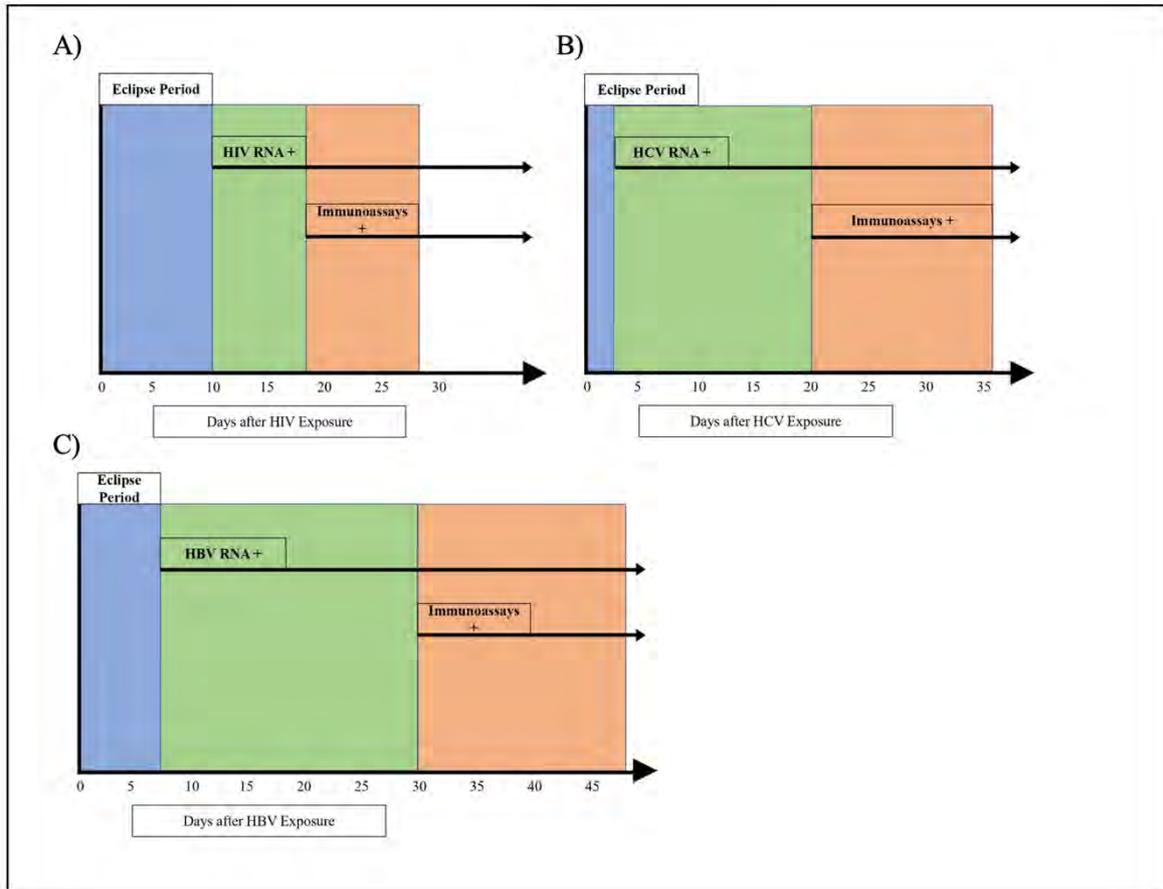


Figure 5. Detection periods comparison between NAT and Immunoassays for A) HIV. B) HCV and C) HBV.

Virus	NAT(+)	NAT(+)	NAT(-)	NAT(-)	Reference
	Immunoassay(+)	Immunoassay (-)	Immunoassay (+)	Immunoassay (-)	
HIV	605	21	143	105,719	16
HIV	88	6	0	9,456	58
HIV	1	1	3	996	59
HCV	323	0	586	105,579	16
HCV	37	4	83	20,991	60

HCV	13	0	9	978	59
HBV	46	1	0	24214	56
HBV	21	22	0	31,524,571	53
HBV	6,386	579	4,958	105,719	16
HBV	5	1	9	985	59
Total	7,525	635	5,791	31,899,208	

Table 1. NAT vs Immunoassay comparison for viral detection.

DISCUSSION

Lives are saved daily thanks to blood transfusions, and this process has become a fundamental part of clinical procedures; hence, ensuring blood safety is essential, and countries must develop public health policies to provide safe blood to everyone^{4,5}. Moreover, the blood donation process has changed over time, and nowadays, several steps and procedures increase blood safety. These include a thorough standardized questionnaire to identify potential risks, serological tests to determine blood type, irregular antibodies, and infections, and molecular tests for viral nucleic acid detection^{4,7,8}.

One of the main issues regarding blood safety is the possible presence of infections in the WP phase. In this phase, the presence of the pathogen cannot be detected by serological testing because the body has not had enough time to produce detectable antibodies. However, the donated blood could be infected, affecting the recipient^{13,14,18}. In this regard, NAT is a molecular technique that can reduce the WP; for instance, for HIV, the serological WP is from 18 to 45 days, and by using NAT, the detection could be performed as soon as 11 days after exposure, reducing the WP by 7 days; increasing the capacity to detect viral infections and reducing the risk of transfusion-transmitted infections^{9,18,19}.

The present article shows how blood safety has improved by implementing NAT as a routine method for viral nucleic acid detection, highlighting the importance of this technique as evidenced by the findings presented herein. Moreover, these results are highly significant, demonstrating the relevance of NAT and advocating for its application on a global scale in blood management protocols. This development could be particularly beneficial for regions with a high viral infection prevalence, including many countries.

CONCLUSIONS

In conclusion, nucleic acid testing (NAT) is a powerful technique capable of detecting viral nucleic acids, even when immunoassays cannot; thus, it narrows the window period. Moreover, NAT can detect occult HBV infections. For example, only in the studies mentioned, NAT has prevented 1,923 hemo components (red blood cells, platelets, and plasma) infected with HIV, HCV, or HBV from being transfused. The novelty of the present research lies in its comprehensive review of the current literature, which describes the sensitivity and specificity of the methods used in blood banks and focuses on the importance of NAT implementation. We aim that countries that have not yet applied this technology will realize its significance in providing safe blood for everyone.

Supplementary Materials: The following are available online at www.revistabionatura.com/xxx/s1, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title.

Author Contributions: Conceptualization, SCU, AKZ, AG; writing—original draft preparation, SCU; writing—review and editing, AKZ, AG, EPC, RTT, PGR, VARP; project administration, AKZ. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: No funding was received.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Universidad UTE and Cruz Roja Ecuatoriana for their support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization. Blood safety and availability [Internet]. 2022. p. 2–9. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>(Accessed:02/05/2021)%0Ahttp://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/
2. Jenny HE, Saluja S, Sood R, Raykar N, Kataria R, Tongaonkar R, et al. Access to safe blood in low-income and middle-income countries : lessons from India. 2017;1–6.
3. Yonemura S, Doane S, Keil S, Goodrich R, Pidcoke H, Cardoso M. Improving the safety of whole blood-derived transfusion products with a riboflavin-based pathogen reduction technology. *Blood Transfus.* 2017;15:357–64.
4. Harris JC, Crookston KP. Blood product safety. Vol. 3, StatPearls Publishing. 2022.
5. Weimer A, Tagny CT, Tapko JB, Gouws C, Tobian AA., Ness PM, et al. Blood transfusion safety in sub-Saharan Africa: a literature review of changes and challenges in the 21st century. *Transfusion.* 2019;59(January):412–27.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Blood Safety Basics [Internet]. March 18, 2020. 2020. p. 2–4. Available from: <https://www.cdc.gov/bloodsafety/basics.html>
7. Godbey EA, Thibodeaux SR. Seminars in Hematology Ensuring safety of the blood supply in the United States : Donor screening , testing , emerging pathogens , and pathogen inactivation ☆. 2019;56:229–35.
8. Leparc GF. Safety of the Blood Supply. *Cancer Control.* 2015;22:7–25.
9. Roth WK. History and Future of Nucleic Acid Amplification Technology Blood Donor Testing.

- Transfus Med Hemotherapy. 2019;46(2):67–75.
10. Jagani R, Dimr U, Kumar S, Pawar A. Experience of Individual Donor Nucleic Acid Testing on Screening of Blood Donors for Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis C Virus, and Hepatitis B Virus at an Apex Blood Bank of Northern India. *Med J Dr D Y Patil Vidyapeeth*. 2022;15(1):49–53.
 11. Candotti D, Laperche S. Hepatitis B virus Blood Screening: Need for Reappraisal of Blood Safety Measures? *Front Med*. 2018;5(February):1–10.
 12. Chang L, Zhao J, Guo F, Ji H, Zhang L, Jiang X, et al. Comparative Evaluation and Measure of Accuracy of ELISAs, CLIAs, and ECLIAs for the Detection of HIV Infection among Blood Donors in China. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2020;2020.
 13. Quinn B, Pearson R, Cutts J, Seed C, Scott N, Hoad V, et al. Blood donation amongst people who inject drugs in Australia: research supporting policy change. *Vox Sang*. 2020;115(3):162–70.
 14. Grubyte S, Urboniene J, Nedzinskiene L, Jelinskaite A, Zagminas K, Ambrozaitis A, et al. Prevalence, incidence and residual risk of transfusion transmitted viruses (HBV, HCV and HIV infections) in Lithuanian blood donors from 2004 to 2018: The incidence/ window-period model study. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(2 February 2021):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0246704>
 15. Gupta E, Bajpai M, Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci*. 2014;8(1):19–25.
 16. Huang W, Wei W, Shi XT, Jiang T. The analysis of the detection performance of nucleic acid testing and ELISA for HIV, HBV and HCV. *Front Lab Med* [Internet]. 2017;1(4):200–2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.flm.2017.12.004>
 17. Velati C, Romanò L, Fomiatti L, Baruffi L, Zanetti AR, Sciariada L, et al. Impact of nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus on the safety of blood supply in Italy: A 6-year survey. *Transfusion*. 2008;48(10):2205–13.
 18. Chigurupati P, Murthy KS. Automated nucleic acid amplification testing in blood banks: An additional layer of blood safety. *Asian J Transfus Sci*. 2015;9(1):9–11.
 19. Wu D, Feng F, Wang X, Wang D, Hu Y, Yu Y, et al. The impact of nucleic acid testing to detect human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus yields from a single blood center in China with 10 - years review. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2022;1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07279-5>
 20. Ju H, Lai G, Yan F. Immunoassay Introduction. In: *Immunosensing for Detection of Protein Biomarkers*. 2017. p. 1–30.
 21. Wang MY, Devare S, Liu JF, Lv XT, Yin P, Guo N, et al. Comparison of three immunoassay systems for screening of HIV infection in blood donation in China. *Ann Blood*. 2019;4(May 2016):13–13.
 22. Zhao J, Zhao F, Han W, Xu X, Wang L, Li R, et al. HTLV screening of blood donors using chemiluminescence immunoassay in three major provincial blood centers of China. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1–9.
 23. Tay MZ, Wiehe K, Pollara J. Antibody dependent cellular phagocytosis in antiviral immune responses. *Front Immunol*. 2019;10(FEB):1–18.
 24. Murin CD, Wilson IA, Ward AB. Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses. *Nat Microbiol* [Internet]. 2019;4(5):734–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0392-y>
 25. Thomson CA. IgG Structure and Function. In: *Encyclopedia of Immunobiology* [Internet]. Elsevier;

2016. p. 15–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.05002-5>
26. Rispens T, Davies AM, Ooijevaar-de Heer P, Absalah S, Bende O, Sutton BJ, et al. Dynamics of inter-heavy chain interactions in human immunoglobulin G (IgG) subclasses studied by kinetic fab arm exchange. *J Biol Chem* [Internet]. 2014;289(9):6098–109. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.541813>
27. Kim H, Chung DR, Kang M. A new point-of-care test for the diagnosis of infectious diseases based on multiplex lateral flow immunoassays. *Analyst*. 2019;144(8):2460–6.
28. Stevens KG, Pukala TL. Conjugating immunoassays to mass spectrometry: Solutions to contemporary challenges in clinical diagnostics. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2020;132:116064. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116064>
29. Tiwari AK, Upadhyay AP, Arora D, Wadhwa T, Aggarwal G, Pabbi S, et al. Head-to-head comparison of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Enhanced Chemiluminescence Immunoassay (ECLIA) for the detection of Transfusion Transmitted Disease (TTD) Markers; HIV, HCV and HBV in blood donors, in India. *J Virol Methods* [Internet]. 2020;285(August):113962. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113962>
30. Alhajj M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: *Molecular Biomechanics Handbook: Second Edition*. 2022. p. 657–82.
31. Drijvers JM, Awan IM, Perugino CA, Rosenberg IM, Pillai S. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: The Application of ELISA in Clinical Research [Internet]. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier Inc.; 2017. 119–133 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00007-2>
32. Wu J, Ju HX. Clinical immunoassays and immunosensing. *Compr Sampl Sample Prep Anal Tech Sci*. 2012;3:143–67.
33. Lin A V. ELISA: Methods and Protocols. In: *ELISA: Methods and Protocols*. 2015. p. 1–216.
34. Huang W, Wei W, Shi XT, Jiang T. The analysis of the detection performance of nucleic acid testing and ELISA for HIV, HBV and HCV. *Front Lab Med* [Internet]. 2017;1(4):200–2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.flm.2017.12.004>
35. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmun Highlights*. 2017;8(1).
36. Azim MAU, Hasan M, Ansari IH, Nasreen F. Chemiluminescence Immunoassay: Basic Mechanism and Applications. *Bangladesh J Nucl Med*. 2018;18(2):171–8.
37. Lu Y, Zheng L, Houquan Z, Sijing L, Yaozong H, Yunlon G, et al. Application of chemiluminescence immunoassay method in HIV antibody/antigen detection and analysis of confirmation cases. *J Clin Hematol*. 2022;360–563.
38. Wang C, Wu J, Zong C, Xu J, Ju HX. Chemiluminescent Immunoassay and its applications. *Fenxi Huaxue/ Chinese J Anal Chem* [Internet]. 2012;40(1):3–10. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040\(11\)60518-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040(11)60518-5)
39. Hans R, Marwaha N. Nucleic acid testing-benefits and constraints. *Asian J Transfus Sci*. 2014;8(1):2–3.
40. Rocha D, De Melo GC, Carneiro JMH, Ribeiro M, Ribeiro S, De Godoy DT, et al. Use of a NAT-based assay to improve the surveillance system and prevent transfusion-transmitted malaria in blood banks. *Malar J* [Internet]. 2020;19(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03345-y>
41. Chiquete E, Sánchez L V., Becerra G, Quintero A, Maldonado M, Panduro A. Performance of the

- serologic and molecular screening of blood donations for the hepatitis B and C viruses in a Mexican Transfusion Center. *Ann Hepatol Off J Mex Assoc Hepatol.* 2005;4(4):275–8.
42. Kleinman SH, Busch MP. Assessing the impact of HBV NAT on window period reduction and residual risk. *J Clin Virol.* 2006;36:495–512.
 43. Mabunda N, Augusto O, Zicai AF, Duajá A, Oficiano S, Ismael N, et al. Nucleic acid testing identifies high prevalence of blood borne viruses among approved blood donors in Mozambique. *PLoS One.* 2022;17(4 April):1–12.
 44. Macchi B, Frezza C, Marino-Merlo F, Minutolo A, Stefanizzi V, Balestrieri E, et al. Appraisal of a simple and effective RT-qPCR assay for evaluating the reverse transcriptase activity in blood samples from HIV-1 patients. *Pathogens.* 2020;9(12):1–9.
 45. Kurt Roth W, Schuller A, Busch MP, Reesink HW, Panzer S. International survey on NAT testing of blood donations: Expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sang.* 2012;102(1):82–90.
 46. Jackson BR, Busch MP, Stramer SL, AuBuchon JP. The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV, and HBV in whole-blood donations. *Transfusion.* 2003;43(6):721–9.
 47. Safic Stanic H, Babic I, Maslovic M, Dogic V, Bingulac-Popovic J, Miletic M, et al. Three-Year Experience in NAT Screening of Blood Donors for Transfusion Transmitted Viruses in Croatia. *Transfus Med Hemotherapy.* 2017;44(6):415–20.
 48. Busch MP, Caglioti S, Robertson EF, McAuley JD, Tobler LH, Kamel H, et al. Screening the Blood Supply for West Nile Virus RNA by Nucleic Acid Amplification Testing. *N Engl J Med.* 2005;353(5):460–7.
 49. CDC. Overview of Testing for SARS-CoV-2 | CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2020.
 50. Baruah S, Pal L. Seven Years Experience in NAT Testing of Blood Donors in a Tertiary Care Centre. *Int J Contemp Med Res [IJCMR].* 2019;6(7):4–7.
 51. Fox R, Corcorran M, Spach D. Diagnosis of Acute HCV Infection. University of Washington. 2021. p. 1–13.
 52. Busch MP, Page Shafer KA. Acute-phase hepatitis C virus infection: Implications for research, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis.* 2005;40(7):959–61.
 53. Hourfar MK, Jork C, Schottstedt V, Weber-Schehl M, Brixner V, Busch MP, et al. Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: Results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion.* 2008;48(8):1558–66.
 54. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. Detection of HIV-1 and HCV Infections among Antibody-Negative Blood Donors by Nucleic Acid–Amplification Testing. *N Engl J Med.* 2004;351(8):760–8.
 55. Kuhns MC, Busch MP. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: Nucleic acid testing versus immunoassay methods. *Mol Diagnosis Ther.* 2006;10(2):77–91.
 56. Keechilot CS, Shenoy V, Kumar A, Biswas L, Vijayrajratnam S, Dinesh K, et al. Detection of occult hepatitis B and window period infection among blood donors by individual donation nucleic acid testing in a tertiary care center in South India. *Pathog Glob Health [Internet].* 2016;110(7–8):287–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/20477724.2016.1248171>
 57. Minegishi K, Yoshikawa A, Kishimoto S, Yugi H, Yokoya N, Sakurada M, et al. Superiority of minipool nucleic acid amplification technology for hepatitis B virus over chemiluminescence

- immunoassay for hepatitis B surface antigen screening. *Vox Sang.* 2003;84(4):287–91.
58. Krajden M, Cook D, Mak A, Chu K, Chahil N, Steinberg M, et al. Pooled nucleic acid testing increases the diagnostic yield of acute HIV infections in a high-risk population compared to 3rd and 4th generation HIV enzyme immunoassays. *J Clin Virol* [Internet]. 2014;61(1):132–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.06.024>
59. Ebeid EY, Kholeif HAE, Hussein NH. Role of Nucleic Acid Test (NAT) in Detection of Transfusion Transmitted Viruses in Comparison to Other Methods. *Egypt J Hosp Med.* 2019;76(2):3542–9.
60. Arora S, Doda V. Role of signal-to-cut-off ratios of anti-hepatitis C virus antibody by enzyme immunoassays along with ID-NAT for screening of whole blood donors in India. *Asian J Transfus Sci.* 2016;10(1):75–8.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Cadena-Ullauri, S.; Gaviria, A.; Guevara-Ramirez, P.; Ruiz-Pozo, VA.; Tamayo-Trujillo, R.; Paz-Cruz, E.; Zambrano, AK. Nucleic acid amplification testing (NAT) impact on blood safety compared to Immunoassays in blood banks: A Review. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 31. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.33>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Comparative Chemical Study For Species of The *Eryngium* genus

Huda Adnan^{1*}, Aboothar Ha. Al-Edhari² 

1 Department of Ecology/ Faculty of Science/ University of Kufa/ Iraq.

2 Department of Ecology/ Faculty of Science /University of Kufa/ Iraq.

* Correspondence: Hhuuddaa19961996@gmail.com: Tel.: 07836071062

Available from: Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.40>

ABSTRACT

Five species of *Eryngium* L. (Apiaceae) native to Iraq—*Eryngium glomeratum* Lam, *Eryngium creticum* Lam, *Eryngium thyrosoideum* Boiss, *Eryngium billardieri* Lam., and *Eryngium campestre*—are the focus of this comparative chemical taxonomy. Chemical analysis revealed that the five species within the genus could be distinguished by their unique chemical signatures thanks to applying the GC Mass Spectrometer (GC-MS) technique to their secondary metabolic components. Species shared specific molecules but had distinct chemical make-ups in others. The chemical properties of the species in the genus were used to calculate Euclidean genetic distance values; the highest value was found to be 5.1962 between *E. creticum* and *E. billardieri*, and the pair with the smallest value of Euclidean distance (3.70) was *E. campestre* and *E. billardieri*. The clustering analysis was displayed in the phylogenetic tree. The species can be classified into three broad categories along a single Euclidean axis, as indicated by chemical evidence that corroborated the result of Principal Component Analysis (4.9). (PCA). The studies also demonstrated the ability to differentiate and identify evolutionary links across species by showing the independence of species in specific isolated chemicals.

Keywords: *Eryngium*; genus; Chemical taxonomic; *Lam Eryngium*, (GC-MS) technique.

INTRODUCTION

Since the beginning of creation and until now, plants have been the primary source to meet human needs in food, housing and clothing¹. Then, it classified them according to those needs, as plants constituted the most crucial aspect of human life since then, so man began studying them in a comprehensive study. With the progress of human perception and concepts, after the development of plants and the multiplicity of their types, and with the different environmental and climatic conditions, The interest of man began to focus on how to divide and arrange those plants in a way that makes it easy for him to benefit from and simplifies his use in his life². The genus *Eryngium* is a herbaceous annual, usually perennial (perennial in Iraq)³, rarely shrubs, leaves divided or whole, usually prickly or ciliary, flowers with dense heads surrounded by foliage, petals Deeply grooved with a tightly curved lobule. The petals are often white or colored. Fruits are ovate, oblate, and sometimes semi-spherical. More than 230 species of plants belong to the genus *Eryngium*, which is found in a variety of habitats around the globe (excluding regions Tropical and South Africa)⁴, where the genus

Eryngium is the most prominent in the Apiaceae family⁵. Scientist⁶ referred to the naming of the *Eryngium* species as medicinal plants in most European countries, where its roots and some of its vegetative parts were used to treat some kidney and bladder diseases⁷. It is widely spread in Greece, as blue dominates many of these lands. The roots of these plants are used in treating snakebite⁸, and their flowers are used in some Arab countries as vegetables Table 9. Both scholars¹⁰ indicated that the roots and leaves of plants of this genus are used to treat anemia colic and regulate the menstrual cycle and ascites. All living organisms contain a primary metabolism that provides plants with essential molecules (proteins, lipids, amino acids, nucleic acids and carbohydrates). Plants also produce compounds that do not come directly from photosynthesis but are derived from subsequent chemical reactions and are called these compounds with secondary metabolites¹¹. The data and chemical facts in the science of taxonomy are inseparable with the resumption of providing a vision of the relationship between plants by the internal structure; it is hoped to a large extent that these facts and chemical information will be able to reach Cytology and Genetics to compare the design of the elements of nucleic acids DNA. Thus, knowledge Inherited factors that help us in accurate diagnosis in isolating species and genera within the larger taxonomic orders; this desire arose among many researchers until the early nineteenth century. Hence, the chemical study is effectively helpful in plant taxonomy¹².

MATERIALS AND METHODS

The samples were collected in January 2022 from the herbarium (College of Education / Salah Al-Din University) in Erbil, where five samples of *Eryngium* species were obtained for study and testing.

Preparation of Plant Extract

The Sutar method was used in preparing the ethanolic solvent extract from the plant parts of the studied species as follows¹³:

Weigh 1 gm of the ground plant sample pre-dried by sunlight with a sensitive scale, wrap it in filter paper after recording the sample name symbol on it, and place it in the middle of the Soxoloth apparatus.

Analysis using a Gas ChromatographicMass Spectrometer (GC-MS)

The alcoholic extract of the plant was analyzed by a GC-MS of the type Agelint (7820A) USA GC Mass Spectrometer, which is connected to the MS Spectrometer according to the following conditions for analysis:

1. Ultra Ineit HP-5ms Column Capillary Separator 30m x 250um diameter x 0.25 um inside diameter (30m length x 250um diameter x 0.25um inside diameter) of 100% dimethyl polysiloxane that acts as an electron sniper detector.
2. The flow rate was 1 ml/min, and the carrier gas was folium gas, with a purity of 99.999%.
3. The injector temperature was 250 C.
4. GC inlet line temperature 250°C
5. The injected fluid was a volume of (1) µL
6. The temperature of the oven is programmed at 60 ° C, with an increase of 7 ° C / min, and the increase continues until it reaches 180 ° C, then increases to 280 ° C and remains stable for 7 minutes.
7. The total time is 34 minutes from starting the device until it turns off
8. The pressure inside the device was 11.933 psi
9. Scanning range 50 m/z-500
10. The injection type was Splitless

The injection type was Splitless.

The chemical compounds were diagnosed according to GC-MS mass spectrometry, and the Industrial Research and Development Organization database was used to ascertain the identity of the compound, the molecular weight, and the structure of the test components. This test was conducted in the GC-MS unit at Ibn Al-Baytar Research Center / Baghdad.

RESULTS

Color chromatography-MS analysis (GC-MS) identified 100 peaks at the top of about 3 chemical compounds in the alcoholic extract of the species under study, where each species contained 20 peaks, as shown in the figures listed below.

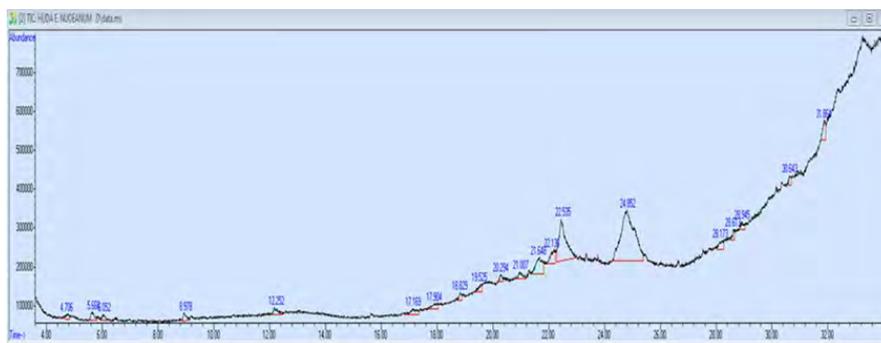


Figure 1. Stander curve for chemical compounds of the type E-glomeratum.

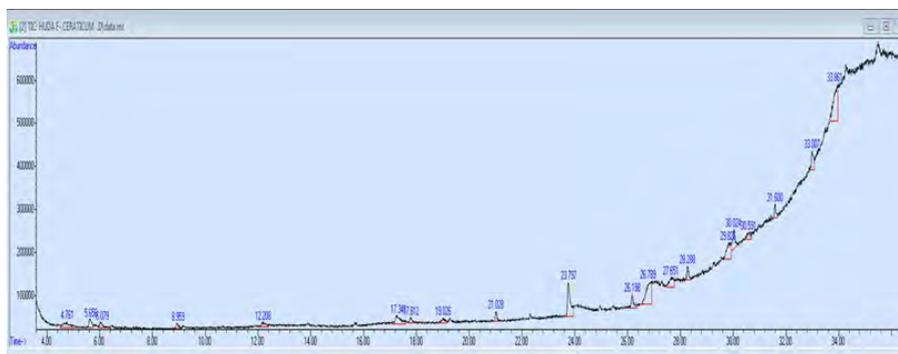


Figure 2. Stander curve for chemical compounds of type E- ceraticum.



Figure 3. Stander curve for chemical compounds of the type E- billardieni



Figure 4. Stander curve for chemical compounds of the E-Campestre

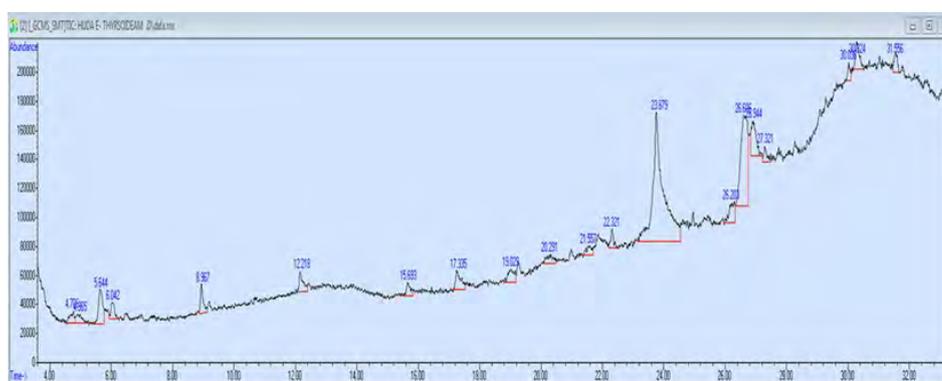


Figure 5. Stander curve for chemical compounds of the E- thyrosoideum

Table 1. indicates the common compounds between the species of the genus *Eryngium* under study based on the chemical results obtained for the species using the GC-MS technique. As it was found that *Eryngium-glomeratum* shared several chemical compounds with other species, the number reached (13) compounds, while it was unique to the other compounds, which amounted to (47) compounds. As for the species *Eryngium - creticum*, it was associated with the species under study with (16) chemical compounds, while it was unique with (44) other compounds Also, the species *Eryngium - billardieri*, when separated, showed that it shared (19) compounds with the studied species of the genus *Eryngium*, while it was isolated with several compounds that reached (41) compounds , while the type *Eryngium - campestre* showed its overlap with other types with (16) chemical compounds and its isolation with (44) other compounds Also, the type *Eryngium - thyrosoideum* contained (18) common compounds, while it contained (42) other single chemical compounds.

NO .	Compound name	<i>E.thyrosoideum</i>	<i>E.campestre</i>	<i>E.billardieri</i>	<i>E.creticum</i>	<i>E.glomeratum</i>
1	cyclopentadiene [c] furo [3,2:4,] furo [3-h] 2,3,6a,9-tetrahydro-1,3-dihydroxy-4-methoxy benzo[a]pyran-11(1H)-one			√		√
2	The Pterin-6-Carboxylic Acid	√	√	√	√	√
3	Chemical formula: 2,4,6-trimethyl-5,6-dihydro-1,3-dithiazine		√	√	√	√

4	N,N-Dimethylethanesulfonamide			√		√
5	1-Decanamine			√		√
6	1-Nitro-beta-d-arabinofuranosyl tetraacetate	√				√
7	Toluene, 4,7,7-trimethyl-, semicarbazone, bicyclo[2.2.1]heptan-2-one	√		√		√
8	Acetate of (S)-Z-13-methyl-11-pentadecen-1-ol			√		√
9	The oleic acid	√	√	√		√
10	Octadecanol, 2-methyl-, zz-313		√	√	√	√
11	1,6-Dimethyl-9- (1-methylethylidene) -5,12-dioxatricyclo[9.1.0.0(4,6)] dodecane-8-one	√				√
12	The cyclododecanol, 1-ethenyl-		√			√
13	Esters of 2,2-dimethylpropanoic acid and 2,6-dimethylnon-1-en-3-yl				√	√
14	A 3-(cyanoethyl) tetrahydrofuran -4-thiopyranone			√	√	
15	3-(4-nitrophenyl amino)indole	√	√	√	√	
16	1,3,5,7-tetramethyl-1-methoxycyclotetrasiloxane	√			√	
17	N6,N6Dimethyladenosine		√		√	
18	The 2-Cyclohexanone (dimethylhydrazine) -3-[4-hexenyl] -1-aci-nitro- (E,E)	√			√	
19	1,1,1,5,7,7,7-Heptamethyl-3,3-bis(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	√			√	
20	1,5,6,7-Tetramethylbicyclo[3.2.0] hept-6-en-3-ylideneemcarbazine		√		√	
21	Methyl ester of 11-octadecenoic acid	√			√	
22	Acyl methyl ester of 9-octadecenoic acid (Z)	√			√	

23	Methylene trans-13-octadecenoic acid	√			√	
24	2-dodecen-1-yl(-)succinate	√	√		√	
25	Chemical formula: 1-(1,5-dimethylhexyl)-4-(4-methylpentyl)-cyclohexane			√	√	
26	1-Dodecanamine	√		√		
27	1-Heptadecanamine		√	√		
28	Bromo-2-ethyl	√	√	√		
29	cis-Vaccenic acid	√		√		
30	[2](1,4)Anthraceno[2](2,6)pyridine phane-1,13-diene		√	√		
31	2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester of 9-octadecenoic acid (Z)		√	√		
32	1H-Indene,5-butyl-6-hexyloctahydro-		√	√		
33	2-Methyl-3,5-dinitrobenzyl alcohol,tert-butyl dimethylsilylether	√	√			
34	3,6-Bis-dimethylaminomethyl-2,7-dihydroxy-fluorene-9-one	√	√			

Table 1. Compounds common to the species of the genus *Eryngium*.

The results shown in Table 2. refer to the values of genetic dimensions amongst the class of the genus *Eryngium* in Iraq, based on the chemical study of the species under study using GC-MS technology. It was found that the highest Euclidean distance was (5.196) between the two species *E. billardieri* and *E. creticum* and that the lowest Euclidean distance was (3.7417) between the two species under study, *E. billardieri* and *E. campestre*.

Types	<i>E.glomeratum</i>	<i>E.creticum</i>	<i>E. billaedieri</i>	<i>E. campestre</i>	<i>E. thyrosoideum</i>
<i>E.glomeratum</i>	0				
<i>E.creticum</i>	5	0			
<i>E. billaedieri</i>	3.8	5.1962	0		
<i>E. campestre</i>	4	4.5826	3.7417	0	
<i>E. thyrosoideum</i>	4.2426	4.7958	4.4721	4.2426	0

Table 2. The Euclidean genetic distance for species of *Eryngium* is based on chemical indicators.

Figure 6 shows the cluster distribution scheme based on the results of separating chemical compounds using the GC-MS technique for the species under study in Iraq. The first significant clade included *E. creticum*, the secondary clad included *E. campestre* and *E. thyrosoideum*, and finally, the combined secondary clad of the double species. *E. billaedieri* and *E. glomeratum*.

The type clade or the secondary clade of *E. thyrosoideum* was considered the sister clade of the main clade of *E. creticum* with a complete cluster strength that reached 100% and an Euclidean distance of (4.9) distributed over the species. The secondary connective clades of the three species *E. campestre*, *E. glomeratum*, and *E. billaedieri*, in particular, were related and considered the sister clade of *E. campestre*, with a cluster strength of 90% and a Euclidean distance (4.3) between them.

As for the last clade, the most expensive sub-clade, the first was characterized by the two species *E. billaedieri* and *E. glomeratum*, with good cluster strength between them (70%) and with an Euclidean distance (3.7) between them, which was considered the brother clade associated with the clades of type *E. campestre* and with an outstanding reliability (80%). With an Euclidean distance of 3.8) between them.



Figure 6. Genetic kinship tree of the genus *Eryngium* in Iraq, according to the UPGMA

Method (14), depending on the results of the chemical study, Figure 7, a precise match with the results of the genetic kinship tree in Figure (6), as the distribution results showed the matching of the groups that make up the genetic kinship tree based on chemical indicators, which show their distribution in two groups or significant clades, the first group included the clades that contain the two species *E. billaedieri* And *E. glomeratum*. In contrast, the second group, or the second major clad, included *E. thyrosoideum*, *E. campestre* and *E. creticum* under study.



Figure 7. Genetic tree of *Eryngium* species based on chemical indicators by Neibor joining.

Table 3. indicates species occurrence in two main components, depending on the chemical indicators amongst them done Principal Component Analysis (PCA) using the PAST program. Component 1 recorded a variance rate of 38.59%, while Component 2 gave a genetic variance rate of %25.699, totaling 64.289% based on chemical indicators.

PC	Eigenvalue	% variance
1	3.78184	38.59
2	2.5185	25.699
3	1.93831	19.779
4	1.56136	15.932

Table 3. PCA component analysis based on chemical indicators.

DISCUSSION

Common chemical compounds between species

When chromatographic analysis was performed with a GC-MS device, it was possible to separate species from the genus *Eryngium* based on the number of separated chemical compounds, although there was overlap between species. Each species under study, separated by the GC-MS device, contained 60 chemical compounds that shared several compounds while they were unique to others. Furthermore, this case constitutes an evolutionary phenomenon of importance, as the participation of species of the genus in certain compounds confirms the existence of a common evolutionary link between the species in terms of chemical characteristics, and this reflects its return to one common ancestral origin, and this was confirmed by the results of previous studies on certain plant families on the taxonomic importance For chemical compounds in distinguishing plant groups, including a study ¹⁵. The species of the genus *Eryngium* growing in Iraq showed significant and many variations in terms of their content of secondary metabolites, as many compounds were extracted, purified and separated using GC-MS technology, which reached a total of (300) compounds in all studied species, and the

differences were returned. This chemical is one of the auxiliary taxonomic indications, which is on the side of the importance and one of the essential auxiliary factors in resolving much confusion and overlap between closely related species, which is difficult to distinguish between them except by using the results of different supporting studies in addition to the current molecular studies in agreement with what was reached Kremer¹⁸ who pointed out the importance of chemical separation of phenolic compounds and essential oils in isolating and characterizing *Eryngium* species from each other.

Genetic dimension values based on chemical indicators

The results shown in Table (2) refer to the values of genetic dimensions amongst the species of the genus *Eryngium* in Iraq, built on the results of the chemical study of the species under study using GC-MS technology. It was found that the highest Euclidean distance was (5.196) between the two species *E-billardieri* and *E-creticum*, and that the lowest Euclidean distance was (3.7417) between the two species under study, *E-billardieri* and *E-campestre*. The results of the current study showed that the Euclidean distance between the sexes was ok.

Genetic kinship tree among species of the genus *Eryngium* based on chemical evidence.

The effects of the current study bared that the species belonging to the genus *Eryngium* fall into one leading group despite the species being separated from each other; as for the affinity with which some species came from their isolation and distribution within secondary clades, it confirms their introversion into one genus belonging to the family Apiaceae 16. The similarity in the chemical characteristics under study is reinforced by the ordinary ancestral regression of the genus types, in addition to the fact that these species occupy one geographical area with very close environmental conditions despite their differences in many other phenotypic characteristics. However, they are genetically close to each other, which was confirmed by the chemical study¹⁷.

Analysis of the main component of *Eryngium* species based on chemical indicators

The results of the PCA (Principal Component Analysis shown in Figure (7) showed a precise match with the results of the genetic kinship tree in Figure (1), as the distribution results showed the matching of the groups that made up the genetic kinship tree based on the chemical indicators, which shows their distribution in two groups or clades. The first group included the clades containing the two species *E. billaedieri* and *E. glomeratum*. In contrast, the second group, or the second major clade, included *E. thyrosoideum*, *E. campestre* and *E. creticum* under study.

The Principal Component Analysis (PCA)

The PAST program. Component 1 recorded a variance rate of 38.59%, while Component 2 gave a genetic variance rate of %25.699, totaling 64.289% based on chemical indicators. This is a positive indication of the efficiency of the chemical evidence used in the study in diagnosing plants and the differences between the species under study and their ability to estimate the magnitude of variations at the molecular level and at the level orthogonal to the two axes and their distribution through all the studied chemical indicators, which reflects the reality of these indicators and their comprehensiveness in plant cells¹⁸. From all of the above, it became clear that it is possible to divide species, clarify the genetic Euclidean dimensions and clarify the kinship and divergence between species depending on the indicators of the chemical study, which may not

strongly support other aspects such as anatomical and molecular studies. However, fortunately, it has proven its limits in the separation and distinction and finding evolutionary links between the species of the genus *Eryngium* in Iraq.

CONCLUSIONS

From the current study, it became clear that it is possible to divide species, clarify the genetic Euclidean dimensions and clarify the kinship and divergence between species depending on the indicators of the chemical study, which may not strongly support other aspects such as anatomical and molecular studies. However, fortunately, it has proven its limits in the separation and distinction and finding evolutionary links between the species of the genus *Eryngium* in Iraq.

Author Contributions: Conceptualization, Huda Adnnan; Aboothar Ha. Al-Edhari and Huda Adnnan; validation, Huda Adnnan; formal analysis, Huda Adnnan; data curation, Huda Adnnan; writing original draft preparation, Aboothar Ha. Al-Edhari; writing review and editing, Huda Adnnan; supervision, Aboothar Ha. Al-Edhari; project administration, Huda Adnnan; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript."

Funding: "This research received no external funding."

Institutional Review Board Statement: In this section, "Not applicable."

Informed Consent Statement: We permit you to publish this article

Data Availability Statement: All data is available by the first author

Acknowledgments: I thank God abundantly for granting me success and assistance in completing this message and crowning my efforts with righteousness. I extend my deepest thanks and great gratitude to those with rights and merits, especially to my professor, Assistant Professor Dr. Abu Dhar Hatem Majid Al-Adhari. It gives me great pleasure to thank the teacher, Dr. Haider Aziz Al-Shibli, for his tireless efforts with me throughout the research period. I also extend my sincere thanks and gratitude to the Deanship of the College of Education / Salahaddin University in Erbil for allowing me to take the samples used in the study.

Conflicts of Interest: There is not any conflict of interest.

REFERENCES

1. Thiem, B. M; Kikowska, A. D ; Kurowska, Kalemba, Essential Oil Composition of the Different Parts and In Vitro Shoot Culture of *Eryngium planum* L. 2011
2. Al-Edhari, AS; Anatomical, Chemical and Molecular Systematic Study for The Genera *Aristida* L., *Stipagrostis* Nees . and *Stipa* L. in the Poaceae (Gramineae) Family in Iraq, 2015, 451.
3. Lajnef, H. F; Pasini, J.Politowicz,. Lipid characterization of *Eryngium maritimum* seeds grown in Tunisia. Ind. Crops Prod. 2017, 105, 47–52

4. Conea, S., Parvu, A. E., Taulescu, M. A., & Vlase, L. Effects of *Eryngium planum* and *Eryngium campestre* extracts on ligature-induced rat periodontitis. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2015, 10(2), 693-704.
5. Kupeli, E.M; Kartal, SE; Aslan, Yesilada, J *Ethnopharmacol*, 2006, 107(1), 32.
6. Guest, E. Notes on plants and plant products with their colloquial names in Iraq. Bull. No. 27. Government Press, 1933.
7. T. Jebril, N., Boden, R., Braungardt, C. Remediation Technique For Cadmium Contaminated Groundwater: A Systematic Review. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 1-18. doi: 10.32649/ajas.2023.178800.
8. Kikowska M.B; Thiem In vitro systems of selected *Eryngium* species (*E. planum*, *E. campestre*, *E. maritimum*, and *E. alpinum*) for studying production of desired secondary metabolites (phenolic acids, flavonoids, triterpenoidsaponins, and essential oil). Springer, Cham, 2020.
9. M. Ajeel, A.; A. Mehdi, L. . Effect Of *Eruca Sativa* Seeds Powder As Feed Supplementation On Some Physiological Traits Of Male Lambs. *Journal of Life Science and Applied Research*. 2020, 1, 20-30.
10. Al-Rawi, A.H; Chakravarty. L. Medicinal Plants of Iraq Ministry of Agriculture & Irrigation, state board for agricultural & water resources research, National Herbarium of Iraq, Baghdad 1964, 41 .,
11. Gibbs, R.D ; History of Chemical Taxonomy. 1963 PP: 41-88 in Swain, T . (ed.), *Chemical Plant taxonomy*. London,
12. Ibraheem M W, Muhaimed A R, Mohammed Th. T. Leg cuts from Awaasi lambs fed a diet with varying levels of *Rhus coriaria* L., Physical dissection and chemical composition. *Revis Bionatura* 2022;7(4) 4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.4>.
13. Sutar, N. R ;Garai, U.S ; Sharma, & Sharma, U. K. Anthelmintic activity of *Platyclusorientalis* leaves extract. *International Journal of Parasitology Research*, 2010. 2(2), 1-3.
14. Bibani, N. M. S., Khidhir, Z. K., Shaker, A. S., Kirkuki, S. M. S. & Abdulateef, S. M. Analyses of mycotoxins in broiler's local and imported feeds. *Iraqi J. Vet.2019 Sci*. 33.
15. Hilu, KW; De Wet, JM, and Seigler, D. Flavonoid Patterns and Systematics in *Eleusine* , *Biochemical Systematics and Ecology* , 1978 , 6:247-249.
16. Berenbaum, M. R. Chemical mediation of coevolution: phylogenetic evidence for Apiaceae and associates. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2001, 45-59.
17. Hamad, H.M., Shabeeb, Z.A., Awad, M.M. Expressions of CD274 (PD-L1) and CD47 receptors on the surface of blast cells in AML patients (2022) *Iraqi Journal of Science*, 63 (6), pp. 2373-2387..
18. Kremer, D. ;Marijana, Z.K. ; Ivan. K. ; Iztok , J.K. , Tanja, P.; Andreja, C.; Sinisa, S.; Valerija, D. and Elma; V. Phytochemical Trants and Biological Activity of *Eryngiumamethystinum* and *E.alpinum* (Apiaceae) *Horticulurae*, 2021, 7.364.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 November 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Adnan, H.; Aboothar, H. Comparative Chemical Study For Species Of The *Eryngium* genus. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 40. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.40>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Isolation and Identification of Fungal Species from the Insect Pest *Callosobruchus maculatus* (F.)

Noor Akmoosh ^{1*}, Ekhlash Al-Shareefi², Kawther Mohammed Ali³

¹ University of Babylon / Babylon/ Iraq; noorn6042@gmail.com; +9647818198773.

² University of Babylon / Babylon/ Iraq; wsci.ikhlass.m@uobabylon.edu.iq; +9647822114389

³ University of Babylon / Babylon/ Iraq; kawtherali1972@yahoo.com; +9647800351337

* Correspondence: wsci.ikhlass.m@uobabylon.edu.iq; Tel.: (+9647822114389)

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.41>

ABSTRACT

Cowpea seed beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) is one of the most common and economically important pests of stored cereal products worldwide. Furthermore, these beetles can act as vectors for several fungal post-harvest diseases. The current research aimed to isolate the fungi associated with adults of *C. maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). The present study aimed to isolate and identify fungi associated with adult insects and evaluate their potential as biocontrol agents against the cowpea beetle, *C. maculatus*. In this study, we collected *C. maculatus* adults from the Babylon local market and five regions (Hilah, Mahaweel, Al-Mashrou', Al-Haswa and Al-Musayyab) with no history of insecticide exposure. A potato dextrose agar medium was used to isolate the fungi attached to the surfaces of adult beetles. By Morphological and microscopic examination, Molecular identification and Sequencing analysis, Twenty-seven genera of fungi were isolated and identified from adult *C. maculatus*, including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida spp*, *white mycelium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Stachybotrys*, *Rhizopus*, *Drechslera*, *Scopulariopsis*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Geotrichum candidum*, *Streptomyces*, *Sarocladium*, *Beauveria bassiana*, *Talaromyces varians*, *Sporothrix flocculasa*, *Pseudozyma flocculasa*, and *Isaria fumosorosea*. The molecular weights of the PCR products for the fungi isolates ranged from 650-700 bp, and the amplified ITS1-5.8S-ITS4 rDNA region of indigenous entomopathogenic fungal isolates showed a high sequence similarity (99-100%) with *B. bassiana* and *M. anisopliae* deposited in the NCBI Genebank. The phylogenetic tree analysis of the ITS region sequences showed a high degree of similarity between the isolates under study, ranging from 96.5-100. However, there were differences in the lines among clades, indicating genetic variation possibly due to mating or mutations in different environments. Our study suggests that the storage pest, *C. maculatus*, would be essential in spreading fungal contaminants and consequently increasing mycotoxin contamination in stored Cowpea.

Keywords: *Callosobruchus maculatus*, Isolation, Fungi

INTRODUCTION

Controlling pests in stored grains is as economically important as increasing the crop yield because, unlike crop damage during the growing season, post-harvest damage of stored grains is not financially compensated. Fungi and animal pests are the primary culprits for damage to stored grains, globally estimated to be responsible for 20% of food losses and up to 40-50% in some developing countries²³. Cowpea seed beetle *C. maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) is one of the most destructive pests on Cowpea and other legumes growing in tropical and sub-tropical countries, both in fresh green crusts in fields and in stored seeds²¹. The adults are not harmful. But, the larvae of this pest feed on Cowpea *V. unguiculata* (L.), chickpea, *Cicer arietinum* L.,

lentil, *Lens culinaris* (Medik.), soybean, *Glycine max* (Mer.), and haricot beans, *Phaseolus vulgaris* (L.)¹⁷. The female adults of *C. maculatus* lay their eggs in the fresh cowpeas before reaping in the field. The larvae, hatched from these eggs, bore into the cowpea seeds, developed by feeding the embryo of the sources and matured just about a month in storage conditions⁸. Therefore, the larvae can lead to both quantitative, due to grain weight loss caused by larvae feeding, and qualitative, due to product alterations such as loss of nutritious and aesthetic values, which increases the loss level in the cowpea grain mass^{1, 19}. Therefore, this pest requires great care due to the potential for severe damage.

Various researchers have isolated fungal species from insects. Burnside⁶ isolated *A. flavus*, *A. niger* and *P. corylophilum* from bees. Gillian and Prest¹⁰ and Gillian et al.¹¹ also isolated various fungi from bees, identifying the species *A. niger*, *A. flavus*, *P. corylophilum*, *C. cladosporoides* and *Alternaria* sp.

Recently, Rehner & Buckley²⁰ used two DNA regions, rDNA ITS-5.8s and elongation factor EF1- α , and compared 86 isolates of *Beauveria* from around the world and from several hosts. In addition to the original isolate from Scottish soil, they found a Swiss isolate labeled *B. bassiana* (ARSEF 1567) from a scolytid beetle grouped in *B. caledonica*. Similarly, an isolate classified as *B. amorpha* (ARSEF 2251), also grouped in *B. caledonica* was originally from a coleopteran insect in Brazil. This suggests that *B. caledonica* has the potential to be an insect pathogen¹².

MATERIALS AND METHODS

Samples Locations

Cowpea samples infested with cowpea seed beetle *C. maculatus* (F.) were collected from the local market in Babylon and for five regions (Hilah, Mahaweel, Al-Mashrou', Al-Haswa and Al-Musayyab), with no history of exposure to insecticides.

Ready-made dextrose potato medium

According to the manufacturer's instructions, this medium is prepared by suspending 39 gm of the medium in 1000 ml of distilled water with 250 mg of chloramphenicol that prevents bacteria growth and sterilizes by autoclave at 121°C and 15 lbs pressure. Soak for 20 minutes; after the end of the sterilization period, leave the beaker until it cools down to 50 °C, then pour the nutrient media into Petri dishes with a diameter of 9 cm and put them in the refrigerator until they are used for isolation, cultivation and reproduction of the fungi used in study²⁴.

Isolation of fungi from adult insects

To isolate pathogenic fungi from the insects, the insects are sterilized with ethyl alcohol (70%) to remove the fungus on the external surface for one minute. Then they are washed with distilled water and then sterilized with a solution of sodium hypochlorite NaOCl (1%) for 30 second, then washed with distilled water and placed on filter papers and then transferred by sterile forceps to the PDA medium at the rate of three replications, where five insects were placed In each repetition. The dishes were incubated at a temperature of 27 ± 2 for a period of 5-7 days; after that, the fungal isolates were purified on a new nutrient medium by taking a 0.3 cm diameter disc from the edge of the fungal colonies and transferred this disc by the sterilized needle to the center of a plastic petri dish containing 20 mm of PDA medium, and the plates were incubated at a temperature of 27 ± 2 for 5-7 days. After incubation and identification, the percentages of frequency and appearance of isolated fungi were calculated according to the following equation: -

Percentages of frequency = Number of isolates per species/ Total Number of isolates of all species * 100

Percentages of appearance = Number of formations in each species of all samples/ Total Number of samples * 100

Morphological and microscopic examination

After appearance growth and examining colonies of fungi concerning color, shape and texture (Powdery, Granular, Cottony) as recorded, pigments are discussed on the colony surface appearance on the foundation. Fungi isolates are examined microscopically, and the fingerprint of the fungi in the colony is taken by adhesive tape; transparent adhesive tape is used, touches the surface of the fungal colonies and then the tape on a glass slide containing a drop of lactophenol cotton blue. Slides examined under magnification 10X, 40X and 100X as described³⁰.

Molecular identification

Fungal genomic DNA was extracted from mycelia by using a Favorgen kit. The internal transcribed spacer with 5.8 s rDNA was amplified using ITS5/ITS4 universal primer for fungal isolates was used. The PCR mixture was prepared according to table (1) and augmented on the current System of cycler PCR (Labnet, USA) by conditions in table (2).0; (Pitt and Hocking, 2013; Rai, 2016). The products of PCR were run on 1.5% agarose gel, and electrophoresis was made at 70 V for 30 min. The gel was pre-stained with 0.05% ethidium bromide. The PCR bands were noticed by using an ultraviolet transilluminator.

No.	Chemical materials	Volumes (µl)
1.	Master Mix	12 µl
2.	Forward Primer	1 µl
3.	Reveres Primer	1 µl
4.	DNA	1-2 µl
5.	Deionizer D. W	Adjusted the volume to 25 µl
	Total mix	25 µl

Table 1. PCR mixture

No.	Steps	Temp.	Time	cycles	Cool stage
1.	Primary denaturation	95 C	Min. 5		
2.	Denaturized	95 C	30 sec	30	
	Annealing	56 C	1.5 Min		
	Extension	72 C	1 Min		
3.	Final extension	72 C	10		4C

Table 2. PCR conditions

Sequencing analysis

Ten isolates of fungal species from this study PCR products are subjected to sequencing analysis. Direct sequencing analysis was performed on the 20 µl PCR product of AFU5S primer, sent to the Macrogen Laboratory in Korea. Afterward, the DNA sequencing data for different fungi isolates are compared with the gene bank using the NCBI Blast nucleotide database.

Phylogenetic tree

The phylogenetic tree is analyzed by using Mega version 6 software program with an unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) tree type based on sequences data of fungal species amplified by ITS5/ITS4 primer for 10 isolates.

RESULTS

Isolation of fungi from adult insects

The results indicate (table 3) that the highest occurrence of isolated fungi from *C. maculatus* was observed in the fungus *A. niger*, with a rate of 46.05%, followed by *Penicillium* sp. and *A. flavus*, which had occurrence rates of 12.91% and 12.33%, respectively. On the other hand, *Aspergillus nidulans* and *Pseudozyma flocculosa* had the lowest occurrence rates, at 0.15% and 0.16%, respectively, among the other isolated fungi. The remaining fungi showed varying occurrence rates ranging from 0.22% to 5.16%.

The results also showed that the highest percentage of occurrence was found in the fungi isolated from *C. maculatus* males, specifically those isolated from the Al-Musayyib region (3.72%), followed by the Al-Hilla and Al-Mahawil regions, where the fungal presence was recorded at 3.70% in each. At the same time, the fungi isolated from *C. maculatus* female showed an occurrence rate of 3.69% among all insect samples collected from the study locations (Al-Musayyib, Al-Hassoah, Al-Mishrak, Al-Mahawil, and Al-Hilla). Among the fungi isolated from *C. maculatus* in this study, two fungi, namely *B. bassiana* and *I. fumosorosea*, were selected as biological agents for conducting further experiments.

NO.	The location Fungus species	Al-Hilla		Al-Mahaweel		Al-Mashrou'		Al-Haswa		Al-Musayyab		Mean
		The percentage of occurrence of fungal species in Males & Females										
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	
1	<i>Aspergillus niger</i>	40	26.3	28	34.9	50	41.4	87.1	60.3	46.9	45.6	46.05
2	<i>Aspergillus terreus</i>	0	1.7	8	0	0	0	2.5	11.1	8.1	0	3.14
3	<i>Aspergillus flavus</i>	15	22.8	4	15.8	20.4	9.7	0	6.3	9.8	19.5	12.33
4	<i>Aspergillus chevalieri</i>	0	3.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0.35
5	<i>Aspergillus candidus</i>	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
6	<i>Aspergillus nidulans</i>	0	0	0	1.5	0	0	0	0	0	0	0.15
7	<i>Aspergillus tamarii</i>	0	0	0	0	6.8	0	0	0	0	0	0.68
8	<i>Penicillium</i>	10	19.2	16	7.9	9	26.8	2.5	9.5	19.6	8.6	12.91
9	<i>Candida</i> spp	0	1.7	4	0	0	0	5.1	3.1	0	6.5	2.04
10	White mycelium	7.5	0	4	0	0	2.4	0	3.1	0	0	1.7

11	<i>Curvularia</i>	5	0	0	1.5	0	0	0	0	0	0	0.65
12	<i>Cladosporium</i>	7.5	8.7	4	3.17	0	12.1	0	0	3.2	0	3.867
13	<i>Chaetomium</i>	0	7	0	14.2	0	0	0	0	0	0	2.12
14	<i>Stachybotrys</i>	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.75
15	<i>Rhizopus</i>	0	0	12	4.7	11.3	7.3	2.5	6.3	3.2	4.3	5.16
16	<i>Drechslera</i>	0	0	8	6.3	0	0	0	0	0	0	1.43
17	<i>Scopulariopsis</i>	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4.3	0.83
18	<i>Paecilomyces</i>	0	0	0	3.1	0	0	0	0	0	0	0.31
19	<i>Mucor</i>	0	0	0	0	2.2	0	0	0	0	0	0.22
20	<i>Geotrichum candidum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.5	0.65
21	<i>Streptomyces</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	8.1	0	0.81
22	<i>Sarocladium</i>	2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25
23	<i>Beauveria bassiana</i>	5	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0.67
24	<i>Talaromyces varians</i>	0	0	0	4.7	0	0	0	0	0	0	0.47
25	<i>Sporothrix flocculasa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.3	0.43
26	<i>Pseudozyma flocculasa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1.6	0	0.16
27	<i>Isaria fumosorosea</i>	0	0	8	1.5	0	0	0	0	0	0	0.95
	The total	40	57	25	63	44	41	39	63	61	46	
	Mean	3.70	3.69	3.70	3.68	3.69	3.69	3.69	3.69	3.72	3.69	

Table 3. Percentages for the emergence of fungal species in males & females of *C. maculatus* adults.

Molecular diagnosis of Fungi

DNA extraction and PCR assay

Ten isolates of fungi species in this study were subjected to DNA extraction. The ITS5 and ITS4 are universal primer pairs that targeted the sequences place of the ITS1-5.8S-ITS2 gene of the fungi isolates, which was used to discriminate fungi to the species level. The molecular weights of the PCR products for the fungi isolates under study ranged from 650-700 bp., as there are apparent differences in the molecular weight of fungi species when ITS5 and ITS4 primers were used. Fig shows agarose gel electrophoresis of PCR products for fungi species.

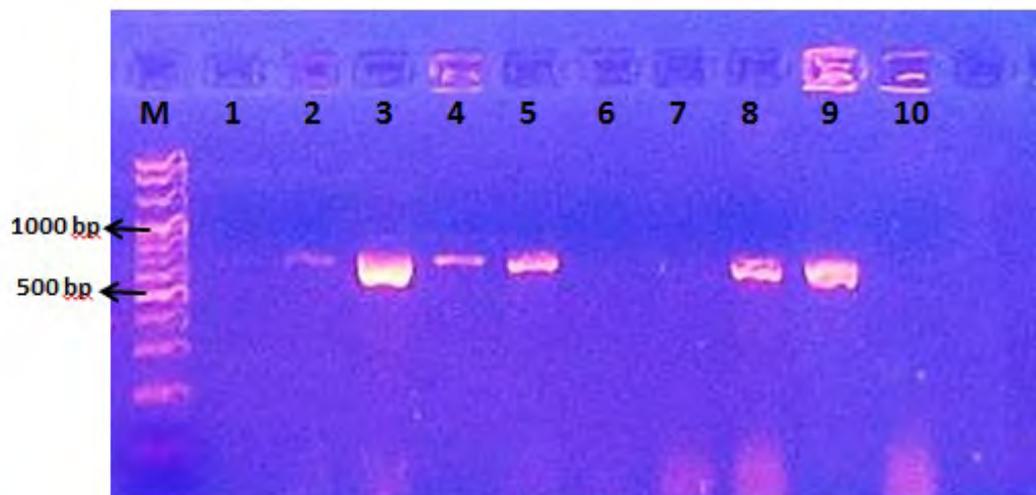


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products for ITS1-5.8S-ITS2 gene of fungi species. Lane M= molecular marker 1500 bp.

Sequencing analysis

PCR was done for ten fungi isolates for the ITS region; direct sequencing analysis was performed on the 20 μ l PCR product of the ITS region, which was sent to the Macrogen Laboratory in Korea. After obtaining the sequence of the nitrogenous bases of the sent isolates, they are matched with the series of reference samples in the gene bank using the NCBI Blast Nucleotide Database to confirm the highest proportion of the genus and species name for each isolate.

Table (4) shows the Results of molecular diagnosis for fungi isolates under study comparison with reference strains in NCBT by Telomorphe name, and the Anamorphe name offsets it. The table showed that the molecular diagnosis using the nitrogenous bases sequence of some samples was identical to the phenotypic diagnosis using traditional laboratory methods except for several isolates; some have not been diagnosed with conventional species-level approaches, which are analyzed by molecular methods.

No.	Molecular diagnosis		Reference strains	Final Diagnosis (Anamorphe)
	NCBT strain (Telomorphe)	Identities		
1.	<i>Sarocladium</i> sp.	100%	MG279089.1	<i>Acremonium</i> sp.
2.	<i>Sarocladium subulatum</i>	100%	MG589575.1	<i>Acremonium</i> sp.
3.	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	99%	OQ612703.1	<i>Sporothrix flocculosa</i>
4.	<i>Aspergillus flavus</i>	99%	MH237625.1	<i>Aspergillus flavus</i>
5.	<i>Talaromyces varians</i>	99%	MH856408.1	<i>Penicillium varians</i>
6.	<i>Talaromyces varians</i>	99%	KC962109.1	<i>Penicillium varians</i>
7.	<i>Beauveria bassiana</i>	98%	KX376473.1	<i>Beauveria bassiana</i>

8.	<i>Beauveria bassiana</i>	99%	MT528790.1	<i>Beauveria bassiana</i>
9.	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	100%	OW984012.1	<i>Sporothrix flocculosa</i>

Table 4. Results of molecular diagnosis for fungi isolates under study comparison with reference strains in NCBI.

Phylogenetic tree

The phylogenetic tree was analyzed by using Mega 6 software program with an unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) tree type based on sequences data of ITS region amplified by ITS5/ITS4 primers pair for 9 isolates. The results of phylogenetic tree analysis for entomopathogenic fungi were observed in five groups. *T. varians*, *B. bassiana*, *P. flocculosa*, *A. flavus* and *Sarocladium* sp. (Figure 2).

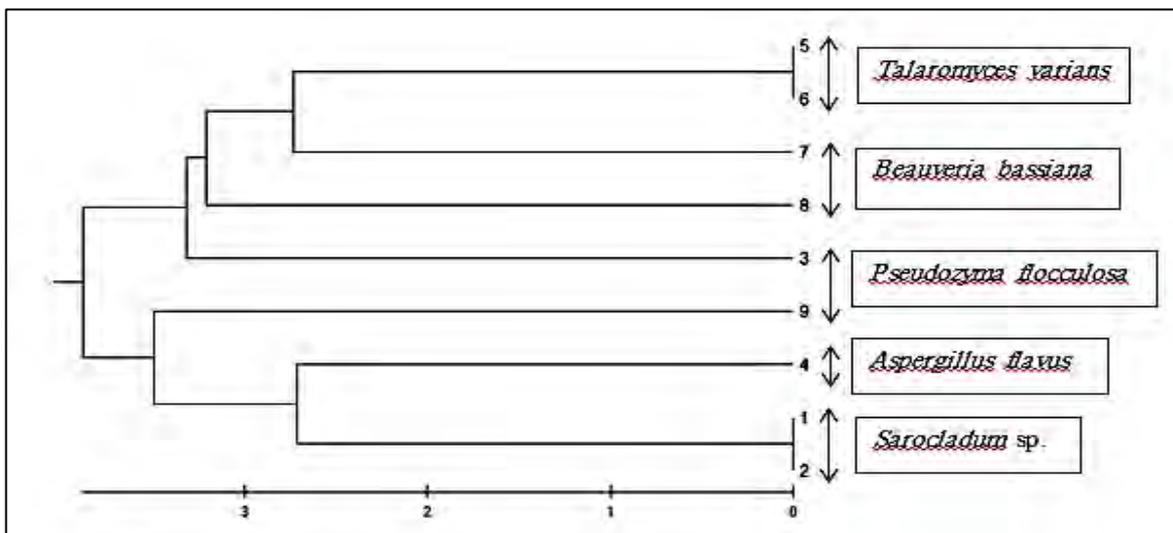


Figure 2. Phylogenetic tree based on ITS region sequences for Fungi isolates understudies.

Drawing the phylogenetic tree of the ITS region sequences for the isolates under study shows a high degree of similarity between species, ranging from 96.5 to 100 %. The difference in sequence among any clades offers approximately 0.0-3.5 %. The weighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) tree type was a common type of phylogenetic tree to determine the diversity of pathogenic fungi. Therefore, many studies have used this type of tree.

DISCUSSION

Isolation of fungi from adult insects

Twenty-seven genera of fungi were isolated and identified from adult *C. maculatus*, including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* spp, white mycelium, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Stachybotrys*, *Rhizopus*, *Drechslera*, *Scopulariopsis*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Geotrichum candidum*, *Streptomyces*, *Sarocladium*, *Beauveria bassiana*, *Talaromyces varians*, *Sporothrix flocculosa*, *Pseudozyma flocculosa*, and *Isaria fumosorosea*.

Most of them belonged to *Aspergillus*, from which seven species were isolated. The reason for this is that *Aspergillus* possesses small reproductive units in large numbers, allowing for long-distance dispersal and the ability to form specific structures to resist unfavorable environmental conditions for its growth²⁵. These findings are consistent with²⁶, who isolated several fungal genera from the mosquito *Gx. quinquefasciatus*, including *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Trichoderma*. These results also agreed with²³, who isolated several fungal genera from the *Tribolium castaneum*, including *Aspergillus spp.*, *Cladosporium spp.*, *Hyphopichia burtonii*, *Penicillium spp.*, *Mucor spp.*, *Rhizopus spp.*, *Cephalophora spp.*, *Alternaria alternate*, *Monascus sp.*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Beauveria*, *Chaetomium*, *Coprinellus*, *Irpex*, *Lichtheimia*, *Trichoderma*, *Byssoschlamys*, *Cochliobolus*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Polyporales*, *Rhizomucor* and *Talaromyces*

Among the fungi isolated from *C. maculatus* insects, two fungi, *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea*, were found. These fungi were utilized as biological agents in this study for insect control, as they have been used to combat various insects.

The selection of *B. bassiana* in the current study agreed with Ozdemir et al.'s²⁷, who used *B. bassiana* in combating the insect *C. maculatus*, additionally, *I. fumosorosea* was chosen to control the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), which is consistent with the findings of the current study on biological control.

Molecular diagnosis of Fungi

The molecular weights of the PCR products for the fungi isolates under study ranged from 650-700 bp. As there are apparent differences in the molecular weight of fungi species by ITS5 and ITS4 primers were used, this agrees with most references that used ITS1-5.8S-ITS2 region of fungal rDNA by ITS5 and ITS4 primer²².

While several references were used for ITS1 and ITS4 primer for ITS1-5.8S-ITS2 region of fungal rDNA to identify, entomopathogenic fungi [5,18,4] were isolated twenty-one entomopathogenic fungi, the resulting from the electrophoresis of the PCR product using the universal primer for the amplification of ITS rRNA gene of bands with a size of 650 bp. Also, Gebremariam *et al.*,⁹ used ITS1 and ITS4 primer to identify *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with a band size of 545 bp. for two species. In another study¹⁵, for the first time, the primer binding site (PBS) marker system was used to discriminate among the entomopathogenic fungi species successfully.

The PCR sequencing of the ITS region of rRNA is currently regarded as the standard method for phylogenetic analyses and identification of fungal species. It provides an excellent tool for identifying fungi species that do not present typical morphological characteristics^{28,14}.

Some studies were using sequence analysis of ITS region by using ITS1 and ITS4 primers or ITS5 and ITS4 primers for identification of entomopathogenic fungi such as Imoulan *et al.*,¹³ were isolated and identified several species of *Beauveria*. Species identification using only the ITS region of rDNA as a DNA barcode reached its resolution limit within *Beauveria*. While Lu *et al.*,¹⁶ four entomopathogenic fungi strains were isolated and identified as *Lecanicillium attenuatum*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium longisporum*, and *Akanthmyces lecanii* based on rDNA-ITS sequence analysis. Also, Yang *et al.*,²² isolated four genes of entomopathogenic fungi from soil samples collected from different localities of southern China as *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea*, *Aspergillus nomius* and *Akanthmyces attenuatus*.

Results of the phylogenetic tree coincided with several recent studies that show a high degree of similarity and homogeneity in the ITS region among entomopathogenic fungi. Al-Shindah *et al.*,²⁹ isolated twenty-one different fungal isolates from samples of infected insects from other areas in Salah El-Din Governorate in Iraq. They showed the similarity percentage between the isolates of entomopathogenic fungi and their conformity

with the globally registered fungal species in NCBI. The similarity ratio reached 97.51 - 99.80% with the globally registered strains, confirming the diagnosis's accuracy. While Gebremariam *et al.*,⁹ used sequences of ITS1-5.8S-ITS4 rDNA region of all indigenous entomopathogenic fungal isolates showed 99–100% sequence similarity with *B. bassiana* and *M. anisopliae* deposited in NCBI/Genebank.

Although there is a high similarity to the fungi isolates in this study in matching the nucleotide sequences, they are genetically different isolates because the match was not 100%. This may be due to matings or mutations in fungi due to their presence in different environments^{2,3}.

CONCLUSIONS

Twenty-seven genera of fungi were isolated and identified from adult *C. maculatus*, including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida spp*, *white mycelium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Stachybotrys*, *Rhizopus*, *Drechslera*, *Scopulariopsis*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Geotrichum candidum*, *Streptomyces*, *Sarocladium*, *Beauveria bassiana*, *Talaromyces varians*, *Sporothrix flocculasa*, *Pseudozyma flocculasa*, and *Isaria fumosorosea*

The molecular weights of the PCR products for the fungi isolates ranged from 650-700 bp, and the amplified ITS1-5.8S-ITS4 rDNA region of indigenous entomopathogenic fungal isolates showed a high sequence similarity (99-100%) with *B. bassiana* and *M. anisopliae* deposited in the NCBI Genebank. The phylogenetic tree analysis of the ITS region sequences showed a high degree of similarity between the isolates under study, ranging from 96.5-100. However, there were differences in the lines among clades, indicating genetic variation possibly due to matings or mutations in different environments

Two fungi, *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea*, were selected as biological agents based on their occurrence rates in male and female *Callosobruchus maculatus* adults.

Funding: This research received no external funding

Data Availability Statement: Data Availability Statements in the "Bionatura Research Data Policies" section at <https://www.revistabionatura.com/policies.html>.

Acknowledgments: The authors would like to thank all the Advanced Mycology Laboratory at the College of Science for Women / University of Babylon for their collaboration.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Al Shareefi, E., & Cotter, S. C. (2019). The nutritional ecology of maturation in a carnivorous insect. *Behavioral Ecology*, 30(1), 256-266.
2. Al-Abedy A.N.; Abu Dakka A.B.; Al-Ghazali N.A. and Ali U.A. (2018). Molecular diagnosis of isolates belonging to the fungi *Rhizoctonia*, *Fusarium* *Penicillium tardochrysoygenum*, *Fusarium solani* and *Verticilliodes* isolated from the roots of some tomato plants *lycopersicum solanum*. *Karbala Journal of Agricultural Sciences*). 5(2).
3. Al-Jawer Z.W.; Ahmed K.D. and Al-Shukurji M.A. (2018). Molecular identification of local isolates of the fungus *Aureobasidium pullulans*. *The Journal of Mesopotamian Sciences*, 27 (4) / Issue of the Third Conference on Life Sciences from 126-115.

4. Al-Shindah1R.S.D.; Hassan A.A. and Mansour M.S. (2022). Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungi from of Green Peach Aphid *Myzus Persicae* and Evaluation of Their Activity for Insect Control. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.
5. Bich G.A.; Castrillo M.L.; Kramer F.L.; Villalba L.L. and Zapata P.D. (2021). Morphological and Molecular Identification of Entomopathogenic Fungi from Agricultural and Forestry Crops. *Floresta e Ambiente*; 28(2): 1-11.
6. Al-Abedy A.N.; Kadhim J.H; Abdalmoohsin R.G; Al-Taey DK. Genetic diversity of *Tomato yellow leaf curl virus* isolates and the effect of virus on the hormones content of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *research on Crops*. 2021;22(2):347-55.
8. Fox, C. W., & Tatar, M. (1994). Oviposition substrate affects adult mortality, independent of reproduction, in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Ecological Entomology*, 19(2), 108-110.
9. Gebremariam A.; Chekol Y., and Assefa F. (2021). Phenotypic, molecular, and virulence characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide. *Heliyon*, 7.
10. Gilliam, M., & Prest, D. B. (1972). Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 20(1), 101-103.
11. Gilliam, M., Prest, D. B., & Morton, H. L. (1974). Fungi isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2, 4-D and antibiotics. *Journal of invertebrate pathology*, 24(2), 213-217.
12. Glare, T. R., Reay, S. D., Nelson, T. L., & Moore, R. (2008). *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. *Mycological Research*, 112(3), 352-360.
13. Imoulan A.; Hussain M.; Kirk P.M.; El Meziane A. and Yao Y. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20 (4): 1204-1212.
14. Kawasaki M (2011). Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses. *Medical Mycology* 52:291–295.
15. Kushiyevev R.; Tunçer C.; Özdemir I.O.; Erper I.; Kalendar R.; Alkan M. and Özer GT. (2022). Molecular Characterization of Native Entomopathogenic Fungi from Ambrosia Beetles in Hazelnut Orchards of Turkey and Evaluation of Them in Vitro Efficacy. *Insects* 13:1-17.
16. Lu Q.; Wang P.; Ali A. and Zang L.S. (2022). Molecular Identification and Virulence of Four Strains of Entomopathogenic Fungi Against the Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 115, (3): 731–738.
17. Mahfuz, I., & Khalequzzaman, M. (2007). Contact and fumigant toxicity of essential oils against *Callosobruchus maculatus*. *University Journal of Zoology, Rajshahi University*, 26, 63-66.
18. Mohammed A.A.; Ahmed F.A.; Younus A.S.; Kareem A.A. and Salman A.M. (2022). Molecular identification of two entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* strains and their efficacy against two aphid species in Iraq. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20 (67): 1-8.
19. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>

20. Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84-98.
21. Singh, S. R., & Emden, H. V. (1979). Insect pests of grain legumes. *Annual review of Entomology*, 24(1), 255-278.
22. Suwaid, A. H. .; Rashid, M. A. .; Taha, M. M. . Genetic Analysis For Combining Ability And Estimation Of Some Genetic Parameters Of Yield And Its Components In Maize Using Half Diallel Cross. *Journal of Life Science and Applied Research*. 2020, 1, 60-64.
23. Yun, T. S., Park, S. Y., Yu, J., Hwang, Y., & Hong, K. J. (2018). Isolation and identification of fungal species from the insect pest *Tribolium castaneum* in rice processing complexes in Korea. *The plant pathology journal*, 34(5), 356.
24. Griffith, G. W., Easton, G. L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., Worgan, H. J., ... & Perkins, W. T. (2007). Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS microbiology letters*, 276(2), 165-171.
25. Samson, R. A., Evans, H. C., & Latge, J. P. (1988). *Atlas of entomopathogenic fungi* Springer. Verlag., Berlin, Heidelberg, New York, 1-187.
26. Govindarajan, M., Jebanesan, A., & Reetha, D. (2005). Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Tropical biomedicine*, 22(1), 1-3.
27. Ozdemir, I. O., Tuncer, C., Erper, I., & Kushiyevev, R. (2020). Efficacy of the entomopathogenic fungi; *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-5.
28. Cafarchia, C., Iatta, R., Latrofa, M. S., Gräser, Y., & Otranto, D. (2013). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infection, Genetics and Evolution*, 20, 336-351.
29. Al-Shindah, R. S., Hassan, A. A., & Mansour, M. S. (2022, July). Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungi from Green Peach Aphid *Myzus Persicae* and Evaluation of Their Activity for Insect Control. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1060, No. 1, p. 012093). IOP Publishing.
30. Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A., & Pitt, J. I. (2006). Important mycotoxins and the fungi that produce them. *Advances in food mycology*, 3-31.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 November 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Akmoosh N, Al-Shareefi E, Mohammed Ali K. Isolation and Identification of Fungal Species from the Insect Pest *Callosobruchus maculatus* (F.). *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 41.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.41>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

The performance of moringa leaf extract application and bagging the bunches to improve fruits quality of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Al-Khadrawi and Al-Buraim

MohammedAbdulrahman¹, ManarAlwan², KadumAbdullah^{2*}, MariamChaffat³

1 Horticulture and landscape Department/ College of Agriculture/ University of Kerbala/ Karbala, Iraq; mohammed.s@s.uokerbala.edu.iq.

<https://orcid.org/0000-0001-6675-8189>

2 Department Horticulture and landscape/ College of Agriculture Al-Qasim Green University; manar.a@agre.uoqasim.edu.iq.

2 Horticulture and landscape Department/ College of Agriculture/ University of Kerbala, Karbala/ Iraq; <https://orcid.org/0000-0002-9619-5900>

3 Plant Protection Department, College of Agriculture, University of Kerbala, Karbala, Iraq.

* Correspondence: kadum.m@uokerbala.edu.iq.; Tel.: 0771 723 8168

Available from: Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.44>

ABSTRACT

The study was conducted at the Fadak farm of the Husseiniya shrine/ Karbala governorate during the growth season 2021 to test the role of application with Moringa leaf extract and the paper bagging of the bunches in improving some qualitative characteristics of the fruits of two palm cultivars, Al-Khadrawi and Al-Buraim. The bunches were sprayed with three concentrations of moringa leaf extract (0, 100, 200 ml. L⁻¹) three times after 7, 10, and 13 weeks of pollination and then bagging the bunches after each application process according to the schedule and plan of the experiment. The results indicated that application with moringa extract and bagging increased the proportion of total dissolved solids (T.S.S.), total sugars and reducing sugars, and decreased the total acidity neutralizing, sucrose, and tannins. Al-Khadrawi cultivar was superior in most of the studied traits.

The study's findings suggest that natural plant extracts (such as Moringa leaf extract) can be utilized as organic amendments or fertilizer additives in conjunction with particular farming practices to enhance the quality of the fruits of some varieties of date palms.

Keywords: T.S.S.; natural extract; *Phoenix dactylifera*; Arecaceae; *Moringaoleifera*.

INTRODUCTION

The palm tree species *Phoenix dactylifera* L. is a member of the Arecaceae family of palms. The number of their species worldwide is estimated at 1500 species¹. About 600 of them are registered in Iraq², as it is one of the oldest palm plantations in the world. Therefore, it is believed that Iraq and the Arab Gulf region are its original home. The fruit of the date palm has much potential. Its fruits, seeds, pits, and byproducts all contain the potential for both nourishment and medicine because fruits and seeds are packed in nutrients such phenolics, dietary fibers, vitamins, minerals, and amino acids which makes them have many functions such as antibacterial, antioxidant, anticancer, and antidiabetic properties and the presence of phytochemicals such as carotenoids, phenolic acid, flavonoids, tocopherol, phytosterols, etc. boosts these bioactivities³.

The al-Khadrawi variety is one of the commercial varieties characterized by slight greenness in its fruits. Its cultivation spreads in the central and southern regions of Iraq. It has several names, including Khadrawi Basra and Khadrawi Mandali. Its fruits are consumed in the wet stage and have a distinctive flavour⁴. Al-Buraim is one of the most important dates in Basra. Its cultivation spreads throughout Iraq, and its ripe fruits are of excellent quality and eaten in the Khalaal and Rutab stages. It is eaten as cooked Khalaal and is not left most of the time until the Tamr stage⁵.

In recent years, global interest in the quality of food consumed has increased, so many practices have emerged that improve the quality of fruits without leaving adverse effects on human health and the environment. One of these practices is using plant extracts that can serve the same purpose as industrial materials but without any danger to humans and the environment⁶. Due to their abundant quantity of different active ingredients, plants serve as the primary source of raw substances for the synthesis of essential and practical bio-products (such as food, cosmetics, medications, bio-stimulants, bio-pesticides, and feed) such that many plant components, including seeds, fruits, flowers, stems, leaves, and roots, have been utilized in their productio⁷. The stimulating properties of botanical extracts are attributed to organic compounds, including polyphenols, amino acids, plant hormones, and vitamins, as well as both micro- and macro-elements; however, their impact on enhancing the quantity and quality of crops depends on the crop species, cultivar, stage of growth, environmental conditions, as well as dose, timing, and application method^{8,9}. Among these extracts is *Moringa oleifera* leaf extract as a natural alternative because it contains many growth hormones, especially zeatin, which is derived from the plant cytokinin group, antioxidants, nutrients and vitamins¹⁰ and thus its effect is similar for the effect of synthetic growth regulators¹¹. In a study conducted in Egypt by¹² application the bunches of the palm cultivar Al-Khadrawi with *Moringa* leaf extract at a concentration of 3% three times between one spray and another month, where the first spray was three hours before pollination, it was found that the application treatment significantly outperformed the proportion of total soluble solids accumulated in the fruit and total sugars as well as reducing sugars. In contrast, application with the extract reduced the non-reducing sugars. As for the neutralizing total acidity, there are no significant differences between the spray and comparison treatment and the case for total tannins in the fruit.

The process of muzzling, i.e., bagging the bunches with different covers, is an essential physical process, especially in hot and dry areas, as it improves the quality of the fruits and protects them from some insect pests, mechanical damage and unsuitable climatic factors that negatively affect the quality and productivity of the palm fruits¹³. Al-Issawi¹⁴ found that when bagging the Khastawi cultivar with different types of covers (transparent polyethylene, black polyethylene, unique sleeve bags, mesh cloth, and paper bags), all covers increased the quality of the fruits.

In order to improve the quality of the fruits and highlight the importance of using natural extracts and specific agricultural techniques to produce high-quality horticultural crops, the study evaluated the effectiveness of applying *Moringa* leaf extract on bunches and bagging them with paper. It also examined how these two practices interacted with various cultivars of palm trees (Al-Khadrawi Basra and Al-Buraim).

MATERIALS AND METHODS

The field experiment was launched at the Fadak farm of the Husseiniya shrine during the season 2021. Thirty-six palm trees were selected, with eighteen palm trees for each cultivar at the age of five years, homogeneous in size and growth strength as much as possible. Manual pollination and thinning were carried out by leaving 6 bunches. Palm⁻¹. Three elements were examined in the study. The first element was three different concentrations of moringa leaf extract (200, 100.0 ml. L⁻¹) applied on the bunches with three sprays. The first spray was after 7 weeks of pollination (the end of the Hababuk stage and the beginning of the Jamri stage), and between one spray and another was 21 days. The second factor was using bagging with closed-end perforated paper bags, where the bagging process was done immediately after the first spray and the bags were lifted at the third spray. The third factor included two cultivars: Al-Khadrawi Basra and Al-Buraim. The experiment was designed in a Randomized Complete Block design, R.C.B.D., with three replications, and the averages were compared according to Duncan's polynomial test at a probability level of 0.05¹⁵. The qualitative characteristics of the fruits were measured, where proportion of dry mass and water content (%), the proportion of total soluble solids (T.S.S.) (%), which were measured using Hand Refractometer according to¹⁶, total and reducing sugars and sucrose (%) which were estimated using The

Lane and Eynon method mentioned by ¹⁷, the total neutralizable acidity (%) determined as in ¹⁸ and the proportion of tannins (%) calculated by the method of ¹⁹.

Chemical components	Leaf Powder	Chemical components	Leaf Powder	Chemical components	Leaf Powder
Moisture (%)	7.5	Iron (mg)	28.2	Histidine (g/16 g N)	0.61
Protein (g)	27.1	Sulfur(mg)	870	Lysine (g/16 g N)	1.32
Fat (g)	2.3	Vitamin A (β -carotene) (mg)	16.3	Tryptophan (g/16 g N)	0.43
Carbohydrate (g)	38.2	Vitamin B1 (thiamine) (mg)	2.6	Phenylalanine (g/16 g N)	1.39
Fiber (g)	19.2	Vitamin B2 (riboflavin) (mg)	20.5	Methionine (g/16 g N)	2
Calcium (mg)	2.003	Vitamin B3 (nicotinic acid) (mg)	8.2	Threonine (g/16 g N)	1.19
Magnesium (mg)	368	Vitamin C (ascorbic acid) (mg)	17.3	Leucine (g/16 g N)	1.95
Phosphorus (mg)	204	Vitamin E (tocopherol acetate) (mg)	113	Isoleucine (g/16 g N)	0.83
Potassium (mg)	1.324	Arginine (g/16 g N)	1.33	Valine (g/16 g N)	1.06
Copper (mg)	0.6				

Table 1. Chemical analytical assessment of 100 g of powdered *Moringa oleifera* leaves.

RESULTS

Water content of fruits (%)

It is noticed from Table 2 that application with moringa leaf extract reduced the water content of the fruits, as the most significant proportion was observed with the comparative treatment of 29.36 %, while the lowest proportion was detected at a concentration of 200 ml. L⁻¹ of 25.69%, while the bagging increased the water content of the fruits, as the bagging treatment reached 28.57%, while treatment without bagging gave 26.23%. The two cultivars also differed in the water content in their fruits, where the fruits of the Al-Khadrawi cultivar recorded the most significant proportion of 31.33%. At the same time, the proportion in Al-Khadrawi variety was 23.56%. Regarding the relationship between extract application and bagging, the application treatment at a concentration of 0 ml. L⁻¹ with bagging recorded the most significant proportion, 30.71%, while the concentration was 200 ml. L⁻¹ recorded the lowest proportion, which was 24.40% without paper cover.

On the other hand, the comparison treatment of moringa extract on the Al-Khadrawi cultivar outperformed by giving the most significant proportion, reaching 34.21%, while the application dose of 200 ml. L⁻¹ on the Al-Buraim cultivar recorded the lowest water content proportion, 22.98%. Regarding the interaction between bagging and cultivar, Al-Khadrawi's bagging treatment outperformed Al-Buraim's non-bagging treatment by recording a proportion of fruit water content that reached 32.12%. In contrast, Al-Buraim's non-bagging treatment recorded the lowest proportion, 22.11%.

The interaction of the three examined variables significantly impacted the water content of the fruits, as it was noted that the spray application was at a concentration of 0 ml. L⁻¹ with bagging on Al-Khadrawi cultivar gave the most significant proportion of 35.20%, while application with a concentration of 200 ml. L⁻¹ without bagging on the Al-Buraim cultivar recorded the lowest proportion of 21.43% Table 2.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	33.23 b*	31.03 c	27.36 e	30.54 a	31.33 a
	With bagging	35.20 a	31.73 c	29.43 d	32.12 a	
Buraim	Without bagging	22.80 h	22.10 hi	21.43 i	22.11 c	23.56 b
	With bagging	26.23 f	24.30 g	24.53 g	25.02 b	
Extract averages		29.36 a	27.29 b	25.69 c		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	34.21 a	31.38 b	28.40 c	Bagging averages	
	Buraim	24.51 d	23.20 d	22.98 d		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	28.01 ab	26.56 ab	24.40 b	26.23 b	
	With bagging	30.71 a	28.01 ab	26.98 ab	28.57 a	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 2. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on the water content of the (%) of two palm cultivars.

Fruit dry matter proportion (%)

The data in Table 3 indicated that the proportion of dry matter of the fruits gradually increased with the increase in the concentration of moringa leaf extract, where the spray application was at a concentration of 200 ml. L⁻¹ had the most significant proportion of 74.30%. The comparison sprays recorded a proportion of 70.63%, while bagging reduced the dry matter in the fruits, reaching 73.76% in the treatment without bagging. In comparison, it amounted to 71.42% in the bagging treatment. As for the cultivars, it is noticeable that there are significant differences between them, as the Al-Buraim cultivar has a significant score of 76.43%, superior to the Al-Khadrawi cultivar, which has a rate of 68.66%—the spray application with 200 ml. L⁻¹ and without bagging was superior to 75.60%, while the 0 ml. L⁻¹ treatment with bagging was the lowest, which amounted to 69.28%—also, the application treatment with a concentration of 200 ml. L⁻¹ was superior to the Al-Buraim cultivar, with the most significant proportion of 77.01%.

The comparison treatment for the Al-Khadrawi cultivar recorded a smaller proportion of 65.78%. In comparison, the non-bagging treatment of the Al-Buraim cultivar outperformed because it gave the most significant proportion of 77.88%, while the lowest proportion was in the bagging treatment for the fruits of the Al-Khadrawi cultivar, which amounted to 67.87%. The data of the triple interaction indicated that the application treatment with 200 ml. L⁻¹ without bagging the Al-Buraim cultivar recorded the most significant proportion of dry matter in the fruits, amounting to 78.56%, during the application with 0 ml. L⁻¹ with bagging on the fruits of the Al-Khadrawi variety recorded the lowest rate of 64.80% Table 3.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	66.76 h*	68.96 g	72.63 e	69.45 c	68.66 b
	With bagging	64.80 i	68.26 g	70.56 f	67.87 c	
Buraim	Without bagging	77.20 b	77.90 ab	78.56 a	77.88 a	76.43 a
	With bagging	73.76 d	75.70 c	75.46 c	74.97 b	
Extract averages		70.63 c	72.70 b	74.30 a		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	65.78 d	68.61 c	71.60 b	Bagging averages	
	Buraim	75.48 a	76.80 a	77.01 a		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	71.98 ab	73.43 ab	75.60 a	73.76 a	
	With bagging	69.28 b	71.98 ab	73.01 ab	71.42 b	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 3. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on fruit dry matter proportion (%) of two palm cultivars.

Total Soluble Solids (%) (T.S.S.)

Table 4 shows that the proportion of total soluble substances increased with an increase in the application of moringa leaf extract, where the application of 200 ml. L⁻¹ gave the most significant proportion of 57.23%, while the comparison treatment revealed the lowest proportion of 51.80%. Also, the proportion of total soluble solids increased with the bagging of the bunches was 55.55%, with a significant difference from the treatment without packaging, which amounted to 53.77%. Al-Khadrawi cultivar significantly outperformed the Al-Buraim cultivar, as their proportions reached 55.86 and 53.46%, respectively.

There was a remarkable effect of the dual interaction between the extract and the bagging, where the application was 200 ml. L⁻¹ with the bagging was superior to all treatments, which was 57.46%. In contrast, the comparison treatment recorded the lowest proportions, amounting to 51.00%, and the treatment of application of Al-Khadrawi cultivar with Moringa leaf extract with a concentration of 51.00%. 200 ml. L⁻¹ with a ratio of 58.58%, while the comparison application for Al-Buraim gave less proportion, which was 50.88% Table 4. The process of bagging the fruits of the cultivars had a considerable effect on T.S.S. The bagging of the Al-Khadrawi cultivar excelled by producing the most significant proportion, which was 56.73%.

The cultivar Al-Buraim gave the lowest rate of 52.55% without bagging. As for the effect of the triple interactions of the study factors, it was significantly superior to the spray of 200 ml. L⁻¹ with bagging for the Al-Khadrawi variety reached 59.83%, while the lowest proportion was in the comparison treatment for the Al-Buraim variety, which was 50.00% (Table 4).

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	52.00 gh*	55.66 c	57.33 b	55.00 a	55.86 a
	With bagging	53.43 ef	56.93 b	59.83 a	56.73 a	
Buraim	Without bagging	50.00 i	53.00 fg	54.66 cd	52.55 b	53.46 b
	With bagging	51.76 h	54.23 de	57.10 b	54.36 ab	
Extract averages		51.80 c	54.95 b	57.23 a		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	52.71 c	56.30 b	58.58 a	Bagging averages	
	Buraim	50.88 d	53.61 c	55.88 b		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	51.00 d	54.33 bc	56.00 b	53.77 b	
	With bagging	52.60 cd	55.58 b	57.46 a	55.55 a	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 4. Impact of moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on two palm cultivars' total soluble solids (%) (T.S.S.).

Total sugars (%)

The data of Table 5 indicates that application with moringa leaf extract increased the proportion of total sugars in fruits, whereas the application with 200 ml. L⁻¹ was significantly superior by giving it the most significant proportion of 51.76%, but the comparative application gave a lower proportion of 46.27%. The bagging practice also increased the proportion of total sugars in the dates. Hence, the proportion in the bagging treatment was 50.65%, with a significant difference from the treatment without bagging, which recorded the lowest rate of 47.75%. The fruits of the two cultivars also varied in terms of the proportion of total sugars, with the Al-Khadrawi cultivar yielding the greatest sugars ratio of 50.74 percent, significantly outperforming the Al-Buraim cultivar, which provided just 47.66 percent.

The same table also demonstrates that the application of the moringa extract and bagging interacted significantly, showing the extract treatment's superiority at a concentration of 200 ml. L⁻¹ with bagging, where the ratio reached 52.74%, while the comparative dose gave a rate of 44.63%. When applied to the Al-Khadrawi cultivar, the two treatments were at 200- and 100 ml concentrations. L⁻¹ resulted in

Respective proportions of 53.18% and 51.21%, whereas the comparative treatment for the Al-Buraim cultivar yielded the lowest proportion of 44.70%. While the comparative treatment for the Al-Buraim cultivar recorded the lowest proportion, 46.21%, the packing treatment for the Al-Khadrawi cultivar recorded the most significant total sugar content, 52.19%.

Regarding the triple interaction, Table 4's findings show the two application treatments with 200- and 100 ml concentrations. L⁻¹ with the packaging of Al-Khadrawi fruits was superior. These treatments had the most excellent rates, reaching 53.94 and 52.73%, respectively, while the comparative treatment for the Al-Buraim variety had the lowest rate, 43.49% Table 5.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	45.78 d*	49.70 c	52.42 b	49.30 b	50.74 a
	With bagging	49.91 c	52.73 ab	53.94 a	52.19 a	
Buraim	Without bagging	43.49 e	46.00 d	49.14 c	46.21 c	47.66 b
	With bagging	45.92 d	49.89 c	51.53 b	49.11 b	
Extract averages		46.27 c	49.58 b	51.76 a		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	47.84 c	51.21 ab	53.18 a	Bagging averages	
	Buraim	44.70 d	47.94 c	50.33 b		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	44.63 c	47.85 b	50.78 a	47.75 b	
	With bagging	47.91 b	51.31 a	52.74 a	50.65 a	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 5. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on Total sugars (%) of two palm cultivars.

Reducing sugars (%)

Table 6. shows that the reduced sugar fraction was dramatically improved by application with moringa leaf extract—the application that involved 200 ml. L⁻¹ had the most significant proportion of reducing sugars, which came to 44.07%, while the comparison treatment had the lowest proportion, 37.44%. When compared to the treatment without bagging, which came to 38.56%, the packaging treatment obtained a proportion of 43.65%, a considerable improvement in the proportion of reducing sugars. Regarding the cultivar component, Al-Khadrawi surpassed the Al-Buraim cultivar with a considerable difference since their respective reducing sugar proportions were 43.54 and 38.67%.

The outcomes of the binary overlapping between extract application and bagging showed that the combination of 200 ml. L⁻¹ concentration and packaging produced the most significant proportion of reducing sugars, 46.57%, while the comparison treatment produced the lowest proportion, 34.75%—the two application treatments with concentrations of 200- and 100 ml. L⁻¹ was superior to the Al-Khadrawi cultivar, where the reducing sugars in them reached 45.55% and 44.80%, respectively, but the comparison treatment on the Al-Buraim cultivar recorded the lowest proportion, 34.60%. The combination of the cultivar and bagging also contributed to the excellence of the packing treatment of the Al-Khadrawi variety, which came in at 46.67%. In contrast, the Al-Buraim variety's treatment without bagging came in at the lowest proportion, at 36.70% (Table 6). In aspects of the triple interaction, the application of 200 ml. L⁻¹ combined with the bagging of bunches of the Al-Khadrawi variety yielded the most significant proportion of reducing sugars, amounting to 48.58%, significantly outperformed the comparison treatments for the fruits of Al-Buraim variety, which delivered the lowest proportion, 32.93%—table 6.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	36.57 f*	42.15 CDE	42.53 CDE	41.41 b	43.54 a
	With bagging	44.02 cd	47.41 ab	48.58 a	46.67 a	
Buraim	Without bagging	32.93 g	36.56 f	42.53 CDE	36.70 c	38.67 b
	With bagging	36.26 fg	41.08 de	44.56 bc	40.63 b	
Extract averages		37.44 b	41.80 a	44.07 a		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	40.29 b	44.78 a	45.55 a	Bagging averages	
	Buraim	34.60 c	38.82 b	42.58 ab		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	34.75 d	39.36 c	41.57 bc	38.56 b	
	With bagging	40.14 c	44.25 ab	46.57 a	43.65 a	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 6. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on Reducing sugars (%) of two palm cultivars.

Sucrose proportion (%)

Table 7 revealed that the sucrose rate decreased as the application concentration with leaf extract continued to increase. The control treatment (0 ml. L⁻¹) recorded the most significant proportion (8.87%), while the spray treatment with a concentration of 200 ml. L⁻¹ recorded the lowest proportion (6.77%). Fruit packaging also reduced sucrose, as the proportion of sucrose in coated fruits reached 6.97%, while the proportion in unwrapped fruits reached 8.65%. As for the cultivar factor, the two cultivars differed significantly between them, where the fruits of the Al-Buraim cultivar gave the most significant proportion of 8.98%, while the Al-Khadrawi cultivar had a decrease in the proportion of sucrose, which amounted to 6.64%. The binary interaction between the study factors is shown in Table 7, which indicates that application with moringa leaf extract at 0 ml. L⁻¹ without bagging produced the most significant proportion of sucrose, 9.97%, while the lowest proportion was 6.07% when treating fruits with a concentration of 200 ml. L⁻¹ with packaging. The comparison treatment of the Al-Buraim cultivar was superior in the bilateral interaction between application with the extract and the cultivar, with a proportion of 10.11%, which did not differ significantly from the application treatment with a concentration of 100 ml. L⁻¹ on the same variety amounted to 9.14%, while the lowest proportion of sucrose was recorded when applied with 200 ml. L⁻¹ for Al-Khadrawi cultivar, which amounted to 5.85%. Regarding the interaction between the packaging and the cultivar, the Al-Buraim cultivar benefited most from the treatment without bagging, where the proportion of sucrose reached 9.48%, comparable to the 8.48% obtained through packaging the same cultivar. Al-Khadrawi cultivar, however, got the lowest proportion, 5.45%, from its bagging treatment Table 7. The triple interaction between the three factors was clear, where it was noted the superiority of the extract spray treatment (0 ml. L⁻¹) + without bagging for the fruits of the Al-Buraim cultivar, which gave a sucrose proportion of 10.55%, while the lowest proportion recorded by the spray application with 200 ml. L⁻¹ with the bagging of Al-Khadrawi variety, which amounted to 5.15% Table 7.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	9.38 bc*	7.54 e	6.55 fg	7.83 b	6.64 b
	With bagging	5.88 gh	5.32 hi	5.15 i	5.45 c	
Buraim	Without bagging	10.55 a	9.49 bc	8.40 d	9.48 a	8.98 a
	With bagging	9.67 b	8.79 cd	6.99 ef	8.48 ab	
Extract averages		8.87 a	7.78 b	6.77 c		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	7.63 b	6.43 bc	5.85 c	Bagging averages	
	Buraim	10.11 a	9.14 a	7.70 b		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	9.97 a	8.52 ab	7.48 bc	8.65 a	
	With bagging	7.78 b	7.05 bc	6.07 c	6.97 b	

*Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 7. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on sucrose proportion (%) of two palm cultivars.

Total Neutral Acidity (%)

The findings of Table 8 show that the overall acidity was negatively correlated with the rise in Moringa leaf extract concentration, with the control treatment recording the most significant proportion of 0.95% and the 200 ml. L⁻¹ spray treatment recorded the lowest proportion of 0.70%. The paper packaging treatment reported 0.75% compared to the control treatment's 0.86%, indicating a reduction in acidity. The cultivars under study did not differ significantly from one another. The interactive outcomes between application extract with bagging showed that the control treatment was preferable; it recorded the most significant proportion (1.02%) during the application with 200 ml. L⁻¹ with bagging recorded the lowest proportion, 0.67%—the application treatment with a concentration of 200 ml. L⁻¹ on the Al-Khadrawi cultivar recorded the lowest proportion, 0.69%.

In contrast, the comparative treatment for the cultivar Al-Buraim was significantly better than the other treatments due to the interaction between the application of extract and the cultivar, where a proportion of 1.02% was recorded. The interaction treatment between bagging and cultivar did not show significant differences for the Al-Buraim cultivar, while the bagging treatment impacted significantly on the Al-Khadrawi cultivar, where the unwrapped bunches gave this cultivar the most significant acidity proportion of 0.85%. In contrast, the bagging reduced the acidity of the same variety, which amounted to 0.73% Table 8.

Findings from the triple impact in Table 8 revealed that the control application of the Al-Buraim cultivar was significantly superior in recording the most excellent acidity of 1.10%, while the application of 200 ml. L⁻¹ with bagging on Al-Khadrawi cultivar recorded the lowest proportion of 0.67% Table 7.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	0.95 b*	0.85 c	0.75 e	0.85 a	0.79 a
	With bagging	0.80 d	0.73 ef	0.67 h	0.73 b	
Buraim	Without bagging	1.10 a	0.80 d	0.70 gh	0.86 a	0.82 a
	With bagging	0.95 b	0.71 fg	0.68 h	0.78 ab	
Extract averages		0.95 a	0.77 b	0.70 c		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	0.87 b	0.79 c	0.69 d	Bagging averages	
	Buraim	1.02 a	0.75 cd	0.71 d		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	1.02 a	0.82 b	0.72 c	0.86 a	
	With bagging	0.87 b	0.72 c	0.67 c	0.75 b	

*Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 8. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on total neutral acidity (%) of two palm cultivars.

The proportion of tannins in the fruits (%)

The data in Table 9 indicate that application with Moringa leaf extract and bagging significantly reduced the proportion of tannins in the dates. The application is 200 ml. L⁻¹ recorded the lowest proportion of 0.35 compared with the most significant rate of 0.46% with the control treatment, while the treatment of fruit packaging recorded 0.35 % compared with the unwrapped fruits, which recorded 0.46%. As for the cultivar factor, the two cultivars differed in the proportion of tannins. The most significant proportion was in the Al-Khadrawi cultivar. Its fruits contained 0.43%, while the Al-Buraim fruits contained 0.39% g.

The dual interactions in the same table indicate the superiority of the treatment of 200 ml. L⁻¹ with the packaging recorded the lowest proportion of 0.33, while the most significant proportion recorded by the comparison treatment was 0.53%, and the application with 200 ml. L⁻¹ for Al-Buraim variety showed a significant decrease in the proportion of tannins that amounted to 0.35, While it increased in the comparison treatment for the Al-Khadrawi variety to 0.48%. As for the interaction between the bagging and the cultivar, the unbagged bunches of the Al-Khadrawi cultivar boosted the proportion of tannins in its fruits, which gave 0.48%, while the practice of the Al-Buraim cultivar recorded the lowest proportion, which amounted to 0.34% (Table 9).

Concerning the triple interactions between the experimental factors, the comparison treatments for the Al-Khadrawi cultivar recorded the most significant proportion of tannins, which amounted to 0.54%. In contrast, the application treatment had a concentration of 200 ml. L⁻¹, coupled with the packaging on the Al-Buraim cultivar, recorded the lowest proportion, which amounted to 0.33% (Table 9).

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	0.54 a	0.50 b	0.40 d	0.48 a	0.43 a
	With bagging	0.43 c	0.37 e	0.33 g	0.37 b	
Buraim	Without bagging	0.53 a	0.44 c	0.37 e	0.44 a	0.39 b
	With bagging	0.35 f	0.34 fg	0.33 g	0.34 b	
Extract averages		0.46 a	0.41 a	0.35 b		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	0.48 a	0.43 ab	0.36 bc	Bagging averages	
	Buraim	0.44 ab	0.39 bc	0.35 c		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	0.53 a	0.47 b	0.38 c	0.46 a	
	With bagging	0.39 c	0.35 d	0.33 d	0.35 b	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 9. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on the proportion of tannins in the fruits (%) of two palm cultivars.

DISCUSSION

The outcomes of the previous tables demonstrate that the use of moringa leaf extract significantly enhances data quality (boosting T.S.S., total and reducing sugars, decreasing sucrose, and tannins), perhaps because the extract contains several hormones, especially auxins, which play a role in luring compounds produced by photosynthesis to be stored in fruits and enhance their quality²⁰ or maybe that the total sugars increased in the dates as a result of the early ripening of the fruits, which led to an enhancement in sugar and thus the proportion of soluble solids in the fruits increased. Additionally, it stimulates several cytoplasmic enzymes that convert organic acids into sugars, reducing the acidity of fruits and boosting their sugar content. The calcium and potassium in the extract, which play a crucial and necessary function in development by regulating and activating enzymes²², may also cause an increase in sweetness and softness of the fruits. These findings concur with²³, who found that application of salami palm bunches with a concentration of 6% Moringa leaf extract resulted in the most significant proportion of total soluble solids, the greatest proportion of total and reducing sugars, and the lowest acidity when compared to the control treatment. This is also in line with 24, which discovered that applying the extract on seedless grapes boosted the total soluble solids and sugar proportion while lowering the neutralizing acidity. The outcomes also demonstrated that the fruit bagging procedure enhanced the quality of the fruits by creating an environment favorable for fruit development by increasing the humidity around the fruits, which resulted in the creation of an environment favorable for enzyme activity or by playing a role in the prevention of photo-oxidation of internal hormones²⁵. These findings are in line with those made by¹³, who found that the brown paper bagging process on the Halawi and Sayer cultivars affected the majority of the fruit's constituent parts as the proportion of total soluble solids, total and reducing sugars, and the fruit's moisture content increased. Additionally, the findings of this study concur with those of¹⁴ who found that the chemical characteristics of the fruits of the Khastawi cultivar were enhanced by bagging them in various cover materials. Naturally, the difference between the two cultivars in the studied characteristics is due to the genotype controlling the phenotypic characteristics of the fruits.

CONCLUSIONS

The results of this study indicate that it is possible to rely on natural extracts, such as those from Moringa leaves, to enhance the quality characteristics of the fruits because their use increases the proportion of total and reducing sugars as well as total soluble solids while decreasing the ratio of sucrose and neutral acidity. Paper bagging can also be advised as an agricultural approach to improve some of the qualities of fruits and create an appropriate environment for their development and ripening. In addition to the research elements' substantial impacts, combining these treatments is desirable since their interactions produced fruits of excellent quality. This research also suggests investigating the effects of other components of this miraculous tree, including its fruits, seeds, and roots, on the development and quality of different horticultural crops, either on their own or in combination with other agricultural techniques.

Author Contributions: Mohammed Abdulrahman; Field application of treatments, Data collection, resources, writing and drafting. Manar Alwan: Supervision, guidance and follow-up, review, and editing. Kadum Abdullah: Supervision, advice and follow-up, review, and editing.

Funding: External support money was not used for this study.

Data Availability Statement: All data is available by the first author.

Acknowledgments: I extend my thanks and gratitude to the management of Fadak farm the Department of Horticulture and Landscaping, and all those who helped in the completion of this research

Data Availability Statement: All data is available by the first author

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Jassim, N. S.; Saleh, A. D. Efficiency of using *Bacillus subtilis* as a growth regulator and its effect on the phenotypic and physiological characteristics of date palm offshoots *Phoenix dactylifera* L. under salt stress conditions. *Journal of Kerbala for Agricultural Sciences*,**2018**. Volume 5, Issue 4, pp. 1-5.
2. Al-Hamdani, K. A. S.; Muhammad, M. H.; Hussein, M. N. *Date Palm*, first edition. Tikrit University Press, Iraq, **2022**. pp340.
3. Idowu, A. T.; Igiehon, O. O.; Adekoya, A. E. ; Idowu, S. Dates palm fruits: A review of their nutritional components, bioactivities and functional food applications. *AIMS Agriculture and Food*,**2020**. 5(4), 734-755.
4. Al-Aqidi H. K. *The date palm is the lady of the trees and the fruit of the fruit*. first edition. the Hashemite Kingdom of Jordan,**2010**. p 396.
5. Hussein, P. A. Description of some varieties of Iraqi date palms. The National Committee for the Registration and Approval of Agricultural Varieties. The national program for the propagation, improvement and cultivation of date palms. Ministry Of Agriculture. The Republic of Iraq ,**2002**.
6. Ali, A. A.; Falih, S. A.; Idan, R. O.; Aziz, H. M. Response of seedlings of olive cultivar Khudairi to treatment with licorice and yeast extracts., *Journal of Kerbala for Agricultural Sciences*,**2017**. Volume 4, Issue 4, pp. 56-68.
7. Godlewska, K.; Ronga, D.; Michalak, Izabela. Plant extracts-importance in sustainable agriculture. *Italian Journal of Agronomy*, **2021**, 16.2.
8. Ertani A.; Pizzeghello D. ; Francioso O; Tinti A. ; Nardi S. Biological activity of vegetal extracts containing phenols on plant metabolism. *Molecules*,**2016**,21:1-14.
9. A.L.- Sharmy, W. A. .; Alkhateb, B. A. A. H. .; Abdel, E. T. . Role Of Perlite Quantity And Intervals Of Irrigation On Potatoes (*Solanum Tuberosum* L.) Grown In Gypsiferous Soil. *Journal of Life Science and Applied Research*. 2020, 1, 31-39.

10. Abdalla, M. M. The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) plants. *Int. J. Plant Physiol. Biochem*,**2013**,*Volume 5*(3): 42-49
11. Mahmood, N. A. & Abdulateef, S. M. Determining Some Undesirable Behavioral Traits and Their Impact on the Behavioral Performance of Broiler Chicks. in I.O.P. Conference Series: Earth and Environmental Science .2021,vol. 904.
12. Mustafa, A.; Abdel-Hamid, N.; Abd El-Hamid, A.; El-Sonbaty, M.; Abd El-Naby, S. Improving Fruit Set, Yield and Fruit Quality of Khadrawi Date Palm Cultivar. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*,**2018**. *Volume 26*(4), 1461–1470.
13. Sharif, H. J. Effect of bagging and licorice extract on early ripening and improvement of fruit characteristics of date palm *Phoenix dactylifera* L. Al-Sayer and Al-Hallawi cultivars, Master Thesis, University of Basra, College of Agriculture, Horticulture and Palm Department. Iraqi-date palms.net.**2008**.
14. Al-Issawi, M. Evaluation of the efficiency of the date and type of taste mastication in the qualitative characteristics and degree of maturity of date palm fruits of the Khastawy cultivar. Master's thesis, College of Agriculture, University of Anbar, Iraq.**2020**.
15. Al-Rawi, K. M.; Muhammad, K. A. Design and analysis of agricultural experiments, second edition. University of Mosul, Ministry of Higher Education and Scientific Research. Republic of Iraq.**2020**.
16. Noaman A I, Khalaf R M, Emad GH, Al-Abbasy, Mohammed Th. T. Effect of flaxseed oil dosing on fertility, growth characteristics and some physical, biochemical, and hormonal blood parameters during the early pregnancy of Awassi ewes. *Revis Bionatura*. 2022;*7*(4) 5. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.5>.
17. A.O.A.C. Official Method of Analysis. Association of Official Method of Analytical Chemists Washington. D.C.,**1970**. p 910.
18. Howrtiz , W. Official methods of analysis association of official analytical chemists Washington, D.C. **1975** . 221p.
19. Ali, H.H., AL-Rawi, K., Khalaf, Y., Alaaraji, S., Aldahham, B., Awad, M., Al-ani, O., Al-ani, F., Ali, A.T. Serum Caveolin-1 Level is Inversely Associated with Serum Vaspin, Visfatin, and HbA1c in Newly Diagnosed Men with Type-2 Diabetes. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*,**2022**, *11* (2), pp. 299-309.
20. H. Muhammed, S., Y. Mohamed, R. Investigation And Molecular Identification Of Cucumber Damping-Off Fungi Under Greenhouse Condition. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, **2023**; *21*(1): 19-31. doi: 10.32649/ajas.2023.179712.
21. Al-Hamoud, F. Some of the physical, chemical and physiological characteristics of the fruits of the fruit. (2019). Master Thesis, College of Agriculture, University of Basra, Iraq.
22. Hasegawa, P.M.; Bressan, R. A.; Zhu, J. K.; Bohnert, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol*,**2000**. *Volume 51*: 463-499.
23. Thabet, A. Y. I.; Abdel-Hak, R. E. S.; Ashour, N. N.; Hassan, H. S. Influence of foliar application with moringa (*Moringa oleifera* L.) aqueous leaf extract on fruit set, yield and fruit quality of Selmy date palms. *Egyptian Journal of Chemistry*,**2022**. *Volume 65* (9), 1-2.
24. Aly, M. A.; Harhash, M.M.; Bassiony, S. S.; Felifal, M.M. S. Effect of Foliar Spray of Sitofex, Moringa Leaves Extract and Some Nutrients on Productivity and Fruit Quality of "Thompson seedless" Grapevine. *Journal of the Advances in Agricultural Researches*,**2020**. *Volume 25*(1):112-129.
25. Mohammad, A. A.; Al-Rayes, A. H. Plant physiology. The second part. Ministry of Higher Education and Scientific Research., College of Agriculture, University of Baghdad, Iraq. **1995**.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 November 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Abdulrahman, M.; Alwan, M.; Abdullah, K. Chaffat, M. The performance of moringa leaf extract application and bagging the bunches to improve fruits quality of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Al-Khadrawi and Al-Buraim. *Revis Bionatura* 2023;*8* (4) 44. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.44>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Avances en la Comprensión sobre Salud Sexual y Reproductiva: Hallazgos en Estudiantes de Educación Secundaria

Advances in Understanding Sexual and Reproductive Health: Findings in Secondary School Students.

Silvana Ximena López Paredes ^{1*}, Mery Rocío Rea Guamán ², Edgar Vinicio Rea Tocta ³, Gissela Mariuxi Punina Quinabanda ⁴

¹, Universidad Estatal de Bolívar. San Miguel de Bolívar - Ecuador

², Universidad Estatal de Bolívar. San Miguel de Bolívar - Ecuador

³, Universidad Estatal de Bolívar. San Miguel de Bolívar - Ecuador

⁴, Universidad Estatal de Bolívar. San Miguel de Bolívar – Ecuador

*Autor de correspondencia: slopez@ueb.edu.ec

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.45>

RESUMEN

El objetivo central de este estudio fue evaluar y fortalecer el conocimiento y actitudes relacionadas con la salud sexual y reproductiva en estudiantes de la unidad educativa Guaranda. A través de una metodología robusta, basada en el instrumento "Design and validation of a brief questionnaire to assess young's sexual knowledge" propuesto por León & Gómez (2020), se desarrollaron dos evaluaciones fundamentales: un pre-test y un post-test, con el fin de determinar el impacto de las intervenciones educativas diseñadas. Los hallazgos iniciales del pre-test destacaron áreas de mejora, como la comprensión básica sobre sexualidad y el uso adecuado de anticonceptivos. Posterior a las intervenciones educativas, los resultados del post-test evidenciaron avances significativos en el grupo estudiado: un incremento del 15% al 64% en respuestas que indican altos niveles de conocimiento sobre salud sexual, y un aumento del 32% al 73% en el reconocimiento y uso correcto de anticonceptivos. A pesar de estas mejoras, se identificó un grupo del 5% que, por diversas razones, optó por no responder algunas cuestiones en el post-test. Este dato resalta la necesidad de personalizar y adaptar aún más las estrategias educativas, considerando factores socioculturales que puedan influir en la percepción y aceptación de temas relacionados con la salud sexual. Finalmente, este estudio reafirma la importancia de implementar programas educativos sólidos y basados en evidencia en el ámbito escolar. Las intervenciones efectivas, como las llevadas a cabo en este estudio, no solo fomentan un conocimiento adecuado, sino que también promueven actitudes y comportamientos saludables en relación con la sexualidad en los jóvenes. Es imperativo continuar investigando y adaptando estrategias para garantizar una educación sexual integral y efectiva

Palabras clave: salud sexual; reproducción; educación sexual

ABSTRACT

The main objective of this study was to evaluate and strengthen the knowledge and attitudes related to sexual and reproductive health in students of the Guaranda educational unit. Through a robust methodology, based on the instrument "Design and validation of a brief questionnaire to assess young people's sexual knowledge" proposed by León & Gómez (2020), two fundamental evaluations were developed: a pre-test and a post-test to determine the impact of the designed educational interventions. Initial findings from the

pre-test highlighted areas of improvement, such as a basic understanding of sexuality and appropriate use of contraceptives. Following the educational interventions, the post-test results showed significant improvements in the group studied: an increase from 15% to 64% in responses indicating high levels of knowledge about sexual health and an increase from 32% to 73% in the recognition and correct use of contraceptives. Despite these improvements, a 5% group was identified that, for various reasons, chose not to answer some questions in the post-test. This data highlights the need to customize further and adapt educational strategies, considering sociocultural factors that may influence the perception and acceptance of issues related to sexual health. Finally, this study reaffirms the importance of implementing sound, evidence-based educational programs in the school setting. Effective interventions, such as those conducted in this study, not only foster adequate knowledge but also promote healthy attitudes and behaviors related to sexuality in young people. It is imperative to continue researching and adapting strategies to ensure comprehensive and practical sexuality education.

Keywords: Sexual health; reproduction; sex education.

INTRODUCCIÓN

La adolescencia es una etapa crucial en el desarrollo humano, ya que es durante este período cuando los individuos experimentan cambios significativos tanto a nivel físico como emocional ¹. Estos cambios pueden conducir a un aumento en la curiosidad y la exploración en temas relacionados con la sexualidad y la reproducción es crucial, lo que subraya la importancia de ofrecer una educación adecuada y promover hábitos saludables durante este período de la vida ². En muchos países, los adolescentes enfrentan desafíos relacionados con la salud sexual y reproductiva, incluyendo embarazos no planificados, enfermedades de transmisión sexual (ETS), violencia de género y falta de acceso a información y servicios adecuados ³. Estos desafíos pueden tener consecuencias a corto y largo plazo, tales como la deserción escolar, complicaciones durante el embarazo y el parto, estigmatización social y problemas de salud física y mental ⁴.

El acceso a información y educación integral en sexualidad es esencial para que los adolescentes puedan tomar decisiones informadas y responsables en cuanto a su bienestar en temas de sexualidad y reproducción ⁵. La enseñanza de la sexualidad debe incluir temas como la anatomía y fisiología del cuerpo humano, la anticoncepción, la prevención de ETS, el consentimiento, las relaciones interpersonales y los derechos sexuales y reproductivos. Además, es importante que los adolescentes cuenten con servicios de salud accesibles y amigables para su edad, donde puedan recibir orientación y apoyo sin temor a ser juzgados o discriminados ⁶.

La promoción del bienestar en sexualidad y reproducción en adolescentes también requiere la atención a las disparidades de género y a los prejuicios culturales que pueden obstaculizar el acceso de los jóvenes a la información y a los servicios ⁷. Es fundamental empoderar a los adolescentes, tanto hombres como mujeres, para que puedan defender sus derechos y tomar decisiones informadas sobre su salud y bienestar. Esto incluye la promoción de la equidad de género y el respeto por la diversidad, así como el fomento de

habilidades para la comunicación y la negociación en las relaciones interpersonales⁸.

Por tal motivo el presente trabajo se enfoca en interpretar percepciones y conocimientos de estudiantes de segundo de Bachillerato Técnico en la Unidad Educativa Guaranda sobre Salud Sexual y Reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio tuvo como objetivo evaluar la interrelación entre la educación sexual, el cambio actitudinal y el conocimiento sobre salud sexual y reproductiva en adolescentes.

Para el diseño de investigación se empleó un diseño cuasi-experimental. En este enfoque, se introdujo un programa de intervención, compuesto por talleres y charlas sobre salud sexual y reproductiva. Primero, se realizó una evaluación previa (pre-test) para determinar el nivel inicial de conocimientos y percepciones de los estudiantes sobre salud sexual y reproductiva. Tras las intervenciones, se llevó a cabo una evaluación posterior (post-test) para medir los cambios en el conocimiento y las percepciones de los estudiantes.

La población de estudio consistió en estudiantes de educación secundaria de la Unidad Educativa Guaranda. Se determinó el tamaño de la muestra n utilizando la fórmula para el muestreo probabilístico de una población finita:

- N representó el tamaño de la población y se estableció en 520 estudiantes de secundaria de la Unidad Educativa.
- Z correspondió al nivel de confianza deseado. Para un nivel de confianza del 99%, Z fue de 2.576.
- p se estableció en 0.5, considerando maximizar el tamaño de la muestra.
- e se fijó en 0.05, correspondiente a un margen de error del 5%.

Con estos valores, se procedió a calcular:

$$n = \frac{520 \times 2.576^2 \times 0.5 \times 0.5}{(520 - 1) \times 0.05^2 + 2.576^2 \times 0.5 \times 0.5} = \frac{520 \times 2.576^2 \times 0.5 \times 0.5}{(520 - 1) \times 0.05^2 + 2.576^2 \times 0.5 \times 0.5}$$

Resolviendo la operación, se encontró:

$$n \approx 292.3$$

Por lo tanto, con los datos proporcionados, se determinó que el tamaño de muestra aproximado era de 292. Sin embargo, considerando las aproximaciones en el cálculo, se concluyó que un tamaño de muestra de 293 sería aceptable bajo estos parámetros..

Se estructuró un cuestionario basado en el estudio "Design and validation of a brief questionnaire to assess young's sexual knowledge" desarrollado por León & Gómez⁹. Este estudio, que incluyó a 566 estudiantes de la Universidad de Sevilla durante el período académico 2015/16, confirmó la validez de una herramienta

compuesta por 8 preguntas, después de eliminar una debido a la falta de correlaciones significativas y problemas de comprensión. La escala, con una confiable consistencia interna ($KR-20 = 0,57$), demostró evidencias de validez, tanto factorial como externa. Un modelo conformado por tres factores logró un buen ajuste a los datos, y los resultados proporcionaron una visión detallada de los conocimientos sobre sexualidad en relación con diversos factores, como la educación sexual previa, la situación sentimental, el uso de anticonceptivos, entre otros.

Además, se integraron adaptaciones para asegurar que el cuestionario estuviera en consonancia con estándares sociales del contexto local. Con esto, el instrumento final no solo se enfocó en áreas fundamentales como el conocimiento sobre salud sexual y reproductiva, actitudes y percepciones, sino que también permitió una evaluación rigurosa y una posible comparación de las variables

Procedimiento:

1. Evaluación Previa (Pre-test): Antes de la intervención, los estudiantes completaron el cuestionario para determinar su nivel inicial de conocimientos y percepciones.
2. Intervención: Se impartieron talleres y charlas diseñados para mejorar la comprensión de los estudiantes sobre la salud sexual y reproductiva, el embarazo adolescente y sus consecuencias, y las enfermedades de transmisión sexual.
3. Evaluación Posterior (Post-test): Después de la intervención, los estudiantes volvieron a completar el mismo cuestionario para determinar cualquier cambio en su conocimiento y percepciones.

Los datos recopilados a través de los cuestionarios se analizaron estadísticamente para identificar diferencias significativas en las respuestas antes y después de la intervención. Utilizando pruebas estadísticas apropiadas, se evaluó el impacto de los talleres y charlas en el conocimiento y las percepciones de los estudiantes.

El diseño metodológico buscó garantizar que el estudio no solo describiera las percepciones y conocimientos de los estudiantes, sino que también evaluara el impacto de una intervención educativa sobre salud sexual y reproductiva. La utilización de instrumentos previamente validados y el diseño cuasi-experimental reforzaron la solidez y rigurosidad del estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pre Test

Categoría de Pregunta	Variable	Ítem Evaluado	Respuestas	Porcentaje	Totales	No Respondieron	Escala (1-5)	Fuente de Información
Conocimientos	Educación sexual	Conocimiento sobre ETS	Regular	65%	190	103	3	Talleres y Charlas
Conocimientos	Situación sentimental	Relaciones de pareja	Negativo	52%	152	141	2	Educación formal
Actitudes	Uso de anticonceptivos	Uso del condón	Regular	60%	176	117	3	Familia
Actitudes	Uso de anticonceptivos	Uso de píldoras	Negativo	55%	161	132	2	Medios de comunicación
Conocimientos	Educación sexual	Reconocimiento de métodos anticonceptivos	Regular	58%	170	123	3	Talleres y Charlas
Conocimientos	Situación sentimental	Comunicación en pareja	Negativo	57%	167	126	2	Educación formal
Actitudes	Educación sexual	Importancia de la educación sexual	Regular	63%	185	108	3	Familia
Actitudes	Situación sentimental	Visión del compromiso	Negativo	54%	158	135	2	Medios de comunicación

Nota: Los resultados presentados en la tabla 1 reflejan una evaluación realizada a 293 estudiantes de la Unidad Educativa Guaranda. La escala (1-5) es una representación ordinal de las respuestas, donde 1 es "Muy Negativo" y 5 es "Muy Positivo". Las fuentes de información representan el medio principal por el cual los estudiantes obtuvieron conocimientos en cada área.

Tabla 1. Resultados de la evaluación sobre conocimientos y actitudes en salud sexual y reproductiva.

La Tabla 1 muestra un conjunto de datos que reflejan los conocimientos y actitudes en salud sexual y reproductiva de 293 estudiantes de la Unidad Educativa Guaranda.

Conocimientos sobre ETS y Educación Sexual:

Un 65% de los estudiantes evaluados presentaron un nivel "Regular" de conocimiento sobre las enfermedades de transmisión sexual (ETS). Esto es preocupante, pues una falta de conocimiento adecuado en esta área puede llevar a comportamientos de riesgo.

Un 58% mostraron un reconocimiento "Regular" de métodos anticonceptivos. Aunque esta cifra es similar a la anterior, sigue siendo un porcentaje alto de estudiantes que no tienen un conocimiento completo en este ámbito.

Es relevante notar que la principal fuente de información para ambos ítems provino de "Talleres y Charlas", lo que indica que las intervenciones educativas son una fuente primordial de información para los estudiantes.

Actitudes y Situación Sentimental:

La comunicación en pareja y las relaciones de pareja se catalogaron como "Negativas" con un 52% y 57% respectivamente. Esto resalta una posible falta de habilidades interpersonales o de comunicación adecuada entre los jóvenes.

La fuente principal de información para estos ítems fue la "Educación formal", sugiriendo la necesidad de revisar y mejorar los currículos educativos en esta área.

Uso de Anticonceptivos

La actitud frente al uso del condón y de las píldoras se evaluó como "Regular" y "Negativo" respectivamente. Si bien el uso del condón tuvo una actitud ligeramente más positiva, es esencial abordar ambos temas con mayor profundidad para mejorar estas percepciones.

Las fuentes de información para estos ítems variaron entre la "Familia" y los "Medios de comunicación", lo que pone de relieve la influencia de estas fuentes en las percepciones de los jóvenes.

Escala y No Respuestas:

La escala utilizada para evaluar las respuestas (de 1 a 5) mostró que la mayoría de los ítems evaluados oscilaban entre 2 y 3, lo que indica una tendencia hacia opiniones y conocimientos neutros o negativos en la mayoría de las áreas.

Las columnas de "Totales" y "No Respondieron" evidencian que un número significativo de estudiantes no respondió a varios ítems. Es crucial considerar estas no respuestas en futuras investigaciones y entender la razón detrás de esta omisión.

Conclusión:

La información presentada en la Tabla 1 refleja un nivel insuficiente de conocimientos y actitudes negativas o neutras en salud sexual y reproductiva entre los estudiantes de la Unidad Educativa Guaranda. Es fundamental abordar estas áreas con programas educativos más efectivos y ajustar las estrategias de enseñanza para mejorar el conocimiento y cambiar actitudes en estas áreas vitales. La revisión de las fuentes de información también puede ofrecer una dirección sobre dónde enfocar esfuerzos educativos.

Intervención

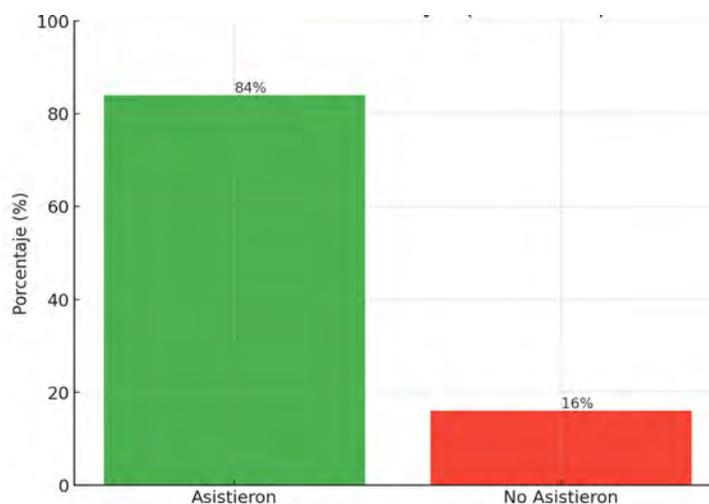


Figura 1. Taller salud sexual. Asistencia a taller sobre salud sexual y reproductiva para adolescentes

La figura 1 muestra información sobre la asistencia de estudiantes a un taller que aborda conceptos básicos sobre salud sexual y reproductiva para adolescentes. De un total de 293 estudiantes, 246 (84%) asistieron al taller, mientras que 47 (16%) no lo hicieron.

La asistencia del 84% de los estudiantes al taller de conceptos básicos sobre salud sexual y reproductiva para adolescentes indica un interés considerable por parte de los jóvenes en adquirir conocimientos sobre este tema crucial. Esto es positivo, ya que la educación en salud sexual y reproductiva es esencial para que los

adolescentes puedan tomar decisiones informadas y responsables en relación con su bienestar sexual y reproductivo.

No obstante, es importante tener en cuenta que un 16% de los estudiantes no asistieron al taller. Aunque este porcentaje no es mayoritario, es relevante analizar las posibles razones detrás de la no asistencia de estos jóvenes. Entre los factores que podrían explicar esta situación se encuentran la falta de interés, barreras culturales o religiosas, conflictos de horario o la percepción de que el taller no es relevante para ellos.

Para abordar este grupo de estudiantes que no asistieron al taller, se deben implementar estrategias que permitan identificar y superar las barreras que impiden su participación. Algunas acciones podrían incluir ofrecer talleres adicionales en horarios alternativos, adaptar el contenido del taller para abordar preocupaciones culturales o religiosas, o llevar a cabo campañas de concientización sobre la importancia de la educación en salud sexual y reproductiva para el bienestar de los adolescentes.

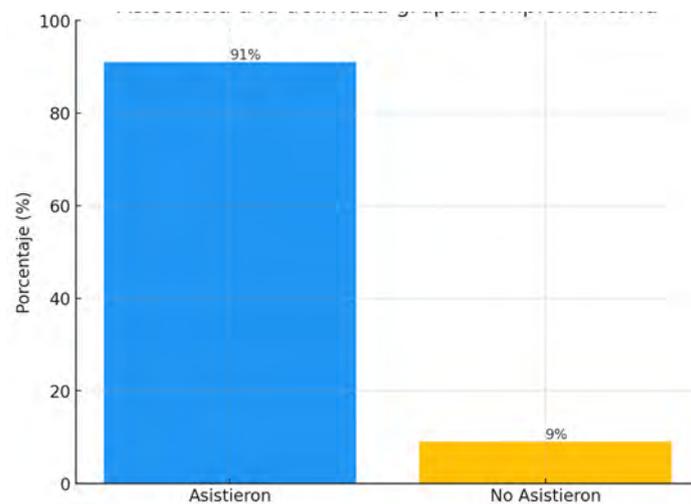


Figura 2. Actividad Grupal. Asistencia a la actividad grupal complementaria

La figura 2 presenta datos sobre la asistencia de estudiantes a una actividad grupal complementaria relacionada con la salud sexual y reproductiva. De un total de 293 estudiantes, 267 (91%) asistieron a la actividad, mientras que 26 (9%) no lo hicieron.

La alta tasa de asistencia (91%) a la actividad grupal complementaria sugiere que los estudiantes están interesados en participar en actividades adicionales que refuercen y complementen la información y el conocimiento adquirido en los talleres previos sobre sexualidad saludable y responsable, así como sobre conceptos básicos de salud sexual y reproductiva. Esto es positivo, ya que actividades grupales interactivas pueden facilitar la comprensión de los temas, la aplicación de los conceptos aprendidos en situaciones de la vida real y fomentar la comunicación y colaboración entre los estudiantes.

No obstante, es importante considerar el 9% de estudiantes que no asistieron a la actividad grupal complementaria. Aunque este porcentaje es relativamente bajo, es relevante identificar las posibles causas detrás de la no asistencia de estos jóvenes, que pueden ser similares a las identificadas en los talleres previos, como falta de interés, barreras culturales o religiosas, problemas de horario o la percepción de que la actividad no es relevante para ellos.

Para mejorar la participación de este grupo de estudiantes que no asistieron a la actividad grupal complementaria, se podrían implementar estrategias similares a las propuestas para los talleres, como ofrecer actividades en horarios alternativos, adaptar el contenido para abordar preocupaciones culturales o religiosas, o llevar a cabo campañas de concientización sobre la importancia de estas actividades en el desarrollo integral de los adolescentes en relación con su salud sexual y reproductiva.

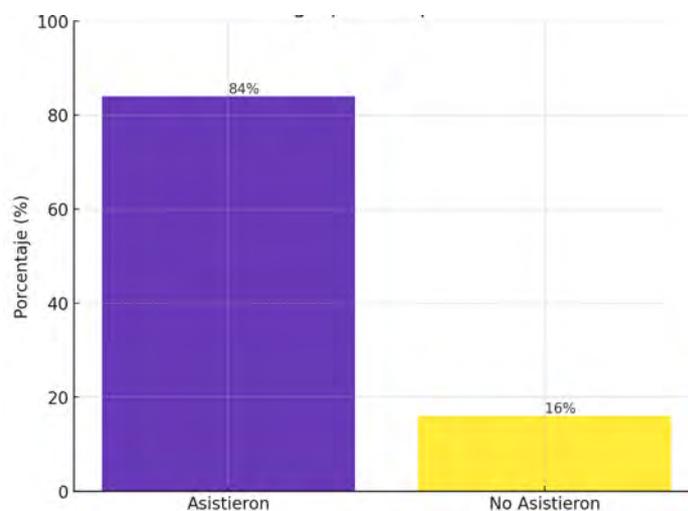


Figura 3. Lluvia de ideas. Asistencia a la actividad grupal complementaria de lluvia de ideas

La figura 3 muestra datos sobre la asistencia de estudiantes a una actividad grupal complementaria de lluvia de ideas relacionada con la salud sexual y reproductiva. De un total de 293 estudiantes, 246 (84%) asistieron a la actividad, mientras que 47 (16%) no lo hicieron.

La asistencia del 84% de los estudiantes a la actividad grupal de lluvia de ideas refleja un interés considerable en participar en actividades que fomenten la creatividad, el pensamiento crítico y la colaboración en temas de salud sexual y reproductiva. Este resultado es positivo, ya que las actividades de lluvia de ideas pueden ser una herramienta efectiva para profundizar la comprensión de los temas, generar nuevas ideas y soluciones a problemas relacionados con la salud sexual y reproductiva, y promover la comunicación y el trabajo en equipo entre los estudiantes.

No obstante, es importante prestar atención al 16% de estudiantes que no asistieron a la actividad grupal de lluvia de ideas. Aunque este porcentaje no es mayoritario, es relevante analizar las posibles razones detrás de la no asistencia de estos jóvenes, que pueden ser similares a las identificadas en los talleres y actividades grupales complementarias previas, como falta de interés, barreras culturales o religiosas, conflictos de horario o la percepción de que la actividad no es relevante para ellos.

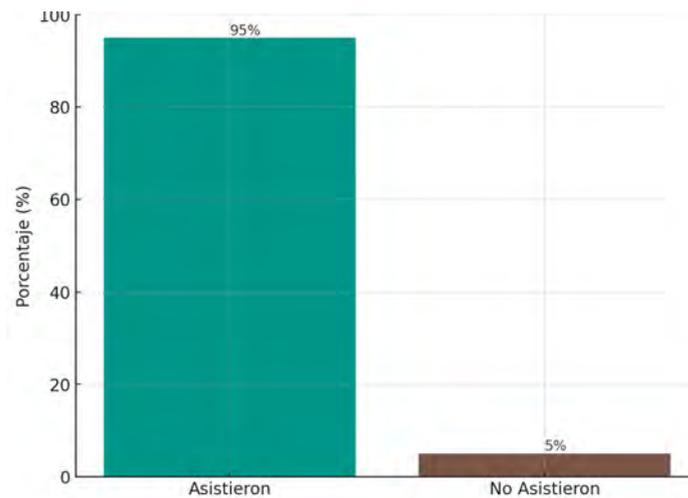


Figura 4. Charla de conceptos. Asistencia a la Charla de conceptos básicos

La figura 4 muestra datos sobre la asistencia de estudiantes a una charla sobre conceptos básicos de salud sexual y reproductiva. De un total de 293 estudiantes, 278 (95%) asistieron a la charla, mientras que 15 (5%) no lo hicieron.

La alta tasa de asistencia (95%) a la charla de conceptos básicos de salud sexual y reproductiva indica un interés significativo de los estudiantes en adquirir información y conocimientos fundamentales en este tema. Este resultado es alentador, ya que demuestra que la mayoría de los estudiantes comprende la importancia de informarse y educarse sobre salud sexual y reproductiva, lo que podría contribuir a la toma de decisiones informadas y responsables en su vida personal.

Sin embargo, es importante tener en cuenta el 5% de estudiantes que no asistieron a la charla de conceptos básicos. Aunque este porcentaje es relativamente bajo, es relevante analizar las posibles razones detrás de la no asistencia de estos jóvenes, que pueden ser similares a las identificadas en los talleres y actividades grupales complementarias previas, como falta de interés, barreras culturales o religiosas, conflictos de horario o la percepción de que la charla no es relevante para ellos.

Asistencia a la la actividad grupal para la construcción de un cuadro PNI	F	%
Asistieron	264	90%
No Asistieron	29	10%
Total	293	100%

Tabla 2. Cuadro PNI

La tabla 2 presenta datos sobre la asistencia de estudiantes a una actividad grupal para la construcción de un cuadro PNI (Positivo, Negativo, Interesante) relacionado con la salud sexual y reproductiva. De un total de 293 estudiantes, 264 (90%) asistieron a la actividad, mientras que 29 (10%) no lo hicieron.

La asistencia del 90% de los estudiantes a la actividad grupal del cuadro PNI muestra un alto interés en participar en actividades que fomenten la reflexión, el análisis y la discusión en temas relacionados con la

salud sexual y reproductiva. Este resultado es positivo, ya que sugiere que la mayoría de los estudiantes está dispuesta a colaborar y compartir sus ideas para evaluar y analizar diferentes aspectos de la salud sexual y reproductiva desde una perspectiva amplia y constructiva.

Sin embargo, es importante considerar el 10% de estudiantes que no asistieron a la actividad grupal del cuadro PNI. Aunque este porcentaje no es mayoritario, es relevante analizar las posibles razones detrás de la no asistencia de estos jóvenes, que pueden ser similares a las identificadas en los talleres y actividades grupales complementarias previas, como falta de interés, barreras culturales o religiosas, conflictos de horario o la percepción de que la actividad no es relevante para ellos.

Para mejorar la participación de este grupo de estudiantes que no asistieron a la actividad grupal del cuadro PNI, se podrían implementar estrategias similares a las propuestas para los talleres y otras actividades, como: Ofrecer la actividad en horarios alternativos o en diferentes formatos, para facilitar el acceso y adaptarse a las necesidades de los estudiantes.

Adaptar el contenido y enfoque de la actividad para abordar preocupaciones culturales o religiosas y asegurar que el proceso de construcción del cuadro PNI sea inclusivo y respetuoso de la diversidad de los estudiantes.

Llevar a cabo campañas de concientización sobre la importancia de la educación en salud sexual y reproductiva, destacando la relevancia de actividades como el cuadro PNI para el análisis y la reflexión en temas relacionados.

Evaluación Posterior

Ítem Evaluado	Respuestas (%)	Porcentajes	Totales	Totales sin Responder	Categoría de Pregunta	Variable	Fuente Principal de Información	Escala (1-5)
Conocimiento sobre ETS	Positivo	82	240	53	Conocimiento	ETS	Talleres y Charlas	4
Métodos Anticonceptivos	Positivo	78	228	65	Conocimiento	Anticonceptivos	Educación formal	4
Comunicación en pareja	Positivo	76	223	70	Actitud	Relaciones	Talleres y Charlas	4
Relaciones de pareja	Positivo	79	231	62	Actitud	Relaciones	Educación formal	4
Uso del condón	Positivo	80	234	59	Actitud	Anticonceptivos	Familia	4
Actitud frente a píldoras	Regular	72	211	82	Actitud	Anticonceptivos	Medios de comunicación	3
Enfermedades por no usarlo	Positivo	83	243	50	Conocimiento	ETS	Talleres y Charlas	4
Sexualidad responsable	Positivo	81	237	56	Conocimiento o y Actitud	General	Talleres, Charlas y Educación formal	4

Nota: La escala utilizada para evaluar las respuestas va desde 1 (muy negativo) a 5 (muy positivo). En esta evaluación posterior, los valores oscilaron entre 3 y 4, lo que indica una mejora general en las percepciones y conocimientos de los estudiantes después de la intervención.

Tabla 3. Evaluación Posterior de Conocimientos y Actitudes sobre Salud Sexual en Estudiantes

Análisis e Interpretación de la Tabla 3 (Post-test)

La Tabla de la evaluación posterior muestra un avance significativo en los conocimientos y actitudes de los estudiantes de la Unidad Educativa Guaranda después de las intervenciones.

Conocimientos Mejorados

Los estudiantes mostraron un conocimiento positivo sobre las ETS, con un impresionante 82% registrando respuestas positivas.

Del mismo modo, un 78% de los estudiantes mostraron un conocimiento positivo sobre métodos anticonceptivos, lo que refleja un aumento significativo en comparación con la evaluación inicial.

Actitudes Mejoradas

La comunicación en pareja y las relaciones de pareja ahora registran respuestas positivas del 76% y 79% respectivamente. Estos valores sugieren que las intervenciones lograron modificar las actitudes y percepciones de los estudiantes en estas áreas clave.

Fuentes de Información

"Talleres y Charlas" aparecen recurrentemente como la fuente principal de información, lo que indica que las intervenciones educativas desempeñaron un papel crucial en la formación de actitudes y conocimientos positivos.

Escala y No Respuestas

La mayoría de los ítems evaluados obtuvieron una puntuación de 4 en una escala de 1 a 5. Esto indica un cambio positivo y notable en comparación con la evaluación anterior.

A pesar de las mejoras observadas, aún hubo estudiantes que no respondieron a ciertos ítems. Estas no respuestas pueden deberse a diversas razones, y es importante considerarlas en futuras investigaciones.

Después de la intervención, se observó una mejora considerable en los conocimientos y actitudes de los estudiantes en áreas vitales de salud sexual y reproductiva. Estos resultados reflejan la eficacia de las intervenciones realizadas y subrayan la importancia de continuar con este tipo de programas educativos.

La educación sobre salud sexual es una responsabilidad que recae en toda la sociedad, comenzando desde el nacimiento en el grupo familiar y continuando a lo largo de la vida en los sucesivos vínculos que se establecen al interactuar con diferentes grupos¹⁰. En la actualidad, se están observando importantes cambios en las conductas, actitudes y valores relacionados con la sexualidad de los jóvenes y adolescentes de ambos sexos¹¹.

Durante la adolescencia y la juventud, los comportamientos riesgosos representan una de las principales razones detrás de lesiones, problemas de salud, consecuencias a largo plazo e incluso fallecimientos,

afectando a personas de ambos sexos ¹². La vulnerabilidad de los jóvenes se relaciona con su historia anterior, así como con los cambios en algunos factores sociales, demográficos, el microambiente familiar, las políticas socioeconómicas y su nivel de conocimiento sobre salud sexual y reproductiva ¹³.

Es importante que las familias tomen medidas para tomar la responsabilidad de guiar a sus hijos en su educación sexual, es esencial establecer un entorno propicio en el que cada individuo pueda ejercer sus derechos sexuales como parte de su crecimiento y desarrollo ¹⁴. Aunque las personas experimentan su sexualidad de maneras diferentes según factores internos y externos, los derechos humanos relacionados con la sexualidad, su protección y promoción deberían ser parte de la existencia diaria de todas las personas. Los derechos sexuales son derechos fundamentales que emanan de la libertad, la dignidad y la igualdad inherentes a cada ser humano, y tienen un alcance universal ¹⁵.

La salud sexual y reproductiva es un componente del desarrollo humano que inicia desde el momento del nacimiento y continúa a lo largo de toda la vida. Desempeña un papel fundamental en el Modelo de Atención Integral de Salud del Ministerio de Salud Pública del Ecuador, donde se brinda educación a las mujeres sobre la importancia de llevar una vida reproductiva saludable y sin riesgos, así como sobre la responsabilidad en el manejo de su sexualidad ⁹.

Siguiendo esta perspectiva actualizada, el Ministerio de Salud Pública ejerce un liderazgo integral en el Sistema Nacional de Salud, con un modelo que se destaca en América Latina al enfocarse en la promoción de la salud y la prevención de enfermedades, manteniendo elevados niveles de calidad y un trato amable en la atención ¹⁶. La salud sexual y reproductiva se transforma en un proceso social en el que se forjan nuevos valores y comportamientos tanto a nivel individual como en el contexto de la familia y la comunidad. Este proceso contribuye a la creación de una cultura renovada en cuanto al cuidado de la salud y al fortalecimiento institucional, en consonancia con el desarrollo humano y la responsabilidad compartida entre individuos, comunidades e instituciones ¹⁷.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio destacan hallazgos significativos y novedosos en relación a la salud sexual y reproductiva entre los estudiantes evaluados. Es evidente que las intervenciones implementadas tuvieron un impacto positivo en el nivel de conocimiento y actitudes de los estudiantes.

Un resultado notable es la reducción drástica del porcentaje de estudiantes con un nivel de conocimiento regular en salud sexual y reproductiva, pasando del 68% en la evaluación previa al 23% en el post-test. Además, el aumento sustancial en el número de estudiantes con un alto nivel de conocimiento (del 15% al 64%) después de las charlas y talleres indica la efectividad de las intervenciones educativas.

El aumento en el uso regular y adecuado de anticonceptivos, que se elevó del 32% al 73% después de las intervenciones, refleja una mayor conciencia sobre la importancia de la protección en las relaciones sexuales.

Sin embargo, es esencial reconocer que aún persisten desafíos. Aunque se redujo, el porcentaje de estudiantes que optaron por no responder preguntas relacionadas con su vida sexual sigue siendo preocupante. Esto podría indicar resistencia o falta de comodidad con el tema y destaca la necesidad de abordar estas barreras en futuras intervenciones.

La influencia de las relaciones sentimentales en el conocimiento y las actitudes hacia la salud sexual y reproductiva también es un hallazgo relevante. Esto sugiere que factores más allá del conocimiento desempeñan un papel en el comportamiento sexual de los adolescentes y podría requerir enfoques específicos en futuras intervenciones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha recibido apoyo parcial de la Universidad Estatal de Bolívar, gracias a su contribución al proyecto PIV-14-2022, enfocado en la Interculturalidad en salud sexual y reproductiva en adolescentes. Este importante proyecto ha sido desarrollado en colaboración con el Grupo de Investigación de Enfermería y Salud, GI-14-2022. Este apoyo ha sido fundamental para la realización y el éxito de nuestras investigaciones, permitiéndonos profundizar en temas cruciales para el bienestar y la educación de los jóvenes. Extendemos nuestro sincero agradecimiento a la Universidad y a todos los participantes del proyecto por su invaluable aporte y compromiso con la investigación y el desarrollo en este campo tan vital.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés

REFERENCIAS

1. Ildefonso Soto M. Intervención educativa sobre salud sexual y reproductiva y su efecto en el conocimiento de los adolescentes del quinto año de secundaria de la Institución Educativa Privada “Trilce”, noviembre - diciembre 2015. Repos Tesis - UNMSM. 2016;
2. Alfonso Figueroa L, Figueroa Pérez L, García Breto L, Soto Carballo D, Alfonso Figueroa L, Figueroa Pérez L, et al. Revista de ciencias médicas de Pinar del Río. [Internet]. Vol. 23, Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río. 1999, Editorial Ciencias Médicas; 2019 [cited 2023 Oct 6]. 954–968 p. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942019000600954&lng=es&nrm=iso&tlng=es
3. Salvatierra, E. A., & Velásquez LM. Nivel de conocimiento sobre salud sexual y reproductiva y el inicio de las relaciones sexuales en adolescentes de la IE Miguel Grau Seminario-El Palla. In 2019.
4. Albornoz N, Arenas V, Fernández M, Martínez M, Mora K. Conocimiento, práctica y actitud de la salud sexual y reproductiva de las madres adolescentes en la frontera del departamento Norte de

- Santander. Arch Venez Farmacol y Ter [Internet]. 2019;38(1):97–105. Available from: www.revistaavft.com
5. Peralta-Jiménez JA, Urrego-Mendoza ZC. Sexual and reproductive health in women victims of the armed conflict. Rev Salud Publica. 2020;22(4):1–5.
 6. Chanamé F, Rosales I, Mendoza M, Salas J, León G. Conocimientos y medidas preventivas frente a infecciones de transmisión sexual en adolescentes peruanos andinos. Rev Salud Pública [Internet]. 2021;23(1):1–7. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revsaludpublica/article/view/85165>
 7. de Bachillerato Modesto Chávez Franco C, Rosa S, Oro E, Liliana Paccha-Tamay III C, Elizabeth García-Galarza KI, Valentina Aguirre-Pesantes A V, et al. Ciencias de la salud Artículo de investigación Salud Sexual en los Adolescentes de Santa Rosa, Ecuador Sexual Health in Adolescents of Santa Rosa, Ecuador Saúde sexual em adolescentes de Santa Rosa, Equador. 2021;7(2):38–51. Available from: <http://dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/indexhttps://orcid.org/0000-0002-7980-8525https://orcid.org/0000-0001-7938-733X>
 8. Restrepo DR, Arenas Duque A, Forero Martínez LJ, Rivera D, Rivillas JC. Conocimientos y percepciones de niñas, niños y adolescentes sobre la sexualidad Notions and perceptions of girls, boys and adolescents about sexuality Noções e percepções de meninas, meninos e adolescentes sobre sexualidade. Available from: <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.e339044>
 9. León-Larios F, Gómez-Baya D. Diseño y validación de un cuestionario sobre conocimientos de sexualidad responsable en jóvenes Design and validation of a brief questionnaire to assess young 's sexual knowledge El comportamiento sexual de los jóvenes científica . El patrón de. Rev Esp Salud Pública [Internet]. 2018;92(1):1–15. Available from: <http://scielo.isciii.es/pdf/resp/v92/1135-5727-resp-92-e20180628.pdf>
 10. Aburto-Arciniega MB, Escamilla-Santiago RA, Díaz-Olavarrieta CA, Fajardo-Dolci GE, Urrutia-Aguilar ME, Arce-Cedeño A, et al. Intervención educativa sobre salud sexual en estudiantes de medicina Sexual health educational intervention in medical students. 2020; Available from: www.gacetamedicademexico.com
 11. Mercado L, Mesías E, Méndez G. Conocimientos y prácticas para prevención y detección de las infecciones de transmisión sexual en adolescentes. Aceptado. 2020;4(1):50–9.
 12. Pérez Castillo R, Cordero González Y. Intervención educativa en mujeres fértiles para elevar el conocimiento del flujo vaginal. Rev Medica Sinerg. 2019;4(4):4–11.
 13. Coates M, Bruschi L, Chamorro V, Chamorro V, Cibotari S et all. Conocimientos, actitudes y practicas de salud sexual. Arch Pediatría Uruguay . 2020;91(4):196–206.
 14. Quintero, L. D., Osorio Osorio, H., Bojorquez-Chapela, I., Isaza, L., Acosta-Reyes, J., & Fernández-Niño JA. Interrupción voluntaria del embarazo y salud sexual y reproductiva en mujeres migrantes en Barranquilla. Rev Panam Salud Pública [Internet]. 2023;47, e49. Available from: <https://www.paho.org/journal/es/articulos/interrupcion-voluntaria-embarazo-salud-sexual-reproductiva-mujeres-migrantes-barranquilla>
 15. Armoa C, Mendez JM, Martínez P, Estigarribia G. Knowledge, attitudes and practices about sexual and reproductive health in high school students of r. I. 3 corrales district, 2018. Med Clin y Soc. 2020;4(1):4–9.
 16. Matos S. Estrategia educativa sobre las consecuencias de relación sexual precoz en adolescentes.

2020.

17. Jacinto Cardenas R, Ruiz Paloalto ML. Efectividad de los programas de educación sexual y reproductiva en los adolescentes. *Horiz Sanit.* 2021;21(1).

Received: 28 September 2023/ Accepted: 15 November 2023 / Published:15 December 2023

Citation. *López Paredes S X, Rea Guamán M R, Rea Tocta E V, Punina Quinabanda G M.* Avances en la Comprensión sobre Salud Sexual y Reproductiva: Hallazgos en Estudiantes de Educación Secundaria. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 45. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.45>

Additional information Correspondence should be addressed to slopez@ueb.edu.ec

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Bionatura ISSN. 13909355. **Scopus coverage years:** from 2016 to the Present

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2023 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Effect of humic and fulvic acid treatment on the anatomical traits of the leaves of two genera of seedlings of ornamental palm *Washingtonia filifera* and *Phoenix canariensis*

Wasen Fawzi Alpresem^{1,*}, Mohammad Abdulameer Alnajjar², Rasul Ibrahim Ahmed³

¹ Unit of Medicinal and Aromatic Plants, College of Agriculture, University of Basrah, Basrah, Iraq wasen.fadel@uobasrah.edu.iq.

² Department of Horticulture and Landscape Design, College of Agriculture, University of Basrah, Basrah, Iraq. mohammed.abdulameer@uobasrah.edu.iq.

³ Department of Horticulture and Landscape Design, College of Agriculture, University of Basrah, Basrah, Iraq

*Correspondence: wasen.fadel@uobasrah.edu.iq, Tel. +9647833272744

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.46>

ABSTRACT

This study was conducted in the growing season 2021 at the Agricultural Research Facility Station, University of Basrah. Start with seedlings of two genera of ornamental palm trees: *Washingtonia filifera* and *Phoenix canariensis*. Were given dosages of humic acid as treatment (0, 10, and 15 ml.L⁻¹). And fulvic acid by ground addition at concentrations of (0, 5, and 10 g.L⁻¹). The findings revealed that humic acids significantly impacted the anatomical traits and caused the improvement of those traits. The Humic acid content of (15 ml.L⁻¹) caused an increase in the thickness of epidermal cells, the length of columnar cells, the diameter of large and small vascular bundles, and the diameter of the fibrous bundles.

Additionally, a level of fulvic acid (10 g.L⁻¹) caused a similar increase in those anatomical traits. The triple interaction significantly impacted the qualities under study. The interaction between the Washington type, the (15 ml.L⁻¹) of humic acid, and the (10 g.L⁻¹) of fulvic acid provided the highest values. For the anatomical traits, the thickness of epidermal cells, length of Columnar epithelial cells, the diameter of large and small vascular bundles, and diameter of large and small vascular bundles. And the diameter of the fibrous bundles. *Washingtonia* palm was significantly higher than the canary palm and had the highest values for epidermal cell thickness, columnar cell length, large and small vascular bundle diameter, and fibrous bundle diameter.

Keywords: ornamental trees; humic substances; leaves; anatomical; fulvic acid; seedling

INTRODUCTION

Palm trees are frequently employed in landscape home and building interior design. It is easy to recognize palm trees by their consistent shape, and they are typically planted either alone or in naturally formed groups in the green space on either side of the garden gates¹. The *Washingtonia filifera* belongs to the Arecaceae family and the genus Washington. It is one of the most widespread palm trees in the world and Iraq. The original country of this tree is the desert oases southwest of Arizona to the American continent and southern Nevada². The Washington palm is monocotyledon (Monoecious) and bisexual, bearing male and female flowering inflorescences on one tree and small, spherical fruits unfit for human consumption³. The Canary Islands in the Atlantic Ocean inspire the name of the Canary Palm, *Phoenix canariensis*. Its cultivation is spread in hot and semi-hot regions of the world. It belongs to the Aceraceae family, and the genus Phoenix is the hallmark of this type of palm. It has a giant stem, smooth cylindrical, with a large head and dense fronds. Canary palms are monocotyledons (Dioecious) and monosexual (Unisexual), bearing male flowering inflorescences on a

male tree and female flowering inflorescences on a female tree. They reproduce by seeds or Off-shoot, and their growth is prolonged⁴. The most significant nutrients in humic acid are nitrogen, carbon, oxygen, hydrogen, sulfur, phosphorus, plus additional mineral elements, whereas fulvic acid is a group of substances having high molecular weights that are comparable in structurally similar; fulvic acid differs from humic acid in that it has a different chemical structure and includes fewer carbon and nitrogen.

Nonetheless, it had more hydrogen and oxygen⁵. Adding humic and fulvic acids increases the number of nutrients absorbed by the plant, transporting nutrients to the plant. It also causes an increase in the root system's growth and germination rate and improves the plant's anatomical traits⁶⁻⁹. Since the ornamental palm suffers from a significant problem, which is the slow growth of seedlings resulting from the seeds, this study was conducted to improve the anatomical characteristics of the seedlings, which are related to the growth indicators of the plant, by treating them with humic and fulvic organic acids.

MATERIALS AND METHODS

A pot with a 25 cm diameter was used to grow the seeds of the ornamental palm trees Washington (W) and Canary (C), containing a soil river and peat moss at a ratio of (1:1) with fulvic acid (F) at concentrations (0, 5 and 10 g.L⁻¹) and humic acid (H) at concentrations (0, 10 and 15 ml/L) as a soil drench at an average of once every two weeks within six months. Leaf samples from all treatments were gathered. Furthermore, it was fixed in the F.A.A. solution for 48 hours. The cut sections were passed with ascending concentrations of ethyl alcohol, and then the samples were embedded with paraffin wax at 58 °C. A Rotary Microtome cut the samples with a thickness of 10 µm. The slides were conducted on slides, stained with Safranin pigment, placed in Fast green pigment, loaded with drops of D.P.X., and covered with the slide cover. Then, the slides were studied. The measurements were taken by micrometer (µm) by an ocular micrometer in an Olympus-type optical microscope equipped with a camera attached to the calculator¹⁰. Statistical analysis The data were analyzed with the statistical tool GeenStat Ver.13 utilizing the variance analysis for the anatomical structure of the research components. Additionally, the averages were examined, and significance was determined using the least significant difference test (L.S.D.) with a 0.05 probability level¹¹.

RESULTS

The thickness of the cuticle layer

The results in Table (1) and Figure (1-a,b,c) demonstrated the considerable impact of palm type on the cuticle layer's thickness, where *P. canaries* outperformed *W. filifera* substantially and received the maximum score of 6.51 µm. In comparison, Washington's palm recorded the lowest average of 5.29 µm. Regarding humic acid's impact, the level of (15 ml.L⁻¹) recorded the lowest average cuticle thickness of 4.75 µm compared to the control treatment, which recorded the highest average of 7.51 µm. The cuticle layer's thickness was impacted by fulvic acid. The level of (10g.L⁻¹) gave the lowest average cuticle thickness, which was 4.98 µm, compared to the control treatment, which had an average of 7.31 µm, the highest. The thickness of the cuticle layer was significantly influenced by the interference between two palm and humic acid genera. The contact of the canary palm with the concentration of (0 ml.L⁻¹) yielded the highest value of 7.99 µm, while the *W. filifera* interfered with the level of (15 ml.L⁻¹) and recorded the lowest value of 4.06 µm. The *W. filifera* and a level (10 g.L⁻¹) interacted regarding the relationship between the kind of palm and fulvic acid. 4.34 µm was the lowest mean cuticle thickness, significantly different from the other interactions. The thickness of the epidermal layer differed significantly from the other reactions at the concentrations of humic and fulvic acid (15 ml.L⁻¹, 10 g.L⁻¹), respectively, and the lowest value was 3.08 µm. This shows that the study components' triple interference had a significant effect.

Skin thickness

The findings in Table 2 and Figures 1-a,b, and c demonstrated the considerable impact of palm type on epidermal cell thickness. The *P. canariensi* reported the lowest average of 10.04 μm , while Washington's palm recorded the highest Figure of 11.20 μm . *W. filifera* was much superior to the Canary palm. The most significant value for the thickness of epidermal cells was 11.74 μm compared to the control treatment, which recorded the lowest average of 9.01 μm in terms of humic acid action (15 ml.L^{-1}), topping the other doses significantly. The thickness of the epidermis was impacted by fulvic acid. Compared to the control treatment, which recorded the lowest average of 9.23 μm , the level of (10 g.L^{-1}) was noticeably superior, and the highest average was 11.50 μm . The interaction between palm and humic acid significantly influenced the thickness of the epidermal cells.

palm type	Humic acid ml/L	Fulvic acid g.L^{-1}			genera \times humic	Species effect
		0	5	10		
Washington	0	8.34	6.69	6.07	7.03	5.29
	10	6.35	4.11	3.87	4.78	
	15	5.69	3.41	3.08	4.06	
canary	0	8.67	8.02	7.29	7.99	6.51
	10	7.75	5.38	5.13	6.09	
	15	7.07	4.81	4.45	5.44	
genera \times fulvic	Washington	6.79	4.74	4.34	Humic effect average	Fulvic effect average
	canary	7.83	6.07	5.62		
humic \times fulvic	0	8.50	7.35	6.68	7.51	7.31
	10	7.05	4.74	4.50	5.43	5.40
	15	6.38	4.11	3.76	4.75	4.98
L.S.D. 0.05						
genera = 0.438	humic = 0.536	fulvic = 0.536	interaction between species and humic = 0.758	interaction between species and fulvic = 0.758	interaction between humic and fulvic = 0.928	triple interaction= 1.313

Table 1. *W. filifera* and *P. canariensi* leaves' cuticle layer thickness following treatment with humic and fulvic acids.

The interaction between the *W. filifera* and the level of (15 ml.L^{-1}) recorded the most significant value of 12.37 μm , and the lowest value, 8.54 μm , was reported for the interference between the *P. canariensi* and level (0 ml.L^{-1}). Regarding the interaction between fulvic acid concentration and palm type, the *W. filifera* interaction with the level (10 g.L^{-1}) recorded the maximum average thickness of epidermal cells of 12.12 μm , significantly different from the other interactions. The interaction between concentrations of humic acid (15 ml.L^{-1}) and fulvic acid (10 g.L^{-1}) produced the greatest value for the thickness of epidermal cells, measuring 12.72 μm , significantly different from the other interactions. In the *W. filifera* tree, the level of (15 ml.L^{-1}) humic acid and the level of (10 g.L^{-1}) fulvic acid exhibited the greatest interaction, which recorded the highest value for the thickness of epidermal cells at 13.34 μm and had a substantial difference from the other interactions.

genera	Humic ml/L	The three-way interaction effect			genera×humic	Species effect
		Fulvic acid g.L ⁻¹				
		0	5	10		
Washington	0	8.38	9.87	10.23	9.49	11.20
	10	10.03	12.41	12.79	11.74	
	15	10.76	13.01	13.34	12.37	
canary	0	7.89	8.61	9.11	8.54	10.04
	10	8.88	11.11	11.42	10.47	
	15	9.42	11.79	12.11	11.11	
genera× fulvic	Washington	9.72	11.76	12.12	Humic effect average	Fulvic effect average
	canary	8.73	10.50	10.88		
humic × fulvic	0	8.13	9.24	9.67	9.01	9.23
	10	9.45	11.76	12.10	11.11	11.13
	15	10.09	12.40	12.72	11.74	11.50
L.S.D. 0.05						
genera = 0.929	humic = 1.137	fulvic = 1.137	interaction between species and humic = 1.608	interaction between species and fulvic = 1.608	interaction between humic and fulvic = 1.970	triple interaction= 2.786

Table 2. The Effect of humic substances treatment on the epidermal cell thickness of *W. filifera* and *P. canaries*' leaves.

The length of the Columnar epithelial cells

The results in Table 3 and Figures 1-a,b,c indicated that the length of the columnar epithelial cells was considerably influenced by the kind of date palm, with the *W. filifera* significantly outperforming the canary palm and recording the most significant value of 16.46 μm , With a mean of 14.27 μm , the *P. canaries* had the lowest average. The effect of humic was much more significant at a concentration of (15 ml.L⁻¹) compared to the other concentrations, and the columnar epithelial cells' maximum length was 17.47 μm , significantly longer than the average length of 12.54 μm for the control treatment. The length of the Columnar epithelial cells was impacted by fulvic acid. Compared to the control treatment, which recorded the lowest average of 12.81 μm , the level of (10 g.L⁻¹) was much superior, and the highest average was 17.08 m. The interplay of the type of palm and humic acid significantly influenced the length of the columnar cells. The canary palm's contact with the concentration (0 ml.L⁻¹) logs the lowest value of 11.89 μm , while the *W. filifera* interaction with the level (15 ml.L⁻¹) logs the greatest value of 18.79 μm .

Regarding the interaction between the type of palm and the concentration of fulvic acid, the Washington palm and the interaction with the level of (10 g.L⁻¹) logs the highest average length of the Columnar epithelial cells at 18.41 μm .and had a substantial difference from the other interactions. In terms of the effects of humic substances, the interference between the concentrations of humic acid (15 ml.L⁻¹) and fulvic acid (10 g.L⁻¹) recorded the highest value for the length of the Columnar epithelial cells at amounted to 19.65 μm with a significant difference from the other interactions. The *W. filifera*, concentrations of (15 ml.L⁻¹) humic and (10 g.L⁻¹) fulvic, and the triple interaction between the study factors all had a significant impact on the length of the columnar epithelial cells, with the Washington palm interaction recording the highest value at 21.32 μm and had a substantial difference from the other interactions.

palm type	Humic acid ml/L	three-way interaction effect			genera×humic	Species effect
		Fulvic acid g.L ⁻¹				
		0	5	10		
Washington	0	11.37	13.67	14.49	13.18	16.46
	10	14.11	18.69	19.43	17.41	
	15	14.88	20.17	21.32	18.79	
canary	0	10.65	12.12	12.91	11.89	14.27
	10	12.48	15.46	16.36	14.77	
	15	13.36	17.12	17.98	16.15	
genera×fulvic	Washington	13.45	17.51	18.41	Humic effect average	Fulvic effect average
	canary	12.16	14.90	15.75		
humic × fulvic	0	11.01	12.90	13.70	12.54	12.81
	10	13.30	17.08	17.89	16.09	16.21
	15	14.12	18.64	19.65	17.47	17.08
L.S.D. 0.05						
genera = 1.796	humic = 2.200	fulvic = 2.200	interaction between species and humic = 3.111	interaction between species and fulvic = 3.111	interaction between humic and fulvic = 3.810	triple interaction = 5.388

Table 3. The effect of humic and fulvic acid treatment on the length of columnar cells in *W. filifera* and *P. canariensi* leaves.

Large vascular bundle diameter

The results in Table 4 and Figure 1-a,b,c demonstrated that date palm type significantly affected the diameter of the large vascular bundles, with *W. filifera* significantly outperforming *P. canariensi* and recording the highest value of 133.5 μm . In comparison, the *P. canariensi* recorded the lowest average of 97.5 μm . In terms of the humic acid effect, the concentration (15 ml.L⁻¹) was significantly superior to other concentrations, and the highest value of the diameter of the large vascular bundles was 149.4 μm compared to the control treatment, which recorded the lowest average of 76.9 μm . The diameter of the large vascular bundles was affected by fulvic acid, where the concentration was significantly exceeded (10 g.L⁻¹), and the highest rate was 140.8 μm compared to the control treatment, which recorded the lowest rate of 80.9 μm . The interaction between the type of palm and humic acid significantly affected the diameter of the large vascular bundles. The interaction between the *W. filifera* and the concentration (15 ml.L⁻¹) produced the highest value of 179.7 μm .

In contrast, the interaction between the *P. canaries* and the concentration (0 ml.L⁻¹) produced the lowest value of 69.6 μ m. In terms of the interaction between palm type and fulvic acid concentration, the interaction between the *W. filifera* and (10 g.L⁻¹) recorded the highest average diameter of the large vascular bundles, amounting to 167.4 μ m, with a significant difference from other interaction values. In terms of the interaction between the effects of humic acid and fulvic acid, the interaction between the concentration (15 ml.L⁻¹) of humic acid and the concentration (10 g.L⁻¹) of fulvic acid recorded the highest value for the diameter of the large vascular bundles, 189.5 μ m, with a significant difference from other interaction values. The interaction between the *W. filifera* and the concentrations (15 ml.L⁻¹) of humic acid and (10 g.L⁻¹) fulvic had the most significant effect on the diameter of the large vascular bundles, measuring 238.5 μ m.

genera	Humic ml/L	Fulvic acid g.L ⁻¹			genera×humic	genera effect
		0	5	10		
Washington	0	62.2	90.1	100.2	84.2	133.5
	10	95.4	151.3	163.4	136.7	
	15	108.3	192.4	238.5	179.7	
canary	0	60.0	69.0	80.0	69.6	97.5
	10	73.8	114.9	122.4	103.7	
	15	85.5	131.5	140.6	119.2	
genera×fulvic	Washington	88.6	144.6	167.4	Humic effect average	Fulvic effect average
	canary	73.1	105.1	114.3		
humic × fulvic	0	61.1	79.5	90.1	76.9	80.9
	10	84.6	133.1	142.9	120.2	124.9
	15	96.9	161.9	189.5	149.4	140.8
L.S.D. 0.05						
genera = 13.72	humic = 16.81	fulvic = 16.81	interaction between species and humic = 23.77	interaction between species and fulvic = 23.77	interaction between humic and fulvic = 29.11	triple interaction = 41.17

Table 4. The effect of humic and fulvic acid treatment on the diameter of the large vascular bundle of *W. filifera* and *P. canariensis* leaves.

Small vascular bundle diameter

The results in Table (5) and Figure (1-a,b,c) demonstrated that date palm type significantly affected the small vascular bundles, where the *W. filifera* was significantly Superior to the *P. canariensis* and logs the highest value of 94.8 μ m. In comparison, the *P. canariensis* logs have the lowest average of 61.8 μ m. In terms of humic effect, the level of (15 ml.L⁻¹) significantly excelled the other concentrations, and the highest value of the diameter of the small vascular bundles was 110.0 μ m compared to the control treatment, which recorded the lowest rate of 41.4 μ m. Fulvic had an apparent effect on the diameter of the small vascular bundles, where the concentration was significantly excellent (10 g.L⁻¹), and the highest average was 100.8 μ m compared to the control treatment, which recorded the lowest average of 44.9 μ m. The interaction between the type of palm and humic acid significantly affected the diameter of the small vascular bundles. The interaction between the *W. filifera* and level (15 ml.L⁻¹) produced the greatest worth of 136.7 μ m, while the interference between the *P. canariensis* and concentration (0 ml.L⁻¹) produced the lowest value of 34.1 μ m.

Regarding the interface between palm type and fulvic level, the interaction between the *W. filifera* and the level of (10 g.L⁻¹) logs the highest average diameter of the small vascular bundles at 122.9 μm, significantly different from the other interactions. In terms of the interaction between the effects of humic acid and fulvic acid, the interference between the level of (15 ml.L⁻¹) humic and (10 g.L⁻¹) fulvic logs the highest value for the diameter of the small vascular bundles, 144.2 μm, with a significant difference from the other interactions. The triple interaction between the study's factors had a significant effect, with the interaction between the *W. filifera* and the level (15 ml.L⁻¹) humic and (10 g.L⁻¹) fulvic recording the highest value for the diameter of the small vascular bundles amounted to 183.1 μm, and had a substantial difference from the other interactions.

genera	Humic ml/L	Fulvic acid g.L ⁻¹			genera×humic	genera effect
		0	5	10		
Washington	0	25.4	55.7	65.4	48.8	94.8
	10	60.4	115.7	120.3	98.8	
	15	71.5	155.4	183.1	136.7	
canary	0	24.4	33.4	44.3	34.1	61.8
	10	38.5	79.5	86.3	68.1	
	15	49.5	95.3	105.3	83.4	
genera× fulvic	Washington	52.4	108.9	122.9	Humic effect average	Fulvic effect average
	canary	37.5	69.4	78.6		
humic × fulvic	0	24.9	44.5	54.9	41.4	44.9
	10	49.4	97.6	103.3	83.4	89.2
	15	60.5	125.4	144.2	110.0	100.8
L.S.D. 0.05						
genera = 15.34	humic = 18.79	fulvic = 18.79	interaction between species and humic = 26.57	interaction between species and fulvic = 26.57	interaction between humic and fulvic = 32.54	triple interaction = 46.02

Table 5. The Effect of humic substances treatment on the diameter of the small vascular bundle of *W. filifera* and *P. canariensis* leaves.

Diameter of fibrous bundles

The findings in Table 6 and Figures 1-a,b, and c demonstrated the palm type's considerable impact on the diameter of the fiber bundles. The *P. canariensis* fared much worse than *W. filifera*, scoring the lowest value of 33.6 μm, while *W. filifera* received the best value of 44.8 μm. The greatest value of the diameter of the fiber bundles was 49.6 μm, compared to the control treatment, which recorded the lowest average of 25.6 μm. Regarding humic acid's impact, a level of (15 ml.L⁻¹) significantly outperformed the other concentrations. The diameter of the fiber bundles was affected by fulvic acid, where the concentration was significantly above (10 g.L⁻¹), and the most significant average was recorded at 47.3 μm compared to the control treatment, which recorded the lowest average of 26.7 μm. The interplay between palm type and humic acid significantly impacted the diameter of the fiber bundles. The *W. filifera* and level (15 ml.L⁻¹) interaction produced the maximum value of 57.5 μm, while the *P. canariensis* and level (0 ml/L) interaction produced the lowest value of 23.7 μm. The *W. filifera* with the level of (10 g.L⁻¹) of fulvic had the strongest interaction, with the *W. filifera* recording the maximum average diameter of the fiber bundles at 55.0 μm, with a significant difference

from the other interactions. The interaction between the effects of humic and fulvic logs the highest value for the diameter of the fiber bundles at 61.5 μm , significantly different from the other interactions. This interaction was between the levels of (15 ml.L^{-1}) humic and (10 g.L^{-1}) fulvic. In *W. filifera*, the level of (15 ml.L^{-1}) humic acid and the concentration of (10 g.L^{-1}) fulvic acid had an interaction that recorded the highest value of the diameter of the fiber bundles at 71.6 μm and had a substantial difference from the other interactions, indicating that three-way interaction effect between the search factors had a significant impact.

7. tannin cell diameter.

The results in Table (7) and Figure (1-a,b,c) revealed a significant relationship between the type of date palm and the diameter of the tannin cells, with the canary palm significantly outperforming *W. filifera* and recording the highest value of 20.18 μm while recording the lowest average of 18.73 μm . Regarding the impact of humic acid, the control treatment, which had the highest average tannin cell diameter of 21.54 μm , recorded the lowest average tannin cell diameter of 18.04 μm at a concentration of (15 ml.L^{-1}). In contrast to the control treatment, which recorded a maximum rate of 21.26 μm , fulvic acid impacted tannin cell diameter, as the concentration (10 g.L^{-1}) recorded the lowest average for tannin cell diameter of 18.30 μm .

genera	Hu- mic ml/L	Fulvic acid g.L^{-1}			genera \times humic	Species ef- fect
		0	5	10		
Washington	0	23.2	26.7	32.3	27.4	44.8
	10	29.4	57.7	61.1	49.4	
	15	35.3	65.5	71.6	57.5	
canary	0	22.2	24.1	24.9	23.7	33.6
	10	24.4	39.4	42.3	35.4	
	15	25.3	48.4	51.3	41.7	
genera \times fulvic	Wash- ington	29.3	50.0	55.0	Humic effect average	Fulvic ef- fect average
	canary	24.0	37.3	39.5		
humic \times fulvic	0	22.7	25.4	28.6	25.6	26.7
	10	26.9	48.6	51.7	42.4	43.7
	15	30.3	57.0	61.5	49.6	47.3
L.S.D. 0.05						
genera = 6.79	hu- mic = 8.32	fulvic = 8.32	interaction between spe- cies and hu- mic = 11.77	interaction between spe- cies and ful- vic = 11.77	interaction be- tween humic and fulvic = 14.41	triple inter- action= 20.38

Table 6. *W. filifera* and *P. canariensi* leaves fiber bundles diameter after humic and fulvic acid treatment.

The interplay between palm type and humic significantly impacted the diameter of the cells. The *W. filifera* level interferes (15 ml.L^{-1}) recorded the lowest value in the second year at 17.29 μm , while the *P. canariensi* level interferes (0 ml.L^{-1}) recorded the most significant value at 22.15 μm . Regarding the relationship between fulvic content and palm type, a relationship between *W. filifera* and the concentration of (10 g.L^{-1}) was observed. The tannin cells' lowest average diameter, which differed significantly from the other interfere, was 17.55 μm . In terms of the interference between humic and fulvic, the interference between the level of humic (15 ml.L^{-1}) and fulvic (10 g.L^{-1}) was noted. Compared to the other interactions, the lowest result for the diameter of tannin cells was 16.85 μm . The triple interaction of the study variables had a significant impact, as the *W. filifera* interaction with the concentrations of humic acid (15 ml.L^{-1}) and fulvic acid (10 g.L^{-1}) recorded the lowest value for the diameter of the tannin cells at 16.11 μm , significantly different from the other interfere.

genera	Humic ml/L	Fulvic acid g.L ⁻¹			genera×humic	generaeffect
		0	5	10		
Washington	0	22.79	20.34	19.66	20.93	18.73
	10	19.91	17.11	16.89	17.97	
	15	19.23	16.53	16.11	17.29	
canary	0	23.14	21.98	21.34	22.15	20.18
	10	21.69	18.87	18.22	19.59	
	15	20.78	17.98	17.59	18.78	
genera× fulvic	Washington	20.64	17.99	17.55	Humic effect average	Fulvic effect average
	canary	21.87	19.61	19.05		
humic × fulvic	0	22.97	21.16	20.50	21.54	21.26
	10	20.80	17.99	17.56	18.78	18.80
	15	20.01	17.26	16.85	18.04	18.30
L.S.D. 0.05						
genera = 1.143	humic = 1.399	fulvic = 1.399	interaction between species and humic = 1.979	interaction between species and fulvic = 1.979	interaction between humic and fulvic = 2.424	triple interaction= 3.428

Table 7. The Effect of treatment with humic and fulvic acids on the diameter of tannin cells of leaves of *W. filifera* and *P. canariensi*.

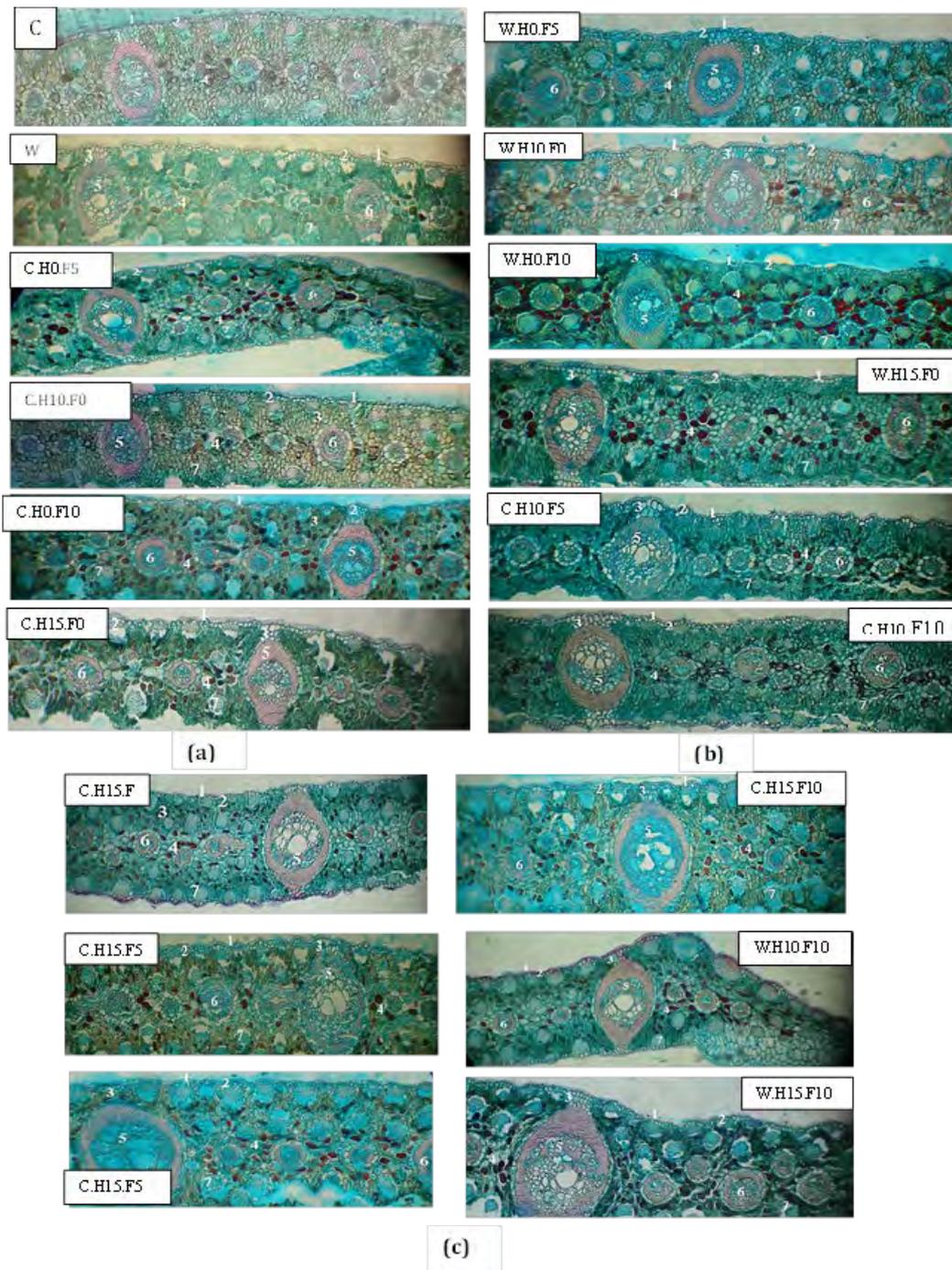


Figure 1. (a) Effect of humic and fulvic acid treatment on the morphological features of Washington and Canary palm leaves (1-cuticle 2- epidermis 3- columnar cells 4- tannin cells 5- macrovascular bundle 6- small vascular bundle 7- fibrous bundle; (b)The effect of humic and fulvic acid treatment on the morphological properties of Washington and Canary palm leaves (1-cuticle 2- epidermis 3- columnar cells 4- tannins 5- macrovascular bundle 6- small vascular bundle 7- fibrous bundle; (c)Effect of treatment with humic and fulvic acids on the anatomical characteristics of leaves of Washington and Canary palms (1-cuticle 2- epidermis 3- columnar cells 4- tannin cells 5- macrovascular bundle 6- small vascular bundle 7- fibrous bundle.

DISCUSSION

Several types of indicators can be used to describe the types of changes that the plant undergoes, such as anatomical indicators, where the plants growing in areas that suffer from fluctuations in environmental and

natural factors such as lack of water and lack of nutrients, and these conditions are determinants of plant growth and development, Despite the harsh conditions, plants have developed some anatomical characteristics that enabled them to survive under these conditions^{12,13}. It is noted from the results of the current study that the palm and humic substances significantly improve the anatomical traits of the leaves of the seedlings of the *W. filifera* and *P. canariensi* for cells compared with those developing in control conditions. This, in turn, may lead to an increase in cell division activity and an improvement in the growth conditions of the seedlings represented in the anatomical characteristics of the leaves. The effect of humic organic acids in improving vegetative growth had an apparent effect in reducing the thickness of the cuticle layer, where it was observed through the results of the current study that there was a significant increase in the averages of the thickness of the epidermal cells and the length of the Columnar epithelial cells, which means that there was an expansion in the surface area of the leaf that led to an increase in the spread of the waxy layer The covering of the upper epidermis and consequently the decrease in its thickness, in addition to the humic function organic acids in increasing the absorption of water, which increases the filling and expansion of cells, including the cells of the epidermis of the leaf, which reduces the thickness of the cuticle layer that covers it. Humic and fulvic acids also have a hormonal effect as they affect the cell's protoplasm and the cell wall, leading to the rapid division and growth of cells¹⁴.

Furthermore, this improves the plant's anatomical traits. It also stimulates the enzymes needed to convert complex compounds into simple compounds and exploits them to provide the plant with energy. Necessary for its growth, all these effects were positively reflected in the studied anatomical traits¹⁵.

CONCLUSIONS

Treatment with organic materials (humic and fulvic acid) as a ground addition to the seedlings of both *W. filifera* and *P. canariensi* ornamental palms led to an improvement in their anatomical characteristics, which led to an increase in the growth of seedlings of both genera.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Zona, S. " The horticultural history of the Canary Islands date palm (*Phoenix canari-ensis*). " *Garden History*, **2008**, 36: 301–308.
2. Johnson (1998). *Washingtonia filifera*. 2006 IUSN red list of threatened species IUCN 2006, retrieved on 11 May 2006.)
3. Albatal, N.. External Ornamental Plants. Damascus University Publications - Syria.**2005**.
4. Hossam, G., and Ali, H. Date palm trees from the reality of the United Arab Emirates. Abu Dhabi: Department of Abu Dhabi Municipality and Town Planning - Department of Agricultural Guidance and Marketing, Livestock. Abu Dhabi Printing and Publishing, **2003**, 467.
5. Moslat Mowaffaq Mizban and Omar Hashem Mosleh Fundamentals of Organic Agriculture Department of Horticulture and Landscaping - College of Agriculture - University of Anbar,**2015**, p.149.
6. Ismail, A.E.H. The effect of adding urea and humic acid on the growth of Alinky Dunya seedlings.*Al-Rafidain Agriculture Journal***2012**, 31-22:(4)40
7. Blackt, R. T. M.A and Al-Hamidawi,A. M. S. The effect of humic and fulvic organic humic acids and irrigation water quality on some vegetative growth indicators of young date palm trees (*Phoenix L dactylifera*, Barhi cultivar). *Kufa Journal of Agricultural Sciences***2015**, 7:(1) 47-56.
8. Al-Rawi, K.F., Ali, H.H., Guma, M.A., Alaaraji, S.F.T., Awad, M.M.The Relationships of Interleukin-33, Ve-Cadherin and Other Physiological Parameters in Male Patients with Rheumatoid Arthritis (2022) *Pertanika Journal of Science and Technology*, 30 (1), pp. 123-140

9. Z. Al-Fayyadh, D. .; Hasson, A. A. .; Hussein, A. K. .; Hassan, R. K., " Effect Of Humic Acid Spray On Growth Characteristics Of Wheat Varieties " Journal of Life Science and Applied Research, 2020, 1, 10-19.
10. Al-Najjar, M. Abd . H .; al-Ibrahimi, M. S. Abd . and Fadel, S. F. The Manual in the Laboratory, Guide to Laboratory Analysis for Postgraduate and Primary Students. Enheduana House for Printing, Publishing, and Distribution. Iraq**2021**, 223 p.
11. Abdul-Lateif, K. M. & Abdulateef, S. M. The effect of injecting hatching eggs with different concentrations of biotin on the quality and physiological characteristics of the hatched chicks. Iraqi J. Vet. Sci.2012, 26.
12. K. kudury, S., A. Abed, I., A. Mahdii, B. Microbial Fertilizers Existence And Its Relationship To Heavy Metals In Some Sustainable Agricultural Fields In Anbar Governorate. Anbar Journal of Agricultural Sciences, 2023; 21(1): 44-53. doi: 10.32649/ajas.2023.179714.
13. Al-Najjar, M. A.;Al-Abrisem,A.H andFadel, S. F. A study of some aspects of the environmental adaptation of date palm seedlings. Phoenix dactylifera L under stress conditions. *Diyala Journal of Agricultural Sciences***2018**10(1) 50-63.
14. F. T. Al-Rawi, Y. T. Abdul-Rahaman , Abdullah I.Noaman , Th. T. Mohammed, S. M Abdulateef, Nadia Jebril and K.I. Mahmud. Role of ascorbic acid and appetite stimulants on a few blood serum biochemical characteristics in pregnant Iraqi ewes under heat stress. Al-Rawi F T, Abdul-Rahaman Y T, Noaman Revis Bionatura 2022;7(4) 6. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.6>.
15. Samavat, S. and Malakoti, M. The necessity of producing and utilizing organic acids to increase the quality and quantity of agricultural products. Sana publisher. Tehran. In Persian with English Summary**2005**.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Alpresem, W.; Abdulameer, M.; Ahmed R. Effect of humic and fulvic acid treatment on the anatomical traits of the leaves of two genera of seedlings of ornamental palm *Washingtonia filifera* and *Phoenix canariensis*). Revis Bionatura 2023;8 (4) 46. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.46>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

The effect of spraying with amino acids and iron on some characteristics of vegetative and flowering growth of petunia

Mushtaq T. AL-Zurfi¹, Karim M. Bhiah^{2*}, Jamal A. Abbass³, Ahmed I. Mohammed⁴ and Amani G. Abboud⁵

¹ Faculty of Agriculture/ Horticulture and Land Scape Department/ University of Kufa- Iraq. mushtaq.alzurfi@uokufa.edu.iq

² *Faculty of Agriculture/ Soil and Water Department, University of Kufa- Iraq. karimm.bhiah@uokufa.edu.iq

³ Faculty of Agriculture/ Horticulture and Land Scape Department, University of Kufa- Iraq. jamal.selman@uokufa.edu.iq

⁴ Faculty of Agriculture/ Horticulture and Land Scape Department/ University of Kufa- Iraq. kbhiah@gmail.com

⁵ Faculty of Agriculture/ Horticulture and Land Scape Department, University of Kufa- Iraq. kbhiah@gmail.com

* Correspondence: karimm.bhiah@uokufa.edu.iq. Tel: 07804496022
Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.47>

ABSTRACT

A pot experiment was conducted during the 2019-2020 season at the temporary place of the Faculty of Agriculture/ University of Kufa/ Najaf city/ Iraq to estimate the response growth and flowering of petunia hybrid to Spraying amino acids and iron. The amino acid concentrations were 0, 3, and 6 ml.l⁻¹, and three iron concentrations were 0, 15, and 30 mg.l⁻¹. It is clear that the interaction between amino acid {6 ml.l⁻¹} and iron {15mg.l⁻¹} produces an increase in vegetative and flowering characters, the number of leaves and branches, length of flowering branches, number of flowers, Flower diameter, The age of the flower in the plant & the flower content of carotene pigment increased remarkably, while amino acid {6 ml.l⁻¹} and iron {30 mg.l⁻¹} have significant effect on leaf chlorophyll content, and total soluble carbohydrates.

Keywords: Petunia plant; amino acids; Iron; Auxins; growth; flowering.

INTRODUCTION

Petunia is an herbaceous winter annual plant, one of the oldest and most successful annual flowers known in Iraq. Its leaves are simple, alternate or opposite, simple in shape, and belong to the Solanaceae¹. The flowers are big, trumpet-shaped, and abundant on the plant during flowering. Many colors, including white, red, pink, violet and pink, have full-edge petals and fringes². Petunias are unsuitable for picking, and many types differ in shape and size. It is native to South America. The increase and improvement of petunias rely on many

elements, including temperature and day length, as beneath short-day prerequisites, boom slows down, and finally, flowers shape short, abundantly branched, and very short internodes. In long-day conditions, the principal department is elongated, branching decreases, and the internodes become larger. The most suitable temperature for vegetative growth is 10 °C for a short day. Also, flowers on the plant form over a long day at a temperature between 17-24 °C. The formation of buds and flowers and their development are not related to the duration of the day in case the temperature drops to 13 °C, but the formation of flowers takes place on both long and short days⁴. It succeeds in sunny and semi-shady places. Petunia is suitable for cultivation in the front panels. It is considered one of the exhibition plants. It is suitable for hanging baskets, balconies and pots, and pond cultivation.

Petunia multiplies by seeds in spring and autumn⁵. Foliar application is spraying nutrients on plant⁶, as the leaves are essential for many vital activities that can absorb nutrients like the roots⁷. Most plants can absorb nutrients through the leaves via leaves stomata or both. It absorbs ions through ion exchange⁸.⁹ indicated that adding nutrients by spraying them on the leaves is more effective than other methods for treating the deficiency of nutrients. Amino acids are organic nitrogen compounds and essential components in the synthesis of proteins. They are also materials for building and forming other organic compounds such as hormones, enzymes and vitamins¹⁰. There are two forms of amino acids, the first of which is the free form (L-amino acids), which are absorbed and built from the plant. The second is D-amino acids, which do not participate in forming proteins, as they play a role in forming enzymes¹¹. Amino acids have particular importance in stimulating and growing cells, and they serve as stores that help maintain pH inside the plant^{12,13}. Through its effect on auxins and gibberellins¹⁴, the plant has a role in increasing the photosynthesis process¹⁵. It is one of the important factors that help open stomata through raising the osmosis of the cytoplasm of the guard cells and has a chelating effect on the microelements, as it helps to increase the speed of absorption and transfer of elements inside the plant by increasing the permeability of the cell membrane^{16,17}. The amino acids also have a role in protecting plants from stress, as they work using osmotic substances that regulate the transport of ions and open stomata, remove the toxins of traditional elements and increase the effectiveness of iron from enzymes and their construction¹⁸. Furthermore, it activates the carbonic metabolism process and increases the effectiveness and the activity of antioxidant enzymes¹⁹. Its easy permeability and absorption also characterize it, as it affects the permeability of plant membranes. Thus, the ease of transporting nutrients within the plant is a natural cell for nutrients that are sprayed with it²⁰. This result is inconsistent with the findings of²¹. Iron has a significant role in many physiological processes of plants through the activation of enzymatic processes and chlorophyll formation in plant^{22,23,24}. More than 75% of the total iron of cells is found in chloroplasts. In the lipoproteins of chloroplast and mitochondrial cell membranes²⁵. As to the peroxidase enzyme, it is essential to stimulate the polymerization process of phenols to lignin²⁶ and regulate iron absorption²⁷. This result is consistent with the findings of²⁸ when spraying chelated iron on (*Calendula officinalis* L.). This study aims to show the petunia's response to growth and flowering to amino acids and iron.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in the temporary place of the Faculty of Agriculture, University of Kufa, during the 2019/2020 season to estimate the effect of spraying amino acids and iron on the growth and flower of petunia. Petunia seeds were collected from a private nursery (An-Najaf Center), An-Najaf al-Ashraf City, Iraq. On 10/1/2019, seedlings were prepared from a private nursery, produced from seed cultivation by a German

company, and planted in a plastic pot with a diameter of 25 cm and a height of 20 cm; it has three kg of Soil. A factorial experiment was carried out in a randomized complete block design (RCBD) with two factors in three replicates, the first-factor amino acids in three concentrations {0, 3 and 6 ml.l⁻¹} (Table 1), The second-factor iron at three concentrations {0,15 & 30 mg .l⁻¹}. The amino acids and iron were sprayed twice: the first when five real leaves appeared and the second 15 days after the first spray. Averages were compared according to the Least Significant Difference test {LSD} of the level of probability 5%²⁹. Standard cultural practices were carried out for each experimental unit, including irrigation and weeding, whenever the plant needed it. Five pots in each experiment unit, each pot contains one plant=135 plants. The physical and chemical properties of the potting Soil are in Table 2. The experiment ended on 2/2/2020. The following growth indicators were measured.

Total (N)	Organic material	Total amino acids	Free amino acids
w/w			
6.5%	15%	20%	11.50%

Table 1. The ingredients of amino acid fertilizer{Spanish company}.

Property	{unit}	{value}
Potential of hydrogen		7.52
Electrical Conductivity	dS m⁻¹	2.85
Nitrogen	g 100 kg⁻¹	0.52
Phosphorus	mg l⁻¹	2.69
Potassium	Centimole kg⁻¹	15.1
Magnesium	Centimole kg⁻¹	1.8
Organic matter	%	0.75
Soil texture	Sandy	
Clay	%	3.0
Silt		4.2
Sand		92.8

Table 2. Physical and chemical properties of the potted Soil.

Vegetative Growth Parameters

Number of leaves {leaf.Plant⁻¹} was counted as the average of five randomly selected from each experimental unit—total number of branches {branch.Plant⁻¹} calculates the total number of branches for each experimental unit. The weight of dry shoot {g} was calculated at the end of the experiment. It was done by removing the

whole plant from the pots, then cutting the stem and the leaves together, removing the root system, and placing it in a room with good ventilation for three days, after which it was placed in an {oven} at a temperature of {70} °C for 8 hours, then take the weight using the sensitive balance, for each experimental unit, and each treatment. Estimation of the total chlorophyll content of leaves {mg.100g⁻¹} The total chlorophyll in the leaves was estimated by following³⁰ by taking a weight of 0.5 g of fresh leaf and adding 10 ml of acetone at a concentration of 85% and crushed by a ceramic mortar until the white tissue completed the volume to 30 ml and then the dye was estimated by a {UV-Visible Spectrophotometer} to measure optical absorption at the positive lengths of 645 and 663 nanometers—estimation of leaves content of total soluble carbohydrates {mg.g⁻¹}. Carbohydrates were estimated by following³¹ by taking the weight of 10 mg of dry ground leaves and adding to the 5 ml of sulfuric at a concentration of 80% and 1 ml of phenol at a concentration of 5% to turn it into an orange color, and this is an indication of the reaction response estimated by UV- device—visible spectrophotometer at a wavelength of 490 nanometers.

Flowering parameters

The length of the flowering branches (cm) was measured by measuring tape for each experimental treatment. The number of flowers (flower.Plant⁻¹) was calculated cumulatively for each experimental treatment and each treatment. Vernia measured the diameter of the flower (cm) for each experimental treatment. Day of flower per plant (day). The number of flowering days on the plant until wilting was calculated for each experimental unit. Determination of the carotene content of the flowers (mg.100g⁻¹) 0.25 g of fresh flower petals was taken, 30 ml of 80% acetone was added to it, crushed by a ceramic mortar, the solution was filtered by filter paper, and the sample was read by a UV-Visible spectrophotometer at a wavelength of 480 nm for each experimental treatment³².

RESULTS

Data presented in Table 3 showed a significant increase in the vegetative growth parameters of Petunia when spraying Amino acids at a concentration of {6ml.l⁻¹} as Number of Leaves, number of branches, weight dry of the shoot system, the content of leaves of total chlorophyll and total soluble carbohydrates), which receded {48.00 leaves. Plant⁻¹, 5.52 branch. Plant⁻¹, 5.47 g, 24.13 mg. 100 g⁻¹ and 11.98 mg. g⁻¹} respectively, compared to the control, which gave the lowest rate of {37.33 leaf. Plant⁻¹ and 2.88 branches. Plant⁻¹, 3.52 g, 20.62 mg.100 g⁻¹, and 9.98 mg. g⁻¹} respectively. The results of the same table showed that spraying iron at a concentration {of 30 mg.l⁻¹} significantly increased the total Leaves, the number of branches, the dry weight of the shoot, the content of leaves from the total chlorophyll and the total soluble carbohydrates, which receded {50.22 leaf—plant 4.66 branch. Plant⁻¹, 5.07 g, 23.47 mg.100 g⁻¹ and 11.00 mg. g⁻¹} compared with control, which observed the lowest rate, {44.67 leaf.plant⁻¹, 3.71 branch.plant⁻¹ 4. 11 g 23.19 mg.100 g⁻¹ & 10.24 mg.g⁻¹} respectively.

Treatment	Conc.	No. Of leaf.plant ⁻¹	No. Of Branch .plant ⁻¹	Dry shoot system (g)	carbohydrate in leaf mg. g ⁻¹	chlorophyll in leaf mg.100g ⁻¹	
Amino acid ml.l⁻¹	0	37.33	2.88	3.52	9.38	20.62	
	3	42.22	4.55	4.59	10.71	22.56	
	6	48.00	5.52	5.47	11.98	24.13	
LSD 0.05		1.930	0.440	0.296	0.220	2.018	
Iron mg.l⁻¹	0	44.67	3.71	4.11	10.24	23.19	
	15	49.61	4.45	4.44	10.84	22.64	
	30	50.22	4.66	5.07	11.00	23.47	
LSD 0.05		1930	0.440	0.296	0.220	2.018	
Amino acid ml.l⁻¹ X Iron mg.l⁻¹	0	0	34.00	2.33	3.24	9.25	20.24
		1	37.00	2.61	3.28	9.28	20.32
		5					
	3	0	41.00	3.66	4.04	9.62	21.30
		1	44.33	3.66	3.95	10.29	24.87
		5	48.33	5.00	4.37	10.80	22.29
	6	0	52.00	5.51	5.45	11.05	23.51
		1	55.67	5.33	5.15	11.18	24.48
		5	63.62	6.00	5.74	12.12	25.33
	LSD 0.05	0	57.85	5.54	5.23	12.45	25.60
		1					
		5					
LSD 0.05		3.344	0.763	0.513	0.382	3.976	

Table 3. The impact of spraying Amino acids and iron on vegetative growth.

Table 3 showed that there was a significant interaction between spraying amino acids and iron at a concentration of 6 ml.l⁻¹ with 15 mg.l⁻¹. This resulted in a significant increase in the number of total Leaves, Number of branches, Dry weight of the Shoot system, the content of leaves of total chlorophyll and total soluble carbohydrates which receded {63.62 leaves. Plant⁻¹, 6.00 branches. Plant⁻¹, 5.74 g, 25.60 mg.100 g⁻¹ and 12.45 mg.g.} Respectively, compared with control, that recorded a lower rate, {34.00 leaves. Plant⁻¹}, 2.33 branches .plant⁻¹, 3.24g, 20.24 mg. 100g⁻¹ and 9.25 mg. g⁻¹ respectively,.

The data exhibited in Table 4 showed a significant increase in the flowering parameters of petunia when spraying amino acids at a concentration of 6 ml. l⁻¹, as the length of the flowering branches, number of flowers, flower diameter, day flower on the plant and the content of flowers of carotene pigment, which receded {13.85

cm,74. 56 flower. Plant⁻¹, 7.76 cm, 9.61 days and 5.11 mg.100 g⁻¹} compared to the control, which gave the lowest rate of {9.97 cm, 55.00 flower. Plant⁻¹, 5.73 cm, 6.22 days and 3.66 mg.100g⁻¹} respectively.

Treatment	Conc.	length of flowering branches (cm)	No. of flower (Flower.plant ⁻¹)	Flower diameter (cm)	Day of flower on the plant (day)	Flower carotene content (mg.100g ⁻¹)	
Amino acid ml.l ⁻¹	0	9.97	55.00	5.73	6.22	3.66	
	3	11.52	63.00	6.61	7.77	5.03	
	6	13.85	74.56	7.76	9.61	5.11	
LSD 0.05		0.433	1.534	0.146	0.440	0.308	
Iron mg.l ⁻¹	0	11.72	60.44	6.40	7.41	4.35	
	15	12.76	65.22	6.78	8.00	4.78	
	30	12.86	67.22	6.92	8.22	4.57	
LSD 0.05		0.433	1.534	0.146	0.440	0.308	
Amino acid ml.l ⁻¹ X Iron mg.l ⁻¹	0	0	9.30	51.33	5.53	6.00	3.37
		1	10.16	55.31	5.70	6.00	3.49
		5					
	3	0	10.46	58.25	5.96	6.66	4.13
		1	11.63	60.67	6.30	7.33	4.53
		5	12.91	62.00	6.66	7.54	5.29
	6	0	13.00	67.11	6.68	8.33	5.27
		1	14.23	69.33	7.36	9.00	5.16
		5	15.20	78.45	8.00	10.22	5.55
	30	0	15.13	76.00	7.93	9.96	4.31
		1					
	LSD 0.05		0.750	2.657	0.252	0.763	0.533

Table 4. The impact of spraying amino acids iron on flowering characteristics.

Table 4 also showed that spraying iron at {30mg.l⁻¹} Led to a significant increase in the flowering parameters of petunia, as {length of the flowering branches, number of flowers, flower diameter, day flower on the plant, and the content of flowers from carotene pigment}, which reached {12.86 cm,67. 22 flower.Plant⁻¹, 6.92 cm, 8.22 days, and 4.57 mg.100 g⁻¹} Compared to the comparison treatment that gave the lowest rate of {11.72 cm, 60.44 flowers.Plant⁻¹, 6.40 cm, 7.41 days and 4.35 mg. 100g⁻¹} respectively. The same table also showed that spraying amino acids at 6 ml.l⁻¹ with iron at {30 mg. l⁻¹} Led to a significant increase in flowering parameters from petunia, such as {length of flowering branches, number of flowers, flower diameter, day flower on the

plant, and flower content of the carotene pigment} which receded {15.20 cm, 78.45 flowers. Plant⁻¹, 8.00 cm, 10.22 days and 5.55 mg. 100g⁻¹ compared to the control, which recorded the lowest rate of {9.30 cm, 51.33 flowers. Plant⁻¹, 5.53 cm, 6.00 days, and 3.37 mg. 100 g⁻¹} respectively.

DISCUSSION

Notes from Table 3 and Table 4 show that the spraying of amino acids led to a significant increase in the parameters of vegetative growth and flowering. This may belong to the important role of amino acids in the physiological processes of the plant via the manufacture of proteins, auxins and carbohydrates^{33,34} and in the synthesis of RNA and DNA and IAA³⁴ which is vital for cell division and elongation³⁵ and lead to giving the highest number of inflorescences³⁶. It is also noted from Table 3 and Table 4 that iron spraying had a significant increase in the characteristics of the shoot and flowering system. This may be due to the effect of iron in the photosynthesis process and the production of energy, ATP, which is important in the vital processes of the plant, rather than entering into the composition of the nucleic acids DNA and RNA necessary for the division cells, which encourages the formation of leaf buds and then increases the number of leaves²⁶. This may be attributed to the fact that iron contributes to the oxidation-reduction reactions in the plant, as it enters the composition of many oxidation and reduction enzymes such as cytochromes, peroxidases, oxidases and others. It also has a role in the process of photosynthesis, as 70% of the total iron is found in the chloroplasts, and this explains its importance in the process of carbon metabolism and then increasing the percentage of carbohydrates in the leaves^{37,38,39}. In addition, iron has a key role in the formation of chlorophyll through the participation of iron in the condensation of succinic acid and glycine to form Y-aminolevulinic acid, which in turn condenses to form pyrrole groups, which also condense to form protoporphyrin. This substance is for the formation of chlorophyll, stimulated by iron,^{40,41} and this may be due to the effect of iron in increasing vegetative growth and increasing the number of leaves, and the importance of iron in the vital processes within the plant that accelerate the transformation of some vegetative buds to flower^{42,43} and then increase Flower buds and then to an increase in the flowers number^{9,44}.

CONCLUSIONS

In this work, spraying amino acids and iron caused a significant increase in vegetative indices flowering growing (leaves, branches, shoot system and number of flowers) in addition to chlorophyll and carbohydrates of petunia.

Author Contributions

Mushtaq T. AL-Zurfi: formal analysis, Karim M. Bhiah: writing, Jamal A. Abbass: project administration, Ahmed I. Mohammed: data curation and review and editing. Amani G. Abboud: methodology and investigation.

Acknowledgments

The authors thank the Faculty of Agriculture/University of Kufa.

REFERENCES

1. Al-Batal, N. Indoor Ornamental Plants, Faculty of Agriculture. Damascus University Publications, Syria **2005**, Al-Ajlouni Press.
2. Gerats, T.; Vandebussche, M. A model System For comparative research petunia. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*(5):251-256.
3. Al-Shahat, N. A. Cultivation and production of flower and ornamental plants, Cairo, Egypt, **2002**, Arab House for Publishing and Distribution.
4. Chalabi, S. K.; Al-Khayat, N. K. Ornamental Plants in Iraq, College of Agriculture, University of Baghdad. Iraq, **2013** University House for Printing, Publishing and Translation.
5. Al-Batal, N. Outdoor Ornamental Plants, Faculty of Agriculture. Damascus University Publications, Syria, **2010**, Rawda Press.
6. Kannan, S. Mechanism of foliar uptake of plant nutrients accomplishments and prospects. *J. Pl. Nutr.*, **1980**, *2* (6):717-735.
7. Peuke, A. S.; Jeschke, W. D.; Hartung, W. Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis*. In The flows of cations chloride and abscisic acid, *New Phytol.*, **1998**, *140*:625-636.
8. Mengel, K. Alternative or complementary role of foliar supply in mineral nutrition. *Acta. Horticulturae*, **2002**, *594*: 33-48.
9. Tisdale, S. L.; Nelson, W. L.; Beaton, J. D. Soil Fertility and Fertilizers. ^{4th} Ed. Mac Millan Publ. Co. New York. USA. **2005**, Pp: 631- 671.
10. Abd El-Aziz, G. N.; Balboa K. L. Influence of tyrosine and Zinc on growth, flowering and chemical constituents of *Salvia farinacea* plant, *Egypt, J. Appl Sci.* **2007**, *3*(11):1479- 1489.
11. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>
12. Davies, D. D. *Physiological Aspects of Protein Turnover*. In: Boulter, D., and B. Parthei (eds), *Encycl. Phys. New Series*, *14*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Germany **1982**, pp.199-288.
13. Ibraheem M W, AL Mjbel A A, Abdulwahid A S, Mohammed Th. T. Characterization of the influence of diet on Japanese quail. *Revis Bionatura*. 2022;7(4) 21. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.21>.
14. Alrseetmiwe, D. S. ; Almayah, A. A. ; Nasser, A. A. ; Alnussairi, M.; Zadeh, H. A.; Mehrzi, F. A. *Escherichia Coli* Strain B121: Cloning And Expression Of An Optimized Interferon Alpha 2B (DE3). *Journal of Life Science and Applied Research*. 2020, *1*, 40-44.
15. Yongin, K.; Seob, L. G.; Sang C.; Tayeak, H.; Jacok, G. Effect of 5-aminolevulinic acid on growth and inhibition of various plant species Kor., *JCSB* **2003**, *48*: 127-133.
16. Westwood, M. N. *Temperate-zone Pomology Physiology and Culture*. Third edition. Humber Press, Portland, Oregon, USA. **1993**, pp. 523.
17. Weaver, R. *Molecular Biology*. 5th edition. Oxford. England **2013**, pp 914.
18. Rai, V. K. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biol. Plantarum* **2002**, *45*:481-487.
19. Tantawy, A. S.; Abdel-Mawgoud A. M. R.; El-Nemr, M. A.; Chamoun, Y. G. Alleviation of salinity effect on tomato plant by application of amino acid and growth regulators. *Eur. J. Sci. Res.* **2009**, *30* (3):484-494.

20. Koksai, A. I.; Dumanoglu, H.; Gunes, N. T. The effects of different amino acid chelate foliar fertilizers on yield, fruit quality, shoot growth and Fe, Zn, Cu and Mn content of leaves in William spear cultivar of *Pyrus communis* L. *Turk. J. Agric. For* **1999**, *23*:651-658.
21. Hassan, F. A.; Al Taher, Z. A. A.; Saleh, A. K. N. Effect of some amino acids and coconut liquid on vegetative and flowering growth and percentage of oil of geranium plants *Pelargonium hortorum*, *MJAS* **2014**, *1*(3):1-20.
22. Hopkins, W. G. Introduction to Plant Physiology. John Wiley and Son Inc. New York. USA **1999**, pp.512.
23. Al-Tai, T. A. A. Fertilizers and soil conditioners (translator). Ministry of Higher Education higher education and scientific research. University of Al Mosul. Iraq., **1987**.
24. Hassan, N. A.; Al-Dulaimi, H. Y.; Al-Ethawi, L. A. Soil Fertility and Fertilizers. House of Wisdom for Printing and Publishing. University of Al Mosul. Iraq. **1990**.
25. Tisdale, S. L.; Nelson, W. L.; Beaton, J. D.; Havlin, H. L. Soil Fertility and Fertilization. Prentices Saddle River. New Jersey. USA. **2005**, pp. 220.
26. Abu Dahi, Y. M.; Al-Younes M. A. Plant Nutrition Guide. Ministry of Higher Education and Scientific Research. University of Al Mosul. Iraq., **1988**.
27. Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Edition. Academic Press. London. England., **1986**.
28. Al-Asadi, Z. N. Effect of spraying with active yeast suspension and chelating iron on the vegetative and flowering growth of chrysanthemum *Calendula officinalis* L. *JOK* **2014**, *12*(3):226-235.
29. Al-Rawi, K. M.; Khalaf Allah A. A. Design and analysis of agricultural experiments, Dar Al-Kutub for printing and publishing. University of Al Mosul. Ministry of Higher Education and Scientific Research. Iraq., **2000**.
30. Thabit S S, Awad M M, Abdulateef S M. Effects of In-Ovo Injection of sialic acid on Chick's embryonic development and physiological traits. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 49. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.49>.
31. Alaaraji, S.F.T., Mohisen, M.A., Awad, M.M. Assessment serum levels of neopterin, IL-6, IL-1 β , hs-CRP, TNF- α and MMP 9 in iraqi rheumatoid arthritis patients (2020) *Systematic Reviews in Pharmacy*, *11* (12), pp. 88-93.
32. Abbas, M. F.; Abbas, M. G. Care and Storage of Practical Fruits and Vegetables. Faculty of Agriculture. Bashra University. Ministry of Higher Education and Scientific Research. Iraq **1992**.
33. Thomas, J.; Mandal, A.; Kumar R. R.; Chordia, A. Role of biologically active amino acid formulations on quality and crop productivity of Tea (*Camellia sp.*). *Int. J. Agr. Res* **2009**, *4* :228-236.
34. Wona, C.; Shena, X.; Mashiguchib, K.; Zhengc, Z.; Daia, X.; Chenga, Y.; Kasaharab, H.; Kamiyab, Y.; Choryc, J.; Zhaoa, Y. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and yuccas in *Arabidopsis*. *PNAS* **2011**, *108*(45):18518–18523.
35. Al-Sahaf, F. H. Applied Plant Nutrition. Baghdad University. Ministry of Higher Education and Scientific Research. Iraq., 1989.
36. Al-Said, M. A.; Kamal A. M. Effect of foliar spray with folic acid and some amino acids on flowering, yield and quality of sweet pepper. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ* **2008**, *33*(10):7403 – 7412.
37. Al-Nuaimi, S. N. Principles of Plant Nutrition. Directorate of Books for Printing and Publishing. University of Al Mosul. Ministry of Higher Education and Scientific Research. Iraq., **2000**.

38. Focus, F. The importance of micronutrients in the region and benefits of including them in fertilizers. *Agrochemicals Report* **2003**, *111*(1):15-22.
39. Barker, A. V.; Pilbeam D. J. Handbook of Plant Nutrition. Taylor & Francis Group. USA. Rai, V. K. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biol. Plantarum* **2007**, *45*: 481-487.
40. Youssef, A.S.M. Influence of some amino acids and micro-nutrients treatments on growth and chemical constituents of *Echinacea purpurea* plant. *J. Plant Production* **2014**, *5* (4):527 –543.
41. Wahba, H.E.; Motawe H.M.; Ibrahim, A.Y. Growth and chemical composition of *Urtica pilulifera* L. plant as influenced by foliar application of some amino acids. *J. Mater. Environ. Sci* **2015**, *6*(2): 499-506.
42. Otani, Y.; Endo, C.; Chin, D.P.; Mii, M. Highly efficient system for plant regeneration from leaf and stem explants in *Dahlia*. *Plant Biotechnol* **2013**, *30*(2), 141–146.
43. Abd-Elkader, H. H.; Kasem, M. M.; Younis, T. T. E.; Gad, A. E. A. Impact of some Amino Acids on Vegetative Parameters, Flowering and Chemical Constituents of *Dahlia* Cut Flowers. *J. of Plant Production* **2020**, *11* (4):333 – 339.
44. A. Zaili, S., M. Alabdaly, M. Responce Of Growth And Yield Of Local Garlic *Allium Sativum* To Potassium Fertilization And Planting Date. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; *21*(1): 54-63. doi: 10.32649/ajas.2023.179715.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: AL-Zurfi M. T., Bhiah K. M., Abbass J. A., Mohammed A. I. and Abboud A. G.. The effect of spraying with amino acids and iron on some characteristics of vegetative and flowering growth of petunia. *Revis Bionatura* 2023; *8* (4) 47. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.47>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

The Effect of Organic Fertilization and Jasmonic Acid on the Morphological, Quantitative, and Chemical Parameters of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) variety Hussainawiya

Hayder S. Jaafar¹, Nazar A. Al-Ibraheemi^{2*}, Aseel A. Ghali³

¹ Horticulture Department/ Agriculture Collage/ University of Kufa; ha.der.alibraheemi@uokufa.edu.iq

² Al-Najaf Agriculture Directorate/ Ministry of Agriculture; nazar_081@yahoo.com

³ Horticulture Department/ Agriculture Collage/ University of Kufa; assela.almamoori@uokufa.edu.iq

*Correspondence: nazar_081@yahoo.com; Tel.: (009647815062035)

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.48>

ABSTRACT

A study was conducted in a field belonging to the Najaf Agriculture Directorate/Najaf/Iraq during the spring growing season of 2021. The study aimed to analyze the response of okra variety Hussainiya for two factors. The first studied factor was three levels of DPW (decomposed palm waste), including 0, 16, and 32 tonha⁻¹, while the second factor was three levels of a foliar application of Jasmonic acid, including 0, 15, and 30 mgL⁻¹. Randomized Complete Block Design (RCBD) was used to model the factorial experiment with three replications, and the Least Significant Differences (LSD) were selected to compare the means at the probability level of 0.05. The results showed the significant superiority of organic fertilization treatment of DPW at the level of 32-ton ha⁻¹ compared with control treatments in the studied parameters, recording the highest value of the plant height, total number of leaves, total leaf area, dry weight of the vegetative system, number of fruits per plant, the yield of one plant, total yield, the percentage of nitrogen in leaves, the total chlorophyll percentage, and the total soluble carbohydrates in fruits. The foliar application of 30 mg. L⁻¹ Jasmonic acid gave significantly higher values for the above indicators than control treatments. The interaction between the application of 32 tons. ha⁻¹ DPW and 30 mg L⁻¹ Jasmonic acids showed significant superiority over other treatments in all studied indicators. These indicators were plant height 131.66 cm, total number of leaves 42.55 leaves plant⁻¹, total leaf area 1.66 m²plant⁻¹, dry weight of the vegetative system 95.48 g plant⁻¹, fruits number 77.15 fruit plant⁻¹, yield of one plant 884.75 g plant⁻¹, total yield 56.17 tons. ha⁻¹, nitrogen in leaves 2.262%, total chlorophyll in leaves 80.91 mg.100 g⁻¹FW, and carbohydrates in fruits 20.33%. While the interaction between non-fertilized plants sprayed with water only recorded significantly the lowest value of these indicators, which scored 77.10 cm, 20.36 leaf plant⁻¹, 0.59 m²plant⁻¹, 54.11 g plant⁻¹, 47.23 fruit plant⁻¹, 237.42 g plant⁻¹, 15.07-ton ha⁻¹, 1.351%, 47.45 mg.100 g⁻¹ fresh weight, and 6.77% respectively.

Keywords: *Abelmoschus* plant; decomposed palm waste; Jasmonic acid; okra, Organic fertilizer; yield indicators.

INTRODUCTION

Okra plant *Abelmoschus esculentus* L. belongs to the Malvaceae family. The original homeland is believed to be Ethiopia and Sudan. It is cultivated in open fields as a summer crop. Also, okra can grow in protected facilities¹. Okra fruits are rich with nutritious value. Each 100 g of fresh fruits contains 85.7% water, 35 calories, 6.4 g carbohydrates, 2.4 g fats, 1.9 g protein, 1.2 g fiber, 249 mg potassium, 66 mg calcium, 56 mg Phosphorous, 53 mg Magnesium, 30 mg Sulfur, 0.35 mg Iron, 0.19 mg Copper, 520 IU Vitamin A, 0.01 mg vitamin B1, 0.07 mg vitamin B2, 0.6 mg vitamin B3, 88.21 µg vitamin B9, and 13 mg vitamin C². Medically,

okra fruits help treat diseases such as anemia, general weakness, urinary tract, kidney inflammation, and diarrhea³.

The total planted area in the world amounted to 20 million hectares with a productivity of 10 million tons, while the total cultivated area in Iraq was 12,128 hectares with productivity of 68,451 tons⁴. The reason for low productivity in Iraq may be related to the failure to use modern technologies and scientific methods in crop management because of their positive impact on plant growth and development and increasing total productivity.

The decomposed organic matter is used to improve the chemical and physical characteristics of the soil because it contains humic acids. Humic acids have water-loving colloids that have a high surface area. Therefore, their absorbent capacity increases by more than 300% of their weight, affecting the water balance content. This change in the soil structure and the volume of pores activates microorganisms in the soil, improves the water condition, reduces heat stress, and reduces drought and salinity. This produces a healthy crop with fewer chemical pollutants like nitrates or oxalates. Organic fertilization is used as fertilizer and soil reformer. Moreover, it provides the necessary nutrients that positively impact the vegetative and physiological indicators of plant growth. This fertilization method improves plant and soil relations to maintain human and animal health^{5,6}.

Applying organic manure (sheep waste with kohl residue) to corn at 4 levels (0, 10, 15, and 20) ton ha⁻¹ increased the vegetative growth indicators of zucchini squash plants⁷. The results also showed that adding 20-ton hectare⁻¹ recorded significantly the highest value of plant height and dry biomass of the vegetative system compared to no treated plants. A study was conducted to determine the effect of organic fertilization with date palm waste and foliar application of date seed extract on the growth and yield of cucumbers⁸. The results showed that organic fertilization with date palm residues significantly increased the quantitative indicators compared to the comparison treatment. Significant differences in the yield indicators were observed when fertilizing the cucumber plant with palm frond residues compared with the control plants⁹.

Recently, some researchers have used Jasmonic acid as a growth regulator since their results showed a positive effect of this acid on the flower development of some horticultural plants. In addition, Jasmonic acid has an essential impact on the cellular system and plant development and reduces stresses such as heat, drought, and salinity¹⁰. Therefore, this study aims to show the effect of organic fertilization with decomposing palm waste (DPW), foliar applications of Jasmonic acid, and their interaction on okra's vegetative, chemical, and yield indicators.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted during the 2021 agricultural season on a field in the desert area of the Haidariya sub-district of Najaf province / Iraq. Before planting, laboratory analyses were conducted on the field soil by taking ten random samples from different places at 0-30 cm soil depth. Irrigation water samples were also taken from the well to analyze some chemical and physical characteristics in the Department of Soil Sciences/ College of Agriculture/ Al-Kufa University, as shown in Table 1.

Characteristics	pH	Ec dS m ⁻¹	Organi c Matter %	N mg kg ⁻¹	P mg kg ⁻¹	K mmol charge L ⁻¹	Cla y g L ⁻¹	Silt g L ⁻¹	sand g L ⁻¹	soil texture
Soil	7.4	3.5	1.2	4.12	3.74	0.59	128	177	695	sandy loam
Well water	7.2	4.3	—	2.26	3.31	0.78				

Table 1. shows some chemical and physical properties of field soil and well water before planting.

The experimental field soil was prepared by plowing, smoothing, leveling, and dividing it into three terraces. The space between terraces was 0.80 m, and each terrace was 30 m long. The distance between one plant and another was 0.35 m. Al-Hussainawiya cultivar seeds were planted after soaking in water for 24 hours on

10/3/2021 alternately on both sides of the growing lines. After three weeks from the germination, the area of the experimental unit was 2.52 m² (3.15 m length x 0.80 m), which contained 16 plants. A factorial experiment using a randomized complete block design (RCBD) with three replications was adopted. Two factors were tested in this study. The first factor is soil applications of organic fertilizer, which was added before the planting at three levels (0, 16 and 32) ton ha⁻¹ ¹¹. Organic fertilizer was obtained from the Preparing Organic Fertilizers and Mushrooms Project at Najaf/Iraq, as shown in Table 2.

Characteristics	N %	P %	K %	C %	B mg.kg ⁻¹	pH	Ec (dS.m ⁻¹)	OM %	C/N %
Value	1.86	0.8	1.3	40.79	13	6.6	6.95	73.33	21.93

Table 2. Some chemical indicators of decomposed palm waste.

The second factor was a foliar application of Jasmonic acid at 3 levels, including 0, 15, and 30 mg L⁻¹. The plant shoots were treated in the first light until the plants reached the entire wetness stage using a 16-liter sprinkler. A detergent was added to the spray in 0.1% as a diffuser one day after irrigation to increase the plant's efficiency in absorbing the sprayed substance ¹². Plants were sprayed three times, and 30 days were separated between each spray. The first application was 21 days after germination when the average number of leaves per plant was 4-5 real leaves. The control plants were sprayed with water only. Some vegetative indicators were measured after 150 days of planting by randomly taking five plants from each experimental unit. The estimated indicators were:

Vegetative Parameters

Some vegetative indicators were measured after 140 days of planting by randomly taking five plants and three replicates from each experimental unit. Then, the indicators' means were calculated.

Plant height (cm)

The height of the okra plants was measured using the metric tape from the point where the stem was connected to the soil to the most extended growing stem.

Total number of leaves (leaf plant⁻¹)

The counted leaves were present on the main stem of the plants.

Total leaf area (m²plant⁻¹)

The leaf area was measured based on the scanner method using the ImageJ software program ¹³.

Dry weight of the vegetative system (plant⁻¹)

This vegetative indicator was estimated at the end of the experiment. Four plants were selected from each experimental unit without their root systems, and their vegetative group was cut into small pieces to accelerate the surface area's moisture loss. Then, it was moved to an electric oven at 70 °C until the weight was stable ¹². Dry weight was measured at the end of this process.

Yield Parameters

The fruit number per plant (fruit plant⁻¹).

This was estimated by dividing the total cumulative number of fruits in the experimental unit by the number of plants in the same experimental unit.

Yield per plant (g plant⁻¹).

This was estimated below the equation.

Yield per plant (gplant⁻¹) = (cumulative fruits weight in the experimental unit) / (Plant number in the experimental unit).

Total yield (ton ha⁻¹)

The total cumulative yield was measured by collecting fruit from 05/19 until 08/26/2021. During this period, each experimental unit¹⁴ collected fruits 32 times.

Chemical indicators of leaves and fruits

Nitrogen Percentage in leaves (%)

The N element was measured by the Micro Kjeldahl device¹⁵.

Total chlorophyll in leaves (mg 100g⁻¹ fresh weight)

Total chlorophyll pigment in green leaves was measured using spectrophotometer¹⁶.

The total soluble carbohydrates in okra fruits (%)¹⁷.

RESULTS

Vegetative parameters

The results in Table 3 show the fertilization effects of DPW on okra plants. The rate of 32 ton ha⁻¹ of DPW gave the highest value of vegetative growth indicators, including plant height, the total number of leaves, total leaf area, and total dry biomass of the vegetative system, which recorded 121.54 cm and 37.53 leaf plant⁻¹ and 1.43 m²plant⁻¹ and 88.16 gplant⁻¹ compared to the control plants (without DPW) which provided the lowest rates of 82.89 cm, 23.97 leaf plant⁻¹, 0.80 m²plant⁻¹, and 58.84 gplant⁻¹ respectively. This outcome may be due to the DPW content with nitrogen-rich nutrients. Nitrogen can positively affect the formation of amino acids that affect the synthesis of proteins, nucleic acids, DNA, and RNA. Amino acids also can affect the construction of chloroplasts, increase the protoplasm mass, accelerate cell division, and build new tissues. This can increase the vegetative system, thus increasing the size and weight of the vegetative group¹⁸. In addition, the rise in the vegetative dry biomass is due to the increase in plant height and total leaf number (Table 3), which is mainly associated with a rise in carbon metabolism, starch, and sugars that are accumulated in the plant, and accordingly increasing the indicator mentioned above.

The results in Table 3 showed significant differences between plants treated with Jasmonic acid in the vegetative indicators, including plant height, the total number of leaves, total leaf area, and dry biomass of the vegetative system. Jasmonic acid at a level of 30 mg L⁻¹ gave the highest rates of vegetative growth indicators, which were 110.35 cm, 35.11 leaves, 1.29 m²plant⁻¹, and 79.37 g plant⁻¹ versus no treated plant, which gave the lowest value for these indicators recording 95.41 cm, 25.76 leaves, 0.90 m²plant⁻¹, and 67.49 g plant⁻¹ respectively. The reason may be related to Jasmonic acid, which is counted as a plant hormone. Thus, it can increase the division and elongation of cells, which leads to an increase in the height indicator of okra plants. Consequently, this can increase the dry biomass of the vegetative system¹⁹.

The interaction between the fertilization treatments with 32 tons. ha⁻¹ DPW and 30 mg L⁻¹ Jasmonic acid significantly affected the vegetative indicators, which recorded the highest rates. Vegetative indicators recorded 131.66 cm and 42.55 leaf plant⁻¹, 1.66 m²plant⁻¹, and 95.48 g plant⁻¹ compared to no treated plant, which provided 77.10 cm and 20.36 leaf plant⁻¹, 0.59 m²plant⁻¹, and 54.11 g plant⁻¹ respectively.

Quantitative and Qualitative Indicators

The results in Table 4 showed a significant impact of fertilizing with DPW on the quantitative and qualitative yield parameters represented by the number of fruits per plant, the yield per plant, the total yield, nitrogen percentage in leaves, the total chlorophyll in the leaves, and the percentage of total carbohydrates in the fruits. These quantitative and qualitative indicators increase by increasing the level of fertilization. The level of 32 tons per hectare gave the highest rates, recording 70.42 fruit plant⁻¹, 730.03 g plant⁻¹, 46.35 tons ha⁻¹, 2.04%, 72.33 mg100 g⁻¹ fresh weights, and 15.04%, respectively, compared to the comparison treatment that gave the lowest rates of those indicators. They recorded 52.85 fruit plant⁻¹, 307.22 m plant⁻¹, 19.50 tons ha⁻¹, 1.51%, 53.58 mg 100 g⁻¹ fresh weight, and 11.30% respectively. The reason may be due to the role of DPW in providing the necessary nutrients for plant growth and development. Also, DPW positively impacts increasing metabolism and transferring most carbohydrates from leaves to fruits. In addition, organic matter can provide

plants with the necessary nutritional elements such as nitrogen and phosphorous, which enhance carbon metabolism, respiration, and protoplasts, form nucleic acids, DNA, and RNA, and accelerate cell division²⁰. Thus, the presence of these nutrients in the organic matter can increase the protoplasm mass and accelerate cellular div²¹. In addition, increasing yield can be attributed to the role of organic fertilizers in improving the soil's chemical and physical properties (Table 1). Therefore, organic fertilizer helps soil retain moisture, provides suitable conditions for the roots to grow, and enhances the activity and number of microorganisms. These microorganisms can dissolve nutrients from soil particles through the mineralization process and increase their absorption by the plant²². The findings in the same table showed the significant impact of Jasmonic acid on the quantitative and qualitative yield parameters, including the number of fruits per plant, the yield of one plant, the total yield, the total nitrogen percentage in the leaves, the total chlorophyll in the leaves and the total carbohydrates percentage in the fruits.

Treatments		plant height cm	Total number of leaves. (leaf plant ⁻¹)	Total leaf area. (m ² plant ⁻¹)	dry weight for the vegetative system (g plant ⁻¹)	
Fertilization levels with DPW (ton ha ⁻¹)	0	82.89	23.97	0.80	58.84	
	16	103.88	30.38	1.08	73.70	
	32	121.54	37.53	1.43	88.16	
L.S.D.0.05		2.14	1.43	0.02	1.56	
Jasmonic acid rates (mg L ⁻¹)	0	95.41	25.76	0.90	67.49	
	15	102.55	31.01	1.13	73.84	
	30	110.35	35.11	1.29	79.37	
L.S.D.0.05		2.14	1.43	0.02	1.56	
fertilization levels X spray rates	0	0	77.10	20.36	0.59	54.11
		15	82.68	23.85	0.84	59.15
		30	88.89	27.71	0.97	63.27
	16	0	96.73	25.18	0.91	67.94
		15	104.39	30.9	1.1	73.8
		30	110.51	35.07	1.24	79.36
	32	0	112.4	31.75	1.19	80.43
		15	120.57	38.29	1.45	88.57
		30	131.66	42.55	1.66	95.48
L.S.D.0.05		4.61	3.45	0.05	3.10	

Table 3. Effect of fertilizing with DPW and Jasmonic acid and their interaction on vegetative growth parameters.

Treatments		Number of fruits (fruit plant ⁻¹)	Yield per plant (g plant ⁻¹)	Total yield ton ha ⁻¹	Nitrogen in leaves (%)	Total chlorophyll in leaves. (mg100 g ⁻¹ FW)	Total carbohydrates in fruits (%)
Fertilization levels of DPW ton ha ⁻¹	0	52.85	307.22	19.50	1.507	53.58	11.3
	16	60.15	492.64	31.28	1.783	63.42	12.41
	32	70.42	730.03	46.35	2.044	72.33	15.04
L.S.D.0.05		1.36	1.65	3.87	0.151	1.11	0.85

Jasmonic acid rates (mg L⁻¹)	0	54.54	392.98	24.95	1.569	56.14	7.61	
	15	62.21	520.9	33.07	1.798	62.49	13.66	
	30	66.67	616	39.11	1.967	70.69	17.48	
LSD 0.05		1.36	1.65	3.87	0.151	1.11	0.85	
fertilization levels X spray rates	0	0	47.23	237.42	15.07	1.351	47.45	6.77
		15	54.07	312.97	19.87	1.496	53.22	11.84
		30	57.26	371.26	23.57	1.675	60.06	15.29
	16	0	53.98	383.1	24.32	1.563	56.27	7.46
		15	60.88	502.83	31.93	1.822	62.9	12.95
		30	65.59	592	37.59	1.965	71.09	16.81
	32	0	62.41	558.43	35.46	1.794	64.71	8.6
		15	71.69	746.9	47.42	2.077	71.36	16.18
		30	77.15	884.75	56.17	2.262	80.91	20.33
L.S.D.0.05		1.78	1.93	6.49	0.347	2.84	1.64	

Table 4. Effect of fertilizing with DPW and Jasmonic acid and their interaction on quantitative and qualitative parameters.

Thirty mg L⁻¹ of Jasmonic acid gave the highest rates of the above parameters, which scored 66.67 fruit plant⁻¹, 616.00 g plant⁻¹, 39.11 tons ha⁻¹, 1.96%, 70.69 mg 100 g⁻¹FW, and 17.48% compared to no treated plants which recorded the lowest value of these indicators scored 54.54 fruit plant⁻¹ and 392.98 g plant⁻¹ and 24.95-ton ha⁻¹, 1.56 %, 56.14 mg 100 g⁻¹ fresh weight, and 7.61% respectively. The increase in quantitative and qualitative parameters may be attributed to Jasmonic acid, one of the growth regulators. Therefore, it affects the plant's growth and development by accelerating cell division, increasing elongation, forming leaf pods, and then increasing the number of flowers in the plant. This leads to a rise in the number of fruits per plant and then increases the yield. The improvement of the plant's nutritional status contributed positively to the increase in the vegetative indicators (Table 3). This is ideally reflected in increasing the yield parameters of okra (Table 4).

The interaction between the fertilization treatments with 32 tonha⁻¹ DPW and 30 mg L⁻¹ Jasmonic acid had significantly the highest quantitative and chemical parameters, which scored 77.15 fruit plant⁻¹, 884.75 g plant⁻¹, 56.17 tons ha⁻¹, 2.262%, and 80.91 mg 100 g⁻¹ of FW, and 20.33 % compared to no treated plants which provided the lowest value of 47.23 fruit plant⁻¹, 237.42 g plant⁻¹, 15.07 tonsha⁻¹, 1.351%, and 47.45 mg 100 g⁻¹FW and 6.77% respectively.

CONCLUSIONS

Okra variety Hussainiya responds favorably to decomposed palm waste (DPW) and foliar jasmonic acid application. The highest yield and quality of okra fruits were obtained when DPW was applied at 32 tons/ha, and jasmonic acid was used at 30 mg/L.

Therefore, the application of decomposed palm waste and foliar jasmonic acid is a highly effective method for enhancing the growth and yield of okra. This combination has the potential to increase the profitability of okra cultivation significantly. The study concludes that fertilization with DPW is at 32 tons ha⁻¹ with foliar application 30 mg L⁻¹ Jasmonic acid gave the best rates for phenotypic, quantitative, and chemical parameters of okra.

Author Contributions: methodology, Jaafar, H and Al-Ibraheemi, N; Resources, Ghali, A.; Writing—original draft preparation, Jaafar, H.; writing-review and editing, Al-Ibraheemi, N; supervision, Ghali, A.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

REFERENCES

1. Bouras, M; B. A. Turabi, and I. Al-Basit. Vegetable Crop Production, Theoretical Part, Damascus University Publications - Faculty of Agriculture**2011**, pg. 466.
2. Iqbal, J.; M. Hasan; M. Ashfaq, and M. Nadeem. Association of chemical components of okra with its resistance against *Amrasca Biguttula Biguttula* (Ishida). *Pakistan J. Zool***2011**,*43*(6): 1141-1145.
3. Hossen, M. A.; I. Jahan; M. A. A. Mamun; J. S. Sakir; M. Shamimuzzaman; M. J. Uddin, and M. E. Haque. CNS depressant and analgesic activities of okra *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. *Mol. Clan. Pharmacol***2013**, *4*(1): 44-52.
4. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Rome. Italy.<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.**2020**.
5. Mishra, A., S. Sahni; S. Kumar, and B. D. Prasad. Seaweed-An Eco-friendly Alternative of Agrochemicals in Sustainable Agriculture. *Curr. J. Appl. Sci***2020**, Technol, *39*, 71-8.
6. Aghasafari, H.;K.Alireza;M. Hosein, and C.Roberto. Determination of the best strategies for development of organic farming: A SWOT - Fuzzy Analytic Network Process approach *Journal of Cleaner Production***2020**, *277*(20):263-288.
7. Hisham, B. E.; M. H. Munajid; and K. J. Farhan. Effect of organic fertilizers and dripper drainage on some physical properties of soil, growth, and yield of *Cucurbita pepo* L. *Journal of Kirkuk University of Agricultural Sciences***2018**,*9*(3):70-81.
8. Abdel Rahman, I. B. The effect of adding organic residues to date palms and spraying with date seed extract on the growth and yield of cucumbers in the open fields. Master Thesis. Faculty of Agriculture. Anbar University. The Republic of Iraq.**2018**.
9. Al-Moussawi, A. A., and I. H. Al-Jubouri. The effect of marine extracts and organic fertilization on the growth and yield of *Cucumis sativus* L. cultivar Seif grown in unheated greenhouses. *Karbala University Scientific Journal*.**2018**,*16*(3): 199-206.
10. S. Jalal, B., M. Ahmed, K. Field Survey And Molecular Detection Of Viruses Associated With Squash Mosaic Disease In Erbil Provence. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; *21*(1): 64-70. doi: 10.32649/ajas.2023.179716.
11. Merzeh, Q. A. 2020. Effect of spraying zucchini squash *Cucurbita pepo* L with amino acids, nano-boron and adding palm residues on growth, fruit and seed yield, and seed vitality. Ph.D. thesis. Faculty of Agriculture. The University of Kufa. The Republic of Iraq.
12. Al-Sahhaf, Fadel Hussein Reda. Applied Plant Nutrition. Faculty of Agriculture. Baghdad University. Ministry of Higher Education and Scientific Research. The Republic of Iraq **1989**,pp. 66 - 61.
13. Sadik, S.K; A. A. Al-Taweel; N. S. Dhyeab, and M. Z. Khalaf. New computer program for estimating leaf area for several vegetable crops. *American- Journal of Sustainable Agriculture. USA*.**2011**,*5*(2):304-309.
14. Yehya, W. A. . Seasonal Monumental Insects Accompanying Euphrates Poplar Leaves. *Journal of Life Science and Applied Research*.**2020**, *1*, 45-53.
15. Jackson, M. L. Soil Chemical Analysis. Prenticaints Hall Inc Englewood. Cliffs, N. J.USA. **1958**.
16. Goodwin, T. W. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment. 2nd Ed. Academic Press, San Francisco, USA .**1976** ,pp. 373.

17. Alaaraji, S.F.T., Awad, M.M., Ismail, M.A. Study the association of asprosin and dickkopf-3 with KIM-1, NTpro-BNP, GDF-15 and CPP among male iraqi with chronic kidney disease (2020) *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11 (5), pp. 10-17.
18. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>.
19. Al-Amiri, L. K. J., and A. T. S. Khalaf. The role of Jasmonic acid and potassium nitrate in ex vivo micro-tuber production of two potato cultivars. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences* 2017 ,48(6): 1599-1590
20. Bibani, N. M. S., Khidhir, Z. K., Shaker, A. S., Kirkuki, S. M. S. & Abdulateef, S. M. Analyses of mycotoxins in broiler's local and imported feeds. *Iraqi J. Vet.* 2019 Sci. 33.
21. Al-Katea, F. HA Effect of adding organic and chemical fertilizers and spraying with alpha-tocopherol on growth, yield, and quality of tomato. Master Thesis. College of Agriculture, University of Baghdad. The Republic of Iraq. 2019.
22. Al-Bayati, H. J. M., and T. J. Kamel. 2016. The role of mulching and organic manure in improving the vegetative growth and yield of *Cucumis sativus* L. growing under the unheated greenhouse. *Karbala Scientific Journal*. 2016, 14(1): 12-21.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: H.; Al-Ibraheemi, N.; Ghali, A. The Effect of Organic Fertilization and Jasmonic Acid on the Morphological, Quantitative, and Chemical parameters of Okra Plan. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 48. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.48>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Effect of foliar application with PRO-SOL and humic acid on some growth and chemical characteristics of sour orange (*Citrus aurantium*) seedlings.

Loai Hamzah^{1,*}, Farqad Al Dabbagh², Mohammed Ibrahim¹

¹ Agriculture College/AL- Qasim Green University/ Babylon/ Iraq.
loaim63@agre.uoqasim.edu.iq.

¹ Agriculture College/AL- Qasim Green University/ Babylon/ Iraq. mohammed.muhi@agre.uoqasim.edu.iq.

² Ministry of Agriculture, plant protection office/ Baghdad/ Iraq. farqad-khidr@gmail.com.

* Correspondence: loaim63@agre.uoqasim.edu.iq; Tel.: 009647723809066.
Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.49>

ABSTRACT

This study was carried out on six months old sour orange (*Citrus aurantium*) seedlings in the lath house/ Agriculture College/AL-Qasim Green University in Babylon province, Iraq, from March 2020 to October 2020 with aim of investigating the impact of spraying PRO-SOL fertilizer (0.0, 1.5, 3.0 and 4.5) gm.L⁻¹ and Humic acid (HA) (0.0, 1.0, 2.0, and 3.0) gm.L⁻¹ independently or in combination on the vegetative and chemical characteristics of sour orange seedlings. In 2021, a factorial experiment with three replications was conducted on local sour orange seedlings. The findings indicated that spraying with PRO-SOL fertilizer at a concentration of (4.5 gm.L⁻¹) and HA (3 gm.L⁻¹) promoted the seedling growth indices (the height of the plant, diameter of stem, number of leaves, and area of leaf), chemical parameters (chlorophyll and carbohydrate percent) also the leaf mineral content of N, P, and K.

Keywords: PRO-SOL; HA; Foliar spray; *Citrus aurantium* seedling; lathhouse; Organic fertilizer.

INTRODUCTION

The sour orange (*Citrus aurantium*) rootstock is widely planted in Diyala province (East of Iraq), and according to the latest statistics from the Iraqi planning ministry, there are about 753329 sour orange trees with a mean productivity of 28.5 kg.tree⁻¹ and total production reached 165779 tons¹. In Iraq, sour orange trees have adapted to the local soil and are compatible with other citrus species, particularly orange trees. Aside from its beneficial impacts on fruit productivity and quality, sour orange trees, according to their ability to grow and develop well in salty soil^{2,3}. Its fruit juice is highly nutritious as it is rich in minerals like P, K, Ca, Mg, S, Na, Fe, vitamin C, and many other compounds that are very useful to human health⁴. For growth and development, sour orange trees need the support of essential nutrients to perform essential biological and metabolic functions during plant growth and development⁵. Taking care of the bushes, fertilizing them with macro and microelements, and spraying techniques help encourage growth and prevent fertilizer consumption via the soil, which can lead to loss due to immobilization⁶. Foliar spraying of mineral fertilizers like PRO-SOL via sprinkles provides a more efficient means of supporting nutrients to many fruit seedlings. It considerably impacts the growth of the vegetative and root systems^{7,8,9,10,11}. Organic fertilizer, whether applied to the soil or sprayed on the vegetative system, is a significant resource for providing plants with the required nutrients without negative effects¹⁰. Humic acid is among the most essential forms of organic fertilizers because it contains oxygen (31-40%) and nitrogen (2-4%), which allows it to remain for long periods to increase soil fertility and plant nutrition¹⁰. Many studies have already detected that HA plays a beneficial impact in many

aspects of vegetative development, including leaf number, the height of the plant, and leaves chemical content^{11, 12, 13, 14}.

MATERIALS AND METHODS

According to Drebee and Abdul Razak¹⁵, 144 homogenous sour orange seedlings were planted in plastic carrier pots containing a 3:1 combination of river soil and peat moss as a planting medium. Table 1 shows the results of the physiochemical assessment of the experimental soil.

Texture	Loam	Clay	Sand	EC	pH	Organic matter	Nutritional availability		
	gm.kg ⁻¹			dSm ⁻¹	Soil paste	gm.kg ⁻¹	N gm.kg ⁻¹	P mg.kg ⁻¹	K mg.kg ⁻¹
Loamy sand	110	78	812	1.4	7.3	7.0	3.8	5.9	3.48

Table 1. Some physical and chemical traits of soil.

This experiment was conducted according to Randomized Complete Block Design (RCBD) involving two factors and their combination with three replications using three seedlings for every experimental unit. The first factor was foliar spraying with four concentrations of PRO-SOL fertilizer (0.0, 1.5, 3.0 and 4.5) gm.L⁻¹ Table 2. shows the content of PRO-SOL. Additionally, the second factor, humic acid (0.0, 1.0, 2.0, and 3.0) gm. L⁻¹. During the experimental season, the sour orange seedlings were applied thrice with PRO-SOL and humic acid individually:

- In the spring season, the first spray was on 15/3/2020, the second on 1/4/2020, and the third on 15/4/2020 (PRO-SOL foliar spray). HA was applied two days after each spray: the first was on 17/3/2020, the second on 3/4/2020, and the third on 17/4/2020.
- In the fall season: the first spray was on 15/8/2020, the second on 1/9/2020, and the third on 15/9/2020 (PRO-SOL foliar spray). HA was applied two days after each spray: the first was on 17/8/2020, the second on 3/9/2020, and the third on 17/9/2020.

N	P	K	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Mo
20	20	20	0.02	0.05	0.10	0.05	0.05	0.0005

Table 2. The content of PRO-SOL fertilizer (% macro and microelements) is stated in the company newsletter.

The control treatment was sprayed with distilled water, and the Tween 80 was added to every treatment solution as a surfactant, applied directly on seedlings (in the early morning). This study consisted of 16 interacted treatments with three replications and three seedlings for every experimental unit (16 X 3 X 3=144 seedlings). The genstat program was used to analyze the data statistically and compare the mean values by using LSD at a 5% level of significance¹⁶. After the end of the growing season, which falls in mid-October, morphological and chemical traits and their means value were recorded on each of the three replicate seedlings. Vegetative growth characteristics:

- Plant height (cm) was calculated by measuring from the ground surface to the plant's highest point.
- The diameter of the stem was estimated in mm using vernier.
- The leaves number is established on seedlings.

- Leaf area recorded by using the following equation¹⁷:
Leaf Area (cm²) = 0.70 × (Leaf length × Leaf width) - 1.06
- SPAD 502-chlorophyll meter¹⁸ determined the total chlorophyll in leaves.
- Total carbohydrates (%) were calculated using Joslyn's (1970)¹⁹ method.
- The status of plant nutrition was measured by calculating the nutrient elements: N (by Kieldahl method), P (by spectrophotometer), and K (by flame photometer).

RESULTS

Vegetative growth traits

Table 3. Data shows that spraying seedlings with PRO-SOL fertilizer and HA at various concentrations significantly increased all tested vegetative parameters (plant highest, stem diameter, leaf number, and leaf area) compared to the control treatment. The dose of fertilizer is known to be important in vegetative growth traits; optimum percentages of plant height (36.50 cm), stem diameter (3.20 mm), leaves number (65.80 leaves), and leaf area (25.30 cm²) were noticed on treatment supplemented with 4.5 gm.L⁻¹ PRO-SOL fertilizer. Also, the applied treatment with HA (3 gm.L⁻¹) had the most outstanding characteristics (35.77 cm, 2.45mm, 60.35 leaves, 21.74 cm²), respectively. A highly significant (P≤0.05) interaction between PRO-SOL (4.5gm.L⁻¹) and HA (3gm.L⁻¹) was shown. The greatest mean of the mentioned characteristics was (51.36 cm, 3.35 mm, 71.09 leaves, and 36.80 cm²), respectively, significantly exceeding all other treatments.

PRO-SOL fertilizer (gm.L ⁻¹)	Humic acid (gm.L ⁻¹)	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	Leaves number	Leaf area (cm ²)
0.00	0.00	23.70	1.46	40.66	14.60
	1.00	30.55	2.23	45.035	18.55
	2.00	31.32	2.30	51.80	19.45
	3.00	35.77	2.45	60.35	21.74
1.50	0.00	31.95	2.62	44.75	18.20
	1.00	35.92	2.82	55.80	22.15
	2.00	38.45	3.11	60.75	22.50
	3.00	46.15	3.41	66.50	25.63
3.00	0.00	33.84	2.65	59.12	22.15
	1.00	36.87	3.39	59.26	25.23
	2.00	38.41	3.15	64.23	27.19
	3.00	42.89	3.60	68.50	29.46
4.50	0.00	36.50	3.20	65.80	25.30
	1.00	39.90	3.60	69.60	28.41
	2.00	41.44	3.35	69.98	32.32
	3.00	51.36	3.35	71.09	36.80
LSD at 5% level		PRO-SOL (P)= 2.624 Humic acid (H)= 2.624 P x H= 5.248	P= 0.283 H= 0.283 P x H= 0.569	P= 2.865 H= 2.865 P x H=5.927	P= 2.252 H= 2.252 P x H= 4.542

Table 3. Impact of vegetative fertilization of PRO-SOL and humic acid at varying concentrations in some foliar development traits of sour orange seedlings.

The chemical parameters

Chlorophyll and Carbohydrate

The data in Table 4. demonstrated that the higher fertilizer concentration increased chlorophyll and carbohydrate content, 4.5gm.L⁻¹treatment achieved the highest value of chlorophyll (48.35 SPAD) and carbohydrate (16.70 percent). Notably, 3 gm of HA per liter of water had the highest average of mentioned parameters (43.25 SPAD) and(16.70%), respectively, compared with zero concentrations. Table 4 presents the positive response of the target plants to chlorophyll and carbohydrate content resulting from the foliar application of PRO-SOL and HA. The gained data demonstrate significant differences within the treatments, with the greatest mean of chlorophyll (60.61 SPAD) and carbohydrate (38.90 percent) at the combination of PRO-SOL concentration (4.5 gm.L⁻¹) and HA (3 gm.L⁻¹). The lowest mean was achieved by control treatment on the same parameters (29.72 SPAD) and (8.50 percent) respectively.

PRO-SOL fertilizer (gm. L ⁻¹)	Humic acid (gm.L ⁻¹)	Chlorophyll (SPAD)	Carbohydrate (%)
0.00	0.00	29.72	8.50
	1.00	33.82	11.80
	2.00	39.12	14.70
	3.00	43.25	16.70
1.50	0.00	43.84	14.76
	1.00	44.40	17.40
	2.00	45.50	19.20
	3.00	44.10	19.23
3.00	0.00	45.40	18.50
	1.00	47.80	20.22
	2.00	48.25	22.11
	3.00	51.56	23.35
4.50	0.00	48.35	25.40
	1.00	49.40	28.90
	2.00	50.30	35.80
	3.00	60.61	38.90
LSD at 5% level	PRO-SOL (P)=3.140 Humic acid (H)= 3.140 P x H=6.280	P= 2.790 H= 2.790 P x H=5.580	

Table 4. Vegetative applying influence of PRO-SOL and humic acid in chemical properties of sour orange seedlings at varying concentrations.

Leaves content of N, P, and K

N, P, K leaves content significantly achieved with fertilizer, where the largest average (2.15% (N), 0.26% (P), and 1.35% (K)was noticed in plants treated with 4.5 gm.L⁻¹PRO-SOL (Table 5.). Also, the table's findings show that as the humic acid dose increased (3gm.L⁻¹), more leaves the content of N, P, and K percentages were recorded (1.58, 0.17, and 1.20)%, respectively. The data is in Table 5. clearly shows a linear increase in

the content of N, P, and K. and that PRO-SOL foliar applied at the highest dosage (4.5 gm.L⁻¹) combined with HA (3gm.L⁻¹) surpassed the other treatments significantly, reaching 2.83% (N), 0.53% (P), and 1.83% (K), while the control had the lowest availability of N (1.04%), P (0.10), K (0.70).

PRO-SOL fertilizer (gm. L ⁻¹)	Humic acid (gm.L ⁻¹)	Leaf mineral percentage		
		N%	P%	K%
0.00	0.00	1.04	0.10	0.70
	1.00	1.27	0.12	0.94
	2.00	1.44	0.15	1.13
	3.00	1.58	0.17	1.20
1.50	0.00	1.76	0.20	1.18
	1.00	1.85	0.25	1.22
	2.00	1.89	0.26	1.24
	3.00	1.93	0.29	1.27
3.00	0.00	2.10	0.23	1.30
	1.00	2.20	0.34	1.35
	2.00	2.23	0.38	1.43
	3.00	2.30	0.40	1.64
4.50	0.00	2.15	0.26	1.35
	1.00	2.39	0.43	1.49
	2.00	2.74	0.52	1.62
	3.00	2.83	0.53	1.83
LSD at 5% level		PRO-SOL (P)= 0.122 Humic acid (H)= 0.122 P x H= 0.244	P= 0.400 H= 0.400 P x H= 0.800	P= 0.202 H= 0.202 P x H=0.204

Table 5. Vegetative spraying influence of PRO-SOL and humic acid at varying concentrations in leaf mineral content of sour orange seedlings.

DISCUSSION

Vegetative growth traits

The significant impact of PRO-SOL fertilizer and HA on the vegetative traits (plant height, stem diameter, leaves number, and leaf area) may belong to their role in supporting plants with mineral elements that are required for photosynthesis, also encouraging the growth of new tissue, promote photosynthesis, protein synthesis and other biological pathways in balanced amounts throughout cell division and elongation⁷. These results agreed with those recorded by AL-Zuhairi et al.⁶, Al-jury and Al-Maamouri²⁰, Abbas et al.²¹ and Hamza and AL-Dabbagh²².

The chemical parameters

Chlorophyll and Carbohydrate

Chlorophylls and some other pigments are vital factors in the photosynthetic apparatus. Their involvement in light energy harvesting, membrane stability, and energy transduction has been well investigated⁹. The increase

in this parameter may be attributed to the mineral fertilizer and organic elements' roles in activating several key enzymes, resulting in auxins, cytokines, and gibberellins production, which indirectly affect chlorophyll content formation⁷. The statistical analysis found that foliar sprays of mineral and organic elements enhanced leaf carbohydrate content, which may be attributed to photo assimilate metabolism and transport^{23, 24}. These findings are similar to those of EmadEldin and Hussein²⁵, Abboatta and EL-Azazy²⁶ and Hamza and AL-Dabbagh²⁴.

Leaves content of N, P, and K

HA application enhanced the permeability of cell membranes, resulting in higher nutrient absorption across these membranes and, consequently, increased nutritional content in plant leaves¹⁴. Furthermore, about fertilizer foliar spraying, Umar *et al.* 27 explained that the exogenous application appears to have the disadvantage of high concentrations, uniform nutrient distribution, and rapid absorption stimulation by the plant. In contrast, the micronutrient foliar spray is tested to be more reliable. These findings agree with Hassan⁸, Al-Abadi, and Abd Al-hayany¹⁴ and Hamza and AL-Dabbagh²².

CONCLUSIONS

From this study, data obtained showed that a triplicate application of multi-nutrient foliar fertilizer (PRO-SOL) (4.5 gm.L⁻¹) combined with humic acid (3 gm.L⁻¹) led to a significant increase in all studied characteristics. The most essential vegetative and chemical responses were produced by fertilization at the spring and fall seasons of growth. This improved vegetative growth indices, chemical parameters, and leaf content of sour orange seedlings N, P, and K.

Author Contributions: Loai Hamzah.; methodology, Farqad Al Dabbagh; writing— original draft preparation, Mohammed Ibrahim.; conceived the project and editing.

Funding: This research received no external funding

Acknowledgments: Special thanks and gratitude to everyone who contributed to overcoming our difficulties during the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Iraqi Agriculture Statistics. Statistics Affairs sector, Ministry of Planning, Iraq. **2019**.
2. Koulympoudi, L.; Papafilippou, A.; Tzanoudaki, M.; Chatzissavvidis, C.; Salamalikis, V. Effect of nitrogen form on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) and sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants grown under saline conditions. *J. Plant Nutr.* **2021**, 1-13. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1918713>.
3. LÜtfyi, Ş.; Tuzcu, Ö. Fruit quality of Valencia orange trees grafted on Volkameriana and sour orange rootstocks grown in two different regions in Northern Cyprus. *Pak. J. Bot.* **2020**, 52, 1803-1808. DOI: [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-5\(12\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-5(12))
4. Torshizi, M. V.; Mohsen, A.; Kashaninejad, M. Application of response surface method to energy and exergy analyses of the ohmic heating dryer for sour orange juice. *Fuel*, **2020**, 278, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118261>

5. Mahmood, N. A., and Abdulateef, S. M., Determining Some Undesirable Behavioral Traits and Their Impact on the Behavioral Performance of Broiler Chicks, in IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, vol. 904.
6. AL-Zuhairi, F. F. A.; AL-Aareji, J. M. A.; AL-Taee, A. K. Effect of nano and regular iron spraying and biofertilization on growth of local lemon transplants *Citrus limon* L. budded on sour orange. *2nd Virtual International Scientific Agricultural Conference. Series: Environ. Earth Sci.* **2021**, 735, 1-6. DOI 10.1088/1755-1315/735/1/012045
7. Al-Tamimi, H. M. A.; Ali, A. A. ; Kadhim, Z. K.; Shatti, R. H. Effect of foliar spraying with Grew More and Scott on improving some vegetative and root growth characteristics of citrus seedlings *Swingle citrumelo*. *Biochem. Cell. Arch*,**2020**,20, 2, 4201-4205. <https://connectjournals.com/03896.2020.20.4201>
8. Hassan, A. M. Effect of foliar application date of PRO-SOL fertilizer and some plant growth promoters on growth of naval orange saplings. *Sci. J. of Kerbala Univ (JKAS)***2017**,15, 4, 36-44.
9. Kemira, G. H. Application of micronutrients: pros and cons of the different application strategies. *IFA International Symposium on micronutrients. Internet/International fertilizer industry Association*. New Delhi, India.2004.
10. Nardi, S.; Pizzeghello, D.; Schiavon, M.; Ertani, A. Plant bio stimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Sci. Agric***2016**,73, 1, 18-23.
11. Mansoor, S. S.; Al-Esawi, J. S. . . ; Al-Falahi, M. N. Assessing The Efficiency Of Cement Kiln Dust For Heavy Metals Removal From Simulated Polluted Water. *JLSAR* 2023, 4, 45-52.
12. Sebastiano, D.; Tognetti, R.; Desiderio, E.; Alvino, A. Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Agron. Sustain. Dev.***2005**,25,183–191. DOI: 10.1051/agro:2005017
13. Omar Khaled Attallah, Thafer Thabit Mohammed and Nasr Nuri Al-Anbari. Effect of Adding Grape Pomace and Resveratrol on Some Physiological Traits and Gene Expression to Prevent Hemorrhagic Fatty Liver Syndrome in Laying Hens . IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.2022, 1060 (1), 012076. doi:10.1088/1755-1315/1060/1/0120
14. Al-Abadi, M. H. A.; ABD Al-hayany, A. M. Effect of humic and salicylic acids foliar application in the chemical content of Papaya seedlings. *Fourth International Conference for Agricultural and Sustainability Sciences Fourth International Conference for Agricultural and Sustainability Sciences. Ser.: Earth Environ. Sci.***2021**, 910 012039. doi:10.1088/1755-1315/910/1/012039.
15. Drebee, H, A.; Abdul Razak, N. A. The Impact of Corruption on Agriculture Sector in Iraq: Econometrics Approach. *IOP Conference Series: Earth Environ. Sci.***2020**, 553, 1.
16. Al-Rawi, K.M.;Khalaf Allah, A, M. Design and Analysis of Agricultural Experiments. The Revised Version. Dar Ebein Al- Atheer for Printing and Publishing, University of Mosul, Iraq, **2000**,488. (In Arabic).
17. Ali, H.H., AL-Rawi, K., Khalaf, Y., Alaaraji, S., Aldahham, B., Awad, M., Al-ani, O., Al-ani, F., Ali, A.T.Serum Caveolin-1 Level is Inversely Associated with Serum Vaspin, Visfatin, and HbA1c in Newly Diagnosed Men with Type-2 Diabetes.Reports of Biochemistry and Molecular Biology,2022, 11 (2), pp. 299-309.
18. Ling, Q.; Huang, W.; Jarvis, P. Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis research* **2011**, 107, 209-214.
19. Shah, S. H.; Houborg,R.; McCabe, M. F. Response of Chlorophyll, Carotenoid and SPAD-502 Measurement to Salinity and Nutrient Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agron.***2017**, 7, 61; doi:10.3390/agronomy7030061.

20. Joslyn, M. N. *Methods in food analysis* (2nd ed.). Academic Press, New York, London.1970 .
21. Al-juthery, H. WA; Al-Maamouri, E. H. O. Effect of Urea and Nano-Nitrogen Fertigation and Foliar Application of Nano-Boron and Molybdenum on some Growth and Yield Parameters of Potato. *Al-Qadisiyah. J. Agricult. Sci.* **2020**, 10, 1,253-263.
22. Abbas, T.; Ahmad, S.; Ashraf, M.; Shahid, M. A.; Yasin, M.; Balal, R. M.; Pervez, M. A.; Abba, S. Effect of humic and application at different growth stages of kinnow mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) on the basis of physio-biochemical and reproductive responses. *Academia J. Biotech.* **2013**,1, 1, 14-20.
23. Hamza, L. M.; AL-Dabbagh, F. M. K. The promotive impact of foliar spray of AGE and KCl on vegetative characteristics and nutrient status of lemon seedlings. *Int. J. Agricult. Stat. Sci.* **2020**,16, 1, 1371-1374. <https://connectjournals.com/03899.2020.16.1371>
24. Sh. Kader, J. Study The Effect Of Foliar Application Of Gibberellic Acid (Ga₃) And Liquid Calcium On Growth And Fruit Quality Of Pomegranate Trees (*Punica Granatum* L.) Cv. Sawa. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 71-86. doi: 10.32649/ajas.2023.179717.
25. Hamza, L. M.; AL-Dabbagh, F. M. K. Impact of Nanoparticle and Salicylic Acid Foliar Spraying in the Growth of Sour Orange Seedling. *Annals of R.S.C.B.* **2021**, 25, 3, 4384 – 4391.
26. EmadEldin, H. A.; Hussain, M. A. Foliar Application of Micro Silica, Potassium Chloride and Calcium Chloride Enhances Yield and Fruit Quality of Balady Orange Tree. *Alexandria Sci. Exch. J.* **2018**, 39, 3, 387-393. <https://doi.org/10.21608/asejaiqsae.2018.9955>
27. Abboatta, W.F.; EL-Azazy, A. M. Role of organic and biofertilizers in citrus orchards. *Aswan University Journal of Environmental Studies (AUJES)*. **2020**,1, 1, 13-27. <https://dx.doi.org/10.21608/aujes.2020.124530>
28. Umar, S.; Bansal, S.; Imas, P.; Magen, H. Effect of foliar fertilization of potassium on yield, quality, and nutrient uptake of groundnut. *J. Plant Nutr.* **1999**, 22,1785–1795. <https://doi.org/10.1080/01904169909365754>

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Hamzah, L.; Al Dabbagh, F.; Ibrahim, M. Effect of foliar application with PRO-SOL and humic acid on some growth and chemical characteristics of sour orange (*Citrus aurantium*) seedlings. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 49. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.49>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Effect of Foliar Application of *Alhagi maurorum* Extract on *Foeniculum vulgare* GrowthWurood Hantoosh Neamah ¹*, Fatimah Ali Hasan²¹ University of Basrah/ Basrah/ Iraq; wurood.neamah@uobasrah.edu.iq² University of Basrah/ Basrah/ Iraq; fatimah.hasan@uobasrah.edu.iq* Correspondence: wurood.neamah@uobasrah.edu.iq; Tel.: (+9647819865272)Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.50>**ABSTRACT**

Among medicinal plants humans use, fennel (*Foeniculum vulgare*) is essential due to its flavor and health benefits. A clean environment requires sustainable methods to reduce soil, water, and air pollution. Camel thorn (*Alhagi maurorum*) is a desert plant distributed widely in Iraq. This experiment investigated the effect of *A. maurorum* extract spraying on vegetative, floral, and seed numbers of *F. vulgare*. 0, 1.5 and 3 g L⁻¹ concentrations of shoot root extracts of *A. maurorum* were utilized as a foliar application on *F. vulgare*. A significant increase in studied characteristics of *F. vulgare* was obtained under extract treatments. Spray with 3 and 1.5 g L⁻¹ of shoot root extracts obtained the highest number of seeds per plant. The results of the present study exhibited a potential to use *A. maurorum* as a natural fertilizer.

Keywords: *Foeniculum vulgare*; *Alhagi maurorum*; foliar application; natural fertilizer; flavonoids; essential oil.

INTRODUCTION

Foeniculum vulgare Mill or fennel is a plant with dietary, culinary, and medicinal uses that belongs to the Umbelliferae (Apiaceae) family; the origin country of the plant is the Mediterranean area, but it is now cultivated almost in every country. It is known to be ancient and used by humans for its flavor and health benefits. ¹ *F. vulgare*, a plant, is rich in nutrients, including fibers, carbohydrates, sugar, vitamins, protein, energy, and minerals distributed in whole plant parts and related to human daily needs; pulpy shoots are still edible vegetables in southern Italy ². Fennel seeds are used in preparing fish and meat dishes due to their flavor; bulb roots are used as salad, snacks, stewed, boiled, and grilled, and refreshing tea is also prepared from seeds and leaves of plant ³. Pharmacological activities of *F. vulgare* are related to phytoconstituents content that include numerous important compounds of plant secondary metabolism such as flavonoids, polyphenols, fatty acids, and volatile compounds ⁴. Volatile compounds are present mainly in essential oils that give the plant an odor and desired flavor, making the food and food products an excellent test. The number and type of volatile compounds are variables according to solvent, plant part, and extraction technique ⁵⁻⁷. However, anethole is considered the primary volatile compound in the essential oil of fennel plant ⁸.

F. vulgare is officially noted in Ayurvedic pharmacopeia and the Canon of Medicine as an essential component of the herbal mixture used to treat numerous illnesses and disorders. The essential oil and extracts of *F. vulgare*

seeds exhibited a broad spectrum of bacterial and viral inhibition⁹⁻¹². Antiinflammatory and antiallergic properties of methanolic extract of *F. vulgare* fruit are investigated and exhibited a significant reduction effect in inflammation and hypersensitivity *in vivo*^{13, 14}. Wild fennel exhibits a higher antiaging activity than medicine and edible fennel by scavenging free radicals caused by oxidative stress¹⁵. Additionally, *F. vulgare* extracts and essential oil are reported to have other pharmacological activities, including estrogenic and galactogenic activities¹⁶, oculo-hypotensive activity¹⁷, antimutagenic effect¹⁸, gastrointestinal protective¹⁹, hepatoprotective role²⁰, and hypoglycemic activity²¹.

Alhagi maurorum camel thorn or Aqool (plant's common name in Iraq) is a desert plant belonging to the Fabaceae (Leguminosae) family. It grows in a wide area, including many Asian countries, Africa, North America and Europe²². Because of its deep root system that reaches six or seven feet into the ground, the plant can grow in dry areas with high salinity and alkalinity²³. In some countries, plant growth is controlled as a weed by several methods. However, *A. maurorum* is rich in critical phytochemical compounds, secondary metabolites that increase under stress, such as flavonoids, fatty acids, coumarins, carbohydrates, tannins, unsaturated sterols, glycosides, sterols, steroids, resins, minerals, vitamins, alkaloids and triterpenes²²⁻²⁴. Treatment of winter and summer crops with aqueous extract of *A. maurorum* caused an increase in total chlorophyll, carotenoids, glutathione, and protein content²⁵. Also, a recent study found that treating *sativum* L. with an aqueous extract of *Alhagi maurorum* led to an increase in soluble sugars, soluble protein, proline, and flavonoids²⁶. The present study was interested in examining the foliar application of shoot and root extract of *A. maurorum* on *F. vulgare* growth and investigating the possibility of using the extracts as alternative growth stimulators to chemical synthetic fertilizers due to cheap cost and sustainability features.

MATERIALS AND METHODS

Fennel seeds were obtained from the local market in Basrah and planted in trays with peat moss substrate in December in the greenhouse / Agriculture College / University of Basrah. After the seedlings reached 5 cm, they were transplanted into pots with a 35 cm diameter and a 3:1 soil-to-peat moss ratio.

Alhagi maurorum extraction

Camelthorn plants were collected from the University of Basrah location; plants were uprooted, washed well, and dried at room temperature. Plants were separated into shoot and root parts, ground until soft powder, weighed 1.5 or 3 g from both parts and soaked with 1 L of distilled water overnight. The next day, extracts are filtrated by filter paper to prepare for the foliar spray²¹.

Foliar application

When fennel plants reached 15 cm, they were sprayed with 1.5 or 3 gL⁻¹ of shoot extract of *A. maurorum*—the next day, 1.5 or 3 g L⁻¹ of root extracts were applied to plants. The foliar application was repeated 3 times on plants, and the period between each spray was one month.

Growth rates measurement

Vegetative characteristics

Plant height (cm)

The height of each plant was measured after the flowering stage by tape measuring from the surface of the potting substrate to the top of the plant and recording.

Branches and leaves number plant⁻¹.

The total of branches and leaves is counted and recorded for each plant.

Fresh weight (g)

A four-level sensitive scale recorded the fresh weight of each plant.

Dry weight (g)

Plants were dried at room temperature until dry mass stability and a four-level sensitive scale recorded weight.

Floral and seed characteristics

Inflorescence plant⁻¹

The number of inflorescences for each plant was counted and recorded after the complete formation of inflorescences.

Flowers plant⁻¹

The number of flowers in inflorescences for each plant was recorded after the flowering stage.

Seeds number plant⁻¹

The total number of seeds is counted after they dry and recorded for each plant.

Experiment design and statistical analysis

The experiment includes 9 factorial treatments, the interaction between two factors. First is the spray with shoot extract of *A. maurorum* extract at (0, 1.5, 3) gL⁻¹ concentration and the second is the spray with root extract of *A. maurorum* at (0, 1.5, 3) gL⁻¹ concentrations. The experiment was designed according to the randomized complete block design (R.C.B.D.) for a factorial experiment. The experiment was repeated twice with three plants for each treatment. Thus, the total number of factorial experiment plants was 54. The graphprism program was used for results analysis and probability level. 0.05 was used to compare averages by one-way analysis of variance ANOVA.

RESULTS

Vegetative characteristics

Plant height

Figure (1) illustrates the effect of study factors and their interaction on the *F. vulgare* height. Both study factors and their interaction significantly affect plant height compared to control (V0R0). Spray with 3 gL⁻¹ of *A. maurorum* root extract (V0R2) obtained the highest plant height, 63 cm, compared to V0R0. Also, the spray with 3 gL⁻¹ of *A. maurorum* shoot extract (V2R0) caused an increase in plant height of 60 cm; the interactions between the two study factors led to a significant increase in plant height compared to the control, 45 cm (Figure 1).

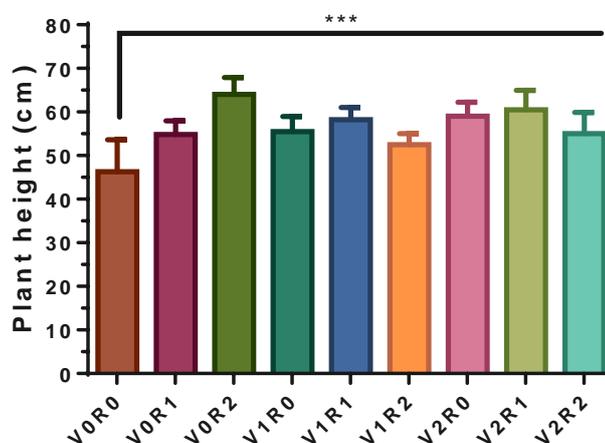


Figure 1. Study factors' effect and interaction on *F. vulgare* height.

The effect of spraying with study factors and their interaction on the height of *F. vulgare* was recorded after the flowering stage. V0R0 is 0 gL⁻¹ of shoot extract root extract of *A. maurorum* (control treatment), V0R1 is 1.5 gL⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V0R2 is 3 gL⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V1R0 is 1.5 gL⁻¹ of *A. maurorum* shoot extract, V1R1 is the interaction between 1.5 gL⁻¹ of shoot extract and 1.5 gL⁻¹ of root extract, V1R2 is the interaction between 1.5 gL⁻¹ of shoot extract and 3 gL⁻¹ of root extract, V2R0 is 3 gL⁻¹ of shoot extract of *A. maurorum*, V2R1 is the interaction between 3 gL⁻¹ of shoot extract and 1.5 gL⁻¹ of root extract, V2R2 is the interaction between 3 gL⁻¹ of both shoot & root extracts. A multiple ANOVA was performed using ordinary One-way ANOVA multiple comparisons. Significance was assigned as follows: ***p < 0.001.

Branches and leaves number.

The study factors and their interaction negatively affected the number of branches and leaves per plant (figure 2).

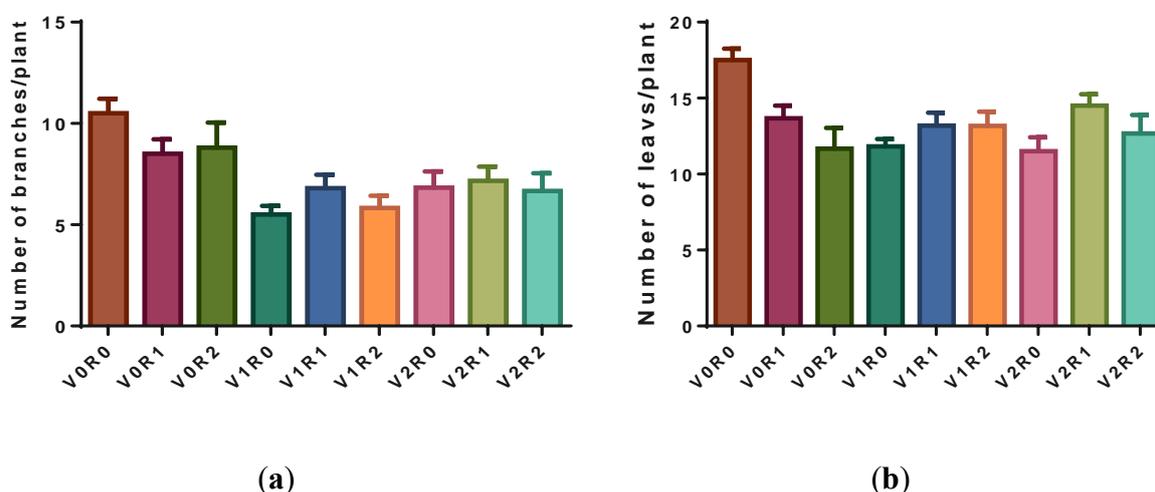


Figure 2. Effect of study factors and their interaction on the number of branches and leaves of *F. vulgare*.

(a) A representative diagram of the effect of study factors on branch number was recorded after the flowering stage. (b) Representative diagram of the effect of study factors on leaves number recorded after flowering stage. V0R0 is 0 g L⁻¹ of shoot extract root extract of *A. maurorum* (control treatment), V0R1 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V0R2 is 3 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V1R0 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* shoot extract, V1R1 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract and 1.5 g L⁻¹ of root extract, V1R2 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract and 3 g L⁻¹ of root extract, V2R0 is 3 g L⁻¹ of shoot extract of *A. maurorum*, V2R1 is the interaction between 3 g L⁻¹ of shoot extract & 1.5 g L⁻¹ of root extract, V2R2 is the interaction between 3 g L⁻¹ of both shoot extract and root extract.

Fresh weights

The plants sprayed with 3 gL⁻¹ of *A. maurorum* shoot extract V2R0 recorded the highest fresh weight, 33 g, compared to control V0R0, 19g. Spraying the plants with 1.5 gL⁻¹ of *A. maurorum* root and shoot extracts caused a significant increase in the fresh weight of *F. vulgare*, 25 g and 27g, respectively. The interaction of study factors did not significantly affect the fresh weight trait (Figure 3).

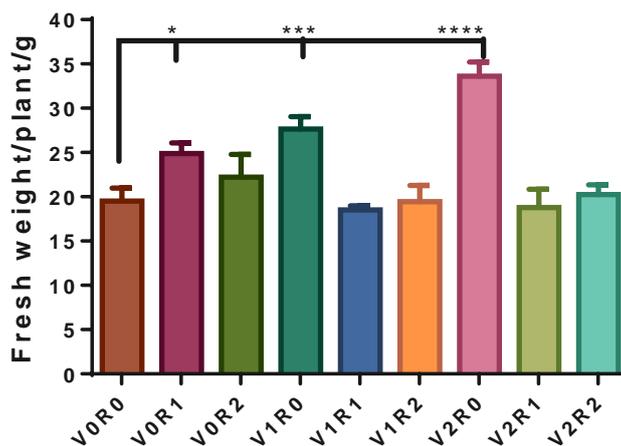


Figure 3. Effect of study factors and their interaction on fresh weight of *F. vulgare*.

Representative, the effect of spraying with study factors and their interaction on *F. vulgare* fresh weight. V0R0 is 0 g L⁻¹ of shoot extract root extract of *A. maurorum* (control treatment), V0R1 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V0R2 is 3 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V1R0 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* shoot extract, V1R1 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract & 1.5 g L⁻¹ of root extract, V1R2 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract and 3 g L⁻¹ of root extract, V2R0 is 3 g L⁻¹ of shoot extract of *A. maurorum*, V2R1 is the interaction between 3 g L⁻¹ of shoot extract and 1.5 g L⁻¹ of root extract, V2R2 is the interaction between 3 g L⁻¹ of both shoot extract & root extract. Multiple ANOVA was performed using ordinary One-way ANOVA multiple comparisons. Significance was assigned: *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Dry weight

All *F. vulgare* sprayed with 1.5 g L⁻¹ and 3 g L⁻¹ of roots and shoot extracts of *A. maurorum* show a significant increase in dry weight compared to the control, 3.1 g. However, the spraying with 1.5 g L⁻¹ of root extract and 3 g L⁻¹ of shoot extract achieved the highest dry weight of the plant, 11 g, compared to the control (Figure 4).

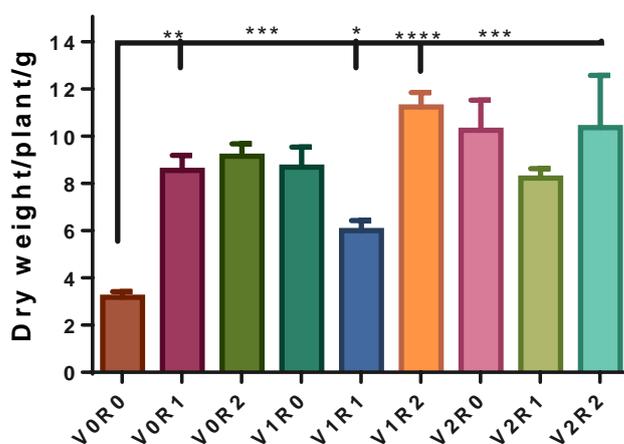


Figure 4. Effect of study factors and their interaction on the dry weight of *F. vulgare*.

The effect of spraying with study factors and their interaction on *F. vulgaris* weight was recorded after total plant drying. V0R0 is 0 g L⁻¹ of shoot extract and root extract of *A. maurorum* (control treatment), V0R1 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V0R2 is 3 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V1R0 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* shoot extract, V1R1 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract and 1.5 g L⁻¹ of root extract, V1R2 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract & 3 g L⁻¹ of root extract, V2R0 is 3 g L⁻¹ of shoot extract of *A. maurorum*, V2R1 is the interaction between 3 g L⁻¹ of shoot extract & 1.5 g L⁻¹ of root extract, V2R2 is the interaction between 3 g L⁻¹ of both shoot extract & root extract. A multiple ANOVA was performed using ordinary One-way ANOVA multiple comparisons. Significance was assigned as following: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Floral and seed characteristics

Number of inflorescences

Spraying with 1.5 gL⁻¹ of shoot & root extract V1R1 and 3 gL⁻¹ of both extracts V2R2, as well as a spray with 3 gL⁻¹ of shoot extract led to the highest number of inflorescences in treated plants, 13 inflorescence-plant⁻¹ compared to control V0R0, 10 inflorescence-plant⁻¹. However, study factors and other interactions have a positive effect on the number of inflorescences per plant (Figure 5)

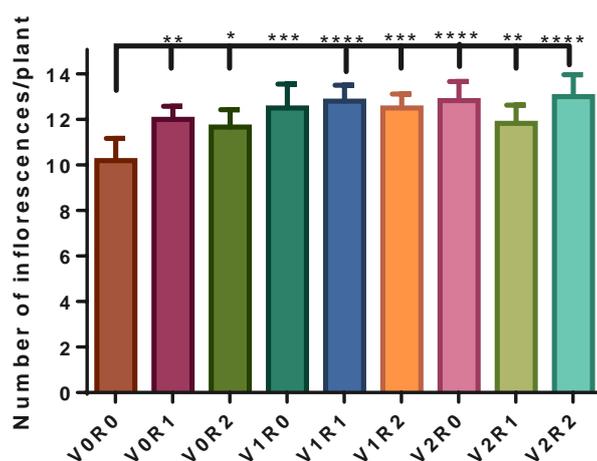


Figure 5. Effect of study factors and their interaction on inflorescences number of *F. vulgaris*.

The effect of spraying with study factors and their interaction on the number of inflorescences of *F. vulgaris* was recorded after the complete formation of inflorescences. V0R0 is 0 g L⁻¹ of shoot extract root extract of *A. maurorum* (control treatment), V0R1 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V0R2 is 3 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V1R0 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* shoot extract, V1R1 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract & 1.5 g L⁻¹ of root extract, V1R2 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract and 3 g L⁻¹ of root extract, V2R0 is 3 g L⁻¹ of shoot extract of *A. maurorum*, V2R1 is the interaction between 3 g L⁻¹ of shoot extract & 1.5 g L⁻¹ of root extract, V2R2 is the interaction between 3 g L⁻¹ of both shoot extract and root extract. A multiple ANOVA was performed using ordinary One-way ANOVA multiple comparisons. Significance was assigned as following: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Number of flowers

F. vulgare that was sprayed with 1.5 g L⁻¹ of root extract & 1.5 g L⁻¹ or 3 g L⁻¹ of shoot extract V1R1 & V2R1 of *A. maurorum* exceeded of flowers number per plant, 110 and 117 flower plant⁻¹ respectively compared to control V0R0, 73 flower plant⁻¹. Also, spraying with 3 g L⁻¹ of shoot extract significantly increased 100 flower plant⁻¹ compared to the control group (Figure 6).

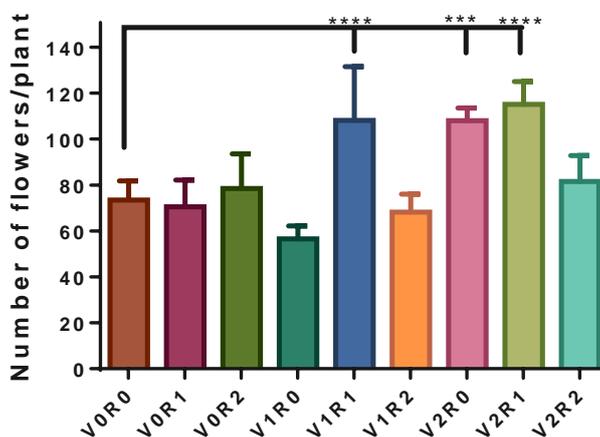


Figure 6. Effect of study factors and their interaction on flower number of *F. vulgare*.

The effect of spraying with study factors and their interaction on *several F. vulgare* flowers was recorded after the flowering stage. V0R0 is 0 g L⁻¹ of shoot extract root extract of *A. maurorum* (control treatment), V0R1 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V0R2 is 3 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V1R0 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* shoot extract, V1R1 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract & 1.5 g L⁻¹ of root extract, V1R2 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract and 3 g L⁻¹ of root extract, V2R0 is 3 g L⁻¹ of shoot extract of *A. maurorum*, V2R1 is the interaction between 3 g L⁻¹ of shoot extract & 1.5 g L⁻¹ of root extract, V2R2 is the interaction between 3 g L⁻¹ of both shoot extract & root extract. A multiple ANOVA was performed using ordinary One-way ANOVA multiple comparisons. Significance was assigned as follows: ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Number of seeds

The study factors and their interaction positively affected the number of seeds per plant. Figure 7 elucidates that individual and interaction treatments significantly increased seed number except for the V1R0 treatment, which does not affect the seed number of treated plants compared to the control treatment. Plants sprayed with 1.5 g L⁻¹ of root extract and 3 g L⁻¹ of shoot extract of *A. maurorum* recorded the highest number of seeds per plant, 105 seedplant⁻¹, compared to the control treatment V0R0, 44 seedplant⁻¹ (Figure 7).

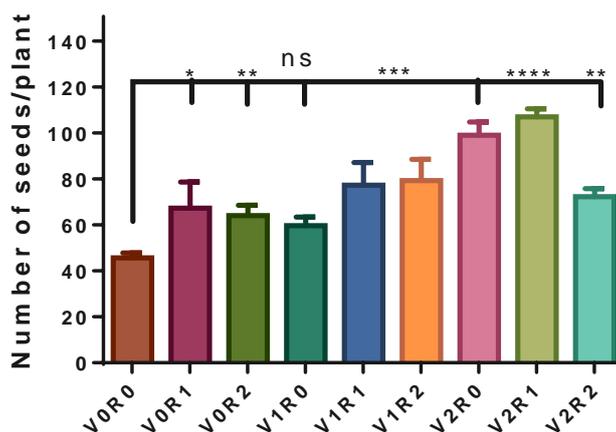


Figure 7. Effect of study factors and their interaction on seeds number of *F. vulgare*.

The effect of spraying with study factors and their interaction on the number of seeds of *F. vulgare* was recorded after the seeds were dried. V0R0 is 0 g L⁻¹ of shoot extract root extract of *A. maurorum* (control treatment), V0R1 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V0R2 is 3 g L⁻¹ of *A. maurorum* root extract, V1R0 is 1.5 g L⁻¹ of *A. maurorum* shoot extract, V1R1 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract & 1.5 g L⁻¹ of root extract, V1R2 is the interaction between 1.5 g L⁻¹ of shoot extract & 3 g L⁻¹ of root extract, V2R0 is 3 g L⁻¹ of shoot extract of *A. maurorum*, V2R1 is the interaction between 3 g L⁻¹ of shoot extract and 1.5 g L⁻¹ of root extract, V2R2 is the interaction between 3 g L⁻¹ of both shoot extract & root extract. A multiple ANOVA was performed using ordinary One-way ANOVA multiple comparisons. Significance was assigned as following: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

DISCUSSION

The obtained result exhibits an increase in the plant's height with *A. maurorum* extract spray (Figure 1). Increase the height of fennel plants when sprayed with shoot and roots of *A. maurorum* or cameltorn extracts due to the rich content of phenolic compounds such as 1,3-Butanadiol, 1,3-butylene glycol, 4-Fluoroveratrole, fluorobenzene, 3,4-methoxy and 2,3-Dimethylpenzene²⁷ Phenolic compounds are responsible for the growth of the plant by helping in cell wall formation, these pools of wall-bound phenolic compound act as a reservoir of phenylpropanoid units for lignin biosynthesis or they act as representative to beginnings of lignification itself²⁸. However, spraying *F. vulgare* with shoot and root extracts of *A. maurorum* caused a decrease in the number of branches and leaves of plants compared to the control (Figure 2). The diminishing number of branches and leaves may be due to containing *A. maurorum* extracts on Coumarin that have a regulatory effect on leaves and branches growth²⁹ or due to the direction of plant growth to elongation at the expense of shoots growth. Figure 3 shows the fresh weight of fennel plants after the treatment with *A. maurorum* extract. The spraying with 1.5 g L⁻¹ of shoot extract only and roots extract only, as well as with 3 g L⁻¹ of shoot extract of *A. maurorum* caused a significant increase in the fresh weight of fennel plants (27, 25, 33) g respectively compared to control 20 g without any effect for study factors interaction (Figure 3). At the same time, the spraying with all concentrations of shoot and root extracts of *A. maurorum* led to a significant increase in the

dry weight of *F. vulgare* compared to the control (Figure 4). The increase in the weight of plants, particularly dry weight, maybe because of the high content of carbohydrates (56.52%) in *A. maurorum* extract, in addition to trace elements present, including Ca, Mg, K, Na, Fe, Cu, Zn, Cr, Cd, Pb, and Ni²², foliar spray with carbohydrate and elements source (*A. maurorum* extract) enhanced plants growth that positively reflected on plants weigh^{30,31}.

Our result showed an increase in inflorescence numbers after foliar spraying with shoot root extracts of *A. maurorum* compared to the control group (Figure 5). At the same time, the number of flowers per plant was affected by only spraying with 3 gL⁻¹ of shoot extract. The interaction between 1.5 gL⁻¹ of both shoot and root extracts and interaction between 3gL⁻¹ and 1.5 gL⁻¹ of shoot extract and root extract of *A. maurorum* respectively (Figure 6). *A. maurorum* is a legumes plant that can form a symbiotic relationship with nitrogen-fixing soil bacteria called rhizobia. *A. maurorum* has a high content of flavonoids including chrysoeriol-7-O.-xylosoid, kaempferol-3-galactorhamnoside isorhamnetin, kaempferol, isorhamnetin 3-O.-β-D-apio-furanosyl (1-2) β-D-galactopyranoside²². Flavonoids are secondary metabolites and have a defense role in the plant. Flavonoids that are secreted in the roots play an additional function in initiating symbiotic development in most legumes³² by acting as mediators in NodD protein synthesis and stimulators of NodD linkage to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti* leading to enhancement of nitrogen-fixing³³. Nitrogen is essential in plant growth at all stages, as it is known that the flowering stage requires a low level of nitrogen and a high level of phosphor. However, several kinds of literature indicated that sufficient or high level of nitrogen application caused an increase in plant flowering due to the activation of gene expression involved in the flowering process³⁴⁻³⁶ that explain the increase of inflorescences and flowers number after foliar application of *A. maurorum* extracts (Figures 5 and 6). Results also show a significant increase in the number of seeds after foliar spray with shoot and root extracts of *A. maurorum* compared to control except the spraying with 1.5 gL⁻¹ of shoot extract (Figure 7). Increasing the number of *F. vulgare* seeds may be related to *A. maurorum* extract content of flavonoids, elements, carbohydrates, and vitamins^{22,37} that has a remarkable role in vegetative and floral growth enhancement of *F. vulgare*, resulting in an increase in seeds number compared to control plants.

CONCLUSIONS

Foeniculum vulgare, or fennel, is a plant used in diet, cooking, and medicine due to its flavor and health benefits. In the current study, exciting results show that spraying with shoot and root extract of *Alhagi maurorum* or camel thorn enhanced the vegetative, floral, and seed characteristics of *F. vulgare*. Most active compounds in the shooting part are present in roots except essential oils, which may cause a little difference in fennel plant growth with individual treatment of shoot extract. However, the interaction between the two factors enhanced the features of the study, especially the treatment with 3 g L⁻¹ of shoot extract and 1.5 g L⁻¹ of root extract, which achieved the highest number of seeds per plant.

Author Contributions: Conceptualization, W.H.N. and F.A.H., methodology W.H.N. and F.A.H., formal analysis W.H.N., writing original draft W.H.N. and updating draft F.A.H.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Data Availability Statements in the "Bionatura Research Data Policies" section at <https://www.revistabionatura.com/policies.html>.

Acknowledgments: We thank Hiba Asaad Majeed, an Agriculture College / University of Basrah undergraduate student.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Rather MA, Dar BA, Sofi SN, Bhat BA, Qurishi MA. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016;9:S1574-S83.
2. Badgajar SB, Patel VV, Bandivdekar AH. *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *Biomed Res Int*. 2014;2014:842674-.
3. Barros L, Carvalho AM, Ferreira IC. The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT-Food Science and Technology*. 2010;43(5):814-8.
4. Badgajar SB, Patel VV, Bandivdekar AH. *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. *Biomed Res Int*. 2014;2014:842674.
5. Al-Zubaidy, N. .; Al-Mubarak, N. F. .; Ahmed, A. M. . The Effect Of Fertilization And Repeated Mowing On Some Vegetative Characteristics And Yield Of Panicum Mombasa Plant. *JLSAR* 2021, 2, 34–45.
6. Damjanović B, Lepojević Ž, Živković V, Tolić A. Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*. 2005;92(1):143-9.
7. Fang L, Qi M, Li T, Shao Q, Fu R. Headspace solvent microextraction-gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from *Foeniculum vulgare* Mill. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2006;41(3):791-7.
8. Thabit S S, Awad M M, Abdulateef S M. Effects of In-Ovo Injection of sialic acid on Chick's embryonic development and physiological traits. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 49. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.49>.
9. Roby MHH, Sarhan MA, Selim KA-H, Khalel KI. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial crops and products*. 2013;44:437-45.
10. Araque M, Rojas L, Usubillaga A. Antibacterial activity of essential oil of *Foeniculum vulgare* miller against multiresistant gram-negative bacilli from nosocomial infections. *Science*. 2007;15(3):366-70.
11. Thakur N, Sareen N, Shama B, Jagota K. Studies on in vitro antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. against spoilage fungi. *Global Journal of Bio-Science and BioTechnology*. 2013;2(3):427-30.
12. Taie H, Helal M, Helmy W, Amer H. Chemical composition and biological potentials of aqueous extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L). *Journal of Applied Sciences Research*. 2013;9(3):1759-67.
13. Kataoka H, Horiyama S, Yamaki M, Oku H, Ishiguro K, Katagi T, et al. Antiinflammatory and anti-allergic activities of hydroxylamine and related compounds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2002;25(11):1436-41.
14. Choi E-M, Hwang J-K. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*. 2004;75(6):557-65.
15. Faudale M, Viladomat F, Bastida J, Poli F, Codina C. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(6):1912-20.
16. Albert-Puleo M. Fennel and anise as estrogenic agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 1980;2(4):337-44.
17. Agarwal R, Gupta SK, Agrawal SS, Srivastava S, Saxena R. Oculohypotensive effects of *Foeniculum vulgare* in experimental models of glaucoma. *Indian journal of physiology and pharmacology*. 2008;52(1):77-83.

18. Ibraheem M W, Muhaimed A R, Mohammed Th. T. Leg cuts from Awaasi lambs fed a diet with varying levels of *Rhus coriaria* L., Physical dissection and chemical composition. *Revis Bionatura* 2022;7(4) 4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.4>.
19. Birdane FM, Cemek M, Birdane YO, Gülçin İ, Büyükokuroğlu ME. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *World Journal of Gastroenterology: W.J.G.* 2007;13(4):607.
20. M. K. Rozbiany, P., M. Taha, S. Response Of Local Sour Orange (*Citrus Aurantium* L.) Seedlings To Foliar Application With Two Types Of Bio Stimulators. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 87-94. doi: 10.32649/ajas.2023.179718.
21. Abou El-Soud N, El-Laithy N, El-Saeed G, Wahby M, Khalil M, Morsy F, et al. Antidiabetic activities of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil in streptozotocin-induced diabetic rats. *Macedonian J Med Sci.* 2011;4(2):139-46.
22. Al-Snafi A. *Alhagi maurorum* as a potential medicinal herb: An Overview. *International Journal of Pharmacy Review and Research.* 2015;5:130-6.
23. Muhammad G, Hussain MA, Anwar F, Ashraf M, Gilani A.H. *Alhagi*: a plant genus rich in bioactives for pharmaceuticals. *Phytotherapy research.* 2015;29(1):1-13.
24. Mostafa RM, Essawy HS. Assessment of camel thorn (*Alhagi maurorum*) as new sources of bioactive compounds using GC-MS technique. *A.P.R.I.L.* 2019. 2019.
25. Ismail A, Sabra F. Allelopathic assessment of aqueous extract of *Alhagi maurorum* and *Sorghum bicholor*. *Egy J Plant Pro Res.* 2014;2:56-73.
26. Khalil R, Yusuf M, Bassuony F, Gamal A, Madany M. Phytotoxic effect of *Alhagi maurorum* on the growth and physiological activities of *Pisum sativum* L. *South African Journal of Botany.* 2020;131:250-8.
27. Mostafa R, Essawy H. Assessment of camel thorn (*Alhagi maurorum*) as new sources of bioactive compounds using GC-MS technique. *Plant Omics.* 2019:70-7.
28. Antonova G, Varaksina T, Zheleznicenko T, Stasova V. Changes in phenolic acids during maturation and lignification of Scots pine xylem. *Russian journal of developmental biology.* 2012;43(4):199-208.
29. Chattha F, Nisa M, Munawer M, Kousar S. Coumarin-Based Heteroaromatics as Plant Growth Regulators. 2016.
30. Ainsworth EA, Bush DR. Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol.* 2011;155(1):64-9.
31. Ghorbani Dehkordi A, Mashayekhi K, Kamkar B. Effect of Foliar Application of Sucrose, Boron, Potassium Nitrate and Salicylic Acid on Yield and Yield Components of Tomato var. Super A. *Research in Crop Ecosystems.* 2015;2(1):43-52.
32. Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual review of genetics.* 2011;45(1):119-44.
33. Peck MC, Fisher RF, Long SR. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology.* 2006;188(15):5417-27.
34. Yuan S, Zhang Z-W, Zheng C, Zhao Z-Y, Wang Y, Feng L-Y, et al. *Arabidopsis* cryptochrome 1 functions in nitrogen regulation of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016;113(27):7661-6.
35. Peng M, Bi YM, Zhu T, Rothstein SJ. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene *NLA*. *Plant molecular biology.* 2007;65(6):775-97.
36. Ali, H.H., AL-Rawi, K., Khalaf, Y., Alaaraji, S., Aldahham, B., Awad, M., Al-ani, O., Al-ani, F., Ali, A.T. Serum Caveolin-1 Level is Inversely Associated with Serum Vaspin, Visfatin, and HbA1c in Newly Diagnosed Men with Type-2 Diabetes (2022) *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 11 (2), pp. 299-309.
37. Mohammed RK, Abd-alkadhemand NAD. Determination of Active Phytochemical Compounds of *Alhagi Maurorum* using Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS). *Iraqi Journal of Science.* 2022;63(1):87-97.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Neamah, W.; Hasan, F. Effect of Foliar Application of *Alhagi maurorum* Extract on *Foeniculum vulgare* Growth. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 50. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.50>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Active constituents and their therapeutic and pharmacological role in the most used herbs in Basrah

Wurood Hantoosh Neamah^{1*}, Fatimah Ali Hasan², Wageeha Mosa Essaa³

¹University of Basrah, Basrah, Iraq;

²University of Basrah, Basrah, Iraq; fatimah.hasan@uobasrah.edu.iq;

³University of Basrah, Basrah, Iraq; wageeha.essaa@uobasrah.edu.iq;

* Correspondence: wurood.neamah@uobasrah.edu.iq; Tel.: (+9647819865272)

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.51>

ABSTRACT

Basrah is a southern Iraq governorate bordering Kuwait to the south and Iran to the east. It is the second population city in Iraq after Baghdad. Via the directed questionnaire to 22 herbalists, a list of medicinal herbs used in ascending order by the flock in a city was obtained. The five most used herbs on the list head are *Matricaria chamomilla* (chamomile), *Nigella sativa* (black seed), *Anchusa italica* (Italian bugloss), *Pimpinella anisum* (anise), and *Trigonella foenum graecu* (fenugreek). GC\MS analysis of the first five herbs displayed numerous remarkable constituents, including N-Hexadecanoic acid, Thymoquinone, 9,12-Octadecadienoic acid, 2,3-Dihydroxypropyl ester, 5-Hydroxymethylfurfural, Anethole, Vitamin E, Campesterol, Stigmasterol, and gamma-Sitosterol that elucidate the purpose from a comprehensive utilization of these herbs by folk in the city. A current study adds a new input to the database. It exhibits an integrative investigation of Basrah governorate's most used medicinal herbs, their constituents, and their therapeutic and pharmacological role.

Keywords: Basrah, Constituents, GC/MS, Herbs, Pharmacology role, Therapy role

INTRODUCTION

Iraq was previously well known for a significant variation of wild plants due to its geographic location and climatic circumstances. It has 363 medicinal plant species belonging to about 270 genera from approximately 98 families¹. Basrah is one of the three essential cities established in Iraq after Baghdad and Mosul. It is located in southern Iraq, bordering Kuwait to the south and Iran to the east². Basrah embraces Shatt Al Arab, a considerable river from the confluence of the great Euphrates and Tigris rivers at Qurna town. A river penetrates the city and connects it with the Arabian Gulf, which gives the town a coastal feel. Shatt Al Arab has numerous branches that feed huge lands in Basrah and give the city agricultural features³. Water abundance, fertile soil, and warm temperature paved for diversity in wild plant growth, which was used by folk for medical purposes for centuries. However, in two recent decades, several causes have influenced the abundance and variety of wild plants, including climate change, salinity intrusion, drought, desertification, topography changes and human activities. Substantial desert areas in Basra were previously green and covered with different wild and implanted plants⁴.

Furthermore, these changes caused the decline of agricultural lands and deterioration of soil fertility, significantly affecting previous causes in the density and distribution of wild plants. Consequently, they reduced the exhibition of local herbs in the markets. However, herbs markets in Basrah present a variety of species of

herbs with numerous forms and have customers from various social classes. Due to the need for a database about medicinal herbs in Basra governorate, including the species of medicinal herbs, most used herbs, therapeutic purposes, and their constituents, a current study has been executed to provide suitable information for the incomplete database.

MATERIALS AND METHODS

Data collection

The study included a questionnaire for 22 herbalists in two primary markets: Al Ashar and Ancient Basrah (Basrah alqademh). The questionnaire included the following questions.

- 1- Age
- 2- Education level
- 3- Source of experience
- 4- Period of herbalist practice
- 5- License of herbalist practice
- 6- Most used herbs.
- 7- Therapeutic purpose of medicinal herbs
- 8- Source of medicinal herbs in the store
- 9- Herbalist background
- 10- Prescription of herbs

Herbs extraction

1 g of five selected herbs were weighted and soaked overnight with 10 ml of pure methanol, extracts filtered by filter paper (150 mm) and analyzed by GC/MS (Agilent 7890B GC, 5977A MSD, US).

RESULTS

The range of herbalists' ages was between 27 and 70, and their education levels ranged between primary school and bachelor's degrees, meaning all herbalists could read and write. Fourteen herbalists inherited the vocation from their granddads, and 8 acquired the skills through practice. The range of their occupation practice was between 2 and 60 years. Eight of them do not have a license for vocational practice, which leads to having a double responsibility from the legal side. During the questionnaire, we found that most sold herbs are imported from Iraq from different countries such as Iran, India, Turkey, and Syria. However, a few herbs, such as fenugreek, coriander, mint, and thyme, are cultivated in Iraq and shopped in the local markets. None of the herbalists in the questionnaire have any knowledge or background about the active constituents of herbs exhibited in their stores. Also, they do not have any background about specific constituents in the sold herbs because they needed to have the opportunity to get classes or academic education about medicinal and aromatic plants. When herbalists were asked the last question, they were concrete about giving customers a suitable dose and the correct therapeutic period of required herbs under the pretext that it is (the most required herbs are known and continually repeated by the customers). However, the alleged pretext may need to be revised to avoid the safety problems.

List of accepted and used herbs by customers in Basrah

Herb	Family	Local name	Therapeutic use
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Asteraceae	Pabonic	anti-inflammatory, antiseptic anti-disturbance of the stomach
<i>Nigella sativa</i> L.	Ranunculaceae	Habat albaraka	anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetic, anti-hypertensive, analgesic
<i>Anchusa italica</i> Retz.	Boraginaceae	Wared Maui	anti-influenza activity
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Umbelliferae	Anisoon	Reduce menopause hot flush
<i>Trigonella foenum graecum</i> L.	Fabaceae	Halbah	Antioxidant
<i>Cassia italica</i> (Mill.)Lam.	Fabaceae	Sanamaki	Antibacterial Antitumor
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Asteraceae	Sheih	Antidepressant
<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Zater	Improve gastrointestinal health
<i>Salvia Rosmarinus</i>	Lamiaceae	Ekleel Aljabal	Anticancer
<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	Mremeya	Antidiabetic
<i>Mentha longifolia</i> L.	Lamiaceae	Butenk	Treat gastrointestinal disorders
<i>Rhus coriaria</i> L.	Anacardiaceae	Sumac	Antioxidants and skin protection
<i>Linum usitatissimum</i> L.	Linaceae	Ketan	Management of diabetes mellitus
<i>Majorana hortensis</i>	Lamiaceae	Bardaqoush	Hormones regulation
<i>Teucrium polium</i> L.	Lamiaceae	Jeadeh	Antinociceptive
<i>Zingiber officinalis</i> Roscoe	Zingiberaceae	Zinjabel	Prevention of aging and degenerative diseases
<i>Cinnamomum zylanicum</i> Blume	Lauraceae	Darseen	Antidiabetic Activities
<i>Lepidium sativum</i>	Brassicaceae	Hab Alreshad	Treat airways disorders

Table 1. Herbs are used widely by folk, and their therapeutics are according to herbalists.

GC/MS analysis

The first five herbs were selected from the list, and GC/MS analyzed their methanolic extracts to identify their active constituents.

Chamomile *Matricaria chamomilla* L.

Figure (1) and Table (2) illustrate the GCMS analysis of the essential constituents in the methanolic extract of *Matricaria chamomilla* flowers.

Constituent name	Retention time (RT)	Area percentage (Area pct)
N-Hexadecanoic acid	12.966	20.427
Eicosane	15.651	0.904
Campesterol	20.946	0.610
Stigmasterol	21.160	0.890
gamma.-Sitosterol	21.738	3.214

Table 2. GC/MS analysis of active constituents in *Matricaria chamomilla* flower extract.

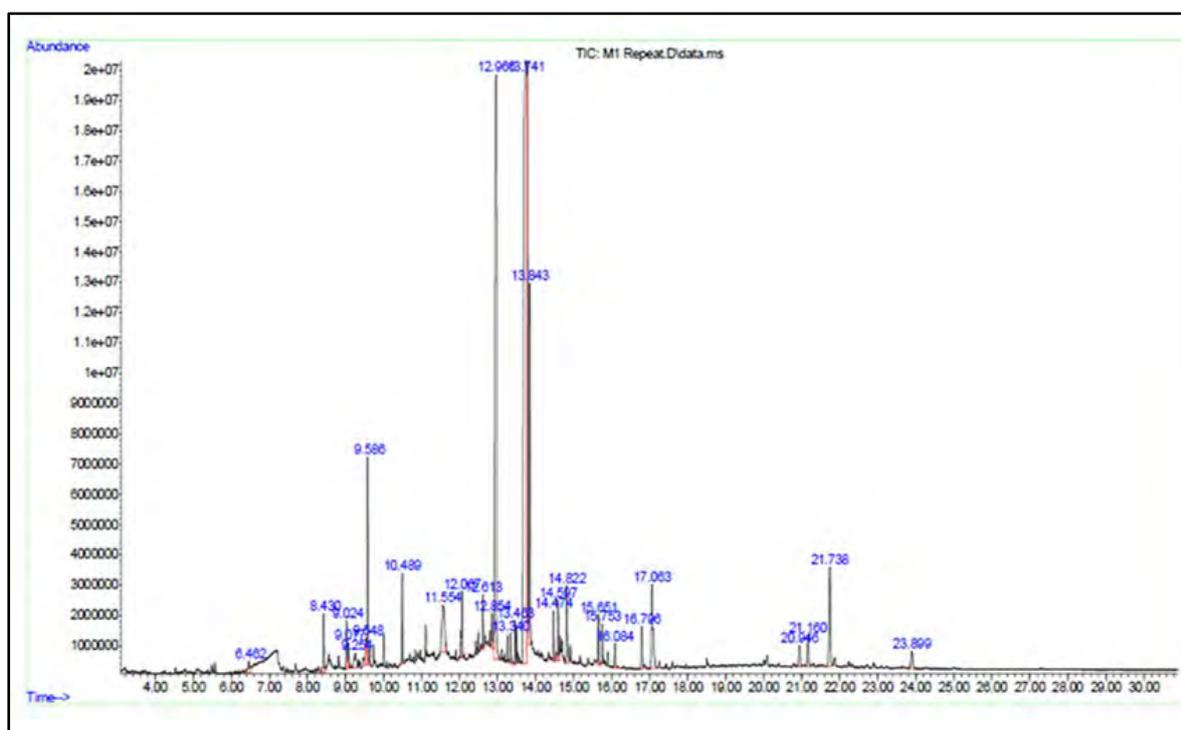


Figure 1. GC\MS analysis of methanolic extract of *Matricaria chamomilla* flowers.

Representative peak area of N-Hexadecanoic acid at RT 12.966, Eicosane at RT 15.651, Campesterol at RT 20.946, Stigmasterol at RT 21.16, and gamma. -Sitosterol at RT 21.738

Black seeds *Nigella sativa* L.

GC\MS analysis of the methanolic extract of *Nigella sativa* seeds shows the remarkable components in Figure (2) and Table (3)

Constituent name	Retention time (RT)	Area percentage (Area pct)
Thymoquinone	9.329	2.988
Caffeine	12.570	2.120
N-Hexadecanoic acid	12.982	13.646
9,12-Octadecadienoic acid	13.741	31.216
2,3-hydroxypropyl ester	17.117	17.124

Table 3. GC\MS analysis of active constituents in *Nigella sativa* seeds extract.

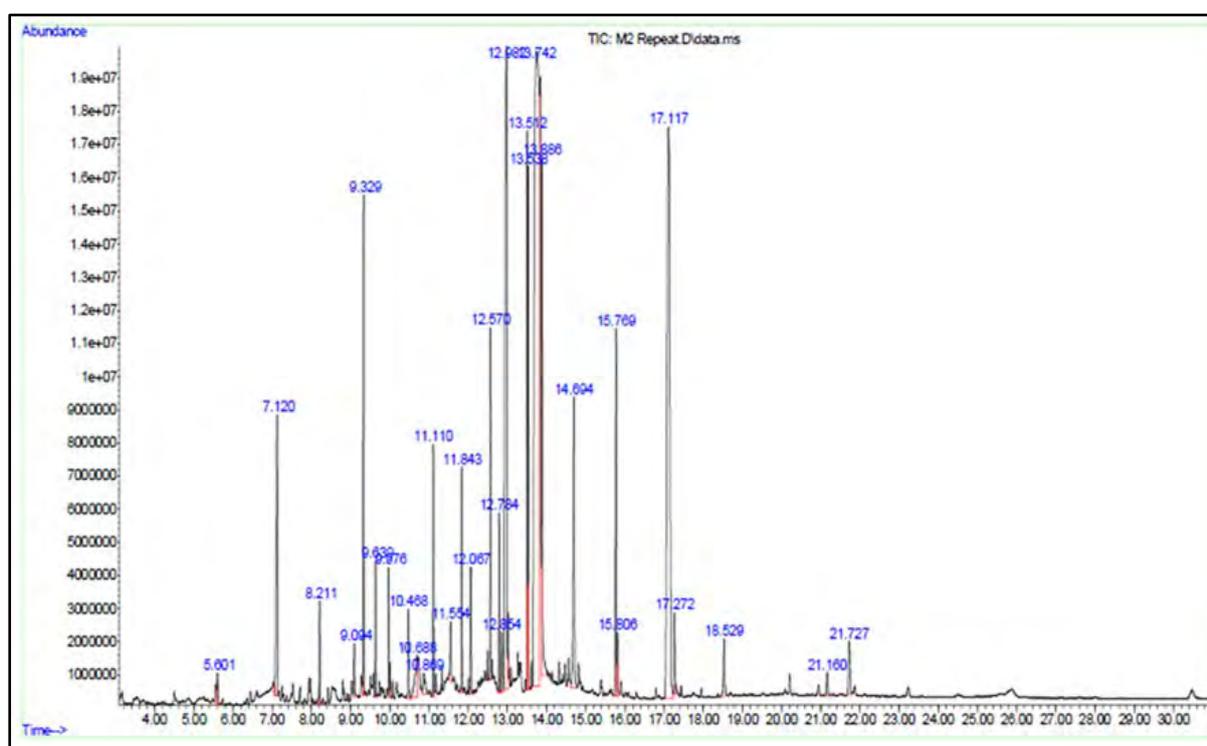


Figure 2. GC\MS analysis of methanolic extract of *Nigella sativa* seeds.

Representative peak area of Thymoquinone at retention time (RT) 9.329, Caffeine at RT 12.570, N-Hexadecanoic acid at RT 12.982, 9,12-Octadecadienoic acid at RT 13.741, 2,3-and hydroxypropyl ester at RT 17.117

Italian bugloss *Anchusa italica* Retz.

Figure (3) and Table (4) exhibit the GCMS analysis of the significant content of the methanolic extract of *Anchusa italica* flowers.

Constituent name	Retention time (RT)	Area percentage (Area pct)
5-Hydroxymethylfurfural	9.206	13.654
Campesterol	20.946	2.242

Table 4. GC/MS analysis of active constituents in *Anchusa italica* flower extract.

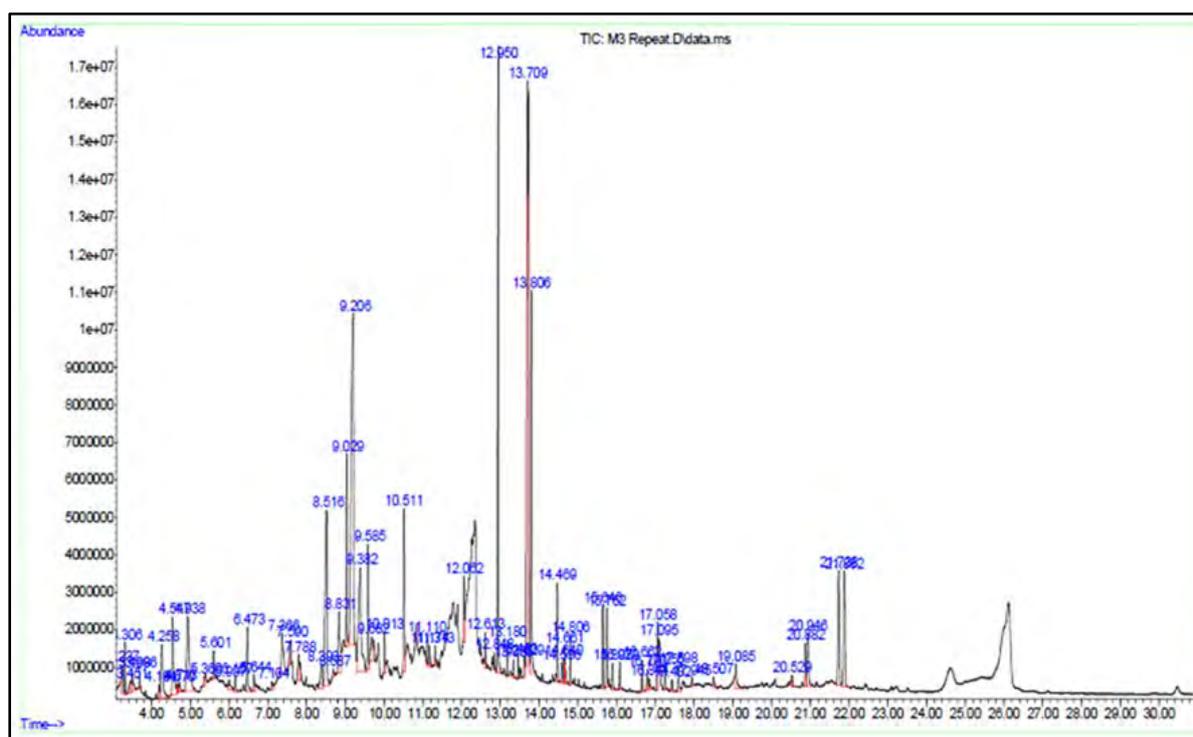


Figure 3. GC/MS analysis of a methanolic extract of *Anchusa italica* flowers

The representative peak area of 5-Hydroxymethylfurfural at retention time (RT) 9.206 and Campesterol at RT 20.946

Anise Pimpinella anisum L.

An essential active compound of methanolic extract of *Pimpinella anisum* seeds is illustrated in Figure (4) and Table (5) by GC/MS analysis.

Constituent name	Retention time (RT)	Area percentage (Area pct)
Anethol	9.607	19.687
Stigmasterol	21.165	1.764

Table 5. GC/MS analysis of active constituents in *Pimpinella anisum* seeds extract.

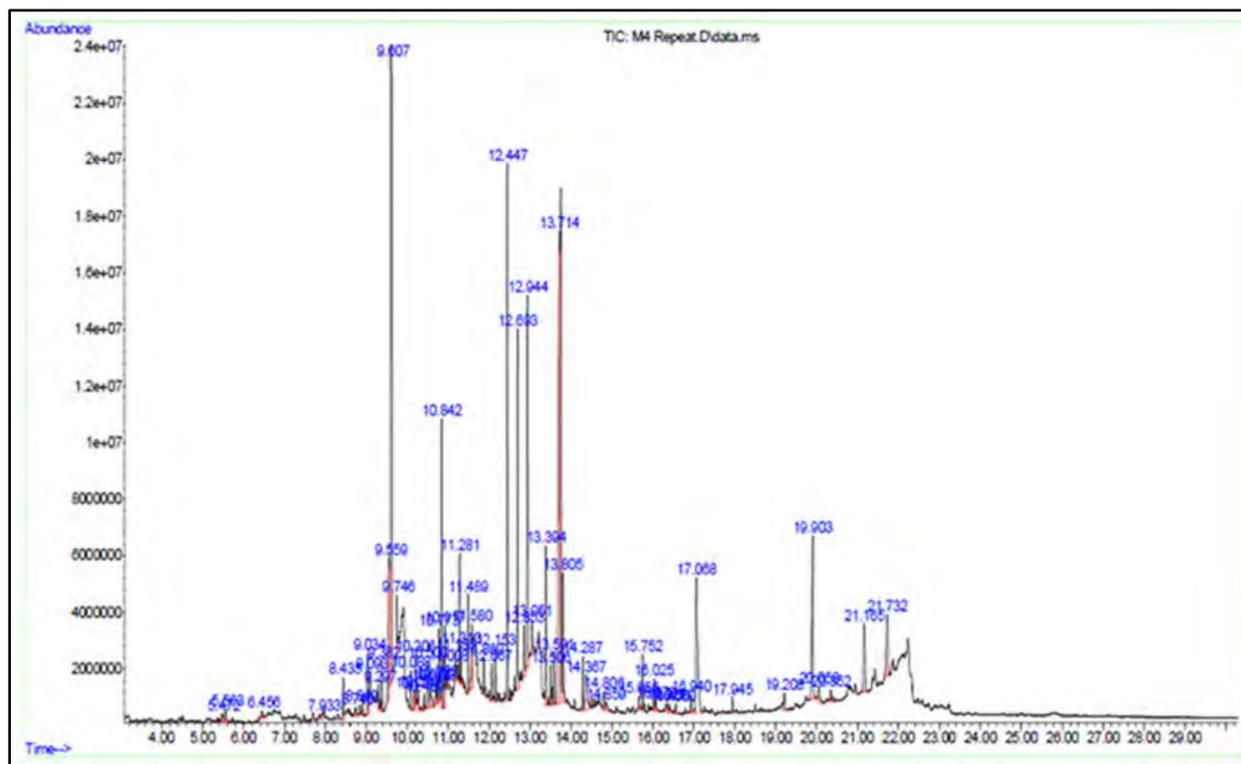


Figure 4. GC\MS analysis of methanolic extract of *Pimpinella anisum* seeds.

The representative peak area of Anethol at retention time (RT) is 9.607, and that of Stigmasterol is at RT 21.165.

Fenugreek *Trigonella foenum graecum* L.

The GCMS analysis of the remarkable components of the methanolic extract of *Trigonella foenum graecum* seeds obtained the result exhibited in Figure (5) and Table (6).

Constituent name	Retention time (RT)	Area percentage (Area pct)
Vitamin E	20.058	2.135
gamma. -Sitosterol	21.738	8.521
Campesterol	20.941	1.4115

Table 6. GC/MS analysis of active constituents in *Trigonella foenum graecum* seeds extract

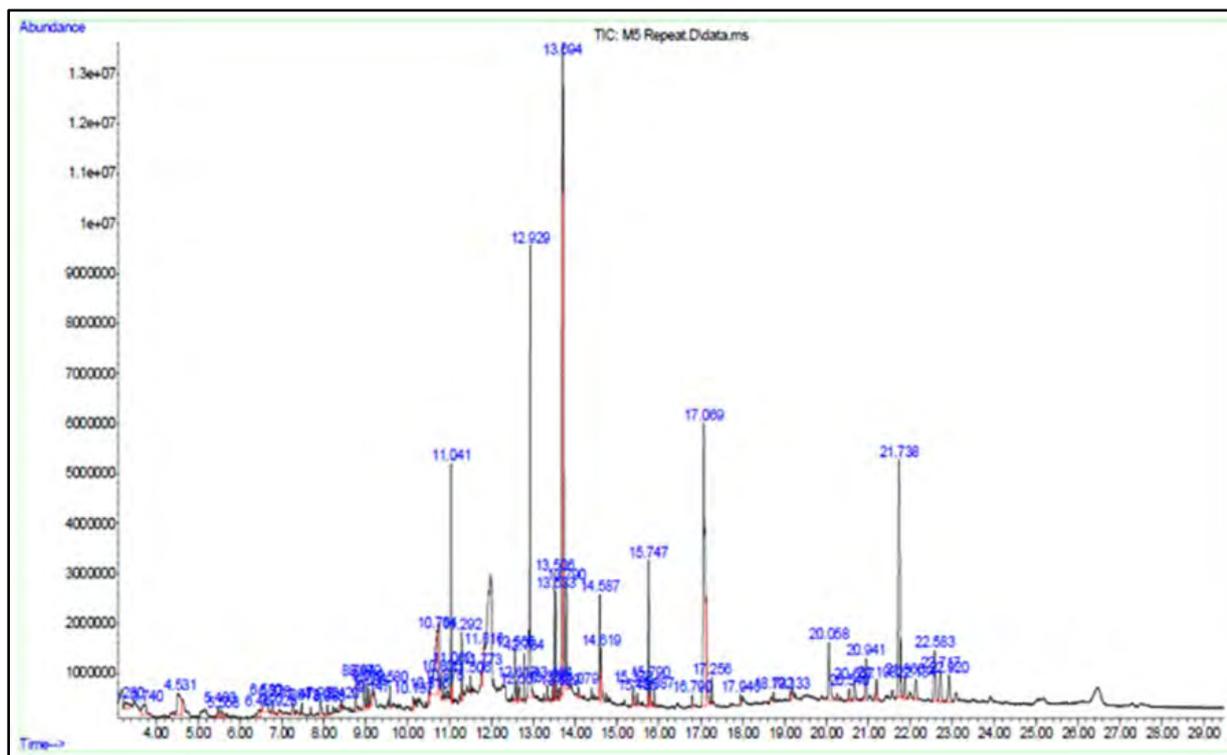


Figure 5. GC\MS analysis of methanolic extract of *Trigonella foenum graecum* seeds

Representative peak area of Vitamin E at retention time (RT) 20.058, gamma. -sitosterol at RT 21.738, and Campesterol at RT 20.941

DISCUSSION

Herbs markets in Basrah are busy markets with high economic value. However, it is not controlled by rules important in selling and using herbs. The rules in the herbs market, including importing, exporting, selling, buying, usage, storage, and exhibiting, and rules related to the herbalists, will organize the work in the scope and increase the significance of the herbs market. Table (1) shows herbs used widely by folk and their therapeutics according to herbalists.

Matricaria chamomilla or Pabonic (a common name in Iraq) was at the head of the list of herbs used mainly in Basrah, the plant belonging to the Asteraceae family. GC/MS analysis of a methanolic extract of chamomile flowers exhibited numerous important compounds (Figure 1). The most crucial compound with anti-inflammatory properties and a high peak area percentage (Area pct) is N-Hexadecanoic acid 20.457 (Table 2). Fatty acids. Such as conjugated linoleic acid and N-Hexadecanoic acid extend anti-inflammatory effects by decreasing the production of inflammatory mediators such as prostaglandin E2, IL-6, IL-1 β , TNF α , and nitric oxide⁵. Also, N-Hexadecanoic acid is reported as an inhibitor of the phospholipase A2 enzyme that hydrolyzes phospholipid membranes and releases fatty acids that initiate inflammation⁶. GC/MS analysis shows 0.904 area pct of Eicosane (Table 2). Eicosane has anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, and antiulcer properties against acetic acid-induced writhing, formalin-induced paw licking, carrageenan-induced paw edema, and

brewer's yeast-induced pyrexia in rats model ⁷.

Furthermore, Eicosane downregulated proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-12) and acted as an anti-inflammatories in vitro assay ⁸. Campesterol, Stigmasterol, and gamma-sitosterol are Phytosterols (PSs) and plant-originated steroids, showing 0.610, 0.890, and 3.214 peak area percentages (Table 2). The structural resemblance of PSs with cholesterol enables them to displace low-density lipoprotein (LDL) cholesterol in the human intestine and consequently reduce the risks associated with heart problems ⁹.

Among various medicinal herbs, *Nigella sativa* L. or Habat albarakh (Ranunculaceae family) is the most important due to a rich historical background in pharmacological potential ¹⁰⁻¹⁴. In a current study, we obtained several active compounds from GC/MS analysis in the methanolic extract of *Nigella sativa* L seeds (Figure 2). N-Hexadecanoic acid, 9,12-Octadecadienoic acid, and 2,3-dihydroxypropyl ester recorded a high peak area percentage, 13.646, 31.216, and 17.124, respectively (Table 3), the combination of three constituents has antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective activity ¹⁵. Thymoquinone 2.988 area pct is the most effective bioactive constituent in *Nigella sativa* L ¹⁶. Thymoquinone's Pharmacological properties range from antioxidant ¹⁷, cardioprotective ¹⁸, Antimicrobial ¹⁹, gastroprotective ²⁰, neuroprotective ²¹, and anticancer properties ²². Caffeine 2.120 area pct (Table 3) is one of the constituents identified in the methanolic extract of *Nigella sativa* L. Caffeine is reported in pain management due to its structure that is similar to adenosine structure; therefore, Caffeine combined with A2a adenosine receptors causing inhibiting and blocking their action. Caffeine does not change dopamine release and does not have abuse possibility like other adenosine-blocking agents such as cocaine. Blocking of adenosine receptors may reduce pain sensation and give relief feels ²³.

Anchusa italica Retz. The common name in the Basrah area is Wared Maui, The plant belongs to the Boraginaceae family and has polyphenol compounds with antimicrobial and antioxidant properties ²⁴. GC-MS analysis of a methanolic extract of *Anchusa italica* Retz flowers showed a high area percentage of 13.654 of 5-Hydroxymethylfurfural (Table 4). This antioxidative has a cardioprotective effect mediated by inhibition of L-type Ca²⁺ channels in a mouse model ²⁵. Anti-inflammatory properties of 5-Hydroxymethylfurfural support its potential therapeutic use for preventing and managing vascular diseases such as atherosclerosis through mechanisms involving the inhibition of VCAM-1 expression and NF- κ B activation in vascular endothelial cells ²⁶. 5-Hydroxymethylfurfural also produces modification of hemoglobin oxygen affinity with promising therapeutic potential to increase O₂ delivery during hypoxic hypoxia due to improved cardiac indices, including stroke volume (SV), cardiac output (CO), ejection fraction (EF), and stroke work (SW) compared to the vehicle group at 5% O₂ in rat model ²⁷.

Pimpinella anisum L. is one of the herbs used widely in Basrah. It belongs to the Apiaceae family and has a common name, Aniston. The most important volatile oil in *Pimpinella anisum* L. that gives characteristic sweet, aromatic flavor and pharmacological properties to seeds is Anethol ²⁸. Figure 4 shows the GC/MS result of the methanolic extract of *Pimpinella anisum* L. seeds; Anethol is recorded as the highest area prc. 19.6847 among anise constituents (Table 5). Anethole is a monoterpene with a position isomerism type and is the main constituent of essential oils from aromatic plants in the Apiaceae family, including anise, star anise, and fennel ²⁹. Anethole is among numerous agents identified from fruits and vegetables that can interfere with several cell signaling pathways, including NF κ B, AP-1, STAT3, Akt, Bcl-2, Bcl-XL, caspases, PARP, IKK, EGFR, HER2, JNK, MAPK, COX2, and 5-LOX that give basis to how Anethole not only prevent but also treat cancer and other diseases ³⁰. Anethol is also one of the chemopreventive agents that suppress cancer cell proliferation, inhibit growth factor signaling pathways, induce apoptosis, inhibit angiogenesis, repress the expression of

anti-apoptotic proteins, and inhibit cyclooxygenase-2 undergoing cancer treatment³¹. Also, Anethole has an antinociceptive effect due to decreasing the production and release of inflammatory mediators³². Stigmasterol is one of the anise constituents with an area percentage of 1.7646 (Figure 4). In one clinical study on CIA rats, Stigmasterol showed anti-inflammatory properties due to suppressing the expression of proinflammatory mediators (TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS and COX-2) and increasing the expression of anti-inflammatory cytokine (IL-10) through down-regulating the expression of NF-kBp65 with resulting in joint destruction reduction and histological alterations improvement³³. Furthermore, because of Stigmasterol's antibacterial and antifungal properties, it is a candidate to serve as a lead compound in developing novel antimicrobial drugs³⁴.

Fenugreek herb, or Halbah, belongs to the Fabaceae family. It is widely used in cooking and traditional medicine by people in Basrah. From GC/MS analysis of a methanolic extract of *Trigonella foenum graecum* seeds, Figure 5 shows some important constituents, including gamma.-Sitosterol, Vitamin E, and Campesterol that have 8.5212, 2.1353, and 1.4115 area pct respectively (Table 6). Gamma-sitosterol reduced the glucose level in the blood of rats on all days of treatment, especially on day 6, compared to rats treated with alloxan-induced diabetes. In addition, gamma-sitosterol caused a significant reduction in the concentration of alkaline phosphatase (ALP) in the treated group compared to the diabetic control group.³⁵ Vitamin E family consists of alpha-, beta-, gamma-, delta tocopherols and tocotrienols. In the clinical study on heart failure patients, giving vitamin E 400 mg once a day orally for 4 weeks significantly reduced oxidative stress, including malondialdehyde and superoxide anion levels. It increased the antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase³⁶. Furthermore, the result of the study investigated the role of vitamin E supplements in the treatment or prevention of nonalcoholic fatty liver (NAFLD). It showed that vitamin E improves the abnormal profile of biochemical liver parameters with liver enzyme normalization, and histological assessment showed enhancement in lobular inflammation and hepatic steatosis following vitamin E treatment³⁷. Campesterol is a member of phytosterols, which are derived from steroid alcohols, are present in a variety of foods, and exhibit numerous physiological functions. In an in vitro model of human ovarian cancer cells, Campesterol exhibited effectiveness in cell death; calcium levels increased, ROS production was induced and suppression of cell proliferation, cell cycle progression, and cell aggregation³⁸.

CONCLUSIONS

The herbalist market in Basrah is rich with diverse herbs that are mostly imported from various countries and used by people in the city. GC\MS results for the most used herbs exhibited essential constituents such as N-Hexadecanoic acid, Thymoquinone, 9,12-Octadecadienoic acid, 2,3-Dihydroxypropyl ester, 5-Hydroxymethylfurfural, Anethole, Vitamin E, Campesterol, Stigmasterol, and gamma.-Sitosterol that illustrate a hidden reason behind the wide use of selected herbs in Basrah governorate

Author Contributions: Conceptualization, W.H.N., F.A.H, and W.M.E; methodology, W.H.N.; F.A.H and W.M.E formal analysis, W.H.N. writing and updating of original draft. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Data Availability Statements in the “Bionatura Research Data Policies” section at <https://www.revistabionatura.com/policies.html>.

Acknowledgments: The authors would like to thank all the herbalists for their collaboration.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Ghazanfar SA. Handbook of Arabian medicinal plants. Boca Raton: CRC Press; 1994. 265 p. p.
2. Abdulzahra Al Rubaie D, Kasib Mizel A, Jarallah Sadoon A. The Geographic Location of Basra Governorate and its Effect on Iraq Power. *مجلة ابحاث البصرة للعلوم الانسانية*. 21-200:(3)43;2018.
3. Hamdan A, Dawood A, Naeem D, editors. Assessment study of water quality index (WQI) for Shatt Al-arab River and its branches, Iraq. MATEC Web of Conferences; 2018: EDP Sciences.
4. Zwain FA, Al-Samarrai TT, Al-Saady YI. A Study of Desertification Using Remote Sensing Techniques in Basra Governorate, South Iraq. *Iraqi Journal of Science*. 2021:912-26.
5. Yu Y, Correll P, Heuvel JV. Conjugated linoleic acid decreases production of proinflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002;1581(3):89-99.
6. Aparna V, Dileep KV, Mandal PK, Karthe P, Sadasivan C, Haridas M. Anti-inflammatory property of n-hexadecanoic acid: structural evidence and kinetic assessment. *Chemical biology & drug design*. 2012;80(3):434-9.
7. Okechukwu PN. Evaluation of anti-inflammatory, analgesic, antipyretic effect of eicosane, pentadecane, octacosane, and heneicosane. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2020;13(4):29-35.
8. Chuah X, Okechukwu P, Amini F, Teo S. Eicosane, pentadecane and palmitic acid: The effects in *in vitro* wound healing studies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2018;8(10):490-9.
9. Choudhary SP, Tran LS. Phytosterols: perspectives in human nutrition and clinical therapy. *Current medicinal chemistry*. 2011;18(29):4557-67.
10. Morsi NM. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotic-resistant bacteria. *Acta microbiologica Polonica*. 2000;49(1):63-74.
11. Bamasa AO, Kaatabi H, Lebdaa FM, Elq AM, Al-Sultanb A. Effect of *Nigella sativa* seeds on the glycemic control of patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian journal of physiology and pharmacology*. 2010;54(4):344-54.
12. Ng WK, Yazan LS, Ismail M. Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. 2011;25(7):1392-8.
13. Peng L, Liu A, Shen Y, Xu HZ, Yang SZ, Ying XZ, et al. Antitumor and anti-angiogenesis effects of Thymoquinone on osteosarcoma through the NF- κ B pathway. *Oncology reports*. 2013;29(2):571-8.
14. Perveen T, Abdullah A, Haider S, Sonia B, Munawar AS, Haleem D. Long-term administration of *N. sativa* affects nociception and improves learning and memory in rats. *Pak J Biochem Mol Biol*. 2008;41:141-3.

15. Kumar PP, Kumaravel S, Lalitha C. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *African Journal of Biochemistry Research*. 2010;4(7):191-5.
16. Banerjee S, Padhye S, Azmi A, Wang Z, Philip PA, Kucuk O, et al. Review on molecular and therapeutic potential of Thymoquinone in cancer. *Nutr Cancer*. 2010;62(7):938-46.
17. Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and chemical toxicology*. 2003;26(2):87-98.
18. Ojha S, Azimullah S, Mohanraj R, Sharma C, Yasin J, Arya DS, et al. Thymoquinone protects against myocardial ischemic injury by mitigating oxidative stress and inflammation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;2015.
19. Harzallah HJ, Kouidhi B, Flamini G, Bakhrouf A, Mahjoub T. Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and Thymoquinone. *Food chemistry*. 2011;129(4):1469-74.
20. Arslan SO, Gelir E, Armutcu F, Coskun O, Gurel A, Sayan H, et al. The protective effect of Thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. *Nutrition Research*. 2005;25(7):673-80.
21. Otaegui-Arrazola A, Amiano P, Elbusto A, Urdaneta E, Martínez-Lage P. Diet, cognition, and Alzheimer's disease: food for thought. *European journal of nutrition*. 2014;53(1):1-23.
22. Almajali B, Al-Jamal HAN, Taib WRW, Ismail I, Johan MF, Doolaanea AA, et al. Thymoquinone, as a Novel Therapeutic Candidate of Cancers. *Pharmaceuticals*. 2021;14(4):369.
23. Sollevi A. Adenosine for pain control. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 1997;41(S110):135-6.
24. Khomsi ME, Imtara H, Kara M, Hmamou A, Assouguem A, Bourkhiss B, et al. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Total Polyphenols of *Anchusa italica* Retz. *Molecules*. 2022;27(2):416.
25. Wölkart G, Schrammel A, Koyani C, Scherübel S, Zorn-Pauly K, Malle E, et al. Cardioprotective effects of 5-hydroxymethylfurfural mediated by inhibition of L-type Ca²⁺ currents. *British Journal of Pharmacology*. 2017;174(20):3640-53.
26. Kim HK, Choi YW, Lee EN, Park JK, Kim SG, Park DJ, et al. 5-Hydroxymethylfurfural from black garlic extract prevents TNF α -induced monocytic cell adhesion to HUVECs by suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression, reactive oxygen species generation and NF- κ B activation. *Phytotherapy Research*. 2011;25(7):965-74.
27. Othman Ghazi Najeeb Alani, Yassen Taha Abdul-Rahaman and Thafar Thabit Mohammed. Effect Of Vêo® Premium and Vitamin C Supplementation on Lipid Profile Before and During Pregnancy in Some Local Iraqi Ewes During Heat Stress. *Iraqi Journal of Science*. 2021, Vol. 62, No. 7, pp: 2122-2130.
28. Sun W, Shahrajabian MH, Cheng Q. Anise (*Pimpinella anisum* L.), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes. *Cogent Biology*. 2019;5(1):1673688.
29. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>.
30. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology*. 2006;71(10):1397-421.

31. AL-Abedy, A. N., Kadhim, J. H., Abdalmoohsin, R. G., & Al-Taey, D. K. (2021). Genetic diversity of *tomato yellow leaf curl virus* isolates and the effect of the virus on the hormone content of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Research on Crops*, 22(2), 347-355.
32. T. Jebril, N., Boden, R., Braungardt, C. Remediation Technique For Cadmium Contaminated Groundwater: A Systematic Review. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 1-18. doi: 10.32649/ajas.2023.178800.
33. Ahmad Khan M, Sarwar AHMG, Rahat R, Ahmed RS, Umar S. Stigmasterol protects rats from collagen induced arthritis by inhibiting proinflammatory cytokines. *International Immunopharmacology*. 2020;85:106642.
34. Hamad, H.M., Shabeeb, Z.A., Awad, M.M. Expressions of CD274 (PD-L1) and CD47 rReceptors on the sSurface of bBlast cCells in AML pPatients (2022) *Iraqi Journal of Science*, 63 (6), pp. 2373-2387.
35. Al-Zubaidy, N. .; Al-Mubarak, N. F. .; Ahmed, A. M. . The Effect Of Fertilization And Repeated Mowing On Some Vegetative Characteristics And Yield Of Panicum Mombasa Plant. *JLSAR 2021*, 2, 34-45.
36. Ghatak A, Brar MJS, Agarwal A, Goel N, Rastogi AK, Vaish AK, et al. Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. *International Journal of Cardiology*. 1996;57(2):119-27.
37. Perumpail BJ, Li AA, John N, Sallam S, Shah ND, Kwong W, et al. The Role of Vitamin E in the Treatment of NAFLD. *Diseases*. 2018;6(4):86.
38. Bae H, Park S, Yang C, Song G, Lim W. Disruption of Endoplasmic Reticulum and ROS Production in Human Ovarian Cancer by Campesterol. *Antioxidants*. 2021;10(3):379.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Neamah, W.; Hasan, F. Essaa. Active constituents and their therapeutic and pharmacological role in the most used herbs in Basrah. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 51. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.51>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Evaluation of the Drinking water in some Hospitals in Baghdad

Yaaroub Faleh Khalef Al Fatlawy¹, Faiza Kadhim², Beadaa Abdalqader Mahdii^{2,*}

¹ University of Baghdad / College of Science / Department of Biology/ Iraq.
dr.yaaroub@gmail.com.

² University of Baghdad / College of Science / Department of Biology/ Iraq.
faizakadhim@sc.uobaghdad.edu.iq.

*Correspondence: beadaaabdalqader@gmail.com .Tel.07810800062
Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.52>

ABSTRACT

Due to the significance of hospital drinking water, a study was done to assess the water in three hospitals in Baghdad (Al-Yarmouk Teaching Hospital, Ibn Sina Hospital, and Ibn-Al-Nafis Hospital) for its nature and quality, compare it to other hospitals in terms of its physical, chemical, and bacterial specifications, and compare it to international standards. According to Iraqi standards from 2009 and WHO standards from 2011, Chemical factors were measured, which included pH, Total Dissolved Solids (TDS), and Calcium Ion (Ca²⁺). Reported readings are all within acceptable ranges for drinking water. In contrast, turbidity, total hardness (T.H.), chlorides (Cl⁻), magnesium (Mg²⁺), the number of aerobic plates (APC), total coliform (T.C.), fecal coliform (F.C.), and fecal streptococcus (F.S.) which maximum values were (8.7 NTU, 690 mg⁻¹, 510 mg⁻¹, 231.1 mg/l, 38 cfu/ml, 20 cfu /100ml, 16 cfu /100ml, and 16 cfu /100ml) respectively. These values were higher than the permissible level recommended by the Iraqi standard (2009) and WHO standard (2011) for drinking water for all months and some months.

Keywords: Drinking/ Water/ Hospitals/ Baghdad.

INTRODUCTION

In hospitals, water is utilized for many things, such as cleaning, personal hygiene, prescription administration, central sterilizing techniques, laboratory water treatment systems, and dialysis. Hospitals are businesses that require water to operate daily. Hospitals use an average of 1litres of water per room per day, more than schools and workplaces but less than hotels and elderly care facilities. Hospitals are among the most water-intensive buildings¹. The National Infrastructure Advisory Council (NIAC) study on water sector resilience found that after two hours of losing water supply, healthcare capacities decreased by 67 to 99 percent, and other community capacities decreased by [67-99] %. 4 hours after the water supply was turned off. Healthcare-related incidents (HAIs) are thought to be responsible for 1.7 million illnesses and 99,000 fatalities in U.S. hospitals each year, Hospital tap water has been praised as one of the most potent weapons in the war against HAIs, yet it has also been labelled as an infection source⁶. One report says waterborne nosocomial pneumonia brought on by *Pseudomonas aeruginosa* alone kills 1400 people annually⁷. Although multidrug-resistant gram-negative organisms are causing an increase in serious HAIs, the potential that they could spread through water has gotten little attention⁷. Because of the importance of drinking water in hospitals, this research was conducted to evaluate the water of some hospitals in the city of Baghdad (Al-Yarmouk Teaching Hospital, Ibn Sina Hospital, and Ibn-Al-Nafis Hospital) for standing the nature and quality of hospital water In order to assess

the quality and its comparison with each other in terms of physical, chemical and bacterial specifications and comparison them with Iraqi and world criteria.

MATERIALS AND METHODS

Study area

1-Al-Yarmouk Teaching Hospital is one of Iraq's hospitals. It is situated in Baghdad's Al-Karkh and Al-Yarmouk districts in addition to Al-Mustansiriya Medical College (and is considered the teaching hospital for its students). After Baghdad Medical City, the hospital, founded in 1964, is currently the second-largest hospital in Iraq. It serves as the most extensive emergency hospital in the nation. It also has an emergency room and an outpatient clinic in addition to the medical, surgical (including orthopedics and burn units), obstetrical, oncology, and gynecological wards. Additionally, it is linked to the hospital's cutting-edge teaching labs, radiology department, blood bank, national center of hematology, and cancer research center. In cooperation with the Central Pediatric Teaching Hospital of the Yarmouk Directorate of Health. Around 700 beds make up the facility⁹ (Figure1).

2-The Ibn Sina Hospital in Baghdad, Iraq, in 1964. The Iraqi government paid a small portion of its actual price for it. The Persian doctor Ibn Sina is honored with the name of the Ibn Sina Hospital in Baghdad (also known as Avicenna). Four Iraqi doctors founded it in 1964, and it quickly rose to the top of Baghdad's hospitals¹⁰ (Figure 1).

3- Ibn-Al-Nafis Medical Center's initials were AL-Shaab when it opened its doors in 1979. After a short while, the blood circulation and the fact that the hospital specializes in fine blood vessels, chest, and heart led to the choice of Ibn al-Nafis as the name of the Arab world. The hospital is in the Rusafa-Karrada district-AL-Nidal neighborhood, close to the Andalusia coast and other important Baghdad^{9,10} Figure 1.

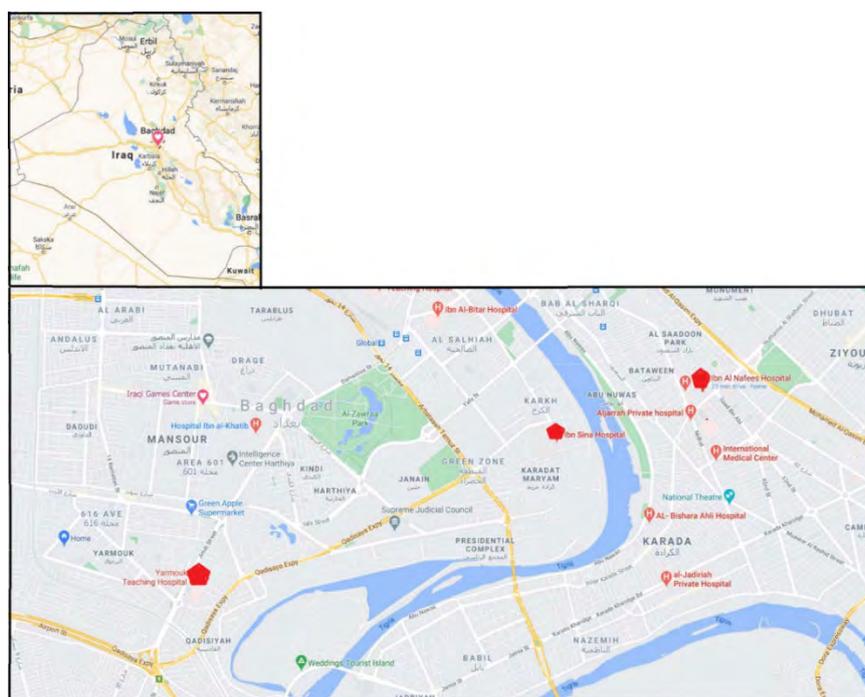


Figure 1. Shows the selected study areas within the city of Baghdad.

Method

Samples were collected between October 2018 and September 2019 and then physical, chemical, and bacteriological characteristics were studied, including pH value (pH), Turbidity, Total Dissolved Solids (TDS), Chloride (Cl⁻), Total Hardness (T.H.), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Aerobic Plate Count (APC), Coliform Bacteria, Faecal Coliform, and Faecal Streptococcus Bacteria), was tested by Baghdad Government in accordance to standard methods for the examination of drinking water. The tests of TDS and pH were measured on-site at the sampling position, and the other tests were done in the laboratory according to Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater to ⁸.

RESULTS

pH value (pH)

The results showed that the highest value was 8.4 in January in Ibn Sina Hospital, while the lowest was 6.4 in Ibn-Al-Nafis Hospital in July Figure 2, Table 1.

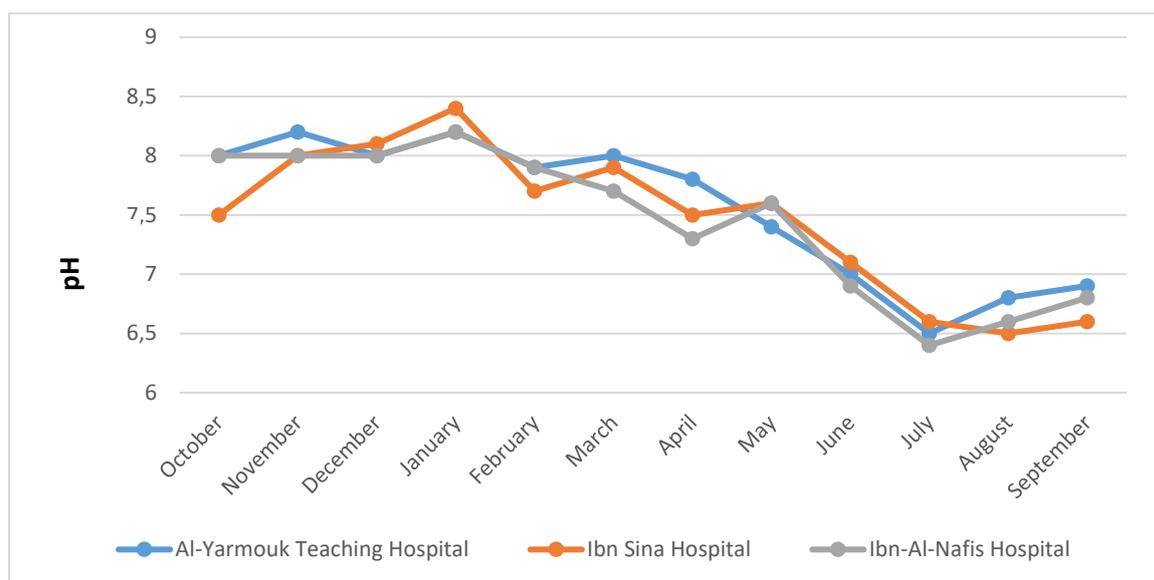


Figure 2. pH values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	8	7.5	8	0.547 NS
November	8.2	8	8	0.398 NS
December	8	8.1	8	0.325 NS
January	8.2	8.4	8.2	0.554 NS
February	7.9	7.7	7.9	0.309 NS
March	8	7.9	7.7	0.451 NS
April	7.8	7.5	7.3	0.549 NS
May	7.4	7.6	7.6	0.451 NS

June	7	7.1	6.9	0.366 NS
July	6.5	6.6	6.4	0.298 NS
August	6.8	6.5	6.6	0.317 NS
September	6.9	6.6	6.8	0.344 NS
LSD value	0.804 *	0.761 *	0.755 *	---

* ($P \leq 0.05$), NS: **Non-Significant**.

Table 1: pH values during the study period.

Total Dissolved Solids (TDS)

The maximum concentration was 790 mg^{-1} in December, while the minimum was 378 mg^{-1} in July (Figure 3, Table 2).

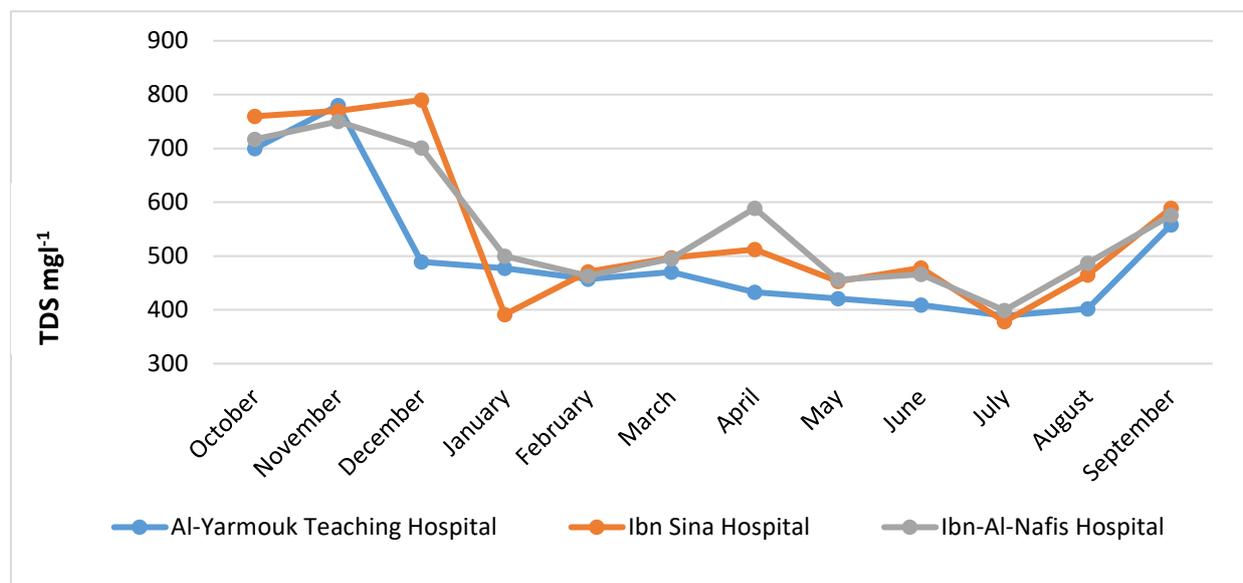


Figure 3. TDS (mg^{-1}) values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	700	760	717	66.74 NS
November	780	770	750	51.25 NS
December	489	790	701	85.42 *
January	477	391	500	63.92 *
February	457	471	463	49.75 NS
March	470	497	495	42.08 NS
April	433	512	589	76.36 *
May	421	453	456	45.94 NS
June	409	478	466	70.44 NS
July	389	378	399	42.19 NS
August	402	465	487	81.52 *
September	558	589	576	44.27 NS

LSD value	91.38 *	85.66 *	84.31 *	---
* ($P \leq 0.05$), NS: Non-Significant.				

Table 2: TDS (mg^{-1}) values during the study period.

Turbidity

This study found that the water samples of Al-Yarmouk Teaching Hospital had the highest value, 8.7 NTU, in January, while the water samples of Ibn-Al-Nafis Hospital gave the lowest value, 1 NTU, in July (Figure 4, Table 3).

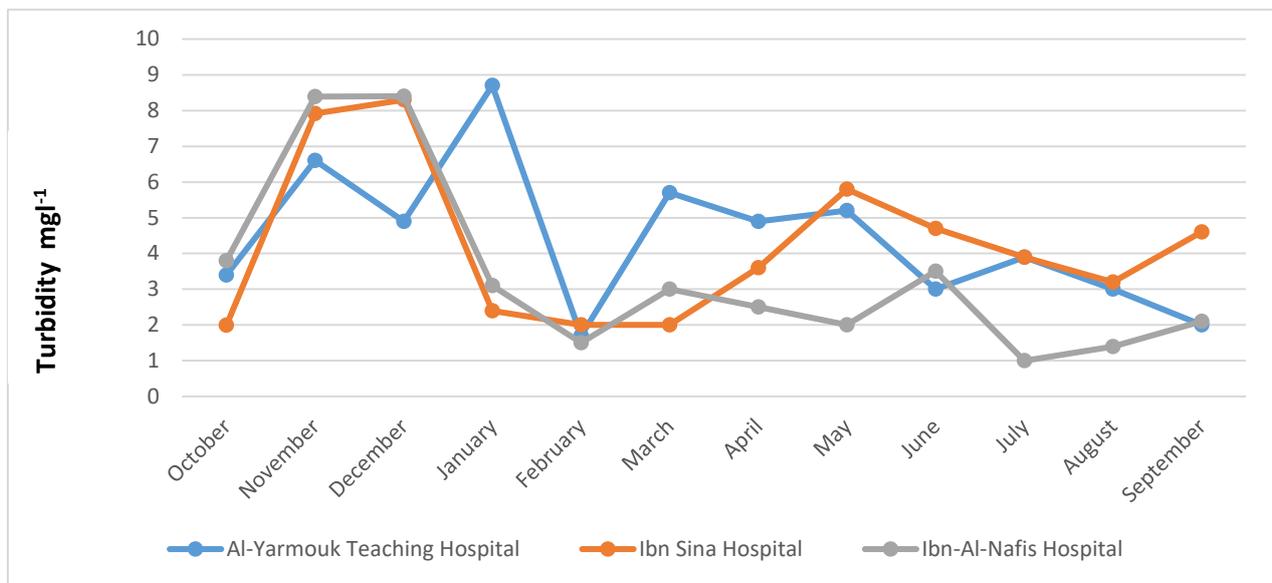


Figure 4. Turbidity (NTU) values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	3.4	1.99	3.8	2.07 NS
November	6.6	7.92	8.39	2.78 NS
December	4.9	8.3	8.4	3.19 *
January	8.7	2.4	3.1	4.05 *
February	1.7	2	1.5	1.66 NS
March	5.7	2	3	3.37 *
April	4.9	3.6	2.5	2.61 NS
May	5.2	5.8	2	3.08 *
June	3	4.7	3.5	2.93 NS
July	3.9	3.9	1	2.89 NS
August	3	3.2	1.4	2.57 NS
September	2	4.6	2.1	2.85 NS
LSD value	5.79 *	5.08 *	4.97 *	---
* ($P \leq 0.05$), NS: Non-Significant.				

Table 3. Turbidity (NTU) values during the study period.

Total Hardness (T.H.)

The results of the current study showed that the maximum value of T.H. in the water samples found in Ibn Sina Hospital water was 690 mg⁻¹ in January, while the minimum value found in Ibn Sina Hospital was 180 mg⁻¹ in July Figure.5, Table 4.

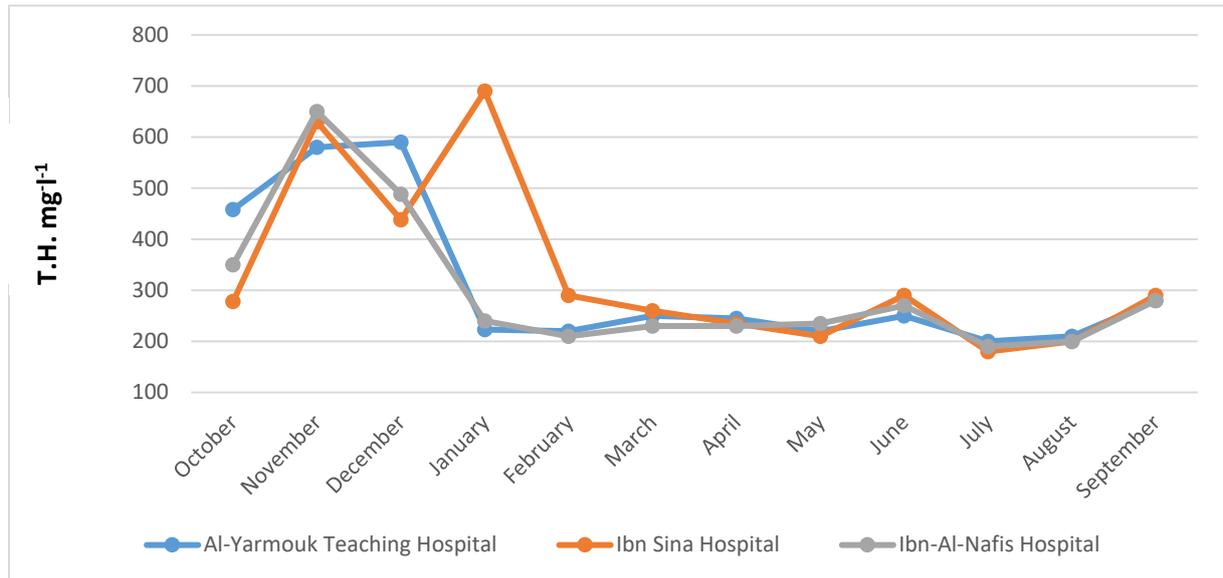


Figure 5. T.H. (mg l⁻¹) values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	458	278	350	92.98 *
November	580	630	650	75.73 NS
December	590	438	488	81.26 *
January	223	690	240	95.48 *
February	220	290	210	77.25 *
March	250	260	230	39.82 NS
April	245	235	230	35.07 NS
May	220	210	235	33.91 NS
June	250	290	270	49.72 NS
July	200	180	190	28.94 NS
August	210	200	200	27.06 NS
September	280	290	280	22.63 NS
LSD value	87.35 *	91.07 *	82.66 *	---

* (P≤0.05), NS: Non-Significant.

Table 4. T.H. (mg l⁻¹) values during the study period.

Chlorides (Cl⁻)

The data from the water samples show that the highest value of Cl⁻ found in Ibn Sina Hospital was 510 mg l⁻¹ in January, while the lowest mean value recorded in the Ibn Sina Hospital was 29 mg l⁻¹ in July Figure.6, Table 5.

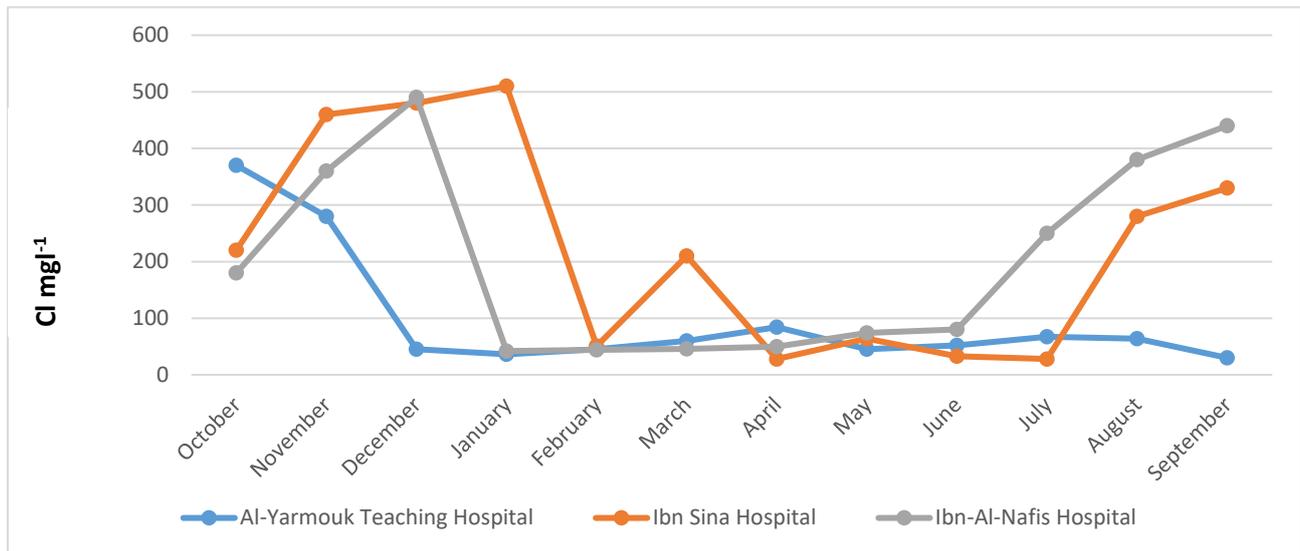


Figure 6. Cl⁻ values (mg l⁻¹) values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	370	220	180	47.05 *
November	280	460	360	50.22 *
December	45	480	490	71.48 *
January	36	510	42	75;48 *
February	45	51	44	13.96 NS
March	60	210	46	43.58 *
April	84	29	50	22.73 *
May	45	64	74	20.82 *
June	52	33	80	19.76 *
July	67	28	250	61.20 *
August	64	280	380	58.96 *
September	30	330	440	72.37 *
LSD value	48.93 *	64.37 *	81.07 *	---

* (P≤0.05), NS: Non-Significant.

Table 5. Cl⁻ values (mg l⁻¹) values during the study period.

Magnesium (Mg⁺²)

The maximum concentration of Mg^{+2} was 105 mg l^{-1} in Ibn Sina Hospital in January, while the minimum concentration was 20 mg l^{-1} in Ibn Sina Hospital in July (Figure 7, Table 6).

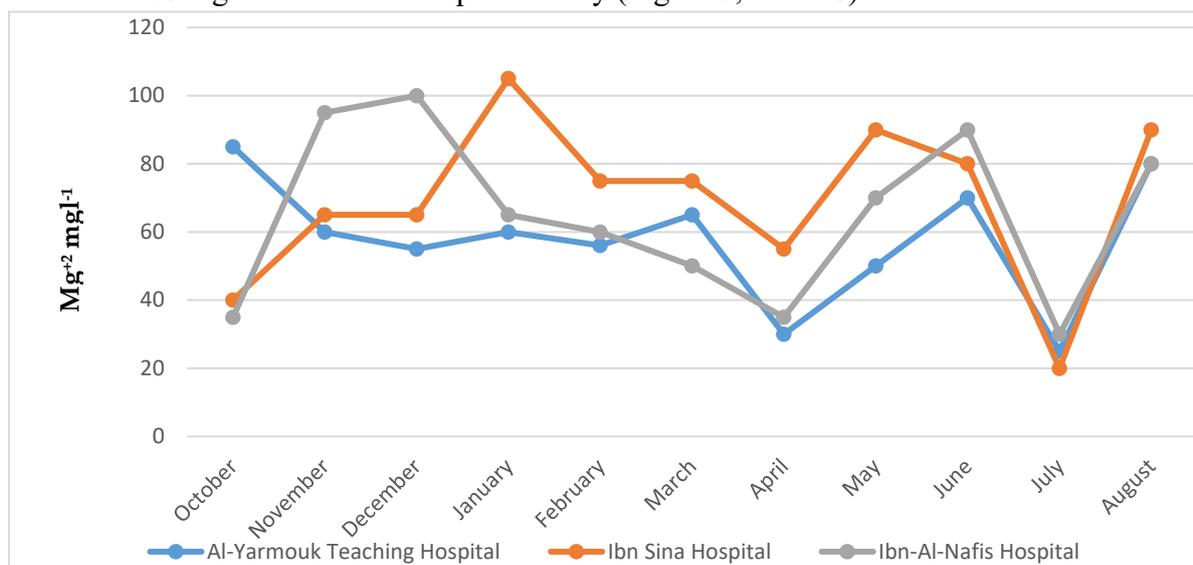


Figure 7. Mg^{+2} (mg l⁻¹) values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	85	40	35	17.52 *
November	60	65	95	15.94 *
December	55	65	100	17.08 *
January	60	105	65	20.56 *
February	56	75	60	16.33 *
March	65	75	50	16.02 *
April	30	55	35	14.39 *
May	50	90	70	20.85 *
June	70	80	90	16.85 *
July	25	20	30	11.48 NS
August	80	90	80	12.75 NS
September	75	90	65	17.50 *
LSD value	17.39 *	23.66 *	18.04 *	---

* (P≤0.05), NS: Non-Significant.

Table 6. Mg^{+2} (mg l⁻¹) values during the study period.

These recorded values are over the allowable limits according to Iraqi standards¹⁰ and WHO standards for drinking water¹², which was 150 mg l^{-1} .

Calcium ion (Ca⁺²)

The maximum value of Ca^{+2} was 231.1 mg l^{-1} in Al-Yarmouk Teaching Hospital during December. The minimum value was 10.5 mg l^{-1} in Ibn-Al-Nafis Hospital during August. Figure.8, Table 7.

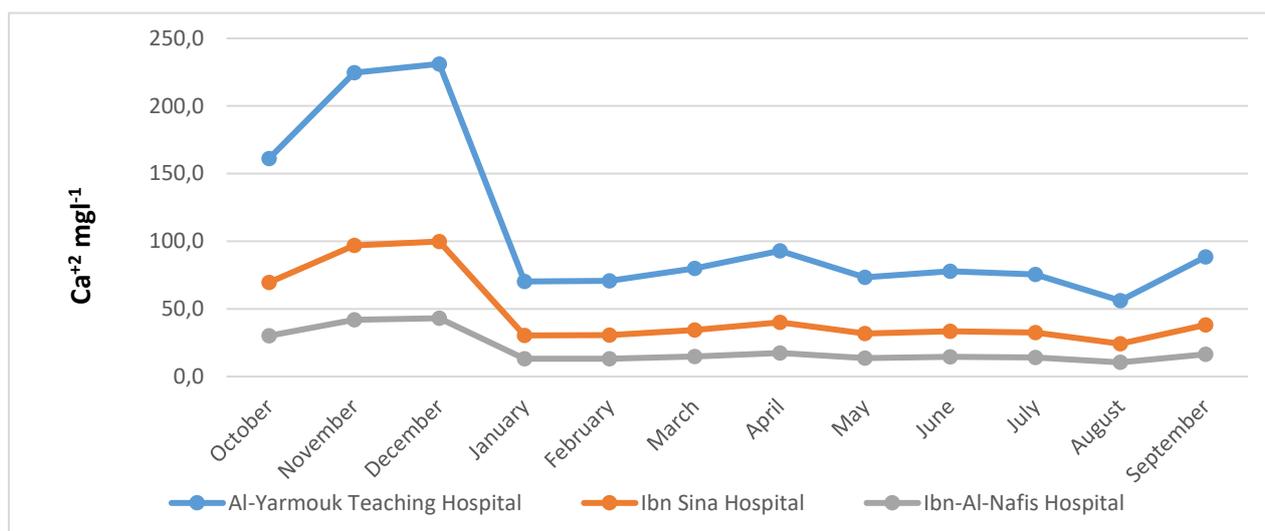


Figure 8. Ca²⁺(mg l⁻¹) values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	161.1	69.6	30.1	26.02 *
November	224.6	97	41.9	36.93 *
December	231.1	99.8	43.1	31.88 *
January	70.4	30.4	13.1	24.68 *
February	70.8	30.6	13.2	21.75 *
March	79.9	34.5	14.9	24.17 *
April	92.9	40.1	17.3	22.39 *
May	73.4	31.7	13.7	19.82 *
June	77.8	33.6	14.5	20.73 *
July	75.6	32.7	14.1	20.18 *
August	56.2	24.3	10.5	17.42 *
September	88.6	38.3	16.5	24.69 *
LSD value	42.38 *	29.74 *	25.77 *	---

* (P≤0.05).

Table 7. Ca²⁺(mg l⁻¹) values during the study period.

However, these recorded values are within the allowable limits according to Iraqi standards ¹⁰ and WHO standards for drinking water ¹², which was 200 mg l⁻¹. The increase in calcium and magnesium in the water may be due to the presence of carbonates, which increases the water's hardness. The results of the total hardness³ confirmed this.

Aerobic Plate Count (APC)

The obtained results showed that the highest value of APC was in November, at 38 cfu/ml *in* Ibn Sina Hospital, while the lowest value was in Ibn-Al-Nafis Hospital, at 1 cfu /ml in February (Figure 9, Table 8).

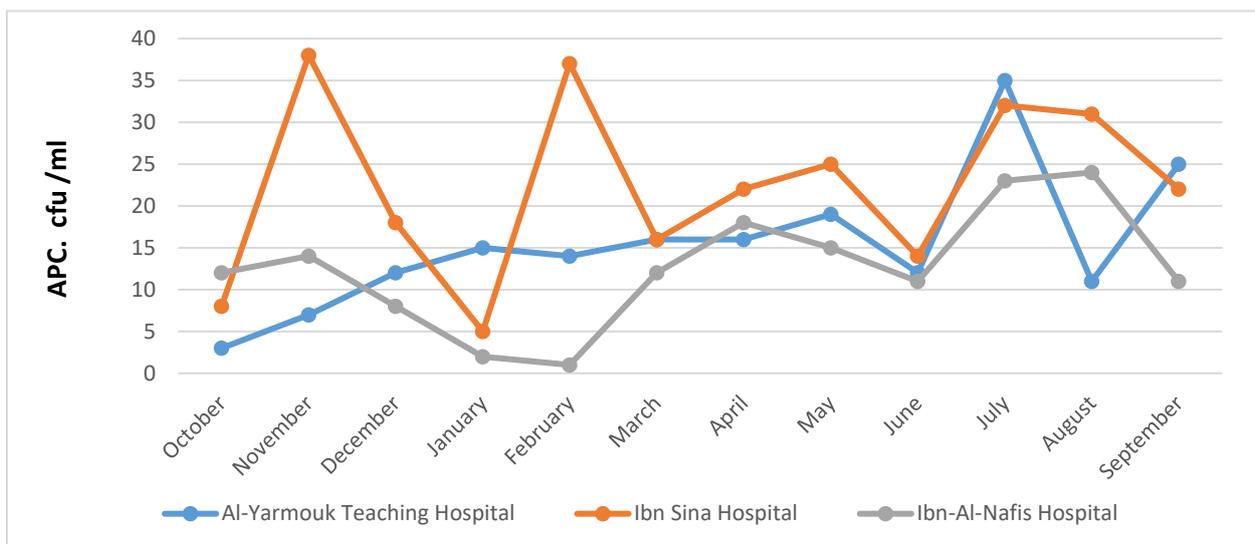


Figure 9. APC cfu /ml values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	3	8	12	3.81 *
November	7	38	14	5.94 *
December	12	18	8	4.66 *
January	15	5	2	4.78 *
February	14	37	1	5.21 *
March	16	16	12	3.91 *
April	16	22	18	4.05 *
May	19	25	15	5.26 *
June	12	14	11	3.25 NS
July	35	32	23	5.92 *
August	11	31	24	4.79 *
September	25	22	11	4.62 *
LSD value	5.63 *	6.79 *	5.84 *	---

* (P<0.05), NS: Non-Significant.

Table 8. APC CFU/ml values during the study period.

Total coliform (T.C.)

In this study, it has been found that T.C. in water samples having a maximum mean value of 20 cfu /100ml was observed in December at the Al-Yarmouk Teaching Hospital, while the minimum mean value of 0 cfu /100ml was recorded in May at Ibn-Al-Nafis Hospital Figure.10, Table 9.

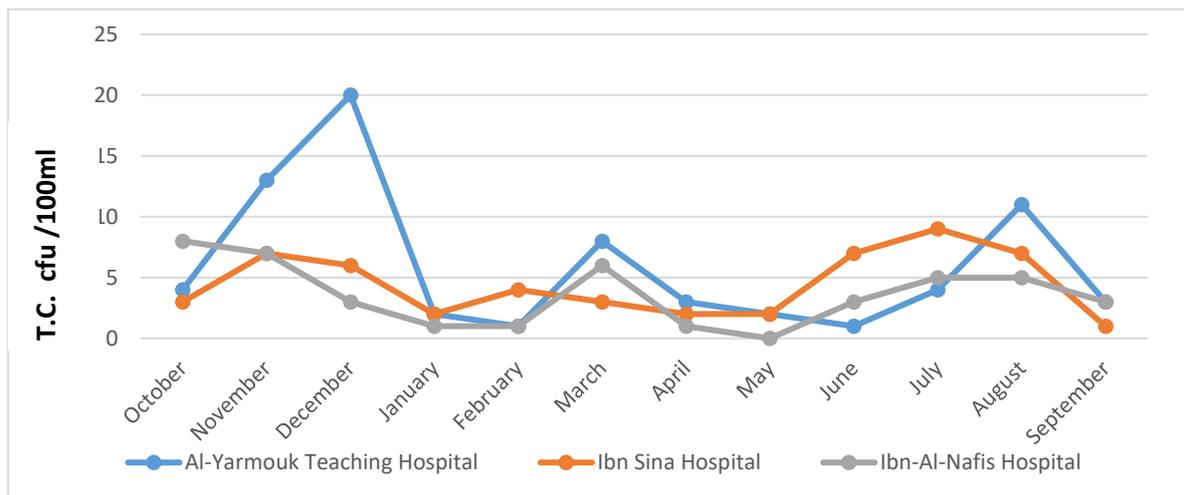


Figure 10. (T.C.) cfu /100ml values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	4	3	8	2.95 *
November	13	7	7	3.77 *
December	20	6	3	3.91 8
January	2	2	1	1.00 NS
February	1	4	1	2.25 *
March	8	3	6	2.84 *
April	3	2	1	2.00 NS
May	2	2	0	2.00 NS
June	1	7	3	3.09 *
July	4	9	5	3.27 *
August	11	7	5	2.89 *
September	3	1	3	2.00 NS
LSD value	5.26 *	3.48 *	3.63 *	---

* ($P \leq 0.05$), NS: Non-Significant.

Table 9. (T.C.) cfu /100ml values during the study period.

Fecal Coliform (F.C.)

Current results revealed that the highest value of F.C. was found in Al-Yarmouk Teaching Hospital, with 16 cfu /100ml recorded during December. The lowest F.C. values were detected in many months; they were 0 cfu /100ml in all hospitals (Figure 11, Table 10).

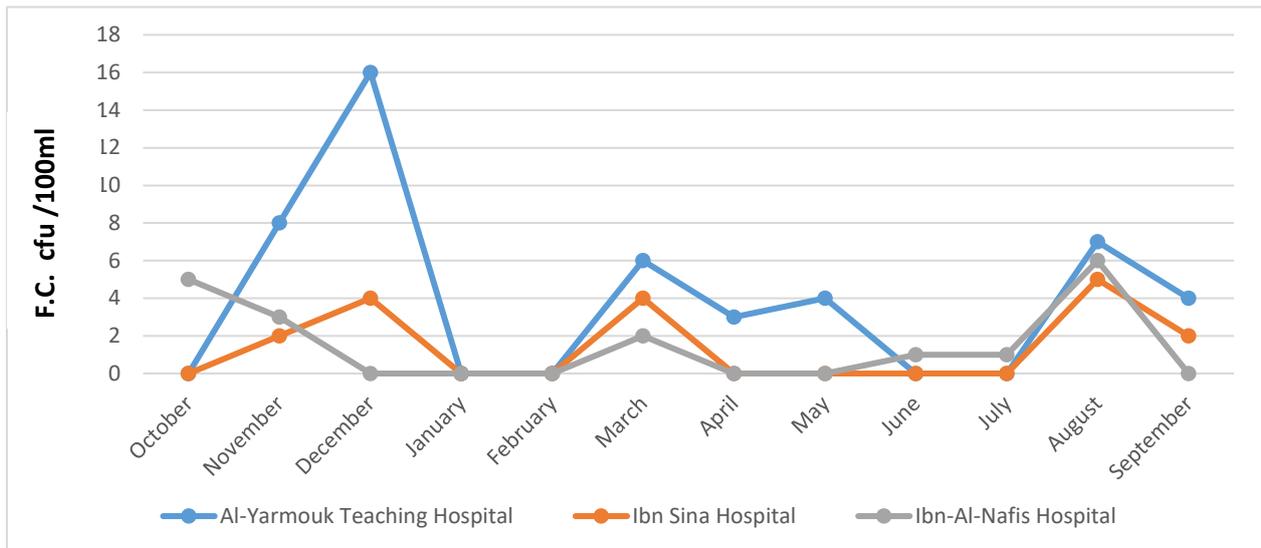


Figure 11. (F.C.) cfu /100ml values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	0	0	5	2.54 *
November	8	2	3	2.70 *
December	16	4	0	4.16 *
January	0	0	0	0.00 NS
February	0	0	0	0.00 NS
March	6	4	2	2.19 *
April	3	0	0	1.94 *
May	4	0	0	2.38 *
June	0	0	1	1.00 NS
July	0	0	1	1.00 NS
August	7	5	6	2.08 NS
September	4	2	0	2.33 *
LSD value	4.51 *	2.78 *	3.09 *	---

* ($P \leq 0.05$), NS: Non-Significant.

Table 10. (F.C.) cfu /100ml values during the study period.

Fecal Streptococcus (F.S.)

Current results revealed that the highest value of F.S. was found in Al-Yarmouk Teaching Hospital: 16 cfu /100ml, recorded during December. The lowest F.S. values detected in many months were 0 cfu /100ml in all hospitals (Figure 12, Table 11).

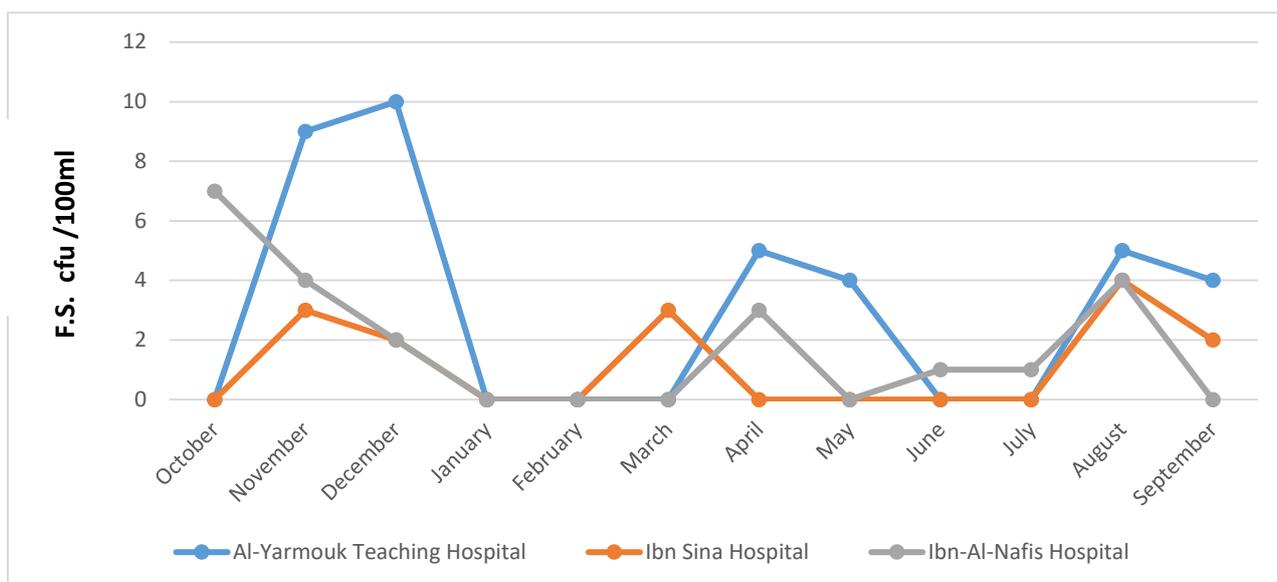


Figure 12. (F.S.) cfu /100ml values during the study period.

Month	Al-Yarmouk Teaching Hospital	Ibn Sina Hospital	Ibn-Al-Nafis Hospital	LSD value
October	0	0	7	2.69 *
November	9	3	4	3.06 *
December	10	2	2	2.71 *
January	0	0	0	0.00 NS
February	0	0	0	0.00 NS
March	0	3	0	1.98 *
April	5	0	3	2.17 *
May	4	0	0	2.04 *
June	0	0	1	1.00 NS
July	0	0	1	1.00 NS
August	5	4	4	1.33 NS
September	4	2	0	2.05 *
LSD value	4.15 *	2.96 *	2.88 *	---

* (P<0.05), NS: Non-Significant.

Table 11. (F.S.) cfu /100ml values during the study period.

DISCUSSION

In this study, neither the lowest nor the highest pH values obtained reached the allowable limits for Iraqi and WHO drinking water levels ^{8,12}, ranging from 6.5 to 8.5. Furthermore, for TDS, the cracks and breaks of drinking water pipelines may increase TDS content, mainly when there is no pressure in the pipelines and using a house water pump ². The present study registered the minimum and maximum TDS values, which were found to be within the permissible limits of Iraqi standards ⁹ and WHO for drinking water ¹², which were 1000 mg^l⁻¹.

The high turbidity of drinking water may be caused by the low quality of purification efficiency caused by the age of the necessary filters for the treatment process and operation method in addition to the breaks and cracks in the net pipes which lead to a mix of drinking water with the surrounding environment with the net pipes². The operation method, the fitness of maintenance processes, the age of the plant, and the amount of alum added have a significant influence on turbidity values in water⁵.

The turbidity values recorded in the present study were higher than the permissible level recommended by the Iraqi standard¹⁰ and WHO standard for drinking water¹² for all seasons, which was 0-5 NTU. While the T.H. values recorded in the present study were higher than the permissible level, especially in the autumn and winter months recommended by the Iraqi standard¹¹ and WHO standard for drinking water¹³ for all seasons, which was 500 mg/l⁻¹. The increase in hardness in the water is due to the presence of calcium and magnesium ions, and their purity is due to carbonates in the water³.

According to chloride source, the rainfall that leached with its substances and elements that form sources of Cl⁻ such as organics leaks to the breaks in the distribution pipelines, which may cause the mixing of drinking water in the pipe with the liquids in the land that network of pipes pass through it, carrying many materials and salts⁴. However, these recorded values are over the allowable limits according to Iraqi standards¹⁰ and WHO standards for drinking water¹², which was 350 mg/l⁻¹. Furthermore, regarding calcium, these recorded values are within the allowable limits according to Iraqi standards¹⁰ and WHO standards for drinking water¹², which was 200 mg/l⁻¹. The increase in calcium and magnesium in the water may be due to the presence of carbonates in the water, thus increasing its hardness, and the results of the total hardness³ confirmed this. For Aerobic Plate Count (APC), the study results indicate that several samples of drinking water have exceeded 10 cfu/ml, which is the allowable limit for the validity of drinking water according to the Iraqi Criteria and Standards of Water's microbial limits¹¹, which was 10 cfu/ml.

The Total coliform (T.C.) in drinking water samples is due to inadequate chlorination, insufficient contact time, and poor maintenance of service reservoirs, and maybe because of the re-growing of bacteria in the distribution system¹³. The results of this study show that several drinking water samples exceeded the allowable limit for the validity of drinking water according to the Iraqi Criteria and Standards of water's microbial limits¹¹, which is zero cfu/100ml. The occurrence of Fecal Coliform (F.C.) in the drinking water sample is proof of fecal contamination and an indicator that water becomes polluted inside the distribution system, and this may refer to a lack of cleaner in the storage tank or to defect in the pipelines which could be old or might be misused by consumers or the water has been contaminated through distribution¹⁴.

The results of this study show that several drinking water samples have exceeded the allowable limit for the validity of drinking water according to the Iraqi Criteria and Standards of water's microbial limits¹¹, which is zero cfu/100ml. This study coincided with previous studies of⁵ which reported that the presence of bacteria in drinking water may be due to the lack of chlorine effects due to low levels of chlorine pumped into the network also to the breaks and cracks in the net pipes which may lead to a mix of drinking water with polluted water resulted from the cracks in the sewage net pipes or groundwater^{15,16}.

The current study results show that several drinking water samples have exceeded the permissible limit of Fecal Streptococcus (F.S.) for the validity of drinking water according to the Iraqi Criteria and Standards of water's microbial limits¹¹, which is zero cfu/100ml.

CONCLUSIONS

The results of the study showed that pH, Total Dissolved Solids (TDS), and Calcium ion (Ca²⁺) recorded values are within the allowable limits according to Iraqi standards (2009) and WHO standards (2011) for drinking water. While Turbidity, Total Hardness (T.H.), Chlorides (Cl⁻), Magnesium (Mg²⁺), Aerobic Plate Count (APC), Total coliform (T.C), Fecal Coliform (F.C.) and Fecal Streptococcus (F.S.). The values recorded in the current study were higher than the permissible level recommended in the Iraqi Standard (2009) and the World Health Organization (2011) standard for drinking water for all months and some months.

Author Contributions: The physical and chemical factors were measured in the Ministry of Science and Technology, and the bacterial factors were measured in the College of Science / University of Baghdad by the second and third researchers. In contrast, the first researcher wrote the research.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: This study was supported by the University of Baghdad/College of Science, Ministry of Science and Technology.

Acknowledgments: I sincerely thank the conference supervisor, Dr. Aqeel and Dr. Harith, for their patience and endurance among the researchers.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Al-Hashimi, H.H.H. Quality Study for Drinking Water in Some Regions of Baghdad Area Ph.D. Thesis. College of Science, University of Baghdad, Iraq. 2012.
2. Al-Fatlawy, Y.F.K. Study of drinking water quality for some water project in Baghdad .Ph.D. Thesis College of the Science University of Baghdad, Iraq. (In Arabic). 2007.
3. Al-Nuaimi Amer Fadel Daoud, Mahdi Hatem Diwan, and Wasfi Muhammad Kazem. Study of some physical and chemical properties of drinking water in Baladrooz district. Diyala For pure science, 2010. Vol: 6 No: 4, ISSN: 1992-0784.
4. Al Shalchi, T.K. Evaluation of Environmental Impact of Tigris River Pollution (Between Jadirriya and Dora Bridges). MSc. Thesis College of Engineering, University of Baghdad, Iraq. 2006.
5. Al-Tmemy, W.B.M. Investigation of Drinking Water Quality in Al-Haay and Al-Bashaar Water Treatment Plants in Wasit Province Southern Iraq. MSc. Thesis. University of Baghdad, Iraq. 2014.
6. Al-Zubaidi, A.N.H. A study of Al-Kut and Al-Karama Water Treatment Plants Efficiency to Purify the Drinking Water in Al-Kut City. MSc. Thesis. University of Baghdad, Iraq. 2011.
7. Al-Rawi, K.F., Ali, H.H., Guma, M.A., Alaaraji, S.F.T., Awad, M.M. The Relationships of Interleukin-33, Ve-Cadherin and Other Physiological Parameters in Male Patients with Rheumatoid Arthritis (2022) *Pertanika Journal of Science and Technology*, 30 (1), pp. 123-140.
8. Omar Khaled Attallah, Thafer Thabit Mohammed and Nasr Nuri Al-Anbari. Effect of Adding Grape Pomace and Resveratrol on Some Physiological Traits and Gene Expression to Prevent Hemorrhagic Fatty Liver Syndrome in Laying Hens . *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2022, 1060 (1), 012076. doi:10.1088/1755-1315/1060/1/0120
9. AL-Qudsi, A., S. Alamili, H. Effect Of Using Sunflower And Canola Oils In Common Carp (Cyprinus Carpio L.) Diets On Growth Parameters, Feed Utilization And Body Composition. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 95-104. doi: 10.32649/ajas.2023.179719.
10. Iraqi Criteria and Standard of Waters Chemical Limits, ICS/13.060.20 number 417/2009, second update. 2009.
11. Iraqi Criteria and Standard of Waters Microbial Limits, ICS/7.100.20/2011 number 2270/14, first update. 2015.
12. WHO, World Health Organization . Guidelines for Drinking Water Quality" 4th ED Geneva 27, Switzerland. 2012.

13. Zain, H.. The Effect Of Using Different Vitamin E Levels On The Antioxidant Status Of Broiler Chickens. JLSAR 2023, 4.
14. Salih, N.Y. Evaluation of Municipal Water Quality and Health Risks of Trihalogen Organic Compounds in Baghdad. Thesis.College of Science, University of Baghdad, Iraq. 2016.
15. Bibani, N. M. S., Khidhir, Z. K., Shaker, A. S., Kirkuki, S. M. S. & Abdulateef, S. M. Analyses of myco-toxins in broiler's local and imported feeds. Iraqi J. Vet.2019 Sci. 33.
16. World Health Organization. Hospitals in the 15 centers/south governorates of Iraq. Geneva, Switzerland. 2002.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Al Fatlawy, Y.; Kadhim, F.; Mahdii, B. Evaluation of the Drinking water in some Hospitals in Baghdad. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 52. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.52>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Evaluation of the quality of potable water in Al-Rusafa side, Baghdad, Iraq

Ahmed Aldhamin¹*

¹ College of Science, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

Correspondence: eahmed.aldhamin@sc.uobaghdad.edu.iq.

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.53>

ABSTRACT

Safe drinking water is essential for the present and future generations' health. This study aims to assess drinking water quality in Baghdad's Al-Rusafa neighborhood. Water samples were taken from 32 neighborhoods on this side. The quality of the examined potable water samples differed depending on the water source. This investigation's pH, chlorine, EC, TDS, TSS, Cd, and Pb levels were below acceptable ranges. TDS levels in Al-Mada'in are more significant than acceptable (>600ppm) water levels. Bacteria have polluted six communities (*Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella*). Bacterial quality of drinking water and gram-negative bacteria resistant to chlorine in Baghdad's municipal water supply. Regarding pH, the water quality, EC, TDS, TSS, Pb, and Cd of Al-Rusafa neighborhoods were within the recommended limits of WHO and the Iraqi drinking water standards.

Keywords: Safe drinking water; contaminated bacteria; Baghdad city; healthcare; pH; Temperature.

INTRODUCTION

Water is necessary for all forms of life to survive. Globally, there are growing water shortages, and the strain on current water resources is increasing due to rising demands in various sectors, including drinking, bathing, showering, agriculture, industrial operations, etc. In general, water quality is just as essential as water supply. As a result, water quality is a critical criterion for assessing environmental changes linked to social and economic development¹. Consumption of low-quality drinking water poses several health hazards to the population, ultimately driving up healthcare costs².

Drinking water polluted with heavy metals, such as Cadmium and lead, is becoming a significant health problem for the general population and providers. On the other hand, the intake of polluted drinking water is the most common source of quantifiable human exposure to heavy metals. Cardiovascular problems, neurological damage, renal injuries, and the risk of cancer and diabetes are all possible side effects. Generating reactive oxygen species, which causes oxidative damage and harmful health consequences, is implicated in heavy metal-induced toxicity. As a result, using heavy metal-contaminated water causes significant rates of sickness and mortality worldwide³.

The incidence of bacteria in the end product is called the bacteriological quality of drinking water. Contaminated water and hygiene are associated with illnesses including cholera, diarrhea, dysentery, hepatitis A, typhoid, and polio transmission. Individuals are exposed to preventable health hazards due to insufficient or poorly managed water and sanitation facilities².

Because of its increased oxidizing potential, low cost, ease of operation, and efficacy in improving drinking water quality, chlorination is one of the most extensively used disinfection methods. The kind and concentration (or intensity) of the disinfectant, the type and concentration of microorganisms, and the physico-chemical qualities of the source water all play a part in the implementation. The disinfection procedure should strike a balance between killing or inactivating a wide range of pathogens, the ability to retain a residual, and

the development of toxic disinfection by-products ⁴.

Based on these findings, the current study attempted to assess the drinking water quality in Al-Rusfa by 1) evaluating physical and chemical parameters such as pH, TDS, TSS, EC, and chlorination, and 2) Cadmium lead concentrations. 3) Contaminants caused by microorganisms.

MATERIALS AND METHODS

Region of the study

Baghdad is the capital of Iraq, divided into two sides: Al-Rusafa and Al-Karkh, located in the eastern and western Tigris Rivers, respectively. This work was performed in the Al-Rusafa side, with 32 prominent residential neighborhoods. As shown in Figure 1

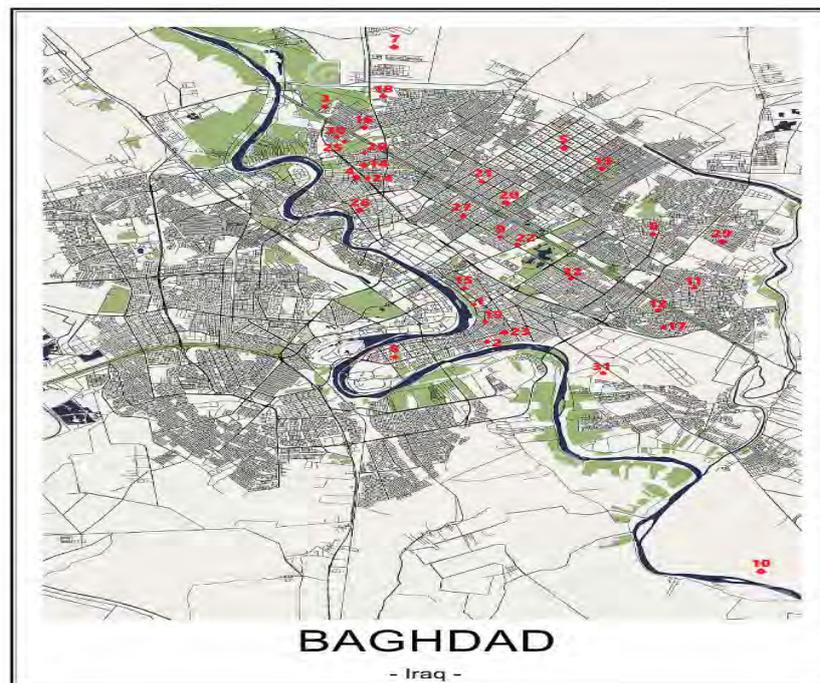


Figure 1. A map of Baghdad city showing the study areas on the Al-Rusafa side.

Water sampling

The samples of drinking water were collected from 32 neighbourhoods (Abu Nawas 1, Al-Arassat 2, Al-Basatine 3, Al-Camp 4, Al-Chwader 5, Al-Fadiliyah 6, Al-Husseiniya 7, Al-Jadiriya 8, Al-Jwadane 9, Al-Mada'in 10, Al-Mu'almeen 11, Al-Naeria 12, Al-Obaidi 13, Al-Qahira 14, Al-Sadoon 15, Al-Shaab 16, Baghdad Aljadeeda 17, Bob Al-Sham 18, Inner Karrada 19, Jameela 20, MadinatAssadar 21, Martyrs' Gate 22, Outer Karrada 23, RaghbaKhatun 24, SabeAbkar 25, Shari Almaghrib 26, Shari Falastine 27, Slakhe 28, Swedan 29, Tunis 30, Zafaraniya 31, and Zayouna 32) in Al-Rusafa side /Baghdad province from August 2021 to December 2021 for all bacteriological, physical, chemical examinations. The samples were collected from the distribution system tap. Instead of a tap serviced by a reservoir or storage tank, a tap that provides water from a service pipe directly linked to the main pipe was chosen. All attachments were removed, and the cold-water tap was opened entirely for 2-3 minutes to clean the support line or long enough to flow out the effluent. Water was collected in sterile bottles (for bacteriological testing, 250 mL glass jars with metallic screw closures and rubbers were used, pre-sterilized in an oven at 160°C for 2 hours), sealed firmly, and delivered to the laboratories within 2-3 hours.

pH and Temperature

These parameters were measured using a Waterproof Portable pH/Temperature Meter (Hanna instrument, Romania).

Electrical conductivity and total suspended solids

These parameters were measured using Portable EC/TDS/Salinity meters (Hanna, Romania).

Total Dissolved Solids

The filtration technique used a membrane filter (LABSCO, Germany). The filtrate was dried completely in an oven at 103 - 105°C. The TDS was calculated using the following equation:

$$\text{TDS mg/l} = [(A - B) / \text{filtrated sample volume in L}] \times 1000 \dots\dots\dots (1)$$

Where:

A (mg) = weight of dried residue + flask.

B (mg) = weight of flask.

The results were expressed as mg/l.⁵

Free residual chlorine

It was measured in the field at the exact sample locations from tap water using a field DR-700 colorimeter (Hach) and a manual comparative chromatography using the diethyl phenyl diamine (DPD) titrimetric technique 4500-CI-F.⁵ After adding a phosphate buffer, this approach requires adding a DPD indicator solution. When the Cl₂ oxidizes the DPD, it turns red. The results were given in parts per million (ppm).

Cadmium and Lead

Water samples were filtered to remove particulate matter. Cadmium (Cd) and lead (Pb) were estimated by the atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer model 5000).⁶

Detection of bacteria

Water samples were cultured on Blood agar (HiMedia, India) and incubated at 37°C for 24 hrs. After that, the resultant colonies were re-cultured on MacConkey agar (Oxoid, UK) and incubated at 37°C for 24 hrs. VITEC 2 Compact (bioMérieux, France) was employed to identify bacterial isolates. The bacterial count was done using a viable count technique using phosphate-buffered saline as a diluent.⁷

Statistical analysis

Data were presented in this work as the mean of at least three replicates ± standard deviation. ANOVA one way and the least significant difference with an alpha = 0.05 were used to calculate significance using the SPSS application. A P-value < 0.05 was considered statistically significant.⁸

RESULTS

As shown in Figure 2, the pH (P < 0.05) varied among study areas, ranging from 7.0 – 7.9 ± 0.16. However, the lowest pH value (7.0) was detected in Inner Karrada, whereas the highest (7.9) was recorded in Al-Huseiniya, Al-Chwader, Slakhe, and Al-Camp.

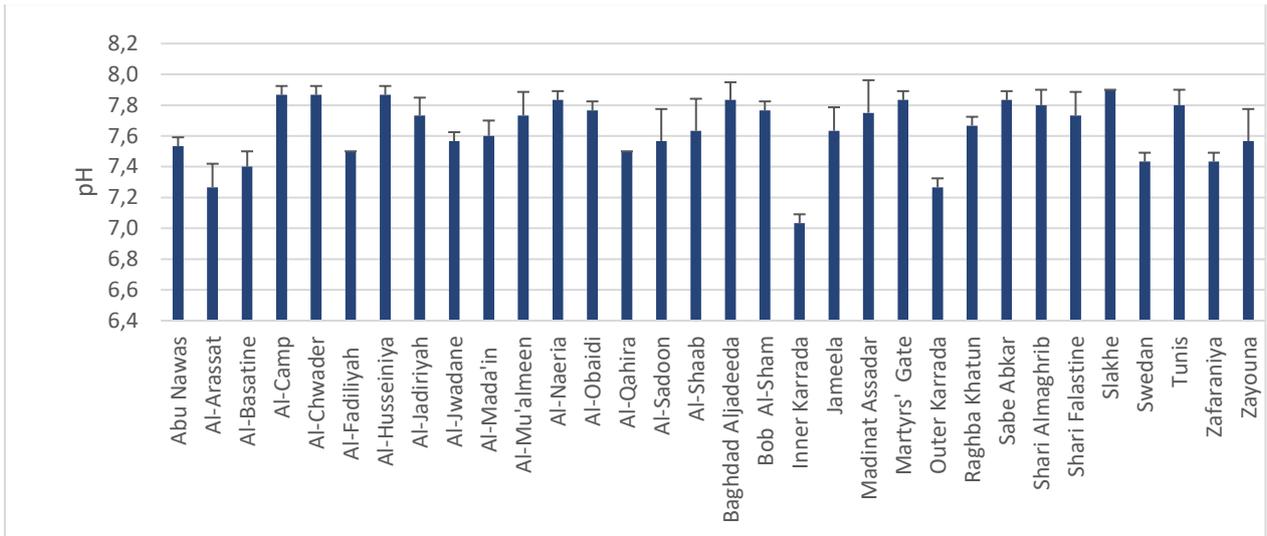


Figure 2. pH values in the tap water of Al-Rusafa side cities. $P= 2.68 \times 10^{-22}$, $LSD= 0.16$.

Regarding residual chlorine (Cl), it demonstrated a significant ($P < 0.05$) variation among study areas as it ranged from $0.0 - 3.0 \pm 0.36$ ppm across all neighborhoods (Figure 3). Nevertheless, the lowest Cl value (0.0) was detected in Al-Jadiriya, Zayouna, and Al-Shaab, whereas the highest Cl value (3.0) was recorded in Al-Mada'in, Baghdad Aljadeeda and RaghbaKhatun.

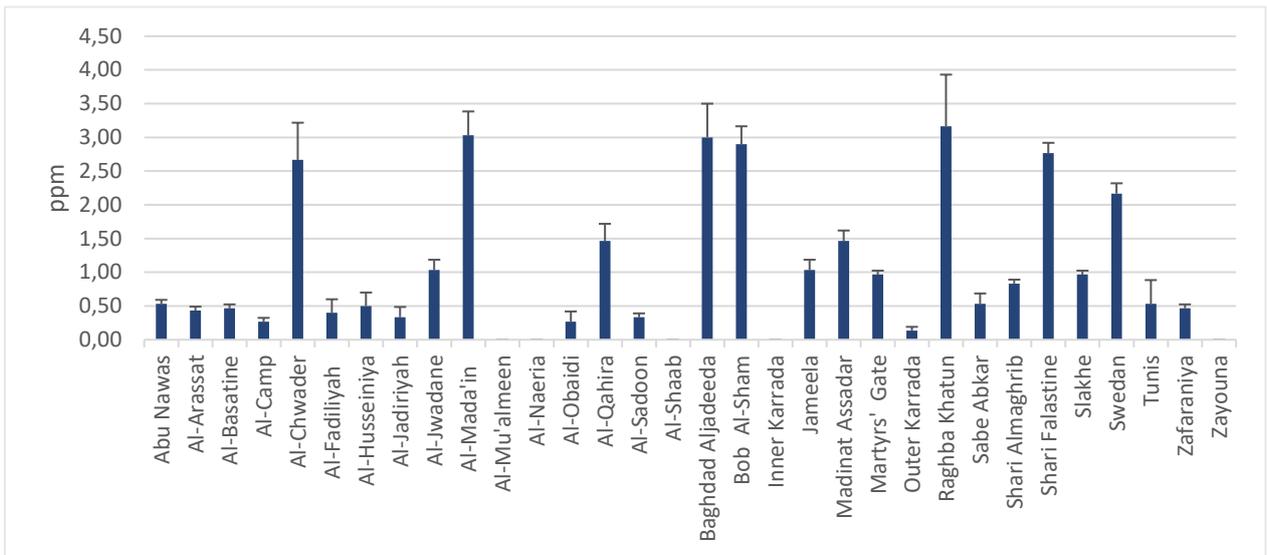


Figure 3. Residual chlorine concentration in the tap water of Al-Rusafa side cities. $P= 3.46 \times 10^{-48}$, $LSD= 0.36$.

The present work found that the Electrical Conductivity (EC) ranged between $760 - 1360 \pm 52.43$ $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Figure 4). However, the highest level ($1360 \mu\text{S}/\text{cm}$) was recorded in Al Mada'in, whereas the lowest level ($760 \mu\text{S}/\text{cm}$) was recorded in Al-Arassat and Outer Karrada.

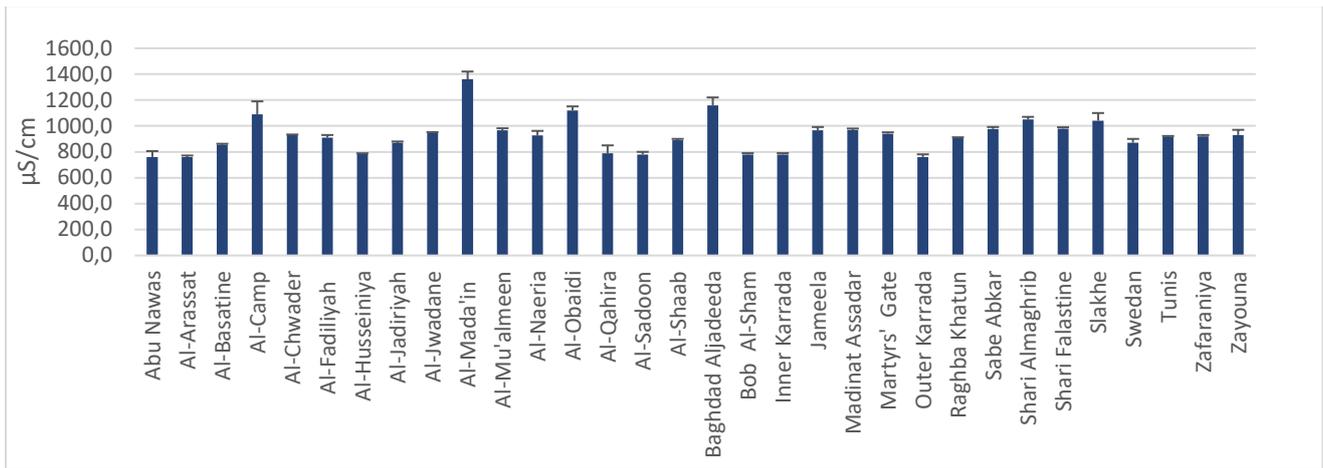


Figure 4. Electrical conductivity values in the tap water of Al-Rusafa side cities. $P= 9.35 \times 10^{-43}$, $LSD= 52.43$.

The TSS values of all the drinking water samples studied are shown in Figure 5. The highest values of 12, 9, 10, and 12 mg/l were found in water samples from Al-Mada'in, Al-Arassat, and Al-Naeria, respectively. Nonetheless, the lowest values (0 mg/l) in many neighborhoods. However, it is still well below the maximum standard limit.

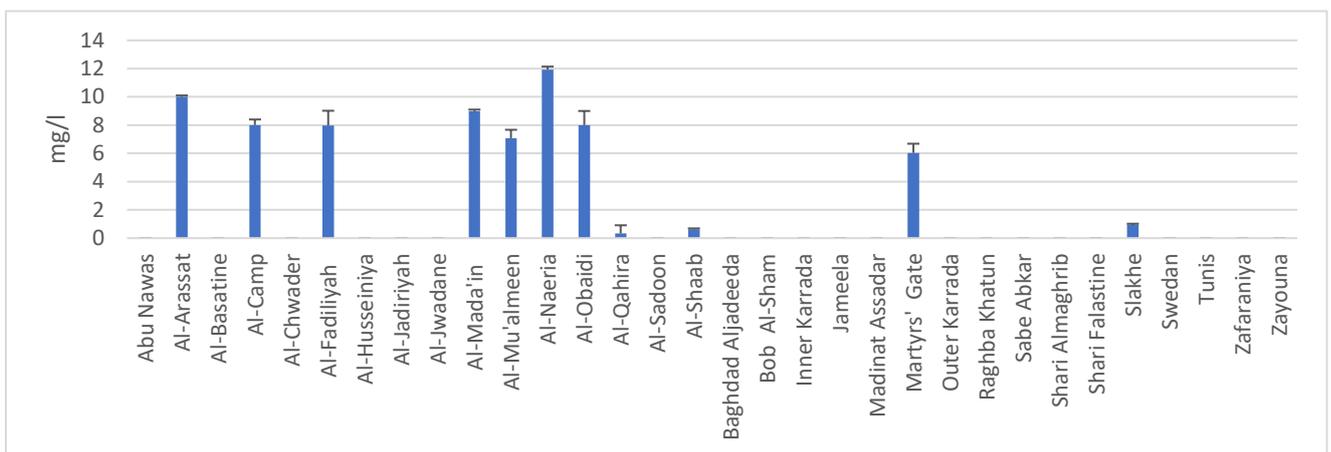


Figure 5. Total suspended solids concentrations in Al-Rusafa side cities tap water. $P= 1.43 \times 10^{-80}$, $LSD= 4.72$

TDS's highest level (680 mg/l) was recorded in Al-Mada'in, whereas the lowest concentration (380 mg/l) was detected in Abu Nawas (Figure 6).

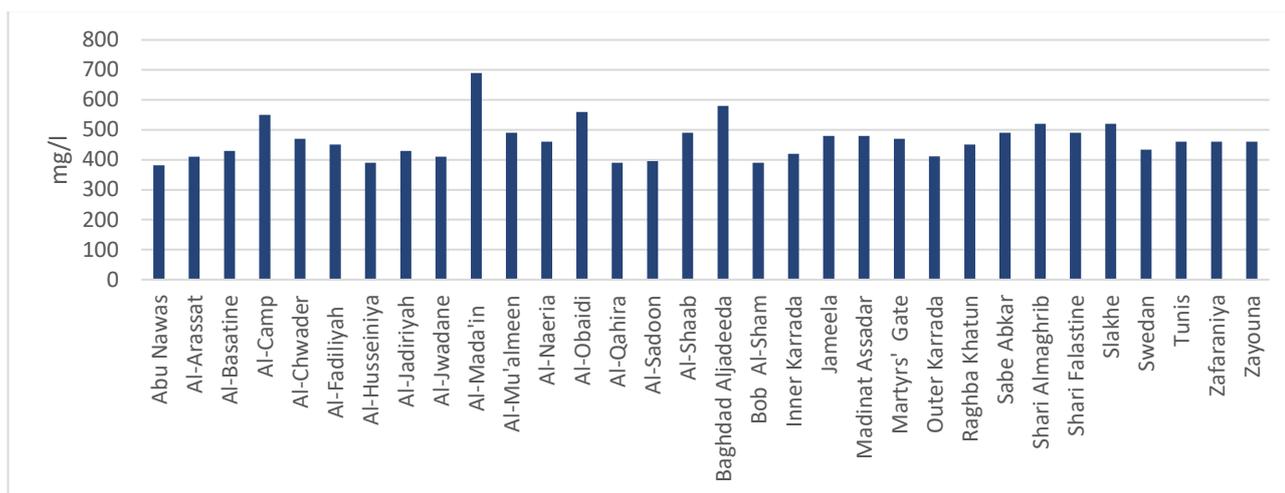


Figure 6. Total dissolved solids concentrations in Al-Rusafa side cities tap water. $P= 1 \times 10^{-14}$, $LSD= 66.14$.

As shown in Figure 7, The highest concentration of Cd (0.03 ppm) was found in Zayouna, while the lowest one (0.003 ppm) was encountered in many neighborhoods. On the other hand, Pb's highest concentration (0.065, 0.067, 0.067, and 0.068 ppm) was in Al-Chwader, Madinat Assadar, Al-Fadiliyah, and Al-Obaidi, respectively. The lowest concentration (0.02 ppm) was detected in Slakhe (Figure 8). According to Iraqi specifications, these concentrations were accepted, and Cadmium is a naturally occurring metal in the planet's crust.

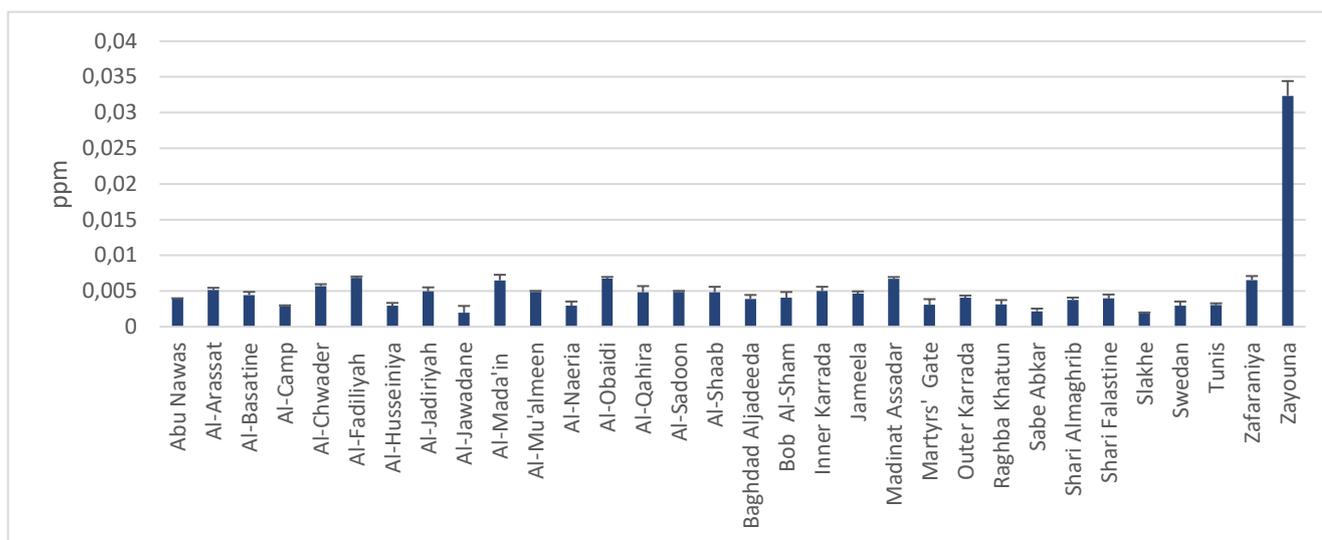


Figure 7. Cadmium concentrations in tap water of Al-Rusafa side cities. $P 5.74 \times 10^{-66}$, $LSD= 0.000948$.

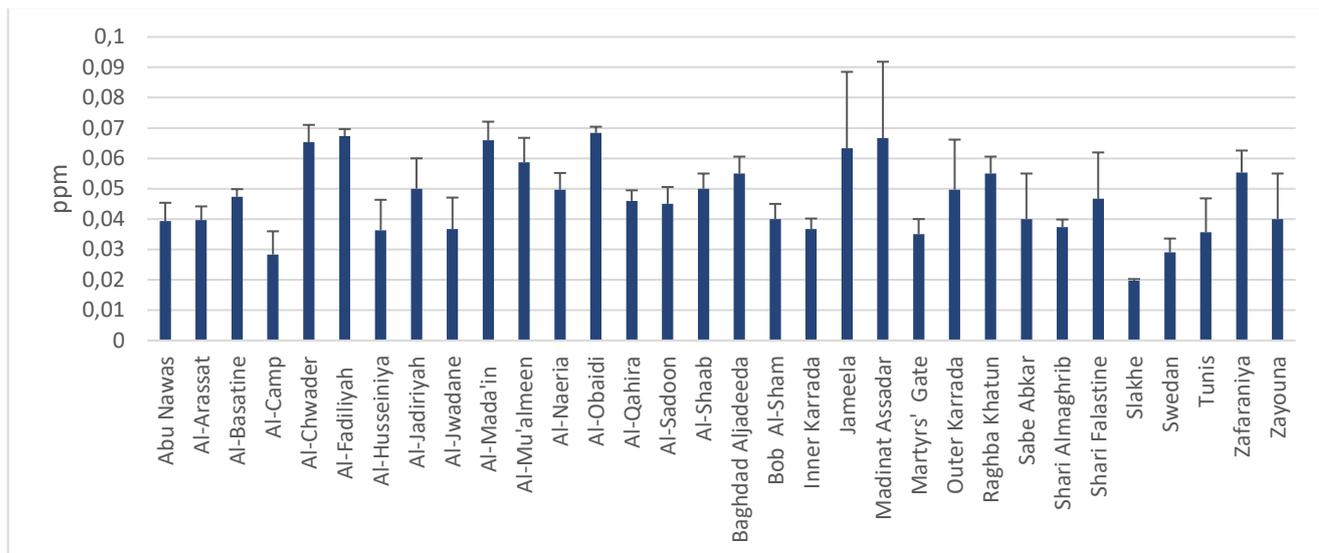


Figure 8. Lead concentrations in the tap water of Al-Rusafa side cities. $P 8.67 \times 10^{-11}$, $LSD = 0.015$.

According to the microscopic examination and biochemical test, the results showed that the potable water of six neighborhoods on the Al-Rusafa side was contaminated with bacteria (*Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*, and *Klebsiella*)

Due to old pipe projects, they may have been contaminated with sewage or inefficient precipitation and filtration processes. A low concentration of chlorine was added to the water plant. Zayouna and Al-Shaab's chlorine concentration was not detected; therefore, *Salmonella*'s growth and *Shigella* were encouraged. Similarly, the growth of *Klebsiella*, *E. coli*, and *Salmonella* was detected in Slakhe, Al-Obaidi, and Inner Karada, which had low concentrations of chlorine—furthermore, a concentration of 3.0 mg/l in Mad.

DISCUSSION

The quality of drinking water, its quantity, and consumption management signify population growth. Hence, drinking water quality is vital for human and animal life.

However, according to the Iraqi Criteria and Standards of Water's chemical limitations (6.5-8.5), ICS/13.060.20 number 417/2009, second version, the lowest and highest pH values reported in this study were beyond the allowed ranges of Iraqi freshwater quality criteria.

The most raw water pH of sources lies at 6.5 to 8.5⁹. In some areas, however, the water pH can be considerably lower due to organic acids from decaying vegetation or biological activity and dissolved carbon dioxide. Furthermore, additional alum doses precipitate calcium carbonate (CaCO_3) to control pipe corrosion. In addition to that, sandstorm effects increase the CaCO_3 concentration in Water¹⁰. Also, one of the essential factors influencing water pH was the rainfall during winter. Naturally, the rain is slightly acidic due to air-dissolved carbon dioxide¹¹. The results of the present study are supported by other local studies¹²⁻¹⁴.

The gradual decrease of residual chlorine concentrations from the addition point to the farthest sampling point may be due to the decomposition of chlorine when it reacts with water to hydrochloric acid. This acid is decomposed rapidly into hydrogen and hypochlorite ions²; due to the loss of water pressure in the pipeline, drinking water is mixed with polluted water from the environment, especially when networking pipes have fractures and cracks¹⁵. According to the Iraqi Criteria and Standards of Water's chemical limits, ICS/13.060.20 number 417/2009, second update, the min and max free residual chlorine values recorded in this study were within the specified range for Iraqi standards for drinking water in some neighborhoods but not in others.

The EC results may be explained by reverse osmosis treatment, removing dissolved particles, turbidity, colloidal debris, and other impurities, resulting in the lowest conductivity value. Similarly, increased mineral concentration in mineral water is predicted, resulting in higher conductivity¹⁶.

Interestingly, most areas developed no TSS. The results varied among neighborhoods due to their filtration systems, which removed suspended particles such as silt, clay, and other inorganic particles¹⁵. The maximum recommended Total Suspended Solids (TSS) limit set by the Iraqi Maximum desired value is 60 mg/l¹⁷.

According to¹⁸, filtration systems help reduce TDS. Nonetheless, the maximum levels recorded in this research were less than 1000 mg/l, below the acceptable parameters of Iraqi drinking water standards, as defined by the Iraqi Standards and Specifications of Water's chemical limitations, ICS/13.060.20 number 417/2009, 2nd update.

Acute exposure to much greater cadmium levels can cause diarrhea, vomiting, fever, lung damage, and muscular soreness, among other things¹⁹. Cadmium concentrations in unpolluted natural waterways are typically below 0.003 parts per million, while the highest allowable Pb value in drinking water was 0.01 per million. Pb in drinking water is usually found in service connections and building plumbing². Tetra alkyl lead in gasoline and lead arsenate as fungicides, plasters, paints, home dust, and wastewater may produce Pb pollution in metropolitan areas. The steel industry, batteries, and polymers all utilize Cd. Cadmium in the environment is also heavily influenced by wastewater and fertilizers. Cd is harmful even at low concentrations²⁰.

As a result, any changes in the number of microorganisms in the pipes can be attributed to flushing, chlorination, or attachment to or release from the biofilm, which may be ineffective since the biofilm protects the bacteria²¹.

E. coli was the most common, followed by *Citrobacter* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., and *Edwardsiella* spp. At 0.2 mg/l for a contact duration of 30 minutes, all eight genera of a Gram-negative²¹.

Total coliform was identified in those samples below the recommended amounts for free residual chlorine, according to²²⁻²³. The adhesion of microorganisms to surfaces dramatically increased disinfection resistance, according to²⁴. Other factors that boosted disinfection resistance were biofilm age, bacterial encapsulation, and prior growth circumstances, which raised chlorine resistance by 2- to 10-fold.

Because water treatment facilities cannot eradicate all Coliforms, the effectiveness of drinking water treatment against gram-negative bacterial isolates should be checked regularly²⁵. Chlorine-resistant microbiological species should be retrieved from chlorinated water distribution systems if they exist²⁶. As a result, this research was conducted to evaluate drinking water's physicochemical and microbiological quality and investigate chlorine-resistant gram-negative bacteria in Baghdad's municipal drinking water supply.

CONCLUSIONS

The study concluded that the physicochemical and microbiological quality of drinking water in Baghdad is not up to the acceptable standards of Iraqi drinking water. The pH of the water was found to be outside the acceptable range, and the levels of chlorine, TDS, and Cadmium were also higher than the recommended values. The microbiological analysis revealed the presence of coliform bacteria, which can indicate contamination with fecal matter. The researchers also found that the water contained chlorine-resistant gram-negative bacteria. These bacteria can survive the chlorination process used to disinfect drinking water and pose a health risk to the population.

The water quality in Al-Rusaf neighborhoods' pH, EC, TDS, TSS, Pb, and Cd was within the recommended limits of WHO and the Iraqi drinking water standards. However, *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, and *Shigella* were detected in six neighborhoods.

Funding: This research received no external funding

Acknowledgments: I want to express my special gratitude to my best friend (Harith Al-Mathkhury).

Conflicts of Interest: The author declares no conflict of interest.

REFERENCES

1. Van Vliet M.T.H.; Jones E.R.; Flörke M., Franssen W. H P.; Hanasaki N.; Wada Y. and Yearsley J. R. Global water scarcity, including surface water quality and expansions of clean water technologies. *Env Res Let* **2021**,16. DOI: 10.1088/1748-9326/abbfc3
2. WHO. Drinking water Fact sheet, **2019**.
3. Rehman K.; Fatima F.; Waheed I., Akash M. S. H.. Prevalence of exposure of heavy metals and their Impact on health consequences. *J Cell Biochem* **2018**,119,157-184. DOI: 10.1002/jcb.26234
4. Jalali Milani S.; Nabi Bidhendi G. A Review on the Potential of Common Disinfection Processes for Removing Virus from Wastewater. *Int J Environ Res* **2022**,16,9.
5. American Public Health Association (APHA) t. AWWAA, and the Water Environment Federation (WEF) 2540 SOLIDS. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 23 ed: American Public Health Association, **2017**.
6. Fu, F., Wang, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *J. Environ. Manag.* **2011**. 92, 407–418.
7. Noaman A I, Khalaf R M, Emad GH, Al-Abbasy, Mohammed Th. T. Effect of flaxseed oil dosing on fertility, growth characteristics and some physical, biochemical, and hormonal blood parameters during the early pregnancy of Awassi ewes. *Revis Bionatura.* 2022;7(4) 5. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.5>
8. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.6th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. NC. USA.**2018**.
9. Alaaraji, S.F.T., Mohisen, M.A., Awad, M.M. Assessment serum levels of neopterin, IL-6, IL-1 β , hs-CRP, TNF- α and MMP 9 in iraqi rheumatoid arthritis patients (2020) *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11 (12), pp. 88-93.
10. Abdalsamed I.; Amar I.; Sharif A.et al.,. Scale Corrosion of Metallic Materials in Water Systems- A Review. *J Chem Rev* **2022**,4,67-80. DOI: 10.22034/JCR.2022.326770.1141
11. Al-Atijawi, S. H. .; Almusawy, R. S. . The Effect Of Adding Different Rates Of Mushroom Powder To The Wheat Flour On The Nutritional Value Of Proteins, Sensory And Physical Properties Of Local Bread. *JLSAR* 2021, 2, 46–53.
12. Awadh S.M. The Atmospheric Pollution of Baghdad City, Iraq. 3rd scientific conference of College of Science, University of Baghdad **2009**;1727-1740.
13. AL-Amier F.H.G. Study the Impact of the wastewater discharged from Al-Karama and Sharq- Dijla water treatment plants on the water quality of Tigris River. College of Science. Baghdad, Iraq: University of Baghdad, **2014**.
14. Abdul-Kareem A.; Khalil M.; AL-Hadidi K. Chemical composition and salt load in rainwater of Mosul city-Nineveh governorate. *Mesopotamia J Agr* **2018**,46,279-285.
15. Salah N. Evaluation of Municipal Water Quality and Health Risks of Trihalogen Organic Compounds in Baghdad College of Science. Baghdad, Iraq: University of Baghdad, **2016**.
16. Rahmanian N.; Ali S.H.B.; Homayoonfard M., et al. Analysis of Physiochemical Parameters to Evaluate the Drinking Water Quality in the State of Perak, Malaysia. *J Chem* **2015**,2015,1-10. DOI: 10.1155/2015/716125

17. Ibraheem M W, AL Mjbel A A, Abdulwahid A S, Mohammed Th. T. Characterization of the influence of diet on Japanese quail. *Revis Bionatura*. 2022;7(4) 21. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.21>.
18. Ali, A. F. .; Mohammed, T. T. .; Al-Bandar, L. K. . The Role Of Optifeed®, Vêo® Premium, And Oleobiotec® In Diets For Improvement Of The Production Performance Of Male Broilers In Heat Stress. *JLSAR* 2022, 3, 32-36
19. Nordberg G.F. Cadmium and health in the 21st century--historical remarks and trends for the future. *Biomaterials* **2004**,17,485-489.
20. A. Mahdii, B., K. Imran, F., J. Sultan, L. The Efficiency Of Microbiology In The Process Of Pesticide Biodegradation. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 105-113. doi: 10.32649/ajas.2023.179720
21. Van Bel N.; Hornstra L.M.; van der Veen A., et al. Efficacy of Flushing and Chlorination in Removing Microorganisms from a Pilot Drinking Water Distribution System. *Water* **2019**,11.
22. Mahmood, N. A. & Abdulateef, S. M. Determining Some Undesirable Behavioral Traits and Their Impact on the Behavioral Performance of Broiler Chicks. in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* .2021,vol. 904
23. Torrance, L., Cowan, G. H., McLean, K., MacFarlane, S., Al-Abedy, A. N., Armstrong, M., ... & Bryan, G. J. (2020). Natural resistance to Potato virus Y in *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Theoretical and Applied Genetics*, 133, 967-980.
24. Gopali J. Study of microbial quality of chlorinated drinking water of Kathmandu. Department of Microbiology. Nayabazar, Kathmandu: National College, **2008**.
25. Bibani, N. M. S., Khidhir, Z. K., Shaker, A. S., Kirkuki, S. M. S. & Abdulateef, S. M. Analyses of mycotoxins in broiler's local and imported feeds. *Iraqi J. Vet.2019 Sci.* 33
26. Ridgway H.F.; Olson B.H. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **1982**,44,972-987. DOI: 10.1128/AEM.44.4.972-987.1982

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Aldhamin, Ahmed, Evaluation of the quality of potable water in Al-Rusafa side, Baghdad, Iraq. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 53. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.53>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Evaluation of the growth efficiency of some citrus rootstocks for spraying melatonin growth regulator under salt stress conditions

Muntadher Al-Mousawi^{1*}, Harith Al-Tamimi¹

¹ College of Agriculture/ Department of Horticulture and Landscape/ University of Kerbala, Karbala/ Iraq; muntadher.m@uokerbala.edu.iq.

² College of Agriculture/ Department of Horticulture and Landscape/ University of Kerbala/ Karbala/ Iraq; harith.mhmod@uokerbala.edu.iq

* Correspondence: muntadher.m@uokerbala.edu.iq; Tel.: 009647714910387

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.54>

ABSTRACT

This research was conducted to determine the impact of spraying the increased regulator melatonin on the tolerance of some citrus roots to salt stress. The results showed that the Sour Orange root was significantly superior to the rest of the citrus rootstocks and recorded the highest increase in the rate (Height, diameter, quantity, and area of leaves for the plant), while the root Volkamer lemon was significantly the best by recording the highest rate of arid mass of the root system and plant life. Furthermore, irrigation with electrical connection water (1.7 sec.m^{-1}) led to obtaining the highest values for vegetative plant girth growth characteristics (plant girth, stem diameter, number of leaves, leaf area, dry weight of the vegetative and root system and root length). Moreover, treatment with the growth regulator melatonin at a concentration of (100 mg.L^{-1}) showed the most significant percentage in the trait (plant height, diameter of the stem, number of leaves, size of the leaves, and dry weight of the vegetative both root system and root length). As well as the binary and triple interactions between these study factors led to a clear significant superiority in the studied traits compared to the comparison treatment, as the triple interaction treatment (Sour Orange root + melatonin at 100 mg. l^{-1} as the concentration+ salinity of irrigation water at a concentration of $1.7 \text{ decimens.m}^{-1}$) was the most significant treatment by giving the highest increase in the rate of vegetative characteristics. Finally, the treatment (rootstocks Volkamer lemon + melatonin at 100 mg.l^{-1} as the concentration + salinity of irrigation water at a concentration of 1.7 dm. m^{-1}) recorded the highest rate of length and weight of the root when it is a dry system.

Keywords: melatonin; rootstocks; salinity

INTRODUCTION

The problematic issue related to salinity, whether soil or irrigation water, is one of the most critical obstacles to the development of agricultural production in general and citrus production in particular. This is mainly in the dry and semi-arid regions of the world, as rainfall decreases and temperatures rise, and agriculture depends mainly on irrigation¹. It leads with time to the accumulation of salts in the soil, thus becoming saline and decreasing its suitability for agriculture, knowing that 20-30% of the world's land is affected by salinity². As for Iraq, the estimation was³, indicating that 70-80% of the center's and the south's lands are within the me-

dium to highly saline soils. It is well-known that the salinity reduces the growth and production of plants. This is due to the damage caused to the integrity of the cell membranes due to the osmotic effect, disruption of the hormonal and enzymatic balance, and the toxic effect of ions⁴. Citrus fruits are classified as sensitive plants to high salinity, and the degree of their impact varies according to the roots grafted on them⁵.

Additionally, it was mentioned⁶ that the rootstocks of citrus fruits differ significantly in their tolerance to salinity and the absorption and transfer of harmful ions from the roots to the vegetative system by excluding or restricting them in the lower parts of the plant. Therefore, searching for solid assets that are resistant to various soils and tolerant of salinity is one of the very important objects in Iraq. This is especially true with the scarcity of water suitable for irrigation and the dependence of farmers on water from wells and sewers to irrigate their orchards.

Sour orange of the Sour Orange L. is a standard rootstock used in Iraq. This is because it was characterized as a semi-shortened root compatible with most commercial cultivars of citrus, tolerant of limestone soils, medium resistance to cold, and resistance to root rot and gum disease. However, it can be infected by Tristeza disease and nematodes⁷. The rootstock Volkamer lemon (*Citrus reticulate X Citrus medica*) is characterized by its rapid growth and stimulating effect on the growth of grafts and adaptation to a wide range of soils, mainly sandy soils, resistant to Tristeza, exocortis and xyloporosis. However, it is sensitive to nematodes. On the other hand, the rootstock Swingle Citrumelo (*Citrus paradise X Poncirustrifoliata*) has been used recently in Iraq, which is characterized by its drought tolerance, medium tolerance to salinity and its resistance to severe cold of a large extent due to the large variety of rootstock⁸. It is also considered a root resistant to Tristeza, exocortis, xyloporosis, root rot and nematode infection⁹.

In recent years, plant hormones have attracted the attention of many researchers in the field of environmental stresses as one of the most critical actors in stimulating the response of plants to carry out biological processes. Many studies have shown that adding plant hormones in low concentrations to plants exposed to salt stress has an influential role in overcoming the harmful effects of salt stress in plants^{10, 11, 12}. Among the plant hormones regulating growth is melatonin, which can be utilized during soaking the seeds or spraying it on the plant shoots. Melatonin was first identified in 1995, and since then, extensive research has revealed the physiological roles that melatonin plays in plants¹³. Most studies have shown that melatonin regulates seed germination, rooting, flowering, and photosynthesis and delays aging^{14;15}. Several recent studies showed that adding malatotin to cucumber, maize and tomato helped reduce salinity's effect and the plant's tolerance to salt stress and improved growth^{18, 17; 16}.

Few studies have examined the impact of the growth regulator on melatonin in increasing the tolerance of citrus roots to salinity. Thus, this research aims to evaluate the efficiency of citrus root growth under salt stress conditions and the growth regulator's impact on melatonin in reducing the damage caused by salinity to citrus roots.

MATERIALS AND METHODS

The experiment took place in the Vegetable University of California, Davis, College of Agriculture, Department of Horticulture and Landscape Kerbala from March to the middle of June of October 2021. Seedlings of three citrus rootstocks (162) were selected with solid growth obtained from the Horticultural and Forestry station / Al-Hindia district/ Karbala Province and planted in polyethylene bags (1.25 kg). They were trans-

ferred on 15/2/2021 to 10 kg bags filled with sandy mixture. A factorial experiment (3 x 3 x 3) was followed utilizing a random complete three-block design (R.C.B.D.) replications, as each replicate contains (27) treatments with 3 seedlings for each experimental unit. The second was irrigation with three different saline concentrations (1.7, 4 and 8 decimens.m⁻¹) at an irrigation rate every week, while the third factor was spraying with the growth control melatonin utilizing three concentrations (0,50 and 100 mg.l⁻¹) starting from 3/15/ 2021 and until 9/15/2021 at a rate of one spray every 30 days until complete wetness. Measurements of several traits were taken on 1/10/2021 as follows:

- Plant height (cm).
- Stem diameter (cm).
- Number of leaves (leaf. plant⁻¹).
- Leaf area (cm²): The leaf area was calculated using the described method (19).
- Then, the shoot's dry weight (gm).
- The length of the root (cm).
- The shoot's dry weight system (gm).

RESULTS

Rate plant height (cm)

Table (1) shows that the root has a notable impact on the plant height rate, where the Sour Orange Root outperformed by providing the highest rate in plant height (85.96 cm) compared to the rest of the assets, while the rootstock Sour Orange recorded the lowest significant difference of (63.72 cm). As for melatonin, it is noted from the same Table that Increasing the concentration caused a significant increase in the plant height characteristic, as the concentration (100 mg. L⁻¹) surpassed it by giving the highest rate of plant height reached (82.83 cm), while melatonin recorded at a concentration (0 mg. L⁻¹) the least significant difference amounted to (63.76 cm).). The salinity of the irrigation water was recorded at a concentration of (1.7 decimens.m⁻¹). The highest rate of plant height was (82.74 cm), while the concentration (8 decimens.m⁻¹) gave the lowest rate of (63.91 cm). The results also indicate significant differences in Volkamer lemon for the binary interactions between the treatments, as the results of the same Table showed that the binary interactions between the rootstock and melatonin significantly affected the plant height rate.) compared to the other treatments, while the interaction treatment (rootstock Swingle Citrumelo + melatonin at a concentration of 0 mg. L⁻¹) recorded the lowest value in the average plant height, which was (58.94 cm). The results of the binary interaction between the rootstock and the salinity of the irrigation water in the plant height trait showed that there were significant differences, where the treatment (Sour Orange root + the salinity of the irrigation water at a concentration of 1.7 dSm⁻¹) outperformed by recording the highest rate of plant height of (97.94 cm) compared to the dual interaction treatment (root + The salinity of the irrigation water with a concentration of 8 dSm⁻¹), which gave the least significant difference of (55.44 cm). As for the bilateral interaction between melatonin and salinity, the results showed significant differences between the two treatments, where the treatment (melatonin at an intensity of 100 mg.l⁻¹ + irrigation water salinity at a concentration of 1.7 decimens.m⁻¹) outperformed the treatment by recording the highest rate of plant height of (94.00 cm), while The dual-interaction treatment (melatonin at a concentration of 0 mg. L⁻¹ + the salinity of irrigation water at a intensity of 8 decimens. m⁻¹) recorded the lowest average plant height of (53.89 cm). As for the triple interaction

treatment, the results of the same Table indicate the superiority of the treatment (Sour Orange root + melatonin at an intensity of 100 mg. L⁻¹ + irrigation water salinity at an intensity of 1.7 decimens. m⁻¹) by providing the best rate in plants height that reached (111.88 cm) compared to the triple interaction treatment (rootstock Volkamer lemon + melatonin at a concentration of 0 mg L⁻¹ + the salinity of irrigation water at a concentration of 8 dm⁻¹), which recorded the smallest percentage of (49.67 cm).

Rate Stem diameter (mm)

The results presented in Table (2) show that the single treatments had a significant effect on stem diameter, where the Sour Orange root was superior by giving the highest significant difference to the stem diameter of the plant, amounted to (8.214 mm) compared to the rest of the assets. It is noted in the same Table that the rise in concentration has caused a significant increase in the character of the stem diameter, as the concentration (100 mg. L⁻¹) outperformed by giving the highest average of stem diameter reached (8.127 mm), while the melatonin recorded at a concentration (0 mg. L⁻¹) the lowest diameter of the plant It reached (6.270 mm). As for the salinity of irrigation water, the treatment recorded an intense level of (1.7 decimens.m⁻¹) the highest rate of plant stem diameter was (7.639 mm), while the concentration (8 decimens.m⁻¹) recorded the lowest rate of (6.906). Mm). The results of the same Table showed that the bilateral interactions between the root and melatonin had a significant effect on the average stem diameter. The treatment (Rootstock citrus + melatonin at an intensity of 100 mg. L⁻¹) outperformed by recording the highest rate of stem diameter of (9.244 mm) compared to the interaction treatment recorded. Swingle Citrumelo + melatonin at a concentration of 0 mg. l⁻¹) the lowest rate was (5.101 mm). The results of the bilateral interactions between the rootstock and the salinity of the irrigation water showed a significant effect on the average stem diameter, as the treatment (Sour Orange root + the salinity of the irrigation water at a concentration of 1.7 dS. m⁻¹). The interaction treatment (rootstock Volkamer lemon + salinity of irrigation water at a concentration of 8 decimens.m⁻¹) had the lowest average (5.384 mm). As for the bilateral interaction between melatonin and salinity of the irrigation water, the same Table shows the superiority of the treatment (melatonin an accumulation of 100 mg. l⁻¹ + salinity). Irrigation water at a concentration of 1.7 decimens.m⁻¹) recorded the highest average stem diameter of (8.712 mm). In comparison, the dual interaction treatment (melatonin at a concentration of 0 mg. l⁻¹ + salinity of irrigation water an accumulation of 8 decimens.m⁻¹) gave the lowest value of (5.844 mm).

The same Table shows that the triple interaction between the study factors (rootstock, melatonin and irrigation water salinity) showed significant differences for stem diameter, as the treatment (Sour Orange root + melatonin at a concentration of 100 mg.l⁻¹ + salinity of irrigation water an accumulation of 1.7 decimens.m⁻¹) excelled by giving the highest rate It reached (9.477 mm), while the triple interaction treatment (rootstock Volkamer lemon + melatonin at a concentration of 0 mg.l⁻¹ + salinity of irrigation water an accumulation of 8 decimens.m⁻¹) recorded the smallest percentage of (4.908 mm).

Rate number of leaves per plant (leaf. plant⁻¹)

It is noted from the results shown in Table (3) that the Sour Orange root outperformed the rest of the roots in the number of leaves by giving the highest rate of (77.09 leaves. Also, melatonin was superior at the concentration (100 mg. L⁻¹) by giving the highest rate of the number of leaves reached (76.41 leaves. plant⁻¹), while the concentration (0 mg. L⁻¹) gave the lowest rate of (65.02 leaves. plant⁻¹). The results also decreased the number of leaves with an increase in the salinity of the irrigation water concentration, and the concentration treatment (1.7 decimens.m⁻¹) outperformed by recording the highest rate for the number of leaves trait

amounted to (88.63 leaves. The average rate number of leaves was (52.76 leaves. Plant⁻¹). The results of the same Table show that there is a significant effect of the bilateral interaction between the rootstock and melatonin, where the treatment (Sour Orange + melatonin at an intensity of 100 mg.L⁻¹) outperformed by recording the highest rate in the number of leaves that reached (80.06 leaves.Plant⁻¹) compared to the other treatments, while the treatment recorded The interaction (Volkamer lemon root + melatonin at an intensity of 0 mg.L⁻¹) had the lowest rate in the number of leaves per plant was (60.22 leaves. Plant⁻¹). As for the dual interaction between the rootstock and the irrigation water salinity, the treatment (Sour Orange root + the salinity of the irrigation water at an intensity of 1.7 dSm⁻¹) was superior. m⁻¹) recorded the highest number of leaves (91.56 leaves. ⁻¹). The results also showed the superiority of the treatment (melatonin at an intensity of 100 mg. L⁻¹ + irrigation water salinity at an intensity of 1.7 dm.m⁻¹) by recording the highest rate in the number of leaves that reached (93.67 leaves. plant⁻¹). In contrast, the dual interaction treatment was recorded. (Melatonin at a concentration of 0 mg. L⁻¹ + the salinity of irrigation water at an intensity of 8 dm⁻¹) the lowest rate was (46.44 leaves. Plant⁻¹). The results of the statistical analysis in Table (5) showed that there were significant differences between the triple interaction between the root and melatonin and the salinity of the irrigation water, as the treatment (Sour Orange root + melatonin at an intensity of 100 mg. l⁻¹ + salinity of the irrigation water at an intensity of 1.7 decimens.m⁻¹) excelled by giving the highest significant difference in the average number of leaves reached (95.17 leaves. plant-1). In comparison, the triple interaction treatment (rootstock Volkamer lemon + melatonin at an intensity of 0 mg. l⁻¹ + salinity of irrigation water at an intensity of 8 decimens.m⁻¹) recorded the least significant difference in the average number of leaves per plant was (39.67 leaves. Plant⁻¹).

Leaf area (cm²)

Table (4) shows the effect of the root and melatonin and the salinity of irrigation water and the interaction between them on the rate leaf area, as the Sour Orange excelled by giving the highest rate of leaf area during the growing season amounted to (1692 cm²) compared to the rootstock Swingle Citrumelo (1221 cm²). The results also show that the use of the growth regulator melatonin, on the one hand, had a significant effect in increasing the leaf area rate, where the concentration treatment (100 mg.L⁻¹) was superior by giving the highest rate of (1603 cm²) compared to the comparison treatment, which gave the lowest rate (1161 cm²). As for the irrigation water salinity, the treatment was recorded at a concentration (of 1.7 decimens.m⁻¹). The highest rate leaf area was (2114 cm²) compared to treatment at a concentration (of 8 decimens.m⁻¹), which gave the lowest average, which amounted to (798 cm²). The binary interactions between (rootstock and melatonin), (rootstock and irrigation water salinity) and (melatonin and irrigation water salinity) showed a significant effect on the average leaf area. The treatment (Citrus aurantium root + melatonin at an intensity of 100 mg.L⁻¹) gave the highest average leaf area of (1876 cm²) compared to the other treatments, and the interaction treatment (Swingle Citrumelo rootstock + melatonin at an intensity of 0 mg.L⁻¹) which gave the lowest rate of (995 cm²). As for the bilateral interaction between the rootstock and the salinity of the irrigation water, the treatment (Sour Orange root + the salinity of the irrigation water at an intensity of 1.7 decimens.m⁻¹) was superior by giving the highest rate of (2541 cm²). The treatment of the twofold interaction was recorded with the (Swingle Citrumelo root + the irrigation water salinity at an intensity of 8 decimens). m⁻¹), the lowest average leaf area was (667 cm²). Table (6) shows the superiority of the treatment of (melatonin at an intensity of 100 mg.l⁻¹ + the salinity of irrigation water at a concentration of 1.7 decimens.m⁻¹) by recording the highest rate in leaf area that reached (2376 cm²) compared to the rest of the treatments. It gave the recorded treatment

(melatonin at an intensity of 0 mg. l⁻¹ + salinity of irrigation water at a concentration of 8 decimens.m⁻¹) the lowest average leaf area was (613 cm²). As for the triple interaction between the rootstock and melatonin and the salinity concentration, the treatment (Sour Orange root + melatonin at a concentration of 100 mg.l⁻¹ + the salinity of irrigation water at a concentration of 1.7 decimens.m⁻¹) gave the highest average leaf area that reached (2848 cm²), followed by the treatment (Sour Orange + melatonin at a concentration of 50 mg.l⁻¹ + salinity of irrigation water at a concentration of 1.7 decimens.m⁻¹) which gave (2695 cm²), while the triple interaction treatment was recorded (rootstock Volkamer lemon + melatonin at an intensity of 0 mg.l⁻¹ + salinity of irrigation water at a concentration of 8 decimens.m⁻¹) The lowest value in the leaf area of a plant was (511 cm²).

Rate dry weight of the shoot (gm)

The results presented in Table (5) show that the single treatments significantly affected the vegetative group's dry weight rate, where the Volkamer lemon outperformed by giving the highest amount of (29.38 g) compared to the rest of the roots. As for melatonin, it was noted that the concentration (100 mg. L⁻¹) was superior by giving the highest rate in the dry weight of the vegetative total of the plant, which amounted to (28.18 g) compared to the comparison treatment that recorded the lowest rate of (24.84 g). As for the salinity of irrigation water, a treatment was recorded at concentration. (1.7 decimens.m⁻¹), the highest rate was (34.72 g). In comparison, the salinity of irrigation water treatment at a concentration (8 decimens.m⁻¹) recorded the lowest rate in the dry weight of the vegetative total was (21.69 g). The results of the same Table also showed that the bilateral interactions between the root and melatonin had a significant effect, as the treatment (Volkamer lemon + melatonin at an intensity of 100 mg. L⁻¹) outperformed the treatment by recording the highest rate in the dry weight of the shot total (31.27 g) compared to the other treatments.

In comparison, the interaction treatment was recorded (rootstock Swingle Citrumelo + melatonin at an intensity of 0 mg. L⁻¹). The lowest rate was (22.56 g). As for the binary interaction between the rootstock and salinity, the treatment (Volkamer lemon root + salinity of irrigation water at an intensity of 1.7 ds.m⁻¹) was superior by recording the highest rate in the dry weight of the shot total (36.75 g) compared to the treatments, and the interaction treatment gave (Rootstock Swingle Citrumelo + water salinity Irrigation at an intensity of 8 dm-1) the lowest rate was (18.55 g). The dual interaction treatment in the same Table indicates the superiority of the treatment (melatonin at an intensity of 100 mg. l⁻¹ + salinity treatment at an intensity of 1.7 decimens.m⁻¹) by recording the highest rate in the dry weight of the shot total (36.75 g), compared to the treatment of the dual interaction (melatonin at a concentration of 0 mg) L⁻¹ + salinity of irrigation water at an intensity of 8 decimens.m⁻¹), the lowest average ton was (19.91 g). The triple interaction between the study factors (rootstock, melatonin and water salinity) significantly increased the shoot population's dry weight rate. The treatment of Sour Orange root + melatonin at an intensity of 100 mg. l⁻¹ + salinity treatment at an intensity of 1.7 ds.m⁻¹) achieved the highest rate. The dry weight of the shoots was (39.20 g), while the treatment (Swingle Citrumelo + melatonin at an intensity of 0 mg. L⁻¹ + irrigation water salinity at an intensity of 8 dS. m⁻¹) recorded the lowest rate of (18.03 g).

Rate root length (cm)

Table (6) shows no significant differences between the rootstocks in the characteristic of root length. When using the growth regulator melatonin, it was noticed that the root length increased with the increase in the concentration, where the treatment at an intensity of (100 mg. L⁻¹) was superior by giving the highest rate in

root length of 36.41 cm. In contrast, the comparison treatment recorded the lowest rate in root length of (34.07 cm). As for the salinity of the irrigation water, the treatment at a concentration (1.7 decimens.m⁻¹) recorded the highest rate of (39.74 cm), while the concentration (8 decimens.m⁻¹) recorded the lowest rate in root length of the plant reached (30.59 cm). The results in the same Table also indicate that there are significant differences in the bilateral interactions between treatments in the characteristic of root length rate, where the treatment (Sour Orange root + melatonin at an intensity of 100 mg. L⁻¹) was superior by recording the highest rate in root length of (37.44 cm) compared to the other treatments.

In comparison, it was recorded. The interaction treatment (Sour Orange root + melatonin at an intensity of 0 mg. L⁻¹) had the lowest average (32.78 cm). As for the bilateral interaction between the rootstock and the salinity of the irrigation water, the treatment (Volkamer lemon root + irrigation water salinity at an intensity of 1.7 decimens.m⁻¹) achieved the highest rate in the root length of the plant reached (41.33 cm) compared to the other treatments. In comparison, the interaction treatment was recorded (Volkamer lemon + The irrigation water salinity was at a concentration of 8 decimens.m⁻¹), with the lowest rate (26.78 cm). The dual interaction treatment (melatonin at an intensity of 100 mg. l⁻¹ + salinity of irrigation water at a concentration of 1.7 decimens.m⁻¹) showed the highest rate in the plant's root length reached (42.00 cm). In comparison, the dual interaction treatment (melatonin at an intensity of 0 mg. l⁻¹+) was recorded. The salinity of the irrigation water at an intensity of 8 decimens.m⁻¹) was the lowest average for the plant's leaf area (29.67 cm). The results of the statistical analysis in Table (6) showed that there were significant differences for the triple interaction, where the treatment (rootstock Volkamer lemon + melatonin at an intensity of 100 mg. l⁻¹ + salinity of irrigation water at an intensity of 1.7 decimens.m⁻¹) outperformed by giving the highest rate of (42.67 cm). The triple interaction treatment (rootstock Volkamer lemon + melatonin at an intensity of 0 mg. l⁻¹ + irrigation water salinity at an intensity of 8 decimens.m⁻¹) recorded the lowest value in root length of (25.00 cm).

Rate dry weight of the root system (gm)

Table (7) shows that the root had a significant effect on the rate dry weight of the root system, as the rootstock of Volkamer lemon was superior by giving the highest rate dry root weight of the plant amounted to (17.20 g) compared to the rest of the roots.). As for the growth regulator, melatonin, the concentration treatment (100 mg. L⁻¹) outperformed by giving the highest rate in the dry weight of the root system (16.07 g) compared to the comparison treatment, which recorded the lowest rate (13.12 g). (1.7 decimens.m⁻¹) the highest rate was (19.83 g) compared to the concentration treatment (8 decimens.m⁻¹), which gave the lowest rate (10.22 g). The bilateral interaction between the study factors shown in Table (7) had a significant effect on the average dry weight of the root group, as the treatment (Volkamer lemon root + melatonin at an intensity of 100 mg.L⁻¹) outperformed by recording the highest rate in the dry weight of the root group amounted to (18.86 g) compared to the treatments The other and the interaction treatment (Swingle Citrumelo + melatonin at an intensity of 0 mg.l⁻¹) gave the lowest rate of (10.25 g). Also, the treatment (rootstock Volkamer lemon + salinity treatment at an intensity of 1.7 decimens.m⁻¹) produced the highest average in the dry weight of the total The root total amounted to (24.52 g) compared to the other treatments, and the treatment (Swingle Citrumelo + irrigation water salinity at an intensity of 8 decimens.m⁻¹) recorded the lowest average dry weight of the root total amounted to (8.40 g). The same data also indicates the superiority of the dual interaction treatment between melatonin. When treated, the salinity of the irrigation water (melatonin at a concentration of 100 mg. l⁻¹ + salinity treatment at an intensity of 1.7 decimens.m⁻¹) recorded the highest average in the dry weight of the rootstock reached (21.59 g). In comparison, the dual interaction treatment (melatonin at an intensity of 0 mg.

l⁻¹) was recorded. + salinity of irrigation water at an intensity of 8 decimens.m⁻¹) the lowest rate was (8.85 g). As for the triple interaction combined among the study factors, the treatment (Volkamer lemon root + melatonin at an intensity of 100 mg. L⁻¹ + salinity of irrigation water at an intensity of 1.7 dS. m⁻¹) was superior in giving the highest rate in the dry weight of the root total of (27.29 g), while the interaction treatment recorded the triple (rootstock Swingle Citrumelo + melatonin at a concentration of 0 mg. l⁻¹ + the salinity of irrigation water at an intensity of 8 dm.m⁻¹) had the lowest value of (3.74 g).

Salinity in ds.m-1 of irrigation water			melatonin mg. L ⁻¹		Rootstocks		
82.74	1.7		63.76	0		70.63	Swingle Citrumelo
73.67	4		73.72	50		85.96	Sour Orange
63.91	8		82.83	100		63.72	Volkamer lemon
1.792			1.792		1.792		L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water			Rootstocks	melatonin mg. liter ⁻¹			Rootstocks
8	4	1.7		100	50	0	
64.94	67.33	79.61	Swingle Citrumelo	81.33	71.61	58.94	Swingle Citrumelo
71.33	88.61	97.94	Sour Orange	98.61	86.56	72.72	Sour Orange
55.44	65.06	70.67	Volkamer lemon	68.56	63.00	59.61	Volkamer lemon
3.104			L.S.D.	3.104			L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water							melatonin mg. L ⁻¹
8			4		1.7		0
53.89			63.56		73.83		50
65.28			75.50		80.39		100
72.56			81.94		94.00		L.S.D.
3.104							L.S.D.
the salinity of irrigation water ds.m ⁻¹				melatonin mg. L ⁻¹		Rootstocks	
8			4		1.7		0
54.50			55.00		67.33		Swingle Citrumelo
66.17			70.50		78.17		
74.17			76.50		93.33		
57.50			73.50		87.17		0
72.67			92.17		94.83		50
83.83			100.17		111.88		100
49.67			62.17		67.00		0
57.00			63.83		68.17		50
							Volkamer

59.67	69.17	76.83	100	lemon
5.377				L.S.D.

Table 1. The effects of root growth, melatonin, and irrigation water salinity and how they interact with the rate in plant height (cm).

the salinity of irrigation water ds.m ⁻¹			melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks		
7.639	1.7		6.270	0	7.594	Swingle Citrumelo	
7.015	4		7.162	50	8.214	Sour Orange	
6.906	8		8.127	100	5.751	Volkamer lemon	
0.2316			0.2316		0.2316	L.S.D.	
Salinity in ds.m-1 of irrigation water			Rootstocks	melatonin mg. liter ⁻¹			Rootstocks
8	4	1.7		100	50	0	
6.932	7.261	8.589	Swingle Citrumelo	8.535	7.636	6.612	Swingle Citrumelo
7.763	8.152	8.728	Sour Orange	9.244	8.301	7.097	Sour Orange
5.384	5.693	6.174	Volkamer lemon	6.601	5.550	5.101	Volkamer lemon
0.4011			L.S.D.	0.4011			L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water						melatonin mg. liter ⁻¹	Rootstocks
8			4		1.7		melatonin mg. liter⁻¹
5.844			6.709		7.676		0
6.256			7.494		7.992		50
6.880			7.112		8.712		100
0.4011							L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water				melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks	
8			4		1.7		
6.060			6.102		7.673		
7.010			7.197		8.697		
7.722			8.485		9.398		
7.800			6.220		7.272		
8.907			7.857		8.140		
9.045			.9212		9.477		
5.828			5.212		5.183		
5.417			5.587		5.647		
						0	Swingle Citrumelo
						50	
						100	
						0	Sour Orange
						50	
						100	
						0	Volkamer lemon
						50	

4.908	6.280	7.693	100	
0.6947				L.S.D.

Table 2. The effect of root growth, melatonin salinity of irrigation water, and how they impact rate stem diameter (mm).

the salinity of irrigation water ds.m ⁻¹			melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks		
88.63	1.7		65.02	0	70.85	Swingle Citrumelo	
73.96	4		73.93	50	77.09	Sour Orange	
52.76	8		76.41	100	67.41	Volkamer lemon	
2.578			2.578		2.578	L.S.D.	
Salinity in ds.m-1 of irrigation water			Rootstocks	melatonin mg. liter ⁻¹			Rootstocks
8	4	1.7		100	50	0	
50.78	75.78	86.00	Swingle Citrumelo	74.78	74.61	63.17	Swingle Citrumelo
61.39	78.33	91.56	Sour Orange	80.06	79.56	71.67	Sour Orange
46.11	67.78	88.33	Volkamer lemon	74.89	67.11	60.22	Volkamer lemon
4.465			L.S.D.	4.465			L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water						melatonin mg. liter ⁻¹	Rootstocks
8			4		1.7		
46.44			67.67		80.94		0
53.94			76.56		91.28		50
57.89			77.67		93.67		100
4.465							L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water				melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks	
8		4		1.7		0	
45.33		88.00		78.17			
52.67		82.67		88.50		50	
78.67		78.67		91.33		100	
54.33		74.17		88.50		0	
63.67		82.83		93.67		50	
66.17		76.00		94.50		100	
39.67		62.88		78.17		0	
45.50		64.17		91.67		50	
53.17		76.33		95.17		100	
7.733							L.S.D.

Table 3. The effects of root growth, melatonin, and irrigation water salinity on the leaf growth rate (leaf. plant⁻¹).

Salinity in ds.m-1 of irrigation water			melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks			
2114	1.7		1161	0	1221	Swingle Citrumelo		
1297	4		1445	50	1692	Sour Orange		
798	8		1603	100	1296	Volkamer lemon		
83.2			83.2		83.2	L.S.D		
Salinity in ds.m-1 of irrigation water			Rootstocks	melatonin mg. liter ⁻¹			Rootstocks	
8	4	1.7		100	50	0		
667	1159	1838	Swingle Citrumelo	1438	1232	995	Swingle Citrumelo	
1025	1510	2541	Sour Orange	1876	1781	1419	Sour Orange	
703	1222	1962	Volkamer lemon	1496	1322	1070	Volkamer lemon	
144.1			L.S.D.	144.1			L.S.D.	
Salinity in ds.m-1 of irrigation water						melatonin mg. liter ⁻¹	Rootstocks	
8			4		1.7		melatonin mg. liter⁻¹	
613			1090		1780		0	
812			1337		2186		50	
970			1464		2376		100	
144.1							L.S.D.	
Salinity in ds.m-1 of irrigation water				melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks		
8			4	1.7	0			
513			892	1579	Swingle Citrumelo			
628			1242	1825				50
860			1343	2111				100
815			1349	2091				0
1086			1574	2695	50	Sour Orange		
1174			1608	2848	100			
511			1030	1669	0			
722			1195	2047	50	Volkamer lemon		
876			1442	2170	100			
249.6							L.S.D	

Table 4. The effect of root growth, melatonin salinity of irrigation water, and how they impact rate leaf area (cm²).

Salinity in ds.m-1 of irrigation water			melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks		
34.72	1.7		24.84	0	23.97	Swingle Citrumelo	
23.89	4		27.28	50	26.94	Sour Orange	
21.69	8		28.18	100	29.38	Volkamer lemon	
1.371			1.371		1.371	L.S.D.	
Salinity in ds.m-1 of irrigation water			Rootstocks	melatonin mg. liter ⁻¹			Rootstocks
8	4	1.7		100	50	0	
18.55	22.08	31.29	Swingle Citrumelo	25.05	24.32	22.56	Swingle Citrumelo
22.06	22.64	36.13	Sour Orange	28.23	27.61	24.99	Sour Orange
24.45	26.94	36.75	Volkamer lemon	31.27	29.91	26.96	Volkamer lemon
2.376			L.S.D.	2.376			L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water							melatonin mg. liter ⁻¹
8			4		1.7		0
19.91			22.21		32.39		50
21.99			24.82		35.02		100
23.16			24.63		36.75		L.S.D.
2.376							L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water				melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks	
8			4		1.7		Swingle Citrumelo
18.03			21.26		28.39		
18.30			22.28		32.38		
19.32			22.71		33.10		Sour Orange
19.42			20.92		34.64		
21.72			25.56		35.54		
22.94			28.55		39.20		Volkamer lemon
20.77			25.96		34.15		
25.96			26.68		37.15		
26.61			.2824		38.96		L.S.D.
4.114							L.S.D.

Table 5. The effects of root growth, melatonin, and irrigation water salinity on the shoot's dry weight rate (gm).

Salinity in ds.m-1 of irrigation water			melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks		
39.74		1.7	34.07	0	35.37	Swingle Citrumelo	
35.00		4	34.85	50	35.33	Sour Orange	
30.59		8	36.41	100	34.63	Volkamer lemon	
1.259			1.259		N.S.	L.S.D.	
Salinity in ds.m-1 of irrigation water			Rootstocks	melatonin mg. liter ⁻¹			Rootstocks
8	4	1.7		100	50	0	
32.56	35.22	38.33	Swingle Citrumelo	37.11	34.89	34.11	Swingle Citrumelo
32.44	34.00	39.56	Sour Orange	37.44	35.78	32.78	Sour Orange
26.78	35.78	41.33	Volkamer lemon	34.67	33.89	35.33	Volkamer lemon
2.181			L.S.D.	2.181			L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water						melatonin mg. liter ⁻¹	Rootstocks
8			4			1.7	
29.67			34.78			37.78	0
30.33			34.78			39.44	50
31.78			35.44			42.00	100
2.181							L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water				melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks	
8		4		1.7		0	
30.67		35.00		36.67		50	
35.00		36.33		37.33		100	
33.67		35.67		42.00		0	
29.33		31.67		37.33		50	
31.33		36.00		40.00		100	
36.67		34.33		41.33		0	
29.00		37.67		39.33		50	
26.33		33.33		42.00		100	
25.00		36.33		42.67		100	
3.778						L.S.D.	

Table 6. The effect of melatonin on root growth, the salinity of irrigation water, and how they impact the rate of root length (cm).

Salinity in ds.m-1 of irriga-	melatonin mg. liter ⁻¹	Rootstocks
-------------------------------	-----------------------------------	------------

tion water							
19.83	1.7	13.12	0	11.55		Swingle Citrumelo	
14.35	4	15.20	50	15.64		Sour Orange	
10.22	8	16.07	100	17.20		Volkamer lemon	
0.960			0.690		0.690	L.S.D.	
Salinity in ds.m-1 of irrigation water			Rootstocks	melatonin mg. liter ⁻¹			Rootstocks
8	4	1.7		100	50	0	
8.40	10.45	15.80	Swingle Citrumelo	12.97	11.43	10.25	Swingle Citrumelo
11.30	16.47	19.16	Sour Orange	16.39	15.72	14.82	Sour Orange
10.97	16.12	24.52	Volkamer lemon	18.86	18.45	14.29	Volkamer lemon
1.195			L.S.D.	1.195			L.S.D.
Salinity in ds.m-1 of irrigation water						melatonin mg. liter⁻¹	
8			4		1.7		
8.85			12.98		17.54		0
10.31			14.94		20.35		50
11.51			15.13		21.59		100
1.195						L.S.D.	
Salinity in ds.m-1 of irrigation water				melatonin mg. liter ⁻¹		Rootstocks	
8			4		0		
3.74			7.36		9.66		Swingle Citrumelo
8.68			11.06		14.53		
9.16			10.63		19.11		
9.84			15.56		19.06		Sour Orange
11.06			16.86		19.22		
12.99			16.99		19.19		
9.35			13.72		19.81		
11.18			16.89		26.46		Volkamer lemon
12.37			17.75		27.29		
2.070						L.S.D.	

Table 7. The effect of root growth, melatonin, the salinity of irrigation water, and how they impact the rate dry weight of the rootstock (gm).

DISCUSSION

The results above indicate differences between the citrus rootstocks (Swingle Citrumelo, Sour orange, and Volkamer lemon) exposed to salt stress in vegetative and root characteristics. Especially the sodium and chloride ions, thus increasing the readiness for absorption of nutrients in the origin area and how they affect the leaves, improving cells' osmotic pressure and reaching a hormonal and nutritional state balance by preserving a high potassium-to-sodium ion ratio, one of the key elements for salinity tolerance.²⁰ It was shown²¹ that the ability of citrus trees to tolerate salinity depends on the possibility of their origin in restricting the absorption and transfer of harmful salt ions to the vegetative system. The results also showed that spraying with the growth regulator melatonin with different concentrations had a significant effect in improving the vegetative and root characteristics of seedlings under salt stress conditions, perhaps due to the role of melatonin similar to the effect of auxin indole-3-acetic acid (I.A.A.) in promoting cell division and elongation and Delaying leaf aging, stimulating photosynthesis, and maintaining the integrity of cell membranes and chlorophyll pigment from demolition under salt stress conditions²² and²³. It was mentioned²⁴ that melatonin and I.A.A. are synthesized inside the plant from the amino acid tryptophan.²⁵ It was found that the addition of melatonin increases the levels of auxin inside the plant by stimulating the auxin flux proteins AUX-IN1/LIKE-AUX1 (AUX/LAX) essential in the manufacture of I.A.A., or perhaps the reason is due to the role of melatonin in protecting the plant from abiotic stresses either directly By scavenging or removing free radicals or by stimulating enzymatic antioxidants such as Peroxidase (P.O.D.), Superoxide Dismutase (S.O.D.) and Catalase (C.A.T.) and non-enzyme such as ascorbic acid, glutathione, and flavonoids, thus protecting enzymes from oxidative damage and enhancing the efficiency of the chain Transfer of electrons and reduce their leakage in the mitochondria and thus reduce the content of free radicals within the plant²⁶,²⁷.²⁸ It was found that spraying Sour orange L with melatonin irrigated with saline water at a concentration of 100 mmol NaCl caused a significant increase in the carbohydrate content of the leaves and the antioxidant activity (S.O.D., P.O.D. and C.A.T.) and glutathione.²⁹ It was found that spraying grape seedlings *Vitis vinifera* var. Xiahei with melatonin at a concentration (200 mmol) caused an increase in the activity of enzyme antioxidants (S.O.D., P.O.D. and C.A.T.) and the dry weight of the shoot and root system. The decrease in the growth of citrus roots, in general, with the increase in salt concentrations in the irrigation water, may be due to the high salinity causing a decrease in the water potential of the plant and thus reducing the expansion of cells and the speed of their division and the closing of the guard cells of the stomata and the decrease in the process of gas exchange and photosynthesis, which is reflected Negatively on growth and other metabolic processes and the accumulation of organic matter³⁰. High salinity also causes poor root growth and production of cytokinins, which are transmitted through the plant sap and stimulate the growth of the vegetative system. Alternatively, perhaps the reason is that the high salinity leads to inhibition of the production of growth inhibitors and reduces the activity of the meristematic tissue of the cambium, which causes a decrease in the size of the new meristematic cells and the lack of their transformation into adult cells³¹.

According to the outcomes of this study, it is possible to irrigate citrus roots with electrical conduction water (8 dSm^{-1}) and spray with a melatonin growth regulator at a concentration of 100 mg. l^{-1} to reduce the damage of high salinity to plants.

CONCLUSIONS

Sour orange rootstock was significantly superior to the rest of the citrus rootstocks and recorded the highest increase in the rate (plant height, stem diameter, number of leaves and leaf area), while the rootstock Volkamer

lemon was significantly superior by recording the highest rate of dry weight of the vegetative and root system. Irrigation with electrical connection water ($1.7 \text{ decimens.m}^{-1}$) led to obtaining the highest values for vegetative and root growth characteristics (plant height, stem diameter, number of leaves, leaf area, dry weight of the vegetative and root system and root length). Treatment with the growth regulator melatonin at a concentration (of 100 mg. L^{-1}) showed the highest rate in the trait (plant height, stem diameter, number of leaves, leaf area, dry weight of the root and vegetative complex and root length). The dual and triple interactions between the study factors led to a significant and clear superiority in the studied traits compared to the comparison treatment, as the triple interaction treatment (Sour orange root + melatonin at an intensity of 100 mg. l^{-1} + salinity of irrigation water at an intensity of $1.7 \text{ decimens.m}^{-1}$) was significantly superior by giving the highest increase in the rate of vegetative traits. Also, the treatment (Volkamer lemon + melatonin at an intensity of 100 mg. l^{-1} + salinity of irrigation water at a concentration of 1.7 dm. m^{-1}) recorded the highest rate of length and weight of the root when it is a dry system.

Author contributions: methodology and project administration, Harith Al-Tamimi; formal analysis, validation, and writing, Muntadher Al-Mousawi.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: Thanks to the Head of the Department of Horticulture and Landscape, Assistant Head of the Department and Supervisor

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

REFERENCES

1. Hussain, S.; Luro, F.; Costantino, G.; Ollitrault, P.; Morillon, R. Physiological analysis of salt stress behaviour of citrus species and genera: low chloride accumulation as an indicator of salt tolerance. *South African Journal of Botany*, **2012**; *81*, pp.103-112.
2. Handi, Z. Response Sour Orange Citrus aurantium L. Seedlings in a Local Class Proline and Sodium Chloride in Avoid Damage to Salt Stress. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **2016**, Vol. 5, No°. 10, pp. 1066 -1071.
3. Emad H. H. Alsalmayn , TH. T. Mohammed. Effect of adding natural zeolite and vitamin E to diets of laying hens (Lohman Brown) on some physiological traits and productive performance during hot weather. *Revis Bionatura* .2022;7(4) 12. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.12>.
4. Iglesias, D. J.; Cercós, M.; Colmenero-Flores, J. M.; Naranjo, M. A.; Ríos, G.; Carrera, E.; Talon, M. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **2007**; *19*, pp. 333-362.
5. Ben-Hayyim, G. ; Moore, G. A. Recent advances in breeding citrus for drought and saline stress tolerance. *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*, **2007**; pp. 627-642.
6. Ferguson, L.; Grattan, S. R. How salinity damages citrus: osmotic effects and specific ion toxicities. *HortTechnology*, **2005**. *15*(1), pp.95-99.
7. Najim, Y. S. .; Mohammed, T. T. .; Hussain, F. M. . The Effect Of The Use Of Different Levels Of Azolla To Male Broilers Diets In The Productive And Physiological Performance. *JLSAR* 2022, *3*, 37-41.

8. Abdulateef, S. M., Aldhanki, Z. T. M. & Rashid, S. A. The influence of different sounds on the feeding behavior of broiler chickens and their impact on blood physiology and conditioning place preference (C.P.P.). *Plant Arch.* 2018.18.
9. Sauls, J. W. "Rootstock and scion varieties." Texas Cooperative Extension publication, Texas Citrus and Subtropical Fruits, Horticulture Department **2002**.
10. A. Jalal, R., E. Aziz, K. Usage Of Antimicrobial Activity Against E. Coli O157:H7 Isolated From Local Meat And Vegetables In Erbil City. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 114-123. doi: 10.32649/ajas.2023.179721
11. Hasanuzzaman, M.; Nahar, K.; Fujita, M. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In *Ecophysiology and responses of plants under salt stress* Springer, New York, NY. **2013**; pp: 25-87.
12. Bielach, A.; Hrtyan, M.; Tognetti, V.B.,. Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *International journal of molecular sciences*, **2017**;18(7), p.1427.
13. Hattori, A.; Migitaka, H.; Iigo, M.; Itoh, M.; Yamamoto, K.; Ohtani-Kaneko, R.; Hara, M.; Suzuki, T. ; Reiter, R.J. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology International*, **1995**; 35(3), pp.627-634.
14. Arnao, M.B.; Hernández-Ruiz, J. Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator. *Trends in Plant Science*, **2019**; 24(1), pp.38-48.
15. Kaya, A.; Doganlar, Z.B.. Melatonin improves the multiple stress tolerance in pepper (*Capsicum annuum*). *Scientia Horticulturae*, **2019**; 256, p.108509.
16. Wang, L.Y.; Liu, J.L.; Wang, W.X.; Sun, Y. Exogenous melatonin improves growth and photosynthetic capacity of cucumber under salinity-induced stress. *Photosynthetica*, **2016**. 54(1), pp.19-27.
17. Arora, D.; Bhatla, S.C. Melatonin and nitric oxide regulate sunflower seedling growth under salt stress accompanying differential expression of Cu/Zn S.O.D. and Mn S.O.D. *Free Radical Biology and Medicine*, **2017**; 106, pp.315-328.
18. Zhou, X.; Zhao, H.; Cao, K.; Hu, L.; Du, T.; Baluška, F. ; Zou, Z.. Beneficial roles of melatonin on redox regulation of photosynthetic electron transport and synthesis of D1 protein in tomato seedlings under salt stress. *Frontiers in plant science*, **2016**; 7, p.1823.
19. Drovnic, V. (1965). *Lucraripactic de ampelographic E. Didacticta spedagogica Bucureseti RS Romania*. Marschner, H. mineral nutrition of higher plants. Academic press., **1995**; 651p.
20. Khoshbakht, D.; Ramin, A.A. ; Baninasab, B. Effects of sodium chloride stress on gas exchange, chlorophyll content and nutrient concentrations of nine citrus rootstocks. *Photosynthetica*, **2015**; 53(2), pp.241-249.
21. Gong, X.; Shi, S.; Dou, F.; Song, Y.; Ma, F. Exogenous melatonin alleviates alkaline stress in *Malus hupehensis* Rehd. by regulating the biosynthesis of polyamines. *Molecules*, **2017**;22(9), p.1542.
22. Zhang, J.; Li, H.; Xu, B.; Li, J. ; Huang, B. Exogenous melatonin suppresses dark-induced leaf senescence by activating the superoxide dismutase-catalase antioxidant pathway and down-regulating chlorophyll degradation in excised leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Frontiers in Plant Science*, **2016**; 7, p.1500.
23. Hernández-Ruiz, J.; Cano, A. ; Arnao, M.B. Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species. *Journal of pineal research*, **2005**;39(2), pp.137-142.

24. Swarup, Ranjan, and Benjamin Péret. "AUX/LAX family of auxin influx carriers—an overview." *Frontiers in plant science* **2012**; (3), pp: 225.
25. Pan, H.Y.; Zhang, X.Q.; Li, J.; Zhao, J.; Bu, H.Y.. Effects of exogenous melatonin on antioxidant activities in *Isatis indigotica* fort. seedlings after low temperature stress. *J Northwest Univ (Nat Sci Ed)*. **2013**; 43: pp: 238–242.
26. Gao, Q.H; Jia, S.S.; Miao, Y.M.; Lu, X.M.; Li, H.M. Effects of exogenous melatonin on nitrogen metabolism and osmotic adjustment substances of melon seedlings under sub-low temperature. *Chin J Appl Ecol*. **2016**; 27: pp: 519–524.
27. Kostopoulou, Z.; Therios, I.; Roumeliotis, E.; Kanellis, A. K.; Molassiotis, A. Melatonin combined with ascorbic acid provides salt adaptation in *Citrus aurantium* L. seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, **2015**; 86, pp: 155-165.
28. Zhong, L.; Lin, L.; Yang, L.; Liao, M. A.; Wang, X.; Wang, J. ;Tang, Y. Exogenous melatonin promotes growth and sucrose metabolism of grape seedlings. *PLoS One*, **2020**; 15 :(4), pp: 1-16.
29. Alaaraji, S.F.T., Awad, M.M., Ismail, M.A. Study the association of asprosin and dickkopf-3 with KIM-1, NTpro-BNP, GDF-15 and C.P.P. among male iraqi with chronic kidney disease (2020) *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11 (5), pp. 10-17.
30. Abu Zaid, Al-Shahat N. Plant hormones and agricultural applications. Madbouly Library. The Arab Republic of Egypt, **1990**.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Al-Mousawi M.; Al-Tamimi, H.; Evaluation of the growth efficiency of some citrus roots for spraying melatonin growth regulator under salt stress conditions. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 54. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.54>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Laboratory determination of spray characteristics using a full hollow cone nozzle at different heights and operating pressures

Athraa K. Hussain¹, Majid H. Alheidary^{2,*}

¹ Department of Agricultural Machines and Equipment/ College of Agriculture/ University of Basrah/ Basrah / Iraq; dhrakhyry@gmail.com.

² Department of Agricultural Machines and Equipment/ College of Agriculture/ University of Basrah / Basrah/ Iraq.

* Correspondence: majid.reshaq@uobasrah.edu.iq; Tel.: +9647733873816
Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.55>

ABSTRACT

Reducing pesticide costs and environmental losses during spraying is considered an essential issue for obtaining the effectiveness of pest control. This study aimed to determine the spray characteristics using a full hollow cone nozzle at different spray conditions. Three spray heights, 25, 50, and 75cm, and three pressures, 2, 3, and 5 bar, were used. Nozzle flow rate, application rate, spray width, angle, and accumulated volume were measured. The results showed an effect on spray characteristics due to the change in spray conditions. The nozzle flow rate increased with the increase in pressure, where the average flow rate ranges between (0.34 to 0.58 l/min) between 2 and 5 bars, respectively. Results also illustrated an increase in height from 25 to 75 cm, and pressure from 2 to 5bar led to an increase in volume rate, spray width, angle, and accumulated volume (285.6 to 474.92), (50 to 100cm), (41 to 90°), and (37.75 to 198ml) respectively.

Keywords: Operating Conditions; Patternator; Nozzle; Spray Indicators.

INTRODUCTION

In the agricultural spraying processes, many processes should be done in fields, for example, controlling insects or weeds. Apart from these processes operations, spraying applications are also an essential issue to be carried out by the farmers to protect the cultivated plants from pests such as insects and fungi¹. The concern of spraying applications for controlling any insect or disease is increasing quickly in several countries for qualitative income of agricultural products². Spray volume is significant when control materials are added to the fields. Different parameters should be studied, such as nozzle type and size, working pressure, and nozzle height, to determine spray volume^{3,4}. These parameters also influenced the uniformity of applied spray volume, coverage percentage, and nozzle angle⁵. The spraying processes under misapplication or without understanding appropriate conditions will lead to losses outside the intended target^{3, 6}. In spraying application, both accuracy and uniformity of spray volume on the zone target are essential to avoid the opposite influences of chemical products on crop injury and the environment and reduce pest management⁷. Nozzle flow rate, operating pressure, spray nozzle angle, spray nozzle height, spray nozzle width, etc., are the factors that influence the agricultural nozzle performance^{8 9 10}. Agricultural nozzles come in various types, each with

unique properties and functions for various spraying tasks. To achieve the desired spray characteristics, a nozzle must be chosen based on the operating pressure and spray height, which impacts the concern of yields¹¹. In Iraqi farms, there needs to be more details about the full hollow cone nozzle, considered the famous nozzle in the fields. So, this study was designed to determine the spray characteristics at different operating conditions using a horizontal patterning in the laboratory, which could be associated with adopting the convenient spray nozzle for plant protection.

MATERIALS AND METHODS

The sampling mechanism of the spraying machine was utilized in the Department of Agricultural Machines and Equipment, College of Agriculture, University of Basrah. The investigations were performed at the laboratory to determine spray characteristics using different operating conditions. Different laboratory investigations are carried out to evaluate the nozzle flow rate, spray application volume, spray width, spray angle, and accumulated spray volume. The mechanism of spraying was adjusted at various nozzle heights (25, 50, and 75 cm) and different working pressures (2, 3, and 5 bar). The nozzle flow rate was measured using collecting tubes for an exposure time (10 seconds) for all experiments.

This study selected the full hollow nozzle type to investigate the spray distribution pattern under different operating conditions; these nozzles are considered popular in Iraqi farms.

Measuring the uniformity of spray volume distribution

The spray volume uniformity throughout the boom nozzle or within the spray width is essential for obtaining maximum efficacy with minimum cost and low spray volume to non-target intended contamination. The uniformity of the spray nozzle was determined using a patternator. The patternator typically consists of several channels (46 grooves) aligned perpendicular to the spray nozzle and can be of any appropriate length, provided that it encompasses the spray area. A nozzle spray volume distribution pattern, which was 240 cm x 150 cm in size, was observed on the patternator. The patternator has 46 grooves at equal spacing (5 cm) and a rack to carry spray-collecting tubes, which were mounted separately under the collecting endpoints of each groove. The nozzle boom was positioned vertically above the patternator at 25, 50, and 75 cm heights. The spraying mechanism was operated for 10s in each condition and could achieve a measurable spray volume rate from the accumulation tubes. This process was replicated three times for each flowrate, and then the average was determined individually based on the employed operating pressure and nozzle height¹¹.

Measuring of spray application volume

The actual spray application rate of the spray mechanism was calculated by measuring the nozzle flow rate and spray swath width (m). The spray width is equal to one spray nozzle. The spray application rate was calculated using the following formula:

$$\begin{aligned} & \text{spray application rate} \left(\frac{1}{\text{ha}} \right) \\ &= \frac{600 * \text{nozzle flowrate} \left(\frac{1}{\text{min}} \right)}{\text{spray width(m)} * \text{spray speed (km/hr)}} \end{aligned} \quad (1)$$

Measuring spray nozzle width

The width of the spray nozzle was calculated by measuring the distance between the spray's outer edges when the nozzle operated at the nozzle height and the operating pressure was fixed. For each nozzle height, the external grooves of the patternator that received 50% or more of the maximum amount of water collected from any groove while the operating pressure increased must be measured.

Measuring the spray angle

The distance located between the right and left of the spray nozzle at constant operating pressure and spray height is used to calculate the spray angle. The first stage for calculating the spray nozzle angle is to measure the spray volume accumulated by tubes. According to the following formula, the spray angle was determined:

$$\varnothing = 2 * \tan^{-1}(W/2 * H) \quad (2)$$

Where \varnothing : is the spray angle ($^{\circ}$); W: is the spray width (cm, total number of full tubes with water* the distance between two adjacent grooves of the patternator); H: is the spray height (cm).

Statistical analysis

Data of spray volume were statistically analyzed using ANOVA tables¹².

RESULTS

Effect of the operating pressure on the nozzle flow rate

As shown in Figure 1, the actual nozzle flow rate values are according to operating pressure. The actual nozzle flow rate was significantly affected at different operating pressures. The results of the nozzle flow rate showed that as the working pressure increased from 2 bar to 5 bar, the nozzle flow rate increased from 0.34 to 0.58 l/min. This result agreed with⁹, which mentioned significant differences in a nozzle flow rate as a result of an increase in the operating pressure.

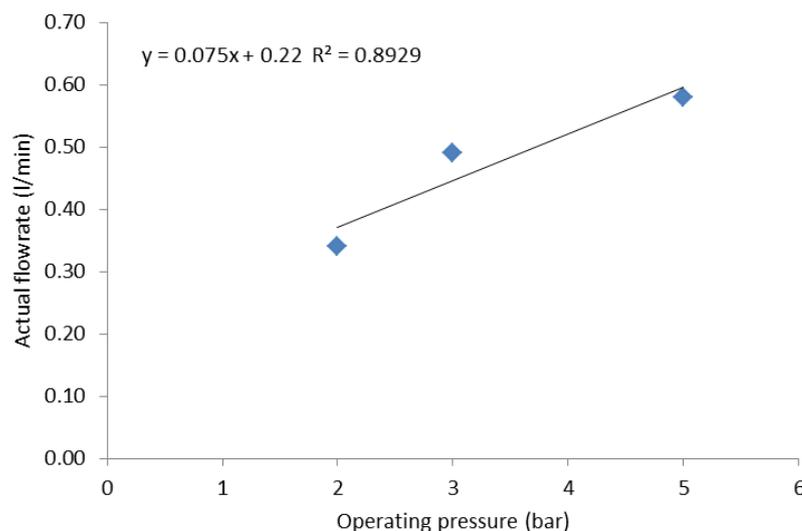


Figure 1. Nozzle flow rate values according to operating pressures.

Effect of operating pressure on spray application rate

Figure 2 shows that the spray application volume around the patternator is recovered by increasing the nozzle flow rate due to increased operating pressure. The amount in spray application rate (285.6 l/ha) was lowest for the operating pressure of 2 bar compared to other operating pressures. Meanwhile, the highest operating pressure (5 bar) results in a high spray application rate (474.94 l/ha). This result agreed with ⁹ due to the increase in nozzle flow rate while increasing operating pressure, thereby increasing the spray application rate.

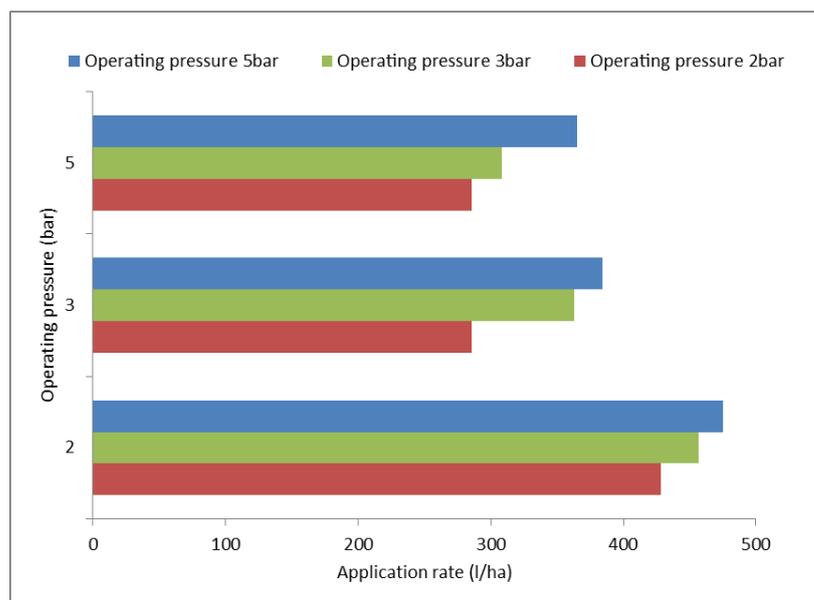


Figure 2. Application rate amount related to operating pressures.

Effect of spray height and operating pressure on spray width

Table 1 illustrates the recorded values for the spray width at different nozzle heights and operating pressures. The results of spray width were significantly affected by both spray height and working pressure. The outcomes of spray width showed that the spray width of the nozzle increased due to increasing the spraying nozzle height operating pressure, or both. It was also observed that the spray width varied from 50 to 100 cm, and the maximum spray width was recorded for a nozzle height of 75cm at an operating pressure of 5 bar. In addition, results in Table (1) showed that the spray width for the full hollow cone was increased from 50 to 80, from 75 to 95, and from 75 to 100cm by increasing the nozzle height from 25 to 75 cm at 2, 3, and 5 bar respectively. Also, the maximum spray width for the full hollow cone nozzle was 100 cm at 75 cm height and an operating pressure of 5 bar, while the minimum spray width was 50 cm at 25 cm nozzle height and pressure of 2 bar. This result agreed with ¹¹, showing that the spraying height and operating pressure were directly related to spray width.

Spray height (cm)	Operating pressure	Spray width (cm)
25	2	50
50	2	65
75	2	80
25	3	75
50	3	85
75	3	95
25	5	75
50	5	100
75	5	100

Table 1. Spray width is related to spray height and operating pressure.

Effect of spray height and operating pressure on the spray angle

The results of spray angles in Figure 3 indicated that spray height and operating pressure significantly affect the spray angles due to the differences in the spray width distribution.

Increasing spray height and operating pressure led to an increase in spray angle. Compared to other spray heights and operating pressures, a higher spray angle (90°) was measured at an operating pressure of 5 bar and a spray height of 75 cm. The smallest spray angle (41°) was measured at the spray height of 25 cm and operating pressure of 2bar compared to other treatments. This result agreed with ¹¹ due to increased spray width, height, and operating pressure.

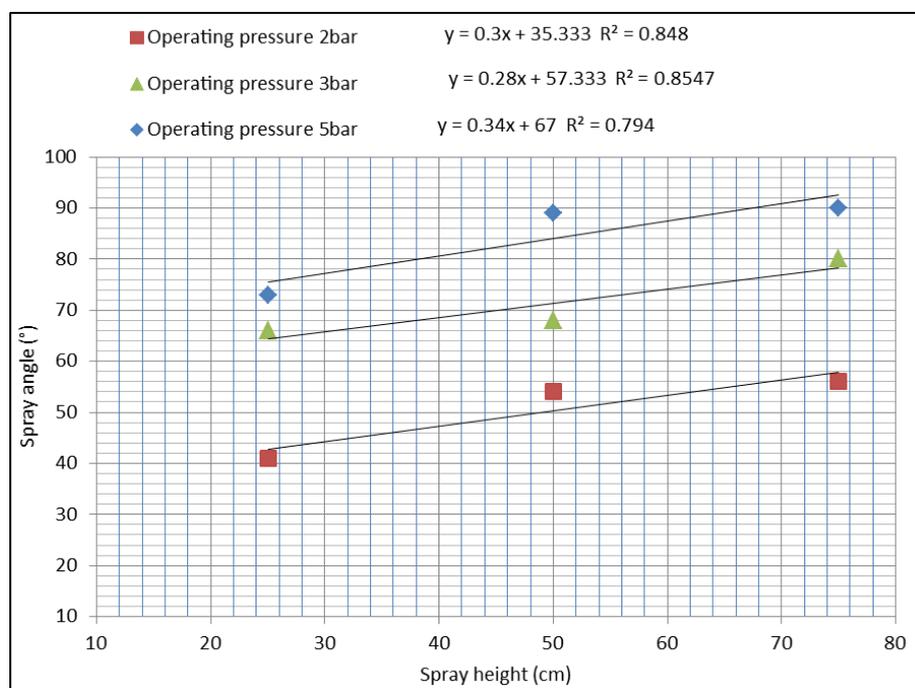


Figure 3. How do spray height and operating pressures affect spray angle.

Spray height (cm)	Operating pressure (bar)	Exposure time (sec)	Accumulated spray volume (ml)
25	2	10	72.67
50	2	10	65.33
75	2	10	37.75
25	3	10	99
50	3	10	83.67
75	3	10	64
25	5	10	198
50	5	10	107.33
75	5	10	93

Table 2. Amounts of spray volume at different operating conditions.

Effect of operating pressure and spray height on accumulated spray volume

Results in Table 2 revealed that a spray angle of more than 50° reduces the spray peak value under the orifice nozzle center. The results also appeared to increase the nozzle angle from 50 to 90° due to an increase in the spray height or operating pressure or an increase in spray width and the total amount of spray accumulated along the patternator. Using high operating pressure (5 bar) instead of the low operating pressure (2 bar) led to improved spray distribution on the grooves of the alternator and an increase in spray width and angle and an increase in accumulated spray volume. This outcome agreed with¹³, which mentioned the distribution of cumulative volumetric spray droplets influenced by nozzle characteristics and operating pressure.

DISCUSSION

This study is beneficial because it focuses on the effects of operating conditions such as operating pressure and spray height using a full hollow cone nozzle, considering that these factors are the most critical influences on spray droplet distribution at the time of spraying processes using any agricultural sprayers to improve the control efficacy and decrease pesticide costs and losses. The main findings of this study showed significant differences in the characteristics of the spray, such as spray width, spray angle, application rate, and accumulated volume deposits on the patternator using different nozzle heights and operating pressures. The spray characteristics were robustly correlated to the spray height and pressure. These results agreed with the previous studies^{4, 5, 9, 10}. The highest spray height and operating pressure mean the greatest spray width, angle, and accumulated spray volume according to^{9, 11, 13}.

CONCLUSIONS

The determination of spray characteristics using a full hollow cone nozzle was investigated under different spray heights and operating pressures. The findings showed that spray characteristics such as nozzle flow rate, application rate, spray width, angle, and accumulated volume were closely related to spray height and

operating pressure. The insufficient or excessive values of spray characteristics in the spraying application revealed that these values varied with the spray height or operating pressure or together.

Author Contributions: The conceptualization, Alheidary, M.; methodology, Alheidary, M.; software, Alheidary, M.; validation, Alheidary, M. and Hussain, A.; formal analysis, Alheidary, M.; investigation, Hussain, A.; resources, Hussain, A.; data curation, Alheidary, M.; writing—original draft preparation, Hussain, A. and Alheidary, M.; writing—review and editing, Alheidary, M.; visualization, Alheidary, M.; supervision, Alheidary, M.; project administration, Alheidary, M.; funding acquisition, Hussain, A.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Self-funding.

Acknowledgments: No organization or agency has provided financial assistance for this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Tudi M, Daniel Ruan H, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D, et al. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *IJERPH*. 2021;18:1112.
2. Singh K, Padhee D, Parmar AK, Sinha BL. Development of a solar-powered knapsack sprayer. *J. Pharmacogn. Phytochem*. 2018;7:1269–72.
3. Sumner PE. Soybean Sprayer Application and Calibration. The University of Georgia; 2009. Report No.: 8.
4. Ghanim, I. .; Ebrahim, S. E. . Preparing Of Bio-Cement Mortar By Using Bacillus Licheniformis Bacterial Cells. *JLSAR* 2022, 3, 23-29.
5. Foqué D, Nuyttens D. Effects of nozzle type and spray angle on spray deposition in ivy pot plants. *Pest Manag Sci*. 2011;67:199–208.
6. F. T. Al-Rawi, Y. T. Abdul-Rahaman , Abdullah I.Noaman , Th. T. Mohammed, S. M Abdulateef, Nadia Jebriil and KI. Mahmud. Role of ascorbic acid and appetite stimulants on a few blood serum biochemical characteristics in pregnant Iraqi ewes under heat stress. Al-Rawi F T, Abdul-Rahaman Y T, Noaman Revis Bionatura 2022;7(4) 6. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.6>.
7. Alheidary MH, Hamed DS, Jaber FN. Optimal efficacy of the essential nozzle characteristics and insecticide type for controlling cabbage aphids. *JCP*. 2021;10:511–22.
8. Agriculture College, Alheidary MHR. Performance of knapsack sprayer: effect of technological parameters on nanoparticles spray distribution. *IJETT*. 2017;46:199–207.
9. Abdul-Lateif, K. M. & Abdulateef, S. M. The effect of injecting hatching eggs with different concentrations of biotin on the quality and physiological characteristics of the hatched chicks. *Iraqi J. Vet. Sci*.2012, 26.
10. Alheidary MHR. Influence of nozzle type, working pressure, and their interaction on droplets quality using knapsack sprayer. *IQ J Agr Scs [Internet]*. 2019 [cited 2022 Aug 1];50. Available from: <http://jcoagri.uobaghdad.edu.iq/index.php/intro/article/view/702>

11. Sh. H. Fayyad, L., A. Sh. Al Shaheen, M. Effect Of Root Treatment With Mycorrhiza And Foliar Application With Moringa Leaf Extract On Npk Elements In Citrullus Colocynthis Leaves. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 124-132. doi: 10.32649/ajas.2023.179722.
12. Ali, H.H., AL-Rawi, K., Khalaf, Y., Alaaraji, S., Aldahham, B., Awad, M., Al-ani, O., Al-ani, F., Ali, A.T. Serum Caveolin-1 Level is Inversely Associated with Serum Vaspin, Visfatin, and HbA1c in Newly Diagnosed Men with Type-2 Diabetes. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 11 (2), pp. 299-309.
13. Cerruto E, Manetto G, Papa R, Longo D. Modelling Spray Pressure Effects on Droplet Size Distribution from Agricultural Nozzles. *Appl. Sci.* 2021;11:9283.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Hussain, A. K. ; Alheidary, M. H. Laboratory determination of spray characteristics using a full hollow cone nozzle at different heights and operating pressures. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 55. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.55>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

First report of *Alternaria alternata* associated with spot blotch of barley (*Hordeum vulgare*) in Iraq.

Itlal AlMasoodi¹, Zainab Hameed¹, Adnan Lahuf^{2,*}

¹ Department of Field Crops/Agriculture College/ University of Kerbala/ Karbala/ Iraq;
zainab.l@uokerbala.edu.iq.

² Department of Plant Protection/Agriculture College/ University of Kerbala/ Karbala/ Iraq;
adnan.lahuf@uokerbala.edu.iq..

* Correspondence: adnan.lahuf@uokerbala.edu.iq; Tel.: (008647810541064)

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.56>

ABSTRACT

A field survey was conducted during the barley growing season 2019 in the Karbala Province of Iraq. Barley plants with severe leaf spot symptoms were collected from several barley fields. The associated fungus was isolated and purified from those symptomatic leaves. The fungus colonies were aeriform mycelia in grey to black color. Conidia observed that they were light to dark brown and formed different-length chains. The causal agent was confirmed as *Alternaria alternata* via the PCR amplification and sequencing of the rDNA-ITS region, actA, and tef1 genes. Pathogenicity test showed that *A. alternata* isolated was pathogenic by producing light to dark brown spots on barley foliage. This is the first record of this pathogen causing *Alternaria* spot blotch on barley crops in Iraq.

Keywords: *Alternaria alternata*; leaf spot; *Hordeum vulgare*; Pathogenicity assessment; Phylogeny analysis.

INTRODUCTION

The Barley (*Hordeum vulgare* L.) is the fourth most common cereal crop after maize, rice, and wheat in the grass family Poaceae,¹. It is currently grown worldwide and can be grown in summer and winter in some temperate and subtropical regions;². Barley production worldwide in 2019 amounted to 142,910,932 tons, of which the Russian Federation continues to be the world's leading producer, 11,88 %, then France, at 7,83% and Germany at 6,70%. However, Iraq produced only 571,283 tons, representing 0.39% of global production³. Besides, the average production per hectare was low at 16062kgg/ha compared to the average of 67930.4kgg/ha in the top 10 producers,³.

Various abiotic and biotic stresses, including fungal diseases, can lead to a significant loss in different plant hosts, including barley crops,⁴. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl is one of those fungi that infect a broad range of hosts, including barley, and causes different diseases. For instance, it was reported to cause leaf spots on *Houttuynia cordata*,⁵ *Ipomoea purpurea*,⁶ and apricot,⁷. Furthermore, it was recorded infecting potatoes, lily and *Catharanthus roseus*, causing leaf blight,⁸⁻¹⁰.

The *Alternaria* genus comprises 299 species with a significant morphological variety,¹¹. Conventionally, the identification of these species is based on their cultural and morphological characterizations,¹². However, this identification is complex and needs to be improved for most *Alternaria* species¹². Thus, these morphological descriptions should be combined with molecular techniques for obtaining accurate and precise identification^{13,14}. Therefore, multiple DNA barcode genetic markers have been employed to detect, identify, and classify fungi comprising *Alternaria* species. For example, the internal transcribed spacer (ITS) region is a standard universal barcode applied successfully for fungal taxonomic differentiation and identification (add a

reference). As well as the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*), actin (*actA*), and DNA-directed RNA polymerase II (*rpb2*) genes are also frequently utilized for the same purpose,¹⁵. However, occasionally, for some species, a specific alternative barcode is needed for sufficient identification,¹⁶.

In Iraq, the etiology of spot blotch disease on barley has been rarely explored. Thus, the present study aimed to identify the fungus associated with this disease in Karbala province/ Iraq based on its morphological and molecular attributes.

MATERIALS AND METHODS

The Fungal isolation and morphological identification

In 2019, leaf samples of different barley varieties with typical spot blotch symptoms (Figure 1) were collected to determine the related causal agent. These samples were gathered from several barley fields in Al-Hussainiya territory (latitude 32°40'25.5" N and longitude 44°09'47.3 "E), Karbala Province, Iraq. The symptomatic leaves were cut into small pieces (1-1.5 cm long), their surfaces disinfected with 2% sodium hypochlorite solution for 2 minutes and rinsed three times with sterile distilled water. The sterilized leaf pieces were then placed on a water agar medium (WA) and incubated at 25+2 °C for three days. To obtain pure colonies, the hyphal tip of each colony that emerged was transferred to Petri dishes containing potato dextrose agar media (PDA) and incubated at 25+2 °C. After one week, the morphological characteristics of the fungal isolates were examined through microscopic observations using a HumaScope PremiumLED compound microscope with a Digital Camera 5 Megapixel attached (HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica Germany). The average length and width of conidia were obtained by random measurement of 50 conidia,^{17,18}.

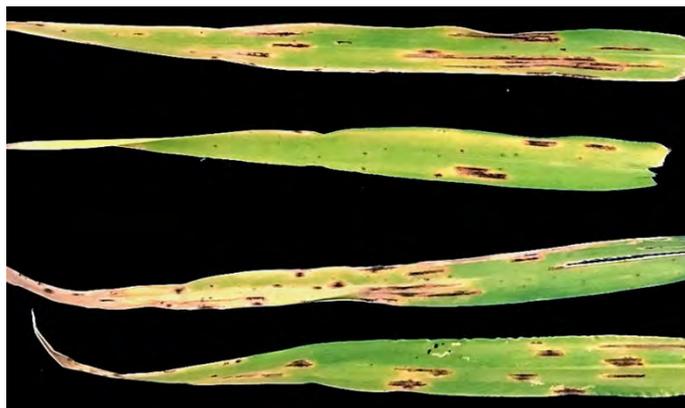


Figure 1. Typical symptoms of spot blotch on barley leaf samples.

Molecular characterization

The genomic DNA of the pure mycelia of seven-day-old colonies was extracted based on a developed protocol,¹⁹. The quality and quantity of DNA extracted were evaluated via NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Subsequently, Polymerase chain reaction (PCR) test was executed using the internal transcribed spacer regions (ITS) primers,²⁰ (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4: 5'-TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3'), partial actin (*actA*) gene primers,²¹ (ACT-512F: 5'-ATGTGCAAGGCCGTTTCGC-'3 and ACT-783R: 5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-'3), and partial translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) gene primers 21(EF1-728F'5-CATCGAGAAGTTCGA-GAAGG-'3 and EF1-986R: 5-TACTTGAAGGAACCCTTAC C-'3). The PCR amplicons of ITS, *actA* and *tef1* were sequenced employing their primers at Macrogen Inc. (Seoul, Korea; <http://www.macrogen.com>). Sequences were then edited via BioEdit version 7.0.5.3 and²² and compared by the nucleotide BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) software with the GenBank database sequences. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA-X,²³ using the maximum-likelihood model for the obtained ITS, *actA* and *tef1* sequenced,²⁴.

Pathogenicity assessment

The pathogenic potential of fungal isolates was verified on barley leaves of Al-Warkaa cv. Utilizing the detached leaf assay, ²⁵. A conidial suspension at a concentration of 2000 conidia per ml was prepared from 7-day-old pure cultures. A 50- μ l of this suspension was applied onto the adaxial side of each healthy leaf (n=12) that was surface disinfected with 70% ethanol. Other disinfected leaves were treated with distilled water only for control purposes. The treated leaves were then sited on moist tissues into plastic containers that were incubated at 25+2 °C in darkness and periodically observed until disease symptoms appeared. The fungal pathogen was re-isolated from spots blotch of inoculated leaves, and its morphological features were re-examined to complete Koch's postulates. The test was repeated twice to confirm the results obtained, ²⁶.

RESULTS

Morphological identification

A total of 20 fungal isolates were obtained consistently from the diseased barley leaves. However, no apparent differences in cultural or morphological characterizations were noticed among these isolates. At the beginning of the fungal development, the colony's growth on PDA was abundant airy mycelium in white-greyish color with light to dark green in internal areas extending from the colony's center. Laterally, the mycelium color converted to dark brown or dark olivaceous bounded with light grey mycelium. However, the colonies were dark brown to black on the reverse surface.

Furthermore, the microscopic analysis showed that the conidiophores were typically branched or simple, usually curved with a length of 12 to 15 μ m and a width of 4 to 6 μ m. Conidia (Figure 2) were pale to light brown and typically formed in branched chains of different shapes. They were generally ovoid, obclavate or ellipsoidal shape with an average length of 22–30 μ m and a width of 16–18 μ m developing a short conical beak at their tips and owned 2-5 transverse septa and 1-2 longitudinal septa. According to these characteristics, which agreed with the previous description¹², the fungus was initially identified as *A. alternata*.

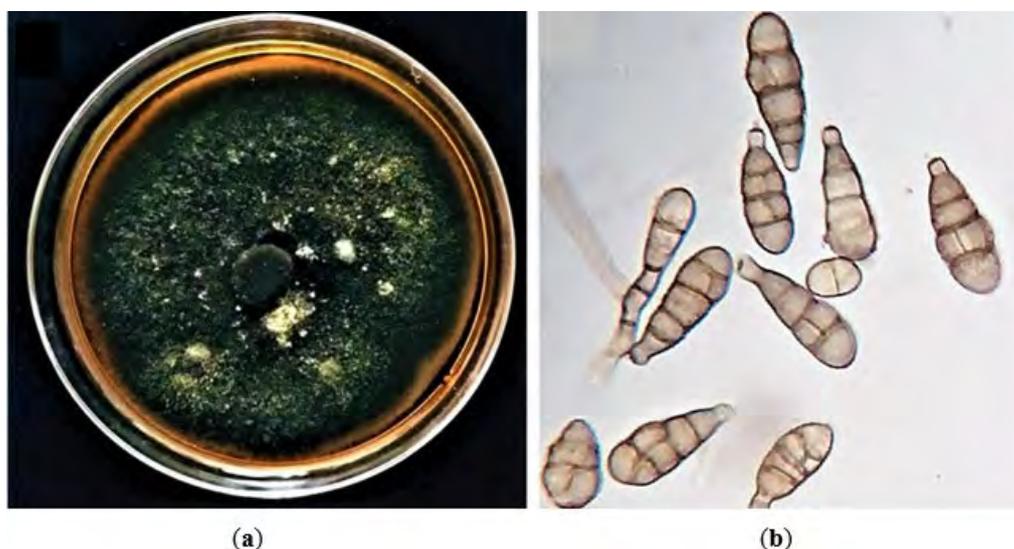


Figure 2. The culture and morphology of *A. alternata* were isolated in this study. (a) Colony morphology of the representative isolate, Alhusseiniya, cultured on PDA; (b) Microscopic observation of the *A. alternata* conidia.

Molecular characterization

The initial identification of the *A. alternata* isolated was confirmed through successful amplification and sequencing generated for the ITS region, *tef1* and *actA* genes, respectively. The BLAST analysis revealed 99-100% similarity of the sequences obtained in this study with those of numerous *A. alternata* isolates deposited in the GenBank database, as the phylogenetic analysis confirmed the identification of this species by clustering it with other references of *A. alternata* in the three genetic markers (Figure. 3,4,5). Accordingly, they were

deposited in the GenBank and had specific accession numbers (ITS-MT874979.1; TEF1-MT875391.1; actA-MT875390.1).

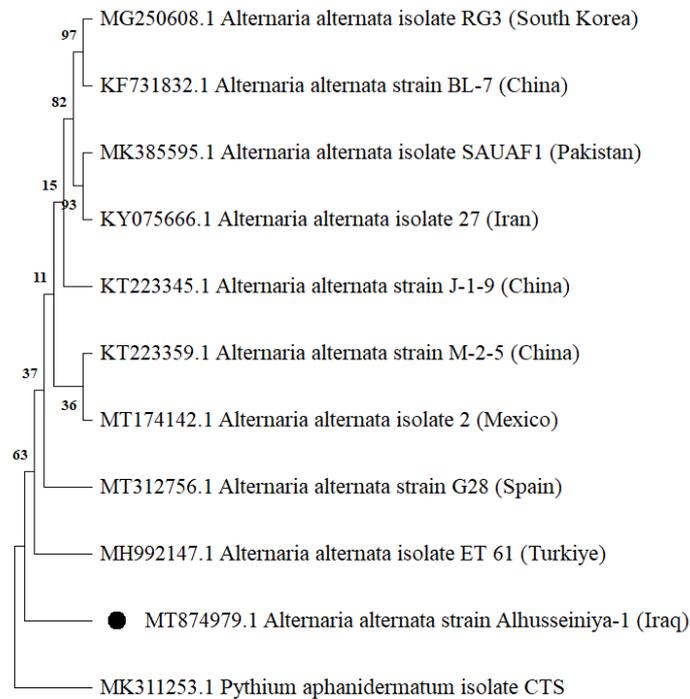


Figure 3. Phylogenetic tree created by neighbor-joining process gathered from ITS-rDNA region sequences presenting the relationships among isolates of *A. alternata* isolate Alhusseiniya-1 (indicated with a black dot) and related *Alternaria* species. The out-group fungus is *Pythium aphanidermatum*.

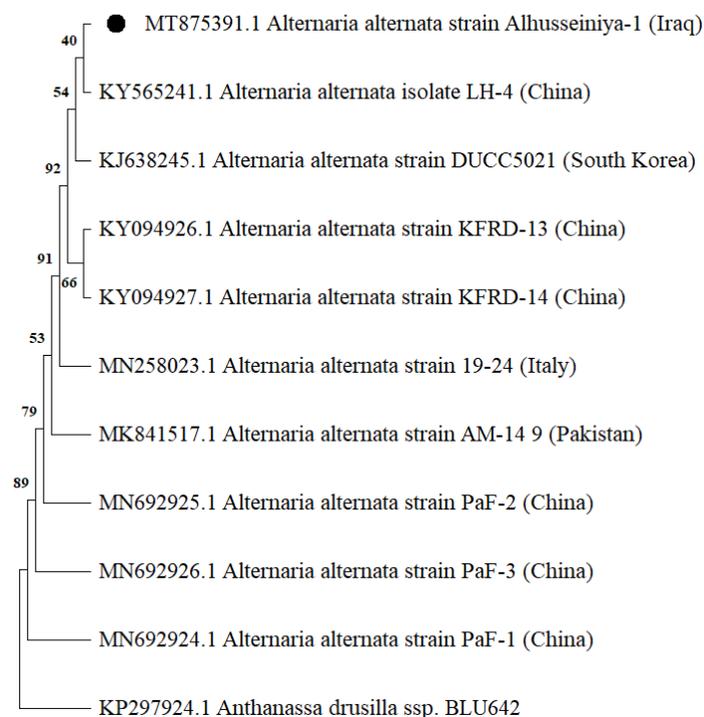


Figure 4. The phylogenetic tree produced by the neighbor-joining procedure collected from *tef1* gene sequences displays the relationships among isolates of *A. alternata* isolate Alhusseiniya-1 (indicated with a black dot) and related *Alternaria* species. The out-group fungus is *Anthanassa drusilla*.

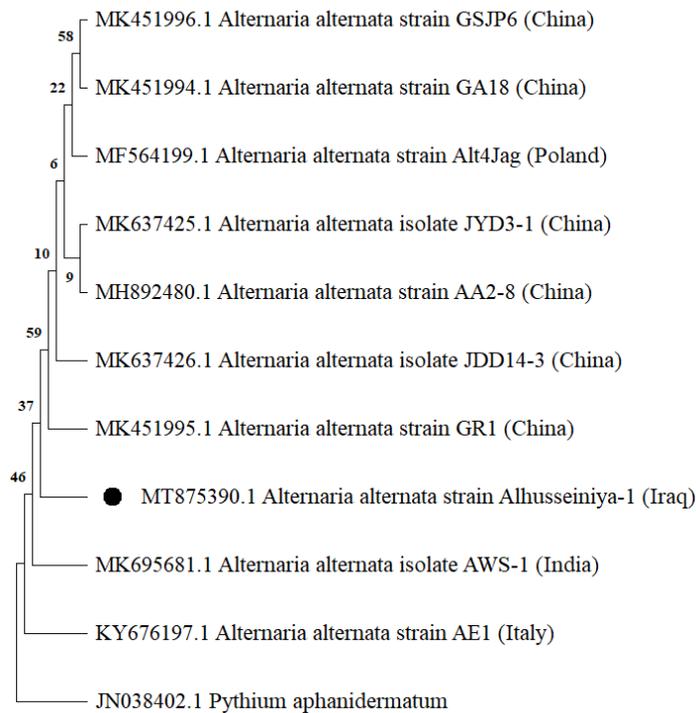


Figure 5. Phylogenetic tree constructed by neighbor-joining procedure collected from *actA* gene sequences showing the relationships among isolates of *A. alternata* isolate Alhusseiniya-1 (indicated with a black dot) and related *Alternaria* species. The out-group fungus is *Pythium aphanidermatum*.

Pathogenicity assessment

The *A. alternata* isolate Alhusseiniya tested was pathogenic, producing symptoms on the detached leaves (Figure 6) starting after about one week. The typical symptoms initially appeared as small brown necrotic lesions that subsequently extended to be more prominent in oval shapes with distinct chlorotic or straw-color edges. These lesions ultimately combined and caused the drying of leaves. However, control leaves did not develop any disease symptoms. The fungal pathogen was re-isolated from the symptomatic barley leaves, and the microscopic observation demonstrated that its morphological features were similar to those of the initially obtained isolate.



Figure 6. Pathogenicity test on barley leaf. The inoculated leaf showed typical symptoms after 14 days post-inoculation.

DISCUSSION

In this study, *A. alternata* isolate Alhuseiniya isolated from barley leaves was identified based on its morphological, molecular, and pathogenicity characteristics. *A. alternata* is supposed to be worldwide distributed, causing various plant diseases such as root rots, blights and leaf spots on a wide range of host plants,⁵⁻¹⁰. To distinguish *Alternaria* spp., morphological characters comprising sizes and shapes of conidia and chain formation are categorized the genus into 14 species,¹². However, diverse morphologic flexibility has been observed among *Alternaria* spp due to the influence of numerous factors such as temperature, light and humidity. As well as, an extensive morphological variation of septation number, shape, color, and size of conidia was based on differentiation in conidium age,¹². Therefore, identifying *Alternaria* species based on their morphological features is complex, insufficient, and inaccurate. Due to these limitations, several molecular methods were suggested to be applied besides morphological characterizations for accurately identifying *Alternaria* species and other microorganisms,^{13,23}.

The sequencing of numerous universal genetic barcodes besides morphological traits has been used successfully in identifying *Alternaria* spp—pathogens, including *A. alternata*. For example, *A. alternata* causing leaf spots on quince trees and *Rehmannia glutinosa* plants was identified relying on the morphological characterizations and sequencing of the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*), internal transcribed spacer (ITS), actin (*actA*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, RNA polymerase II second largest subunit, major allergen Alt a 1 gene, endopolygalacturonase gene and anonymous gene region,²⁷. The sequences of the Internal transcribed spacer and β -tubulin were utilized in identifying the same species causing fruit Rot of opium poppy and black spots on pink lapacho,²⁸.

The pathogenicity assessment proved that *A. alternata* isolates Alhuseiniya were pathogenic to this crop by producing varying spot blotch symptoms. The disease incidence was estimated to be around 20-30% in all barley fields surveyed in the Alhuseiniya region of Karbala province, where the disease was noticed. However, previous studies have recorded *A. alternata* associated with different diseases on various crops,²⁹. It has been reported only as one of the causal agents of spot blotch disease on barley crops,³⁰. However, this research's findings and prior reports suggest the polyphagous aspect of this species and its adaptation to more significant geographic regions. The leaf spot blotch disease of barley caused by *A. alternata* is occurring in Karbala province and possibly in barley-producing regions of Iraq. However, it was undetected by the farmers until it was reported in the present study. Thus, this is the first record of *A. alternata* causing spot blotch on barley in Iraq. This discovery is highly significant regarding the fungal epidemiology and management of the disease using new control and management methods that were proved to be efficient against various plant pathogens such as biological agents and nanoparticles,³¹⁻³³.

CONCLUSIONS

In this study, the etiology of spot blotch disease on barley crops has been identified as the fungus *A. alternata* for the first time in Iraq. This identification was based on the fungal pathogen's morphological, molecular and pathogenicity characteristics.

Author Contributions: Conceptualization and methodology, A. L.; investigation, Z. H.; resources and writing—original draft preparation, I. A.; writing—review and editing, Z. H.; visualization, I. A. and Z. H.; supervision and project administration, A. L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Data supporting these reported results can be found at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT874979.1>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT875391.1>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT875390.1>

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge the administrative support by the Department of Plant Protection, Agriculture College, and the University of Kerbala.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Stein, N. ; Muehlbauer, G. J. *The Barley Genome*; Springer International Publishing: Gewerbestrasse, Switzerland, 2018;pp.1-430.
2. Ullrich, S. E. *Barley production, improvement, and uses*; John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, UK,2011; pp. 1-300.
3. FAO. Food and Agriculture Organization. The database of annual production. FAOSTAT. Statistical database. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (accessed on 25 September 2021).
4. Lahuf, A. A. First report of *Fusarium proliferatum* causing stem and root rot on lucky bamboo (*Dracaena braunii*) in Iraq. *Hell. Plant Prot. J.* **2019**, *12* (1),1-5. <https://doi.org/10.2478/hppj-2019-0001>.
5. Zheng, L. ; Lv, R. ; Li, Q.; Huang, J.; Wang, Y.; Hsiang, T. First report of leaf spot of houttuynia cordata caused by *Alternaria alternata* in China. *Plant Dis.* **2011**, *95*, 3. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-10-0724>.
6. Yang, Q. Q. ; Zhou, S. Y. ; Liang, W. X.; Li, L. First Report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on Ipomoea purpurea in China. *Plant Dis.* **2017**, *102*, 2. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1278-PDN>.
7. Hameed, Z. L.; Lahuf, A. A. ; Jasim, M. T.; Mohsen, H. M. ; Kadim, B. J. ; Saleh, S. A. ; Mohamed, A.F. First Report of *Alternaria Alternata* causing brown leaf spot on apricot (*Prunus Armeniaca*) in Karbala Province of Iraq. *Earth Environ. Sci.* **2021**, *910*, 012080. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/910/1/012080>.
8. Van Der Waals, J.E.; Pitsi, B.E.; Marais, C.; Wairuri, C.K. First report of *Alternaria alternata* causing leaf blight of potatoes in South Africa. *Plant Dis.***2011**, *95*, 363-363. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-10-0820>.
9. Lahuf, A. A.; Abdalmoohsin, R. A. G.; Alhusani, A. H.; Al-Asadi, A. First report of leaf blight disease in lily (*Lilium candidum*) caused by *Alternaria alternata* in Iraq. *Biopestic. Int.* **2018**, *14* (2), 123-126.
10. Lahuf, A. A. *Alternaria alternata* causes leaf blight of rosy periwinkle (*Catharanthus roseus*) in Iraq. *Aust. Plant Dis. Not.* **2019**, *14*:4.<https://doi.org/10.1007/s13314-019-0334-9>.
11. Lahuf, A. A.; Abdullah, K. M.; Mohammadali, M. T. Assessment of the nanosized particles of ZnO and MgO and some cultivars in control of *Alternaria solani* causing tomato early blight. *Ecol. Environ. Conserv.* **2020**, *26*, 89-95.
12. Simmons, E.G. *Alternaria. An Identification Manual*, CBS Biodiversity Series 6.; CBS Fungal Biodiversity Centre: Utrecht, The Netherlands, 2007. pp.22-39.
13. Shehan, S.J.; Abdalmoohsin, R.G.; Lahuf, A.A. First report of *Ectophoma multirostrata* causing root rot of Celosia argentea in Iraq. *New Dis. Rep.* **2022**, *46*, e12126. <https://doi.org/10.1002/ndr2.12126>.
14. Bajinka, O. ; Secka, O. Integration of Molecular Methods into Microbiological Diagnostics. *Appli. Micro.* **2017**, *3*, 130.
15. Noaman A I, Khalaf R M, Emad GH, Al-Abbasy, Mohammed Th. T. Effect of flaxseed oil dosing on fertility, growth characteristics and some physical, biochemical, and hormonal blood parameters during the early pregnancy of Awassi ewes. *Revis Bionatura.* 2022;7(4) 5. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.5>.

16. Jaber, M.H.; Lahuf, A.A. Survey, pathogenicity and molecular identification of novel *Fusarium* species causing seed decay and damping-off disease of wheat crop in Kerbala Province, Iraq. *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* **2020**, *21*, 1–14.
17. AL-Musawi, M. A. ; Lahuf, A. A.; Jafar, O. H . Isolation and diagnosis of the pathogens causing seed decay and damping-off disease on wheat and control them using some biological and chemical factors. *Journal of Kerbala for Agricultural Sciences* **2017**, *4* (1), 113-132. <https://doi.org/10.59658/jkas.v4i1.88>.
18. Lahuf, A. A.; Jaafar, O. H.; Al-mosoy, M.; Hameed, Z. L. First record of the crown rot fungus *Fusarium equiseti* affecting *Triticum aestivum* L. and *Aptenia cordifolia* in Iraq. *Asian J. Agric. Biol.* **2018**, *6* (4), 543-548.
19. Sh. Al-Obaidy, G., F. Abdulrahman, M., Sh. J. Alobaidy, B. Future Trends For Green Environmental Applications Of Nanotechnology: A Review. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; *21*(1): 133-147. doi: 10.32649/ajas.2023.179725.
20. White, T.; Bruns, T. ; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocol: a guide to methods and applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., Eds.; Academic Press: San Diego, USA, 1990.pp.22-34.
21. Al-Tememe, Z.A.M.; Lahuf, A.; Abdalmoohsin, R.G.; Al-Amirry, A.T. Occurrence, identification, pathogenicity and control of *Neoscytalidium dimidiatum* fungus, the causal agent of sooty canker on *Eucalyptus camaldulensis* in Kerbala Province of Iraq. *Plant Arch.* **2019**, *19*, 31–38.
22. Hall, T.A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. No. 41. *Nucleic Acids Symposium Series* **1999**, *41*, 95–98.
23. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *33*, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
24. Zain, H.; Tatar , A.; Alabi, O. M. .; Samiei Zafarghandi, M. . The Effect Of Using Different Levels Of Vitamin E On The Antioxidants Status Of Broiler Chickens. *JLSAR* 2023, *4*, 37-44.
25. Akhtar, K.P.; Sarwar, N.; Saleem, M.Y.; Asghar, M. *Convolvulus arvensis*, a new host for *Alternaria solani* causing early blight of *Solanum lycopersicum* in Pakistan. *Aust. Plant Dis. Not.* **2011**, *6*(1), 84–86. <https://doi.org/10.1007/s13314-011-0029-3>.
26. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>.
27. Guo, L.; He, S.; Gao, Z.; Wu, Z.; Duan, R.; Yang, K.; He, X. First report of fruit rot in opium poppy (*Papaver somniferum* L.) caused by *Alternaria alternata* in China. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 3264-3264. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0211-PDN>.
28. Ali, H.H., AL-Rawi, K., Khalaf, Y., Alaaraji, S., Aldahham, B., Awad, M., Al-ani, O., Al-ani, F., Ali, A.T. Serum Caveolin-1 Level is Inversely Associated with Serum Vaspin, Visfatin, and HbA1c in Newly Diagnosed Men with Type-2 Diabetes (2022) *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, *11* (2), pp. 299-309.
29. Ramakant, R.; Joshi, P.; Bhandari, M.S.; Pandey, A.; Pandey, S. Identification and pathogenicity of *Alternaria alternata* causing leaf spot and blight disease of *Ailanthus excelsa* in India. *For. Pathol.* **2019**, *00*:e12584. <https://doi.org/10.1111/efp.12584>.

30. Aada, A. M. M. A. Identification of pathogens and control of spot blotch disease of barley (*Hordeum vulgare*) by combining plant resistance and biological control. A PhD. Thesis, Newcastle University, Newcastle, UK. 2013.
31. Lahuf, AA; Kareem, A.A.; Al-Sweedi, T.M.; Alfarttoosi, H.A. Evaluation the potential of indigenous biocontrol agent *Trichoderma harzianum* and its interactive effect with nanosized ZnO particles against the sunflower damping-off pathogen, *Rhizoctonia solani*. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ.* **2019**, 365, 012011. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/365/1/012033>
32. Lahuf, A.A.; Alfarttoosi, H.A.; Al-Sweedi, T.M.; Middlefell-Williams, J.E. Evaluation of an integration between the nanosized zinc oxide and two cultivars for the control of damping-off disease in sunflower crop. *Res. Crops.* **2019**, 20,1,174–179. <https://doi.org/10.31830/2348-7542.2019.024>.
33. Abdulmoohsin, R. G.; Lahuf, A. A.; Husain, Y. N.; Hameed, Z. L. Bioefficiency of some indigenous biocontrol agents against *Rhizoctonia solani* causing cowpea seed rot and preemergence damping-off. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **2019**, 388, 012011. <https://doi.org/doi:10.1088/1755-1315/388/1/012011>.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: AlMasoodi, I; Hameed, Z; Lahuf, A. First report of *Alternaria alternata* associated with spot blotch of barley (*Hordeum vulgare*) in Iraq. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 56.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.56>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Efficiency and economic feasibility of using Neonicotinoids against Flat-headed borer *Chrysobothris affinis* (Fabricius, 1794) (Buprestidae: Coleoptera) infesting Jujube orchards in Basra Province, Iraq

Mohammed M. Alderawii¹, Aqeel Alyousuf^{ID}^{2*}

¹ Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq 1; agripg.mohammed.mahdi@uobasrah.edu.iq.

² Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq 2;

* Correspondence: aqeel.alyousuf@okstate.edu.

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.57>

ABSTRACT

A field study evaluated the efficiency and economic feasibility of using three Neonicotinoids to control Flat-headed borers infesting Jujube orchards in Basra Province during 2020 and 2021. The insecticides tested were Acetamiprid, Imidacloprid and Thiamethoxam, with recommended field application rates. This study showed that Acetamiprid and Imidacloprid provided the best protection to jujube trees, reflected in the high average efficiency (88.70% and 93.40%, respectively). Acetamiprid and Thiamethoxam enhanced the production, with an average of 60.10 and 60.00 kg/tree, respectively, compared to 39.50 kg of the check trees. Thus, the study showed the highest economic return from controlling the flat-headed borers using Acetamiprid and Thiamethoxam (5714900 and 5676500 dinars/ dunum, respectively). In contrast, the economic returns of Imidacloprid were 5082900 Iraqi dinars/ dunum. These results confirmed that the high economic feasibility was related to the efficacy of the low-cost insecticides in reducing the fruit infestation rate and increasing the yield.

Keywords: Buprestidae; Insecticides; flat-headed borers; Economic visibility; Neonicotinoids.

INTRODUCTION

Jujube tree (*Ziziphus* spp., Family: Rhamnaceae) is an evergreen fruit tree that grows in tropical, subtropical and warm temperate regions¹. There are many cultivars in Iraq, including Tuffahi, Zaitooni and Hindi (*Z. mauritiana*), and Bambawi, Malasi and wild cultivars (*Z. spinachristi*)². Jujube plantations spread mainly in the central and southern regions of Iraq; recently, they have been planted on a large scale in Basra Province due to the economic importance of these trees to smallholder farmers; there are around 146,720 trees in an area of 5,675 Iraqi dunams (Department of Horticulture-Basra, Ministry of Agriculture, 2021). The Tuffahi cultivar is the most desirable to consumers and farmers due to its high productivity and good fruit quality.³ The fruit of these trees is distinguished by its high nutritional value, as it contains many carbohydrates, ascorbic acid (vitamin C), and amino acids.^{3,4}

Jujube trees are affected by several pests causing economic damage, such as *Tarucus rosaceus* (Lycaenidae: Lepidoptera)⁵, and Jujube fruit fly *Carpomya incomplete* and *C. vesuviana* (Tephritidae: Diptera), which leads to fruit damage and fall, and consequently the lack of production as a result of infestation⁶. In recent years, Jujube trees have been infested with flat-headed borers *Chrysobothris affinis* (Buprestidae: Coleoptera) in Basra Province; this important pest caused significant economic damage to the trees⁷.

Flat-headed borers infested more than 700 species of trees in North America⁸. These beetles attack the trunks of fruit, shade and ornamental trees, causing significant economic losses; it can cause a rapid decline in economically significant trees during severe infestations^{9,10}. Most flathead borers can survive in the cold winter, as the glycerin accumulates in the larvae; the insect has one generation per year^{11,12}.

Flat-headed borers infesting different host trees are controlled by several insecticides, such as pyrethroids^{13,14} and Neonicotinoids, which can reduce the damage of the infestations¹⁴. Neonicotinoid Insecticides are very applicable in controlling flat-headed borers; they can be effectively sprayed or soil-treated, including pellets, seed dressing, or injection¹⁵; several Neonicotinoids, such as Imidacloprid, against several borers, such as the flat-headed apple-tree borer, *Chrysobothris femorata* (Olivier)¹⁶. Also, Soil-treated insecticides (Imidacloprid and Thiamethoxam) were used against *C. femorata* (Olivier) infesting red maple (*Acer rubrum* L.)¹³. Neonicotinoids are systemic pesticides that move between plant tissues and provide protection for all parts of the plant; the mode of action of these insecticides includes the ability to bind with Nicotine Acetylcholine receptors (nAChRs), causing failure of the transmission of nerve impulses, paralysis and death within a few hours^{17,18}. This study aimed to assess the efficiency of neonicotinoids against flat-headed borers infesting Jujube orchards and determine the economic feasibility of using these insecticides.

MATERIALS AND METHODS

Description of the Experiment Site

The experiment was carried out in seven orchards planted with Jujube trees in the Shatt Al-Arab district, southeast of Basra province (E 65932 N 87892, E 65975 N 87797, E 66041 N 87652, E66139 N 87916, E 66192 N 87835, E 66216 N 87717, E 65992 N 87734). Each orchard has 4 dunums; the Jujube tree cultivar (Tuffahi) is identical in size, age, and irrigation method. Each dunum contains 80 Jujube trees, and the distance between one tree and another is 4 meters.

Insecticides

Three Neonicotinoid insecticides (Acetamiprid, Imidacloprid and Thiamethoxam) were applied in two ways: spraying and soil drenching (Table 1) two times (10/5/2021 and 10/6/2021). Each insecticide was applied individually in different orchards. Overall, six treatments (3 insecticides and 2 applications) and the check treatment were carried out individually at the seven above private orchards. The spraying application was done using a 100-liter sprayer (Turkish-made), and the homogeneity of the spraying process was considered on all parts of the tree so that the spray covered all parts at a rate of 10-15 liters of solution per tree. However, a 20-liter watering plastic can was used in the soil drench treatments; to increase the efficiency of the pesticide absorption process, basins were made surrounding the trees to ensure the spread of the pesticide solution on all the tree roots.

Chemical name	Trade name	active ingredient % a.i	Formulation	Concentration of formulation (ml or g/ L)	Price (ID/ 1 L or Kg)	Company
Acetamiprid	Mospilan	20	S.P.	50	70000	Nippon Soda
Imidacloprid	Confidor	20	SL	50	100000	Bayer
Thiamethoxam	Actara	25	G.P.	50	80000	Syngenta

Table 1. Neonicotinoid insecticides used in the study and the use rate to control flat-headed borers.

Data Collection

Ten jujube trees in each orchard were sampled at the end of the growing season of 2020 and 2021. The infestation rates of flat-headed borers (*C. affinis*) were recorded in each Jujube orchard (treatment). The infestation rate (equation 1) of the pest was determined based on the symptoms of infestation on the trees (the presence of holes, dead branches, the presence of traces and feeding tunnels for larvae and gummy secretions), as well as cutting the branches that have symptoms and dissecting them and noting the presence of larvae inside the branches. The insecticide efficiency was calculated according to the Henderson-Tilton formula (2)

$$\text{Infestation rate} = \frac{\text{The number of infested trees}}{\text{Total number of trees}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Corrected \%} = \left(1 - \frac{n \text{ in Co before application} \times n \text{ in T after application}}{n \text{ in Co after application} \times n \text{ in T before application}}\right) \times 100 \quad (2)$$

Where, n = insect population, T= Treated, Co= control

Calculating the economic feasibility of using the pesticide

The production cost was calculated as follows:

The productivity of one dunum was calculated without the costs of application, harvesting and marketing by randomly selecting the productivity of 5 trees from each treated orchard and untreated orchard.

$$\text{The productivity of a dunum without control cost average production of one tree} \times \text{number of Jujube trees per dunum} \times \text{average price of one kilogram during the season} \quad (3)$$

Estimation of the cost of flat-headed borer's control:

The costs of the control process were calculated for each treatment according to the ¹⁹⁻²¹ method; the price of the insecticide was calculated as follows:

$$\text{Cost of insecticide applied (Quantity of insecticide applied (L) X insecticide concentration for 100 L of water X price of 1 g or ml of the insecticide) / 100} \quad (4)$$

The cost of inputs related to control for each application, including labor wages, was 50,000 Iraqi dinars for controlling 4 dunums, in addition to the cost of a 100 litres-sprayer of 10,000 Iraqi dinars.

The cost of inputs unrelated to control, including harvesting and transportation wages, was calculated using the following equation:

$$\text{Cost of inputs unrelated to control} = \text{Cost of harvesting} + \text{Cost of transportation} \quad (5)$$

The worker's wages = 25,000 Iraqi dinars/day; the cost of transporting 1000 kg of fruits = 50000 Iraqi dinars.

The average price of one kilogram of Jujube fruits of a Tuffahi Cultivar from the beginning to the end of the season is 4000 Iraqi dinars.

The economic return of using the insecticide per dunum was calculated according to the following equation:

$$\begin{aligned} \text{Economic return} &= \text{Yield_Price per controlled dunum} - (\text{the cost of the insecticide application} \\ &+ \text{Yield_Price per check dunum}) \end{aligned} \quad (6)$$

Statistical analysis

The data were tested using analysis of variance (ANOVA), and means were compared using a Least Significant Difference (L.S.D.) test at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Efficiency of Insecticide

The results of Table (2) showed that there were significant differences in the efficiency of the insecticides against flat-headed borers infesting jujube trees; the highest rate of efficiency was 93.40% of Imidacloprid, followed by Acetamiprid and Thiamethoxam with a rate of 88.70% and 83.30%. Also, the results indicated no significant differences between the application ways (spraying and soil drenching).

Insecticide	Efficiency of Insecticide %		Mean
	Spraying	Soil drench	
Acetamiprid	84.00±3.71	82.70±5.39	83.35±4.51
Imidacloprid	91.90±3.55	94.80±3.11	93.40±3.28
Thiamethoxam	87.60±7.14	89.8±3.82	88.7±5.59
Mean	87.80±5.01	89.1±4.37	
L. S. D (0.05)	NS		9.36

Interaction (insecticide X application) = N.S.

Table 2. Efficiency of Neonicotinoid insecticides against flat-headed borers.

Production

The results of Table (3) showed that there were significant differences between the productivity of the controlled Jujube trees compared to the check trees; the highest rate of production per tree for the pesticide Acetamiprid and Thiamethoxam were 60.10 and 60.00 kg/tree, respectively; however, the production of the trees controlled by Imidacloprid was 58.10 kg/tree, compared to 39.50 kg of the check trees; the results also

showed that there were no significant differences in the productivity of trees depending on the application ways (spraying and Soil-drench); The production of the trees were 55.60 and 53.25 kg/tree, respectively.

Insecticide	Production (Kg/tree)		Mean
	Spraying	Soil drench	
Acetamiprid	62.00±1.52	58.20±1.77	60.10±1.79
Imidacloprid	53.80±3.02	62.40±3.34	58.10±3.21
Thiamethoxam	61.20±1.59	58.80±1.68	60.00±1.65
Check	45.40±3.40	33.60±2.56	39.50±3.08
Mean	55.60±4.45	53.25±4.95	
L. S. D (0.05)	2.014		2.848

Interaction (insecticide X application) = 4.028

Table 3. Shows the productivity of trees in the treated and untreated jujube orchards.

Economic Feasibility

Results of the economic feasibility of using neonicotinoids against flat-headed borers infesting Jujube orchards (Table 4) indicated Imidacloprid recorded the highest cost of pest control, with an average of 97,500 Iraqi dinars per dunum, followed by Thiamethoxam and Acetamiprid, with an average of 81,500 and 73,500 Iraqi dinars per dunum, respectively. The study also showed that the highest economic return resulting from controlling the borer using Acetamiprid (5714900 dinars/ dunum), while the economic returns of Thiamethoxam and Imidacloprid were 5676500 and 5082900 Iraqi dinars/ dunum, respectively.

Insecticide	Insecticide efficiency (%)	Cost of insecticide/ 2 seasons	Application frequency	Application Cost (I.D.)	Production (kg/dunum)	Yield_ Price (I.D./dunum)	Economic return (I.D./dunum)
Acetamiprid	83.35	56,000	2	73,500	4808	19,232,000	5,714,900
Imidacloprid	93.40	80,000	2	97,500	4648	18,592,000	5,082,900
Thiamethoxam	88.70	64,000	2	81,500	4800	19,200,000	5,676,500
Check					3160	12,640,000	

Table 4. Economic feasibility of neonicotinoids-controlled flat-headed borers infesting Jujube orchards.

DISCUSSION

Determining the efficiency and net benefit of insecticide usage is fundamental to optimum use decisions and, therefore, insecticide regulation. The pest control frameworks provide an exciting pattern to model the economic feasibility of insecticides that are kept in practical work. Due to the previously slight concurrence regarding the right state of the pest control procedure, economists must work with entomologists to reach suitable usable forms that determine pest control and net benefits. In this study, the efficacy and economic feasibility of three Neonicotinoids (Acetamiprid Imidacloprid and Thiamethoxam) against flat-headed borers infesting Jujube trees was investigated; all the applied Neonicotinoids were efficient in decreasing the infestation rates of the borer on Jujube orchards. The highest production rates per tree were recorded for the pesticides Acetamiprid and Thiamethoxam; however, the lowest production was noticed on the trees controlled by Imidacloprid compared to the check trees. Imidacloprid recorded the highest cost of borer's

control, while the low-cost insecticide was Acetamiprid; however, the highest economic return resulting from controlling the borer using Acetamiprid, while Imidacloprid caused the lowest economic returns.

Many studies indicated the efficiency of Imidacloprid against different flat-headed borers; the flat-headed apple-tree borer, *C. femorata* (Olivier), was controlled by using Imidacloprid; this study indicated that this insecticide would be sufficiently compelling to uptake from the soil treatment and thus be well protected from flat-headed borer attack¹⁶. Also, soil-drench Neonicotinoids Imidacloprid and Thiamethoxam can support multi-year *C. femorata* management, increasing maple tree growth¹⁴. Neonicotinoids are systemic insecticides that protect plants from pests²² due to their ability to transfer mainly through tissue Xylem, and the systemic properties of these pesticides give the ability to be distributed evenly in all parts of the plant^{23,24}.

The insecticide group is used to control insect pests by applying (soil treatment) or by spraying the vegetative parts; they are characterized by their systemic properties protecting treated plants for sufficient time; they work as contact and stomach poisons²⁵. Although there were no significant differences between the application ways (spraying and soil-drench) of the insecticides depending on the results of this investigation, some studies indicated the disadvantages of tree sprays are that they must be treated at least two times annually. However, soil application-neonicotinoid could be applied only once at the start of the growing season¹⁴.

CONCLUSIONS

The study showed that Neonicotinoids could be effectively sprayed or soil-treated against the flat-headed borers infesting Jujube orchards in Basra Province; Acetamiprid had a high rate of efficiency, reducing the damage of the infestation of the borer and increasing the production. That is reflected in the highest economic return resulting from controlling the borers. These results confirmed that the high economic feasibility was related to the efficacy of the low-cost insecticides in reducing the fruit infestation rate and increasing the yield.

Author Contributions: Conceptualization, A.M.M. and A.A.; methodology, A.M.M. and A.A.; software, A.M.M.; validation, A.M.M. and A.A.; formal analysis, A.M.M. and A.A.; investigation, A.M.M. and A.A.; resources, A.M.M. and A.A.; data curation, A.M.M.; writing—original draft preparation, A.M.M.; writing—review and editing, A.A.; visualization, A.A.; supervision, A.A.; project administration, A.A. Both authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments: The authors are very much thankful to the staff of the Natural History Museum at the University of Baghdad for confirming the I.D. of the species. Also, the authors thank the growers who let us conduct this study in their orchards.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

REFERENCES

- 1 San, B.; Yildirim, A. N. Phenolic, alpha-tocopherol, beta-carotene and fatty acid composition of four promising jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) selections. *J Food Compost Anal* 2010, **23**, 706-710.
- 2 Odeh A, Abdalmoohsin RG, AL-Abedy AN. Molecular identification of *Fusarium brachygibbosum* and some isolates of *Trichoderma* spp. *Int. J. Pharmaceut. Res.* 2021 1 January;13(1):1390-6.

- 3 Altaha , A. M.; Al – Sareh , E. A. ; Ibrahim , M. A. Yield , annual profit and fruit development , Tufahi jujube cultivar *Ziziphus mauritiana* lam. *Basrah Journal of Agricultural Science*, 2006, **19**, 1-9.
- 4 Abbas , M. F. jujube . In : Post harvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits (Mitra , K. S. ed.) C.A.B. *International , Oxford , England , 1997*, 405-415.
- 5 Alyousuf, A. A.; Abass, M. H. ; Maziel, M. M. Seasonal appearance and feeding preference of butterfly of Jujubes leaves *Tarucus rosaceus* (Austat) [*Lycaenidae ; Lepidoptera*] on different cultivars of Jujbe *Ziziphus* spp. *Basrah J. of Agr. Sci.*, 2004, **17**, 187-197.
- 6 Al-Yousif, A. ; Al-Miahy, M. Z. Effect of calcium on jujube *Ziziphus* sp. fruit growth and their resistance to jujube fruit fly *Carpomyia incompleta*. *J. of kerbala univ. , 2007*, **3**, 106-113.
- 7 Torrance L, Cowan GH, McLean K, MacFarlane S, Al-Abedy AN, Armstrong M, Lim TY, Hein I, Bryan GJ. Natural resistance to Potato virus Y in Solanum tuberosum Group Phureja. *Theoretical and Applied Genetics*. 2020 Mar;133:967.
- 8 Mahmood, N. A. & Abdulateef, S. M. Determining Some Undesirable Behavioral Traits and Their Impact on the Behavioral Performance of Broiler Chicks. in I.O.P. Conference Series: Earth and Environmental Science .2021,vol. 904.
- 9 F. T. Al-Rawi, Y. T. Abdul-Rahaman , Abdullah I.Noaman , Th. T. Mohammed, S. M Abdulateef, Nadia Jebril and K.I. Mahmud. Role of ascorbic acid and appetite stimulants on a few blood serum biochemical characteristics in pregnant Iraqi ewes under heat stress. Al-Rawi F T, Abdul-Rahaman Y T, Noaman Revis *Bionatura* 2022;7(4) 6. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.6>.
- 10 Wellso, S. G. ; Manley, G. V. A revision of the *Chrysobothris femorata* (Olivier, 1790) species group from North America, north of Mexico (Coleoptera: Buprestidae). *Zootaxa , 2007*, **1652**, 1–26-21–26. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1652.1.1>
- 11 Orlova-Bienkowskaja, M. J. ; Bieńkowski, A. O. The life cycle of the emerald ash borer *Agrilus planipennis* in European Russia and comparisons with its life cycles in Asia and North America. *Agric. For. Entomol.*, 2016, **18**, 182-188. <https://doi.org/10.1111/afe.12140>
- 12 Hamad, H.M., Shabeeb, Z.A., Awad, M.M. Expressions of CD274 (PD-L1) and CD47 rReceptors on the sSurface of bBlast cCells in A.M.L. pPatients (2022) *Iraqi Journal of Science*, 63 (6), pp. 2373-2387.
- 13 Potter, D. A.; Timmons, G. M. ; Gordon, F. C. Flatheaded apple tree borer (Coleoptera: Buprestidae) in nursery-grown red maples: phenology of emergence, treatment timing, and response to stressed trees. *J. Environ. Hortic.*, 1988, **6**, 18-22. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-6.1.18>
- 14 Oliver, J.; Fare, D.C ; Youssef, N.; Scholl, S.S.; Reding, M.E. ; Ranger, C.M. ; Moyseenko, J.J. ; Halcomb, M.A. Evaluation of a single application of neonicotinoid and multi-application contact insecticides for flatheaded borer management in field grown red maple cultivars. *J. Environ. Hortic. , 2010*, **28**, 135-149. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-28.3.135>
- 15 Jeschke, P. & Nauen, R. Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag. Sci.*, 2008, **64**, 1084-1098. <https://doi.org/10.1002/ps.1631>
- 16 Adesso, K. M., Oliver, J. B., Youssef, N. N. & Fare, D. C. Evaluation of Systemic Imidacloprid and Herbicide Treatments on Flatheaded Borer (Coleoptera: Buprestidae)

- Management in Field Nursery Production. *J. Econ. Entomol.*, 2020, **113**, 2808-2819.
<https://doi.org/10.1093/jee/toaa228>
- 17 Yamamoto, I.; Casida, J. E. *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*, 1999 Springer, Japan.
- 18 Goulson, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.*, 2013, **50**, 977-987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
- 19 Khairi, I. R. ; Salman, M. A. . Effect Of Plant Growth Regulators On In Vitro And Ex Vitro Conditions On Propagation Of *Dianthus Caryophyllus* L. *JLSAR* 2021, 2, 54–60.
- 20 R. Aziz, S., A. Rashid, S. Impact Of Using Sunflower Seed Meal In Broiler Male Diets On Performance Traits And Carcass Characteristics. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 148-157. doi: 10.32649/ajas.2023.179726.
- 21 Onstad, D. ; Crain, P. Major economic issues in integrated pest management. *The economics of integrated pest management of insects*. CABI, Wallingford, , 2019, 1-13.
- 22 Kuhar, T. P.; Stivers-Young, L. J.; Hoffmann, M. P. ; Taylor, A. G. Control of corn flea beetle and Stewart's wilt in sweet corn with imidacloprid and thiamethoxam seed treatments. *J. Crop Prot.*, 2002, **21**, 25-31. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00056-4)
- 23 Elbert, A.; Nauen, R. ; Leicht, W. *Imidacloprid, a Novel Chloronicotinyl Insecticide: Biological Activity and Agricultural Importance* In: *Insecticides with novel modes of action*, Ishaaya, I. ; Degheele, D. (Eds.). Springer, Berlin, Heidelberg. 1998, 50-73.
- 24 Grewal, P. S.; Power, K. T. ; Shetlar, D. J. Neonicotinoid insecticides alter diapause behavior and survival of overwintering white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Pest Manag. Sci.*, 2001, **57**, 852-857. <https://doi.org/10.1002/ps.373>
- 25 Senn, R. Actara Soil application use . Novartis Crop Protection AG, Basel, Switzerland, 1999, 47 pp.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Alderawii, M. M.; Alyousuf, A.; Efficiency and Economic Feasibility of using neonicotinoids against Flat-headed borers *Chrysobothris affinis* (Fabricius, 1794) (Buprestidae: Coleoptera) infesting Ju-jube orchards in Basra Province, Iraq. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 57.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.57>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Efficacy of different concentrations of flax plant oil *Linum usitatissimum* in controlling green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)

Haidar H. Al-Kallabe^{1*}, Akram A. Mohammed² and Ali A. Kareem³

¹ Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kufa, Najaf, Iraq

² Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kerbela, Kerbela,

* Correspondence: hayderh.alchallabe@uokufa.edu.iq
Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.58>

ABSTRACT

The green peach aphid, *Myzus persicae*, is a significant insect pest worldwide. The potential for using *Linum usitatissimum* flax seed oil to control insects has been reported. However, no study has been conducted on the efficacy of flax seed oil against *M. persicae*. Therefore, this study aimed to evaluate the bioactivity of *Linum usitatissimum* flax seed oil at four concentrations (1.00, 3.00, 5.00, and 10.0 ml / 100 ml water). The highest mortality of adults (100%) was caused 4 days post-treatment with all tested concentrations.

Similarly, the results demonstrate that foliar application of flax seed oil against all nymphal stages caused 100% mortality rates at all concentrations after 4 days of treatment. The rate of nymph production of aphids significantly decreased and reached 0.0 nymph per adult after 4 days. The results suggest that flax seed oil has the potential as a biological control agent of *M. persicae*.

Keywords: botanicals, essential oil, insects, biological control

INTRODUCTION

Myzus persicae colonizes many environments, which is of great economic importance among all aphids¹. *M. persicae* is considered an essential species affecting more than 400 plant species and within 40 diverse plant families, including crops of economic importance, such as vegetables and ornamental trees in fields and greenhouses^{2, 3, 4}. Moreover, it can transmit over fifty plant viruses in different plant hosts. Also, due to its short generation time and high fertility, its high ability to achieve a population density in new plant tissues of recent growth.⁵

Insecticides are still the primary way to control aphids in field crops⁶. Using chemical pesticides is the usual way to combat this pest; However, this strategy is ineffective¹, but also harmful to the environment and human and animal life⁷. As a result, plant-derived insecticides with different active compounds (secondary metabolites) may provide a suitable alternative to chemical pesticides⁸.

Vegetable oils are a complex mixture of diverse natural substances classified under two chemical groups such as terpenoids (monoterpenes and sesquiterpenes) and phenylpropanoid compounds⁹, which exhibit a wide range of biological activities, including antioxidant and antimicrobial activities¹⁰.

These vegetable oil-derived formulations would significantly reduce the use of industrial chemical pesticides and allow effective control of aphids, resulting in less environmental impact due to fewer residual effects,¹¹.

In the study that investigated the insecticides of essential oils extracted from black pepper, eucalyptus, rosemary, and tea tree and their binary combinations against an insect of green peach, the combination of essential oils influenced the mortality rate of aphids. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) showed that the mixture of essential oils was stable and unaffected by the storage temperature (15, 25, 35°C), and the functional groups did not change during storage. Based on their results, essential oils can be used as an insecticide against *M. persicae*¹².

The study aimed to search for materials of plant origin that effectively kill green peach insects to replace the currently used manufactured chemical insecticides, which many insects have acquired resistance against.

MATERIALS AND METHODS

Test the level of effectiveness of a fixed oil obtained from the local market, *L. usitatissimum* flax seed oil. Also, a comparator insecticide, Actara 25% WG, recommended by the Iraqi Ministry of Agriculture, was used against *M. persicae*, whose samples were collected from infected plants on farms in Najaf Governorate in 2022.

The method used in carrying out experiments for the breeding and treatment of *M. persicae*, as laboratory experiments, was carried out by designing a process that is summarized by diagonally installing perforated plastic tubes, each of which is 2 cm long, placed inside a plastic basin with dimensions of 30 x 15 cm and in the form of two lines. Each line contains three tubes. The plastic basin was filled with water with nutrients for the plant, and until the tubes were submerged inside it, the newly grown, clean, and uninfected leaves of the treated plant were fixed inside the plastic tubes. In each experiment, 20 aphids/leaves were transferred. The vegetable oil (seed oil) was prepared. Flax) used against a green peach insect by dissolving vegetable oil in an aqueous solution containing 1000 ml of sterile distilled water with one ml of dishwashing liquid (bright) to dissolve the oils in water¹³. The test was carried out in five ways:

1- Effect of flaxseed oils *L. usitatissimum* with different concentrations on the various stages of green peach *M. persicae*.

1-1- Evaluation of the efficiency of different concentrations of flaxseed oil in the mortality rates of adults and nymphs of *M. persicae*

To carry out this experiment, clean leaves free from any aphids or diseases were selected from the upper part of the plant. They placed them appropriately by inserting the leaf stalk into the plastic tube fixed at an angle in a plastic basin prepared for this purpose, as shown above. Twenty adults of *M. persicae* were transferred to each leaf and left for the next day to raise after placing the nymphs and keeping only 20 of them on each leaf and destroying the excess with a fine needle (Needle) and after 8 days until the nymphs reached the adult stage and application transactions.

Likewise, to obtain the first, second, third, and fourth nymphal turn, the previous process is repeated, and after the process of laying the first stage, the adults are removed by a needle and examined under a microscope. The same previous process is repeated to obtain the other roles (second, third, fourth), but according to the period for growth and development, Nymphs as shown (48 hours, 72 hours, 120 hours) respectively and the application of the coefficients.

All the leaves were sprayed with vegetable oil at concentrations (1, 3, 5 and 10%) separately by using a small-sized glass hand sprayer (measurement of 10 ml) until the leaves were completely wetted by 1 ml per leaf and five replications for each treatment. The treated leaves were transferred to the incubator to provide optimum temperature ($5\pm 25^{\circ}\text{C}$) and relative humidity ($\pm 5\%$). A comparison treatment was also carried out by following the same previous steps, except for spraying it with sterile distilled water only. After 1, 2, 3 and 4 days, the number of dead individuals was calculated in each replicate within one treatment, and the values were corrected according to the Abbot equation in laboratory¹⁴.

1-2- Studying the effect of spraying plants and soil with flaxseed oil on the mortality rates of *M. persicae* adults.

1-2-1- The method of spraying the plant.

After preparing the seedlings of the cucumber plant with a size of 2000 mg and several 15 seedlings and waiting for some time until obtaining a plant with good growth and 10 days old, the plant was contaminated

with adults of a green peach insect at a rate of 50 adults for each repeat and for all concentrations (and the disposal of new births by Needle and keep the insect rate 50 insects for each treatment, and determine the average number of insects before treatment for each treatment, and then the plant leaves were sprayed with oil concentrations (1%, 3%, 5% and 10%) with three replicates for each treatment in addition to the control treatment by adding 5 ml of each concentration to each replicate, and distilled water was added in the same amount as a control treatment. The seedlings were placed in an incubator under 25 ± 2 C and 60 ± 10 % relative humidity. All seedlings were examined daily, and the readings were recorded 1, 3, 5, and 7 days after incubation, as the number of remaining individuals was recorded, and the corrected Percentage of death was recorded for each of them using the Abbot equation in the laboratory¹⁵.

1-2-2- Soil spraying method

Healthy cucumber plants were taken with three replicates for each treatment in addition to the control treatment, and the soil with which the seedlings were planted was sprayed with concentrations (1%, 3%, 5% and 10%) of oil as in paragraph (3-8-14-5-1). By spraying 100 ml of each concentration into the soil and leaving the plants for 10 days to allow the flow and spread of the extract inside the plant¹⁶, and then contaminated the plants with insect pests of green peaches at the rate of 50 adults for each replicate, and distilled water was added in the same amount as a treatment. Control and determination of the average number of insects for each treatment and the seedlings were placed in an incubator under 25 ± 2 °C temperature and 60 ± 10 % relative humidity. All seedlings were examined daily, and readings were recorded for paragraphs 1, 3, 5 and 7 days after incubation, as the number of dead individuals was recorded and the corrected Percentage of the loss of each of them using Abbot's equation laboratory¹⁵.

1-3- Effect of different concentrations of flaxseed oil on the yield of *M. persicae* adults and the growth period of subsequent roles.

In this study, the effect of flaxseed oil was tested with concentrations (1, 3, 5, 10%) on the productivity of treated insects from adults by taking (10) adults and with three replicates for each concentration, transferred by a soft mattress and placed on the leaves of the plant inside Petri dishes. The treatment was applied by spraying the concentrations (1, 3, 5, 10 %) using a hand sprayer with a volume of 10 ml. 60 ± 5 %) is ideal. A comparison treatment was also carried out by following the same previous steps, except for spraying it with sterile distilled water only. After 24 hours of treatment, 6 adults were randomly transferred from each treatment to a plant containing only six leaves. The plants were planted in small pots of 1 kg for each repeat plant and placed on Each leaf 1 adult. Then, the treated seedlings were transferred to the incubator to provide the ideal temperature (5 ± 25 ° C) and relative humidity (60 ± 5 %). The seedlings were followed up, and insects were monitored to determine their productivity by calculating the number of nymphs placed and the periods of each turn.

2- Effect of different concentrations of the chemical pesticide Actara 25% WG on the motile roles of green peach *M. persicae* in vitro.

The efficiency of the chemical pesticide Actara 25% WG recommended by the Iraqi Ministry of Agriculture was tested in combating aphids, which was obtained from the local markets of Najaf Governorate and which contains 25% thiamethoxam as an active substance, which is produced by the Swiss company Syngenta, as the concentrations of the pesticide were prepared through Recommended dose Different concentrations (0.10, 0.50 and 1.00%) were prepared after dilution with water. Then, 20 aphids were transferred to each leaf of the plant, with 3 replications for each concentration installed in the basins designed to be treated as in paragraphs (3-4). complete. A treatment was performed compared to spraying the insect-bearing leaves with empty water. The treated leaves were incubated in the incubator at a temperature of 5 ± 25 °C and a relative humidity of 60 ± 5 %. After 1, 2, 3 and 4 days of treatment, the mortality rate of insects was calculated.

RESULTS

Effect of flaxseed oils *L. usitatissimum* with different concentrations on the different stages of green peach *M. persicae*.

Evaluation of the efficiency of different concentrations of flaxseed oil in the mortality rates of adults of *M. persicae*

The results in Table 1 indicated the mortality percentages of adults treated by spraying *L. usitatissimum* with different concentrations of flaxseed oil on *M. persicae* at different time intervals (1, 2, 3 and 4 days). The results showed an increase in the mortality rate by increasing the concentration and the exposure period, and the results showed the severe sensitivity of the insect to flaxseed oil, which caused 100% destruction in all tested concentrations after 4 days and at the tested concentrations (1, 3, 5, 10). It was found that flaxseed oil (*L. usitatissimum* L.) accumulates many bioactive compounds and elements, including linolenic acid, linoleic acid, lignans, cyclic peptides, polysaccharides, alkaloids, cyanogenic glycosides and cadmium. Most biological and clinical studies of flaxseed have focused on extracts containing alpha-linolenic acid or lignans. Other flaxseed compounds have received less attention, and their activity needs better described. The benefits of consuming whole flaxseed parts such as oil, gum and protein indicate that consideration of the full range of existing bioactives is required to link biological activity with specific compounds^{17, 18}. It also noted that essential oils are a mixture of compounds that may have acted against insect pests through complex mechanisms. Its components have been proven to be an effective source of biological pesticides.

Moreover, several studies have shown the repellent effects of oils on aphids. In this context, the oils are very effective against some aphids, such as from corn leaves *Rhopalosiphum maidis*¹⁹ and²⁰. they were also pointed out. Another way to reduce the use of chemical pesticides is with alternatives such as bio-icides to manage insect pests. Such as using different essential oils (black pepper, eucalyptus, rosemary and tea tree), together and alone, against *M. persicae*. These essential oils have insecticidal and repellent activity for many insects, including aphids, and the results showed excellent control of green peach through a high mortality rate. The combinations of essential oils showed synergistic, additive and anti-insecticidal interactions. Fourier Transform Infrared Spectroscopy analysis of the stability of a mixture of essential oils showed that it was not affected by the storage temperature (15, 25 and 35 °C), and all functional groups did not change during storage for three months. Based on the results, the essential oils can be used as a commercial insecticide against *M. persicae* and thus reduce the use of chemical pesticides and their negative impact on the environment and human health. Natural products based on essential oils can be an excellent alternative to synthetic pesticides.

Treatments	Concentration (%)	Death Corrected Percentage (%)			
		1day	2days	3days	4days
Flax oil	1	53	72	86	100
	3	66	82	98	100
	5	81	88	100	100
	10	90	100	100	100
LSD	Concentration: 3.34				
	Days: 4.86				

Table 1. Evaluation of the efficiency of different flaxseed oil *L. usitatissimum* concentrations in percentages corrected for mortality of *M. persicae* adults after 1, 2, 3 and 4 days of treatment.

Evaluation of the efficiency of different concentrations of flaxseed oil in the mortality rates of adults and nymphs of *M. persicae*

The results shown in Table 2 indicated the percentages of mortality of the different freedom stages (first, second, third and fourth), which were treated by spraying with different concentrations of flaxseed oil *L. usitatissimum* on the nymph stages of *M. persicae* and at different time intervals (1-2-3-4). Day), and the results showed the extreme sensitivity of the oil to the nymphs of the first stage at a concentration of 10%, which

caused 100% destruction on the first day of the treatment, which was created with a significant difference from the death rates recorded by the other instars (second, third and fourth) for the first day and with the same concentration, which amounted to (98, 97, 96 %) respectively in all tested concentrations after 4 days and in the tested concentrations (1, 3, 5, 10 %). The results showed increased mortality rates with increasing concentration and exposure period.

²¹ noted that pesticide resistance has evolved due to the long-term and widespread use of chemical pesticides. Essential oils from aromatic plants provide a new and safe alternative to traditional insecticides. The underlying mechanisms of that oil were studied in a study on the effect of *Melaleuca alternifolia* oil and its chemical components against *Helicoverpa armigera* and its different phases. It showed a distinct anti-nutritional essential oil and good contact against *H. armigera* in 24 hours. Using gas chromatography/mass spectrometry, ten chemical components were identified, mainly terpinen-4-ol, γ -terpinene, α -terpinene, α -terpinol, terpinenol and 1,8-cineol. Its results showed that these components have a pronounced anti-nutritional effect. The activity of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase was significantly inhibited by the essential oil, compared to the control, with strong dose- and time-dependent effects. The results provide the basis for its future development and use in pest control.

Nymphal instars	Concentration (%)	Death Corrected Percentage (days)			
		1	2	3	4
First	1	88	98	100	100
	3	96	98	100	100
	5	97	99	100	100
	10	100	100	100	100
Second	1	79	93	99	100
	3	80	96	100	100
	5	94	99	100	100
	10	98	100	100	100
Third	1	77	94	99	100
	3	72	85	97	100
	5	91	99	100	100
	10	97	100	100	100
Fourth	1	51	59	75	100
	3	72	89	98	100
	5	87	97	100	100
	10	96	100	199	100
LSD	Nymphs: 4.11				
	Concentration: 2.77				
	Days: 2.94				

Table 2. Evaluation of the efficiency of different *Linum usitatissimum* seed oil concentrations in the corrected mortality percentages for first, second, third and fourth stage nymphs of *M. persicae* after 1, 2, 3 and 4 days of treatment.

²², indicated in a study presented, essential oils can be an environmentally friendly alternative to control this pest. This work used two biological tests to study the repellent effect of essential oils and pure compounds against aphids. Against natural enemies of aphids, adults and *Aphidius colemani* and larvae of *Sphaerophoria rueppellii*, in olfactory scale bioassays and a bioassay for residual toxicity, using a computer-controlled spray device, showed slight toxicity against *S. rueppellii* larvae and foliar application of emulsion farnesol + (E) - anethole 1:1) nanoparticles on aphid-infested plants resulted in a reduced population growth ratio of *M. persicae* $r_i = -0.78$ and *M. euphorbiae* $r_i = -3.85$. Among the compounds tested, farnesol is a promising compound to be introduced in managing aphids due to its potential as a repellent and bactericidal, as well as being an attraction to some of the natural enemies of this pest.

Evaluation of different concentrations of flaxseed oil in the yield of *M. persicae* adults and growth duration of subsequent roles.

The results proved that the treatment of green peach aphid adults with different concentrations of flaxseed oil led to an apparent effect in decreasing the Percentage the productivity of new individuals from the pest compared to the comparison treatment Table No. 3 showed the results of the average number of new individuals after exposure of the adults to concentrations (1 and 3) and 5 and 10%) of flaxseed oil, as the results showed that the treatment of adults with concentration 10% was less effective for the day (1, 2, and 3), as it was recorded (0.83, 0.66 and 0.16 individuals) respectively with a significant difference with the treatment of adults with concentration 1. It was recorded on the day (1, 2 and 3 days), (1.66, 1.33, 0.66 individuals) respectively. It was noted that the increase in the concentration of the used oil had an apparent effect on reducing the productivity of new births, which was most in the concentrations of 1% and 5%, with an average birth rate. It reached 1.66 and 1.50 individuals, respectively, which differed significantly from the concentration of 10%, which amounted to 0.89 individuals. As for the number of days, the fourth and fifth days of all concentrations recorded the lowest average birth rate, reaching 0.00 individuals for all concentrations. Compared to the comparison treatment Table (3)

Concentration (%)	Mean of adults' productivity after (day)				
	1	2	3	4	5
1	1.66	1.33	0.66	0.00	0.00
3	1.50	1.16	0.33	0.00	0.00
5	1.50	1.16	0.16	0.00	0.00
10	0.83	0.66	0.16	0.00	0.00
LSD	Concentration: 0.43				
	Days: 0.25				

Table 3. Evaluation of different concentrations of flaxseed oil in the yield of *M. persicae* adults and growth duration of subsequent roles.

It was found that flaxseed oil contains many practical chemical components, which may be due to the effective effect in affecting the productivity of *M. persicae* adults, as it was found that vegetable oils affect the adults of the pest through treatment by several mechanisms, including it may affect eggs by preventing Gas exchange or the hardening of the eggshell, thus preventing the hatching process. As for a green peach insect, the effect may be on the protoplasm of the fetus inside the mother's body and, thus, the death of the embryos ²³. Furthermore, in a previous study mentioned by ²⁴, an essential oil obtained from *Foeniculum vulgare* was tested for the mortality of *M. persicae* and to provide excellent efficacy against *M. persicae* while not causing any

significant mortality from the tested non-target organisms. Its results indicate a very high potential for using the essential oil of *F. vulgare* in developing environmentally safe plant insecticides designed to protect the plant against aphids.

Studying the effect of spraying plants and soil with flaxseed oil on the mortality rates of *M. persicae* adults.

Plant Spraying

The results of Table (4) showed that there were significant differences between the factor of periods (1, 3, 5 and 7 days) to give the death rate of adults of *M. persicae*, which amounted to (44.6, 27.0, 10.0 and 4.66) insects, respectively, as for the concentration factor, the concentration exceeded the concentration 10% on the rest of the concentrations significantly in giving the highest Percentage of death in adults, as the average live individuals after treatment was 14.66 for the first day compared to 44.6 for the 1% concentration.

Soil spraying

The results of Table (4) showed that there were no significant differences between the factor of periods (1, 3, 5 and 7 days) in giving the death rate of adults of *M. persicae*, as it reached (66.6, 78.3, 110 and 146) insects, respectively. As for the concentration factor, all concentrations have no significant differences.

Through the results indicated in Table (4), the high effect of flaxseed oil on *M. persicae* may be related to the presence of unpalatable compounds in the oil, which usually have an anti-feeding effect and can interfere with the hormonal processes in the insect^{25, 26, 16}. indicated that the death rate of nymphs of *B. tabaci* was the highest when foliar spraying of neem oil at a concentration of 1.0%, which reached 75.5% after seven days of applying the treatment. This agreed with²⁷, who recorded the death rate of nymphs of *B. tabaci* at 100% when treated with neem oil by foliar application at a concentration of 10.0 ml/L.

In the current study, the foliar treatment of flaxseed oil caused significant differences in the mortality rates of *M. persicae* compared to soil spraying with oil. The difference between the effect of the foliar treatment and the soil spray treatment may be related to the presence of chemical residues of the oil in or on the leaves, or it may be because different soil factors may have affected the effectiveness of flax oil, or perhaps the efficiency of its absorption by the plant roots is not sufficient. To reach the level affecting insects.

Methods	Conc. (%)	Individuals No. before treatment	Individuals No. Before treatment (days)			
			1	3	5	7
Plant spraying	1	50	44.6	27.0	10.0	4.66
	3	50	39.0	21.6	9.66	6.66
	5	50	29.3	14.3	2.00	0.66
	10	50	14.66	5.66	0.00	0.00
Soil spraying	1	50	66.6	78.3	110	146
	3	50	66.0	91.3	118	147
	5	50	63.0	85.6	106	144
	10	50	70.0	87.6	103	143
LSD			Methods: 5.75			
			Concentration: 2.31			
			Days: 4.45			

Table 4. Evaluating the effect of spraying plants and soil with flaxseed oil on the mortality rates of *M. persicae* adults.

Effect of different concentrations of the chemical pesticide Actara 25% WG on the motile roles of green peach *M. persicae* in vitro.

The results in Table 5 proved that the pesticide Actara had an apparent effect in increasing the mortality rates of *M. persicae* adults with increasing concentration. The deaths, according to the concentration of 1% for the first day of application, recorded a death rate of (93.3%), followed by a significant difference of both concentrations (0.50 and 0.10%), which achieved a killing rate of (55.0 and 28.0), respectively, with all these treatments differing in terms of sperm for the comparison treatment. Also, all the concentrations of the pesticide used (0.10, 0.50 and 1.00%) gave a significant reduction in the rates of insect mortality by increasing the number of days after treatment with the pesticide, which reached (93.3, 100, and 100%) for concentrations (0,10, 0.50 and 1.00%), respectively for the day third of treatment.

Also, ²⁸ stated that Actara pesticide works in a good, unique and distinct way, as it affects sites in the nervous system that other pesticides do not work on. It is one of the systemic pesticides that work by contact and also through the digestive system, as it stops the chemical, neurological communication between the ends of nerve cells within the nervous system due to its effect on the receptors. The substance acetylcholine stops the transmission of nerve signals to the insect's body and then stops the vital processes, leading to the insect's death. It is used in the fight against piercing insects that suck plant juices, and it is used in all methods of agricultural transactions. The rapid spread within the tissues of the plant characterizes it. It is considered one of the few toxic pesticides, and the maximum residual limit is three days for most vegetables and leafy crops.

Concentration (%)	Death percentage after (days)			
	1	2	3	4
0.10	28.0	66.5	93.3	100
0.50	55.0	98.0	100	100
1.00	93.3	100	100	100
LSD	Concentration: 3.78			
	Days: 5.61			

Table 5. Represents the evaluation of different concentrations of the chemical pesticide Actara 25% WG on the motile roles of green peach *M. persicae*.

Also, ²⁹ indicated that the numerical density of adult corn leaf insects was more than 100 insects per square inch, cotton bugs were 75-51 insects per square inch, and bean insects were more than 100 insects per square inch and less. Number of live individuals remaining in the field with an area of one square inch of plant leaves when treated with a concentration of 0.4 g/L of the pesticide Aktara for each of the insects of corn, cotton and beans, respectively, after 24 hours of treatment. Its results showed that the concentrations of Aktara used were 2.0, 0.3 and 0.4 g/L, which gave high efficacy and reduced the numerical density of different types of aphids with significant differences at 0.05 compared with the control treatment.

CONCLUSIONS

Flaxseed oil is an effective insecticide against green peach aphids (*M. persicae*) in all life stages. The mortality rate of *M. persicae* increased with increasing concentration of flaxseed oil. Flaxseed oil was most effective against nymphs, especially in the first stage. Flaxseed oil also reduced the fecundity of *M. persicae* adults. Flaxseed oil can be applied to plants as a foliar spray or to the soil. Flaxseed oil is a safe and environmentally friendly alternative to chemical pesticides. Flaxseed oil is more effective than neem oil against *M. persicae*.

Flaxseed oil is more effective against *M. persicae* than the chemical pesticide Actara when applied as a foliar spray. In conclusion, flaxseed oil is a promising new insecticide effective against green peach aphids. It is safe for the environment and can be applied in various ways. Flaxseed oil can be valuable in integrated pest management (IPM) programs.

REFERENCES

1. Bass, C.; Puinean, A.M.; Zimmer, C.T.; Denholm, I.; Field, L.M.; Foster, S.P.; Gutbrod, O.; Nauen, R.; Slater, R.; Williamson, M.S. (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 51:41-51. doi: 10.1016/j.ibmb.2014.05.003.
2. Blackman, R. L. and Eastop, V. F. (2007). Taxonomic Issues. In: *Aphids as Crop Pests*. H.F. van Emden and R. Harrington (Eds.). CABI, UK., pp. 1-29.
3. Mohammed. AA (2016). Interactions between the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and the parasitoid *Aphidius colemani* for the control of green peach aphid *Myzus persicae* under laboratory and field conditions Ph.D Thesis. University of Reading, Reading, UK.
4. Blackman RL and Eastop VF, 2018. *Aphids on the World's Plants*. Available from: <http://www.aphidsonworldsplant.info>.
5. Gavkare, O., Kumar, S., Sharma, N. and Sharma, P. L. 2013. Evaluation of some novel insecticides against *Myzus persicae* (Sulzer). *The Bioscan*. 8(3): 1119-1121.
6. Charaabi K, Boukhris-Bouhachem S, Makni M, Denholm I (2018) Occurrence of target-site resistance to neonicotinoids in the aphid *Myzus persicae* in Tunisia, and its status on different host plants. *Pest Manag Sci* 74:1297–1301.
7. Costa, L.G. (2018). Organophosphorus compounds at 80: some old and new issues. *Toxicological Sciences*. 162: 24-35.
8. Villaverde, J. J., Sevilla-Morán, B., Sandín-España, P., López-Goti, C., & Alonso-Prados, J. L. (2014). Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest management science*, 70(1), 2-5.
9. Asbahani, A.E.; Miladi, K.; Badri, W.; Sala, M.; Addi, E.H.A.; Casabianca, H.; Mousadik, A. E.; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F.N.R. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal Pharmaceutics*. 483:220-243. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.069.
10. Hanen F, Mariem BJB, Mariem S, Riadh K (2020) Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food chem* 330:127268.
11. Castreana, J., & Puhl, L. (2021). Botanical formulations for the ecological management of *Myzus persicae* (Sulzer) and *Aphis gossypii* (Clover)(Hemiptera: Aphididae) and their side effects on parasitoids. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 38(1), 50-61.
12. Ahmed, Q., Agarwal, M., Al-Obaidi, R., Wang, P., & Ren, Y. (2021). Evaluation of Aphicidal Effect of Essential Oils and Their Synergistic Effect against *Myzus persicae* (Sulzer)(Hemiptera: Aphididae). *Molecules*, 26(10), 3055.
13. Younus, A. S., & Mohammed, A. A. (2020). Insecticidal potential of commercial Neem-based insecticide, nimbecidine ec against the red flour beetle (*Tribolium castaneum*) in the laboratory. *Plant Arch*, 20, 2618-2622.
14. Islim, M. T. ;Olleka, A. and Shunxiang, R. (2010). Influence of neem on susceptibility of *Beauveria bassiana* and investigation of their combined efficacy against sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* on egg plant . *Pesticide Bioche. Physiol*. 98(1):45-49.
15. Ibraheem M W, AL Mjbel A A, Abdulwahid A S, Mohammed Th. T. Characterization of the influence of diet on Japanese quail. *Revis Bionatura*. 2022;7(4) 21.
16. Islam, M. d.; Touhidul, D.; Omar, M. ; Latif, A. and Mahbub, M. M. (2011). The integrated use of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* with botanical insecticide, neem against *Bemisia tabaci* on eggplant African *J. Microbiol. Res*. 5(21): 3409-3413.

17. Shim, Y. Y., Gui, B., Arnison, P. G., Wang, Y., and Reaney, M. J. (2014). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in food science and technology*, 38(1), 5-20.
18. Albouchi, F., Ghazouani, N., Souissi, R., Abderrabba, M., & Boukhris-Bouhachem, S. (2018). Aphidicidal activities of *Melaleuca stypelioides* Sm. essential oils on three citrus aphids: *Aphis gossypii* Glover; *Aphis spiraeicola* Patch and *Myzus persicae* (Sulzer). *South African journal of botany*, 117, 149-154.
19. Halbert, S. E., Corsini, D., Wiebe, M., & Vaughn, S. F. (2009). Plant-derived compounds and extracts with potential as aphid repellents. *Annals of Applied Biology*, 154(2), 303-307.
20. Ahmed, Q. H. (2018). Evaluation of efficacy of fumigants and natural product extracts for management of springtail *Hypogastrura vernalis* (Collembola: Hypogastruridae) and green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae).
21. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>.
22. Cantó-Tejero, M., Casas, J. L., Marcos-García, M. A., Pascual-Villalobos, M. J., Florencio-Ortiz, V., and Guirao, P. (2022). Essential oils-based repellents for the management of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. *Journal of Pest Science*, 95(1), 365-379.
23. Al-Adel, K. M. (2006). *Pesticides are basic concepts and their role in the agricultural and health fields*. first edition. Baghdad, Iraq. 422 p.
24. Alkhateeb, A. R. ; Ibrahim, W. ; Taha, A. A. . Correlation Between Udder Conformation With Daily Milk Yield Of Buffaloes. *JLSAR* 2021, 2, 61–65 .
25. Al-Rawi, K.F., Ali, H.H., Guma, M.A., Alaaraji, S.F.T., Awad, M.M. The Relationships of Interleukin-33, Ve-Cadherin and Other Physiological Parameters in Male Patients with Rheumatoid Arthritis (2022) *Pertanika Journal of Science and Technology*, 30 (1), pp. 123-140.
26. Ascher, K. R. S. ; Meisner, J. and Klein, M. (2000). Neem- based bio pesticides against the western flower thower thrips and the onion thrips *Phytoparasitica*. 28(1):87-90.
27. N. Khorshed, A., S. Ahmed, A. Cultivation Of Reishi Mushroom (*Ganoderma Lucidum*) On Different Local Substates In Kurdistan Region, Iraq. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 158-173. doi: 10.32649/ajas.2023.179727.
28. Cortada, R. (1998). Actara 25WG Product information. Synagenta Crop Protection AG, Basel, Switzerland.4PP.
29. Khalaf, J.M. and Al-Farhani, I.M.O. and Al-Quraishi, M.T. and Daoud, S.H. 2014. Effectiveness of Aktara on three species of aphids (Aphididae: Homoptera). *Maysan Journal of Academic Studies*, Vol. 13, p. 24, p. 183-191

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Haidar H.; Akram, A.; and Ali, A. Efficacy of different concentrations of flax plant oil *Linum usitatissimum* in controlling green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 58. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.58>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Efficacy of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisoplae*, against Khapra beetle *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) under laboratory conditions

Battol Qasem Kteo^{1*}, Akram Ali Mohammed¹, Hanaa H. Al-Saffar²

¹Faculty of Agriculture/ University of Kufa/ Najaf/ Iraq;
akrama.abodarb@uokufa.edu.iq

²Iraq Natural History Research Centre and Museum/ University of Baghdad/
Baghdad/ Iraq; hanaahani2014@gmail.com

*Correspondence: Battol Kteo; batt2018alhussein@gmail.com
Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.59>

ABSTRACT

The khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), is an important pest of stored wheat worldwide. This study assessed the efficacy of two isolates of *M. anisoplae* (commercial and local isolates). Different conidial concentrations (1×10^8 , 1×10^6 , 1×10^4) conidia/ml⁻¹ and fungal filtrate (100, 75, 50) % of *M. anisoplae* were evaluated. In both fungal isolates, corrected mortality of *T. granarium* after exposure varied according to fungal concentrations conidial concentration of conidia/ml⁻¹, and the fungal filtrate at a concentration of 75% caused the highest mortality rates. In addition, mortality rates were significantly varied according to the beetle's developmental stage. Both isolates of *M. anisoplae* caused between 41 and 67.6 % reduction in total fecundity of the female adults. The results demonstrate no significant differences between the local isolate of *M. anisoplae* and commercial formulation (Met 52 EC). Further studies under commercial storage conditions are required.

Keywords: Insects storage pests, biological control, Entomopathogenic fungi

INTRODUCTION

The khapra beetle, *T. granarium*, is one of cereals' most common and damaging insect pests¹. It is considered one of the most dangerous pests of stored crops due to its multiplicity of food hosts, and it infects wheat, barley, and industrial powdered milk². The larvae of this insect can enter into a long hibernation and endure unsuitable conditions. It can also remain without food for several years and, most of the time, hide in cracks, making it difficult to control with chemical insecticides. However, extensive use of synthetic insecticides has led to insecticide resistance in stored insect pests and environmental pollution with harmful side effects on human health³. Recently, there has been increasing awareness of environmental concerns related to the use of insecticides, and these issues have encouraged the development of alternative control methods⁴. The efficacy of entomopathogenic fungi against insect pests of stored grain products, including *T. granarium*, has been evaluated in many regions worldwide^{5,6}. However, there is little information on the potential of Iraqi isolates of entomopathogenic fungi for *T. granarium* control. Studies on the virulence of these fungal isolates and the factors influencing their efficacy are still required to evaluate the potential of these fungal isolates against *T. granarium*. The susceptibility of different developmental stages of coleopteran insect pests such as *Otiorhynchus sulcatus* F. and *Sitona lineatus* L. to fungal infection has been studied⁷. In addition, the susceptibility of adults and larvae of *T. granarium* to infection by some Iranian isolates of *M. anisoplae* has been investigated⁸. The objectives of this study were to evaluate different conidial concentrations and fungal filtrates of two isolates of entomopathogenic fungus, *M. anisoplae* (commercial isolate

based on Met 52 EC and Iraqi isolate) against different *T. granarium* life stages, and to investigate sublethal effects of fungal infection on the fecundity of individual *T. granarium* adults

MATERIALS AND METHODS

The media used

Medium Potato Dextrose Agar (PDA)

To prepare potato infusion, 200 g of boiled potato were sliced and placed in 1 liter distilled water for 30 min using a glass beaker. Then, it was filtered through cheesecloth to obtain the potato infusion. The potato infusion was mixed with 20 g of Dextrose and 20 g of Agar. The mixture was autoclaved at a temperature of 121°C and a pressure of 15 pounds/ing² for 20 minutes. The medium was poured into the Petri dishes according to the required experiments, and some medium was kept in the refrigerator until use. This medium was used to grow the fungi under study.

Potato Dextrose Broth (PDB)

This media was prepared in the same way mentioned in the previous paragraph. However, without adding Agar, this medium was used to grow fungi to obtain fungal secretions.

Metarhizium anisoplae isolate sources.

The local isolate of the fungus was obtained from the Faculty of Agriculture, University of Babylon, and Prof. Jamal Hussein diagnosed the fungus. A formulation of *M. anisopliae* (Met 52 EC by Planet Natural, Canada) was obtained from the Faculty of Agriculture, the University of Kufa, which was kept at 4 °C until use.

Collection and diagnosis of *Trogoderma granarium* Everts

A pure colony of Khabra *Trogoderma granarium* was obtained from the entomology laboratory of the Faculty of Agriculture / University of Kufa. The insect was diagnosed as a Khapra beetle by Dr. Rasha Abdul Razzaq Jawad / Plant Protection Department / College of Agriculture / University of Kufa, and the insect was raised on sterilized wheat grains. The temperature was incubated at 30±1, and the culture was constantly monitored and renewed after each generation.

Preparation of conidial concentrations of the fungus *Metarhizium anisoplae* (local and commercial isolates)

The conidial concentrations of *M. anisoplae* were prepared by activating and multiplying it through transferring several times using the media PDA, and a Petri dish containing the developing fungus was taken for 7 days and washed with 5 ml of sterile distilled water containing 0.02% Tween 20, and stirred well then 1 ml of it was taken and diluted in a ratio of (10:1) with sterile distilled water containing 0.02% of tween to the first dilution, and then the second, third and fourth dilutions etc.

As for the commercial, it was prepared by taking 10 gm of loaded fungi and adding it to a liter of sterile distilled water, which contains 0.02% of tween compound, and thus the first dilution was obtained 1×10^{10} and 1 ml was taken from it and added to 9 ml of sterile distilled water. Thus, the required dilutions were obtained in the experiment: (1×10^8 , 1×10^6 , 1×10^4) conidia /ml⁻¹.

Preparation of the filter for *Metarhizium anisoplae*

This method used glass flasks with a volume of 250 ml and a broad base. 150 ml of the PDB culture medium, which had been prepared previously, was placed in these flasks. After cooling the medium, the flasks were inoculated with discs, each with a diameter of 0.5 cm of fungi colonies of *Metarhizium anisoplae* a week old, which were grown on Petri dishes containing PDA with (1-3) fungi discs/beaker for all fungi

isolates used in the experiment⁹. The flasks were incubated in the incubator at a temperature of 25 ± 2 °C for 28 days, with the flasks agitated every three days to split the mycelium and separate the spores. After the end of the period, the fungi farms were filtered using a glass funnel and filter paper of the type What man No.1, and the filtrate was kept until it was used in glass containers¹⁰.

Preparation of different concentrations of filtrate of the *Metarhizium anisoplae* (local – commercial isolates)

Different concentrations of the produced fungal filtrate were prepared, which are (100, 75, and 50) % for each fungal isolate, by taking a quantity of the fungal filtrate according to the required concentration and dissolving it in distilled and sterile water. Dishes were sprayed with a fungicide according to the concentration of each treatment using a small hand sprayer with a capacity of 100 ml. In contrast, the control dishes were sprayed with distilled water only, and all treatments were incubated at approximately 30°C for 10 days.

Obtain different larval stages of the Khapra beetle.

The method described by⁴ was used to obtain a similar age of different developmental stages of *T. granarium* (third and fifth instars, as well as adults). Adults were transferred from a stock culture into small plastic jars (15 adults per jar) and allowed to produce eggs for 1 day at 42, 32 or 21 days before bioassay to allow adults, fifth and third instars, respectively, to be available for experimental use on the same treatment date. The adults were removed, and the eggs were allowed to develop for 41, 31 or 20 additional days before beginning the experiment in an incubator at 30 ± 1 °C, 60 ± 5 % RH and continuous darkness.

Effect of conidial concentration and fungal filtrate of *M. anisoplae* on the productivity of adults of Khapra beetle *T. granirum*

To determine the sublethal effect of fungal infection on the fecundity of *T. granarium* adult females, male-female (1–2 day old) pairs (each pair is a replicate) were introduced into each 9-cm Petri dishes containing Whatman No. 1 filter papers that pairs were exposed to 1 ml of either 10^8 conidia ml^{-1} or fungal filtrate at a concentration of 75% for each isolate. Each treatment was replicated 15 times. After 24 h, each male-female pair was transferred to an individual sterile Petri dish with 5 g of wheat grains covered with muslin cloth, secured using a rubber band and kept at 30 ± 2 °C, 65 ± 5 % RH and 12:12 (L:D) h photoperiod. The number of eggs produced by each female was recorded daily until the female's death using a magnifying lens. In the control treatment, adults were sprayed with sterilized water only. Experiment design and statistical analysis: The laboratory experiments were carried out according to a Complete-Randomized-Design (CRD) with one factor, and the averages were compared using the Least-Significant-Differences (LSD) and under the probability level of 0.05. The percentages of fatalities were corrected according to Abbott's equation¹¹. The fixed loss percentage was calculated as follows:

$$\text{Corrected Death percentage} = \frac{\% \text{ Death in Treatment} - \% \text{ Death in Control}}{100 - \% \text{ Death in Control}} \times 100$$

The loss percentages were converted into loss percentages, and the corrected percentage of death was transformed into angular values to be included in the statistical analysis¹².

RESULTS

Effect of different concentrations of the spore suspension of *M. anisoplae* on the mortality rate of the different instars of Khapra beetle

Table (1) indicates the effect of the interaction of different concentrations of the conidial suspension of the commercial *M. anisoplae*, as well as the time duration on the corrected mortality of the third, fifth instar larvae and adult of *T. granirum*, as the results showed that the highest effect of the different concentrations of

the spore suspension factor was at a concentration of 1×10^8 conidia/ml after 7 days of treatment for adults, the corrected mortality was (58.8), while for the third and fifth larval stages, the concentration of 1×10^8 conidia/ml gave the highest corrected mortality after 10 days of treatment with the spore suspension, which was (80 and 62.5) respectively. The lowest death rate was at the concentration of $10^4 \times 1$ conidia/ml in all insect stages, reaching (32.5) in adults after 7 days of treatment, while the third and fifth larval instars reached (52.9 and 43.4), respectively, after 10 days of treatment. As for the effect of time, it was great after treatment with sporozoites, as the largest corrected death rate was on the seventh day of the adult stage in all concentrations and the tenth day in the third and fifth stages also in all concentrations, and the lowest death rate was on the third day, as the excretion of the spore suspension started on the third day of treatment for both adults, the third larval instar and the fifth larval instar. The corrected mortality ratio for the concentration was $10^8 \times 1$ conidia/ml (0.5, 10, 7.5), respectively.

Developmental stage	Conidial concentration conidia ml ⁻¹	Corrected mortality (%)				
		1 day	3 days	5 days	7 days	10 days
Adult	1×10^4	0.0	0.0	5.0	32.5	
	1×10^6	0.0	0.0	17.4	40.1	
	1×10^8	0.0	0.5	30	58.8	
Fifth instar larvae	1×10^4	0.0	0.0	2.5	17.5	43.4
	1×10^6	0.0	0.0	7.5	30.0	55.0
	1×10^8	0.0	7.5	17.5	35.0	62.5
Third instar larvae	1×10^4	0.0	5.0	12.6	37.8	52.9
	1×10^6	0.0	7.5	25.4	47.3	72.2
	1×10^8	0.0	10.0	37.5	52.5	80

Table 1. The corrected mortalities of different developmental stages of *T. granarium* treated with different conidial concentrations of commercial formulation (Met 52 EC) based on *M. anisopliae* strain F52. Mortality at the adult stage was recorded for 7 days only because it was the maximum lifetime of the adult stage to survive.

LSD for developmental stage = 3.45; LSD for Conidial concentration = 2.56; LSD for days = 4.32

Table (2) indicates the effect of the interaction of different concentrations of the spore suspension of the local fungus *M. anisopliae*, as well as the time duration on the corrected percentages of the mortality of the third, fifth and adult larval age members of *T. granarium*, as the results showed that the highest effect of the different concentrations of the spore suspension factor was At a concentration of $10^8 \times 1$ conidium/ml after 7 days of treatment for adults, the corrected mortality rate was (42), while the third and fifth larval stages gave the concentration 1×10^8 conidia/ml the highest corrected death rate after 10 days of treatment. The ratio was (77.4 and 60.5) Consecutively, the lowest death rate was at a concentration of $10^4 \times 1$ conidia/ml in all insect stages, reaching (32.5) in adults after 7 days of treatment at the third and fifth larval stages. It reached (60.9 and 45.5) respectively, after 10 days of treatment. Its effect was significant after treatment with sporozoites, as the largest corrected death rate was on the seventh day of the adult stage in all concentrations and the tenth day in the third and fifth stages also in all concentrations. The lowest death rate was on the third day due to the effect of the sporozoites. It started on each adult's third day of treatment, the third and fifth larval instar. The corrected mortality ratio for the concentration was $10^8 \times 1$ conidia/ml (2.5, 5, 5.5), respectively.

The results showed that the third larval stage gave the most mortality in all concentrations, followed by the fifth larval stage and then the adult stage, and this is due to being more sensitive due to its thin chitinous wall, which is easily penetrated by the enzymes of pathogenic fungi, then depletion of its internal contents and then death. What¹³ found that the modern stages of the rusty red flour beetle *Tribolium castaneum* gave the highest mortality rate of 97% for concentration $10^8 \times 5$ conidia/ml. The results also agree with¹⁴ when studying the

effect of the fungus *Lecanicillium lecanii* on the larvae of the saw-breasted beetle *Oryzaephilus surinamensis* L. The results showed that the mortality rates for the larvae in the early stages were high, reaching 60% at the concentration of 1×10^3 conidia/ml. The chitinous wall has fewer tanning materials than the advanced stages, making it easier for the fungus to penetrate the larva's body and consume its internal contents, leading to the larva's death. The killing rates increased with the increase in the concentration of the fungal suspension, and these results agreed with ¹⁵, where the killing rates of the hairy beetle increased with the increase in the concentration of the fungal suspension of *Beauveria bassiana*.

Developmental stage	Conidial concentration conidia ml ⁻¹	Corrected mortality (%)				
		1 day	3 days	5 days	7 days	10 days
Adult	1×10^4	0.0	0.0	2.5	32.5	
	1×10^6	0.0	2.5	10.4	37.5	
	1×10^8	0.0	2.5	12.5	42	
Fifth instar larvae	1×10^4	0.0	0.0	5.0	17.5	45.5
	1×10^6	0.0	0.0	5.5	27.5	52.2
	1×10^8	0.0	5.5	15.0	35.0	60.5
Third instar larvae	1×10^4	0.0	0.0	15.6	33.5	60.9
	1×10^6	0.0	2.5	20.4	47.5	70.0
	1×10^8	0.0	5.0	27.5	50.5	77.4

Table 2. The corrected mortalities of different developmental stages of *T. granarium* treated with different conidial concentrations of a local isolate of *M. anisopliae*. Mortality at the adult stage was recorded for 7 days only because it was the maximum lifetime of the adult stage to survive.

LSD for developmental stage = 2.91; LSD for Conidial concentration = 3.72; LSD for days = 5.43

Effect of different concentrations of the filtrate of *M. anisopliae* on the mortality rate of the different instars of the grain beetle

The results presented in Table (3) showed the effect of the commercial fungi filtrate by direct spraying and the time duration on the corrected mortality percentage of adults and the third and fifth larval instars of *T. granarium*. The highest cumulative death rate at the concentration was 100%, and it was (39) after 7 days for the adults. As for the third and fifth larval stages, it reached (50 47.5), respectively, after 10 days of treatment, while the lowest cumulative death rate was at the concentration of 50% after the passage of 7 Days of adult treatment, the corrected percentage of mortality was (18), while the third and fifth larval instars were after 10 days of treatment, where it gave mortality percentage (27.5 and 25), respectively. As for the effect of the time, the 7 days for adults significantly outperformed the rest of the periods at 5,3.1 in all concentrations. In the third and fifth larval instars, the period was 10 days more than the rest of the periods 7,5,3.1 also in all concentrations, while the lowest death rate was on the third day of treatment for both adults and instars. The third larvae and the fifth larval instar had the corrected mortality rate of the concentration 100% (12.5, 10, 5), respectively, and we conclude from that that the period has an essential effect on biological control, as there is a direct relationship with the mortality rates.

Developmental stage	EPE filtrate concentration	Corrected mortality (%)				
		1 day	3 days	5 days	7 days	10 days
Adult	50%	0	2.5	5	18	
	75%	0	10	20	27	
	100%	0	12.5	22.5	39	
Fifth instar larvae	50%	0	2.5	7.5	20	27.5
	75%	0	10	12.5	20	40
	100%	0	5	12.5	25	47.5
Third instar larvae	50%	0	2.5	10	15	25
	75%	0	10	12.5	12.5	40
	100%	0	10	15	27.5	50

Table 3. The corrected mortalities of different developmental stages of *T. granarium* exposed to different concentrations of filtrates of commercial formulation (Met 52 EC) based on *M. anisopliae* strain F52. Mortality at the adult stage was recorded for 7 days only because it was the maximum lifetime of the adult stage to survive.

LSD for developmental stage = 3.08; LSD for Filtrate concentration = 1.75; LSD for days = 3.77

Table (4) shows the effect of local fungus filtrate and the time duration on the corrected mortality percentage of adults and the third and fifth larval instars of *T. granarium* by direct spraying. The concentration of 100% on the two concentrates exceeded 75.50% in the death rate of insect instars, as the highest cumulative death rate in adults after 7 days of treatment was at (42.5), while the third and fifth larval instars reached (47, 44) respectively after 10 days. From the treatment, while the lowest cumulative death rate at the concentration was 50% after 7 days of adult treatment, the corrected percentage of mortality was (20). The factor of the effect of the time showed that the time of 7 days for adults significantly exceeded the rest of the periods 5, 3, and 1 day in all concentrations, while in the third and fifth larval instars, the time of 10 days exceeded the rest of the periods 7, 5, 3, 1 day. The lowest mortality rate was on the third day of treatment for adults, third larval instars, and fifth larval instars, and the corrected mortality rate for the concentration was 100% (10, 7, 7.5), respectively.

Developmental stage	EPE filtrate concentration	Corrected mortality (%)				
		1 day	3 days	5 days	7 days	10 days
Adult	50%	0	2.5	7.5	20	
	75%	0	5	20	32	
	100%	0	10	25	42.5	
Fifth instar larvae	50%	0	2.5	7.5	20	27.5
	75%	0	12.5	16	20	31
	100%	0	7.5	17.5	25	44
	50%	0	5	11.4	17.5	22

Third instar larvae	75%	0	10	17.5	24.5	38
	100%	0	7	15	23.5	47

Table 4. The corrected mortalities of different developmental stages of *T. granarium* exposed to varying concentrations of filtrates of a local isolate of *M. anisopliae*. Mortality at the adult stage was recorded for 7 days only because it was the maximum lifetime of the adult stage to survive.

LSD for developmental stage = 1.53; LSD for Filtrate concentration = 2.16; LSD for days = 3.66

Effect of conidial concentration and fungal filtrate of *M. anisopliae* on the total fecundity of adults of *T. granarium*

Treatment	Total fecundity mean No. of eggs per female (\pm SE)
<i>M. anisopliae</i> (Met 52 EC)	11.9 \pm 3.2 a
<i>M. anisopliae</i> (Local isolate)	13.7 \pm 2.1 a
Fungal filtrate (Met 52 EC)	19.9 \pm 4.3 b
Fungal filtrate (Local isolate)	22.6 \pm 5.6 b
Control	37.7 \pm 4.7 c

Table 5. filtrate at 75% on the mean numbers of eggs produced per adult female of *T. granarium* compared to the control. Means within a column followed by different lowercase letters indicate significant differences among treatments at each insect species at $P = 0.05$ using the LSD test.

Table (5) shows the significant effects of the conidial concentration and the fungal filtrate on the mean number of eggs produced by adult females of *T. granarium*. The conidial concentrations were outperformed in reducing the number of eggs compared to the fungal filtrate. The number of eggs decreased significantly to its lowest levels, reaching (11.9 \pm 3.2 a 13.7 \pm 2.1 a) eggs per female treated with a concentration of 1×10^6 conidia/ml for the two commercial and local isolates, respectively, While the number of eggs for females treated with the fungal filtrate was (19.9 \pm 4.3 b, 22.6 \pm 5.6 b) eggs for each female treated at 75% concentration for the two commercial and local isolates, respectively, compared with (37.7 \pm 4.7 c) eggs/female in the control treatment. The issue by adults is due to the fungi's consumption of nutrients inside the insect's body. This result was observed when the fungus *M. anisopliae* infected the pupae of *R. ferrugineus* ¹⁶. These results also agree with the findings of ¹⁷. that the use of the suspension the spore suspension of the entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* against three types of insects, *Trogoderma granarium*, *Tribolium castaneum* and *Callosobruchus maculatus*, showed effectiveness in decreasing the total fertility of the three treated insect pests.

CONCLUSIONS

The fungus *M. anisopliae*, in its commercial and domestic isolation, showed activity against *T. granarium* under laboratory conditions. A decrease in the fertility of the treated insect was also recorded. However, more studies are needed to confirm the efficacy of *M. anisopliae* in commercial storage conditions. In addition, the potential effects of the fungus should also be evaluated in conjunction with some other control methods.

REFERENCES

1. Al-Azzawi, A.F. and Mahdi, M.T. (1983). Warehouse insects. Ministry of Higher Education and Scientific Research, University of Mosul, 464.
2. Omar Khaled Attallah, Thafir Thabit Mohammed and Nasr Nuri Al-Anbari. Effect of Adding Grape Pomace and Resveratrol on Some Physiological Traits and Gene Expression to Prevent Hemorrhagic Fatty Liver Syndrome in Laying Hens. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.2022, 1060 (1), 012076. doi:10.1088/1755-1315/1060/1/0120.
3. Al-Iraqi, R.A., Hamid, A.A. and Al-Hadidi, I.K. (2008). Effect of some plant powders on the life of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *Tikrit J. Pure Sci.*, 13 (1): 60-64.
4. Mohammed, A. A, Jamal, H.K and Ahmad, M.H (2019). Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi for the control of Khapra beetle (Coleoptera: Dermestidae) and their effects on the beetles' fecundity and longevity. *J. Agric Urban Entomol.*, 35(1) :1-11
5. Alkhateeb, A. ; Ibrahim, W. I.; Taha, A. E. . Body Conformation with Daily Milk Yield Relationship On Buffaloes. *JLSAR* 2022, 3, 1-5.
6. Bilal, M., Ranjha, M. H. and Bashir ,N. H.(2017). Comparison of *Beauveria bassiana* with IGRs against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Trogoderma granarium* (Everts) (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Entomol. Zool. Stud.* 5:113–117.
7. Poprawski, T. J., Marchal, M. and Robert ,P. H.(1985). Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stages to five entomopathogenic hyphomycetes. *Environ. Entomol.* 14: 247–253.
8. Khashaveh, A., Safaralizadeh, M. H. and Ghosta, Y.(2011). Pathogenicity of Iranian isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) (Ascomycota: Hypocreales) against *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *Biharean Biol.* 5: 51–55.
9. Thabit S S, Awad M M, Abdulateef S M. Effects of In-Ovo Injection of sialic acid on Chick's embryonic development and physiological traits. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 49. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.49>
10. Al-Jubouri, A.N.H. (2006). Integration of aphid resistance using some local fungicide isolates and the insecticides Chess and Polo. Master's Thesis - Technical College / Al-Musayyib.
11. Alaaraji, S.F.T., Mohisen, M.A., Awad, M.M. Assessment serum levels of neopterin, IL-6, IL-1 β , hs-CRP, TNF- α and MMP 9 in iraqi rheumatoid arthritis patients (2020) *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11 (12), pp. 88-93.
12. Al-Rawi, K.M. and Khalaf Allah, A.M.(2000). Design and analysis of agricultural experiments. faculty of Agriculture. Second Edition. University of Al Mosul. Ministry of Higher Education and Scientific Research. The Republic of Iraq.
13. Al-Anbaki, H.A.M.; Al-Amiri, N.A.K.; Sultan, A.A.; Saadi; H. and Alwan M. (2013). The use of some pathogenic fungi in controlling the red rust beetle *Tribolium castaneum*. *Diyala Journal of Agricultural Sciences*, 5 (2): 282.
14. Al-Douri, M.R.T. (2017). Biological control of the saw-breasted beetle *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae) using the fungus (Zimm.) *Lecanicillium lecanii*. Master Thesis, College of Science for Women, University of Baghdad.
15. Al-Hadithi, OTHA (2016). The use of microwave radiation and the biological fungus *Beauveria bassiana* in controlling the *Trogoderma granarium* (Everts) (Coleoptera: Dermestidae) and the red rusty flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbest) (Coleoptera: Tenebrionidae). Tikrit University.
16. H. Kh. Al-Khater, S., I. Neamah, S. Effect Of Growth Regulators 2,4-D And Kintein In The Inducation Of Callus From Helianthus Annuus L. Cotyledon. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 174-187. doi: 10.32649/ajas.2023.179728.

17. Akram, A.M; Amal , S.Y. and Abdulla, N.A .(2021). Efficacy of *Clonostachys rosea*, as a promising entomopathogenic fungus, against coleopteran stored product in set pests under laboratory conditions. *Egypt J Biol Pest Control.*, 31: 55.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Kteo, B.; Mohammed, A.; AL-Saffar, H. Efficacy of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisoplae* against Khapra beetle *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) under laboratory conditions. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 59. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.59>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

New Records in Iraq and Arab Nations for some Fungi Isolated from Al-Barakia wastewater treatment plant in Al-Najaf Province

Nihad Mutlag ^{1*}, Douaa Hussain ²,

¹University of Kufa / Najaf/ Iraq; nuhadh.alazerjawi@uokufa.edu.iq

²University of Kufa / Najaf/ Iraq;

*Correspondence: douaa.f.hussain@gmail.com

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.61>

ABSTRACT

This study was conducted in 2020 in the wastewater treatment plant in Al-Barakia Najaf, where samples were taken in November from the Bioshft unit and the compact unit from the plant to know the efficiency of the plant in treatment. The process of isolation and purification was Microbiology Laboratory_ Ecology and Pollution Department - College of Science - University of Kufa. Its diagnosis was carried out at the Plant Virus Laboratory - College of Agriculture - the University of Karbala, and (19) fungal isolates isolated from wastewater treatment plants were diagnosed. These isolates were analyzed using the PCR technique and determination of the nucleotide sequences of the polymerase chain reaction products that were amplified from those isolates using ITS4 and ITS1 primers. It belonged to the fungus *A. caespitosus*. and isolated *A flavus* (7,8), *T. asperellum* (9-11) *A.tubingensis* (12), *A.terrus*(13), *A.niger* (14,15), *A. alternata* (16), *C.sphaerospermum* (17), *A.oryzae* (18), *Acremonium sp* (19), similarity rate of 100% with isolates registered with the NCBI. The results show that all the isolated fungi diagnosed in this study are recorded globally. However, they are not recorded in Iraq, and (5) isolates are not recorded in the Arab nation and Iraq, including *A. tubingensis*, *C.sphaerospermum*, *A. alternate*, and *A.oryzae*, while the isolate *Acremonium sp*. According to the National Center for Biotechnology Information NCBI, it is registered only in Germany under the number (AJ557731), and the similarity rate is 100% with the isolate diagnosed in this study.

Keywords: wastewater; Molecular Identification; fungi; Polymerase chain reaction (PCR); DNA sequence analysis.

INTRODUCTION

Water covers about 71% of the Earth's surface and makes up 65% of our body. We all want cleaning water - to relax, drink, and enjoy. If polluted, this water loses economic and aesthetic value, and it can pose a significant hazard to health and aquatic life. Such as the fish that live in it and the wildlife that depends on it¹. One of the more serious environmental issues is the chemical pollution of rivers and lakes. Because chemical pollution is carried by water and enters rivers and streams, it causes massive destruction^{2,3}. Although some types of water pollution may occur through natural processes, they are primarily the result of human activity. Humans use water every single day in industry and homes. Used water is taken from lakes, rivers, and underground; after use pollution, most of the water returns to the same sites. This use of water is called "wastewater." Water not treated before is released into rivers, leading to severe pollution¹. Wastewater is a mixture of water-borne effluents disposed of through establishments, dwellings and industrial facilities, as well as groundwater and surface water⁴. This water generally contains a large amount of waste that requires an amount of oxygen and pathogens (microbes), Organic matter, plant growth-stimulating nutrients, minerals, sediments and inorganic chemicals. The water may also contain toxic compounds⁵. Wastewater can be defined as a mixture of water-borne effluents discharged from dwellings, commercial and industrial establishments, and institutions, along with groundwater, rainwater, and surface water. Generally, it contains a large amount of waste that requires oxygen, pathogens or pathogens, organic matter, nutrients for plant growth, chemicals, sediments, inorganic materials, and minerals. It may also include toxic substances.¹

Wastewater is divided into four types:

1. Household sewage: wastewater emitted from business establishments, households, and similar facilities; Industrial sewage: containing a variety of wastes
2. Leakage or/Outflow: Water leaks into the sewage system via indirect or direct means like leakage connections
3. Porous or cracked walls Storm water that enters the sewage system through rainfall drainage connections
4. Rainwater: runoff resulting from floods as a result of rainfall. For several years, the main objective of wastewater treatment in cities has been to lower the concentration of suspended particles, oxygen-requiring chemicals, dissolved substances, and potentially dangerous bacteria and fungi. However, in recent times, there has been increased emphasis on improving the ways of solid waste disposal from municipal treatment operations. Wastewater is the primary storage location for all microorganisms, including fungi and heavy metals.^{6,7} Wastewater is the primary reservoir for every microorganism, including fungal ones^{8,9}. Fungi are eukaryotic microorganisms in a separate kingdom; about 95% of these species are currently unknown and must be discovered—discovery^{10,11}. The classification of fungi based on their morphological characteristics may often give accurate results. However, many researchers do not rely on morphological characteristics because it may require sufficient experience in the field of classification, especially since there are groups of fungi that are very similar and require significant effort and time. It is also often an inaccurate method. After all, it is affected by environmental factors that may influence the shape and colors of spores, size and fungal colonies^{12,13}. PCR technology is the molecular technique that relies on the selection and amplification of a specific area of the organism's genome, and thus knowledge of the genetic relationships in terms of similarity and the difference between the species of fungi that will help in the phenotypic diagnosis of the study fungi^{14,15}. This study aimed to isolate and diagnose fungi isolates using (PCR), determine the sequence of nitrogenous bases, and identify similarities and differences in genetics between the isolates—compared with the same fungi internationally diagnosed recorded in (NCBI).

MATERIALS AND METHODS

Al-Barakia wastewater treatment plant is located in Najaf Governorate to the southeast of the city of Kufa on the Euphrates River (Shatt al-Kufa) at the coordinates (N 32 00 40, E 44 25 20) and as shown in Figure (1): The wastewater treatment plant consists of two projects, where samples were collected from the modern project, which contains two treatment units, Bio_Sheft unit, and compact unit. Water samples were collected from the Al-Barakah sewage treatment plant in the morning of November 2020, and (3 replicates) were taken for the Biosheft unit and the Compact unit. A sample was taken from the al-Kufa River (1 km) before entering the site to carry out laboratory tests, isolate and diagnose fungi from the sewage station, where they are collected using polyethylene containers with a capacity of (5) liters that are washed with distilled water before use. According to (Himedia), PDA was prepared for the isolate of fungi, as (39 g) PDA powder was dissolved in 1 liter of "distilled water" and autoclaved at 121 °C, then 15 ib.ng-1 pressure. The media is then cooled, and an antibacterial, chloramphenicol (250) mg/liter, is added to stop bacterial growth before pouring. Furthermore, the fungi are isolated and purified. A separate method (1 ml) is taken from water samples for the two sites and placed in Petri dishes, 15 ml of PDA medium is added, and three replicates are taken for each site. The media is left until the PDA hardens and then incubated at 25 -⁺ 28 °C for five days until the microbial colonies grow correctly. The process of purification and diagnosis was carried out, including morphology and microscopic features of the fungi.

Molecular diagnosis of fungi isolates

The DNA extraction technique of fungi isolates, by the method described by the American company Zymo0 Research, was used, with the kit (Cat. No. D6005) provided by the same company.

Polymerase chain reaction (PCR)

To diagnose isolates fungus isolated in this study, a test polymerase chain reaction(PCR) through the use of the Kit (Maxime PCR PreMix (i-Taq), Cat. No.25026), made by the Korean company (iNtRoN). They performed a (PCR) with total volumes of the (20µl), which contained (1µl) of each initiator's front (ITS1:TCCGTAGGTGAACCTGCGGG) and posterior (TCCTCCGCTTATTGATATGC: TS4) (White et al.,1990) as well as (1 µl) of DNA extracted. All of the above components were placed inside a tube provided by the manufacturer, and the volume was 20 µl of nuclease-free water. The subsequent steps have doubled the DNA of the fungal isolates. PCR conditions are: DNA denaturation first for five minutes at 98°C, followed by the final denaturation process. that consists of 35 cycles during 40 seconds at 94°C, and the primer annealing process continues during period40s at 55 °C, then the initial elongation by the PCR, amplified products during the period (1 minute) at 72°C. Elongation step at 72°C. Finally, the PCR ended by one step with the final elongation at 72°C¹⁶.

DNA sequence analysis for fungi

This study aims to diagnose the fungal isolates (1-19) and those isolated from the Al-Barakia wastewater treatment plant by PCR. Therefore, the primer (ITS1 and ITS4) was delivered to the Macrogen Company of South Korea to determine The sequence of the nitrogenous bases. All nitrogenous base sequences are analyzed by BLAST to compare the results with the facts provided in NCBI) belonging to the like fungus at (NCBI) Phylogenetic trees analysis is using drawn MEGA X¹⁷.

RESULTS

solation and Identification of Fungi

Table (1) identifies 19 fungal isolates from the Al-Baraka wastewater treatment plant in Najaf. The fungi were identified by molecular diagnosis by PCR technique, and the most fungi were *Aspergillus (13) isolates*, *Trichoderma (3) isolates*, *A. alternate (1)*, *Acremonium sp (1)*, and *C. sphaerospermum((1) isolate* and the similarity and difference ratios were compared with fungi isolates previously registered in NCBI (BLAST) as shown in Table 1

The isolate identified in this study	Nearest relative isolate (Accession No.)	Nucleotide sequence similarity (%)	Origin
<i>Aspergillus caespitosus</i> (1,2,3)	MF319914	100%	India
<i>Aspergillus caespitosus</i> (4,5,6)	MT573201	100%	Saudi Arabia
<i>Aspergillus flavus</i> (7,8)	MT292809	100%	India
<i>Trichoderma asperellum</i> (9,10,11)	LC514692	100%	Indonesia
<i>Aspergillus niger</i> (12,13)	GU951769	100%	China
<i>Aspergillus oryzae</i> (14)	KJ941129	100%	India
<i>A. alternate</i> (15)	MK108918	100%	South Korea
<i>Acremonium sp.</i> (16)	AJ557731	100%	Germany
<i>Aspergillus terreus</i> (17)	KT310990	100%	China
<i>C.sphaerospermum</i> (18)	MN947604	100%	China
<i>Aspergillus tubingensis</i> (19)	MT446135	100%	China

Table 1. Fungi isolated from wastewater treatment plant.

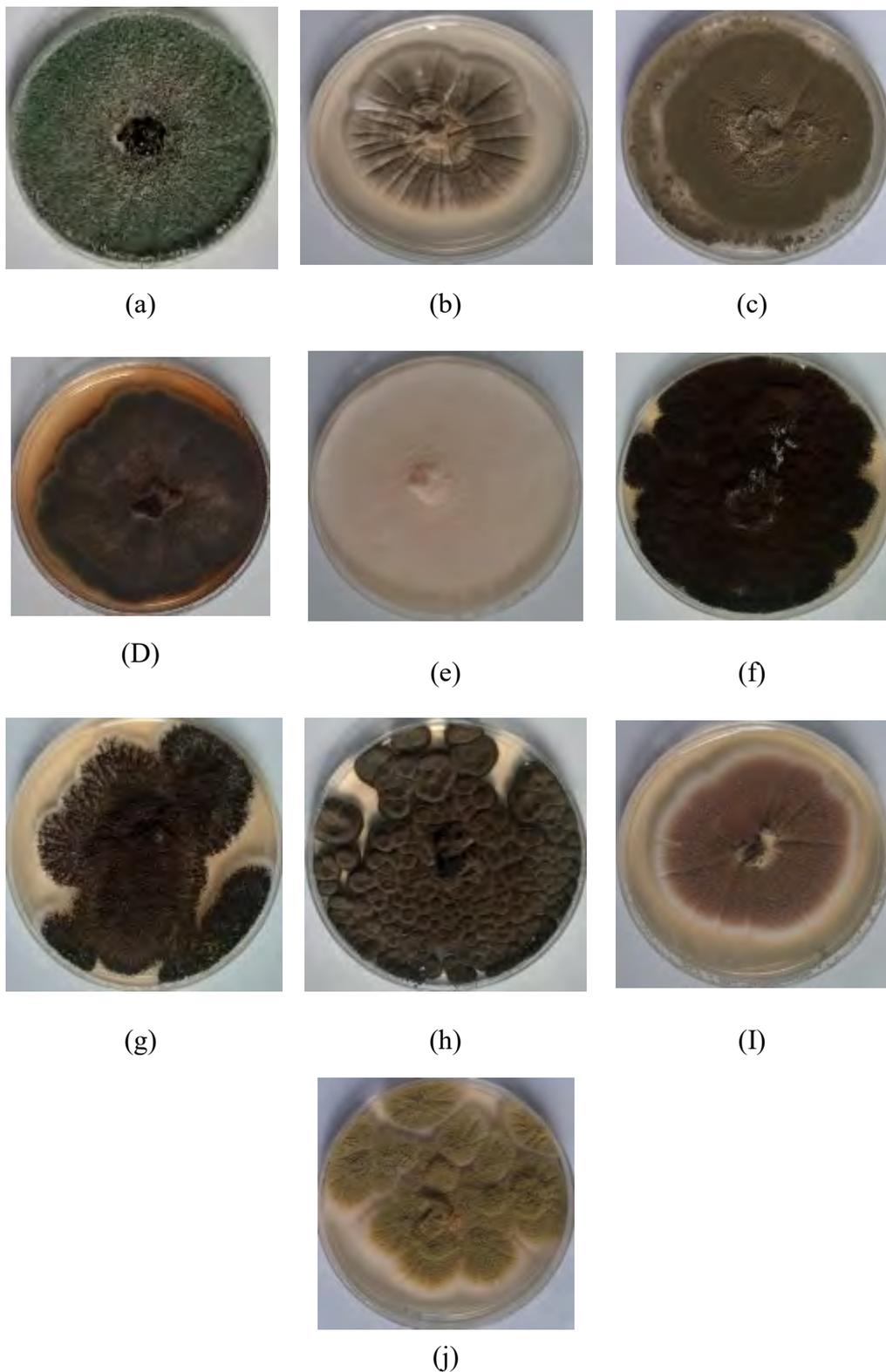


Figure 1. (a) *Trichoderma asperellum*. (b) *Aspergillus caespitosus*. (c) *Aspergillus flavus* (d) *Alternaria alternata*. (e) *Acremonium sp.* (f) *Aspergillus niger* (g) *Aspergillus tubingensis* (h) *Cladosporium sphaerospermum* (I) *Aspergillus terreus* (J) *Aspergillus oryzae*.

Molecular Diagnostics of Fungi by Using PCR Technology

The results of DNA extraction from fungal isolates (1-19) and PCR exposure revealed (Figure 3.2) the capability of multiplying PCR-amplified product with sizes ranging from (620 bp) and using the pair of primers (ITS1) and (ITS2) (ITS4). M = DNA ladder marker (100bp DNA ladder marker with volume each fastened to the number of nitrogen base pairs (bp) on the Figure's left side). N.C. refers to unfavorable Comparison (a mixture containing PCR components without DNA addition). as shown in Figure 2.

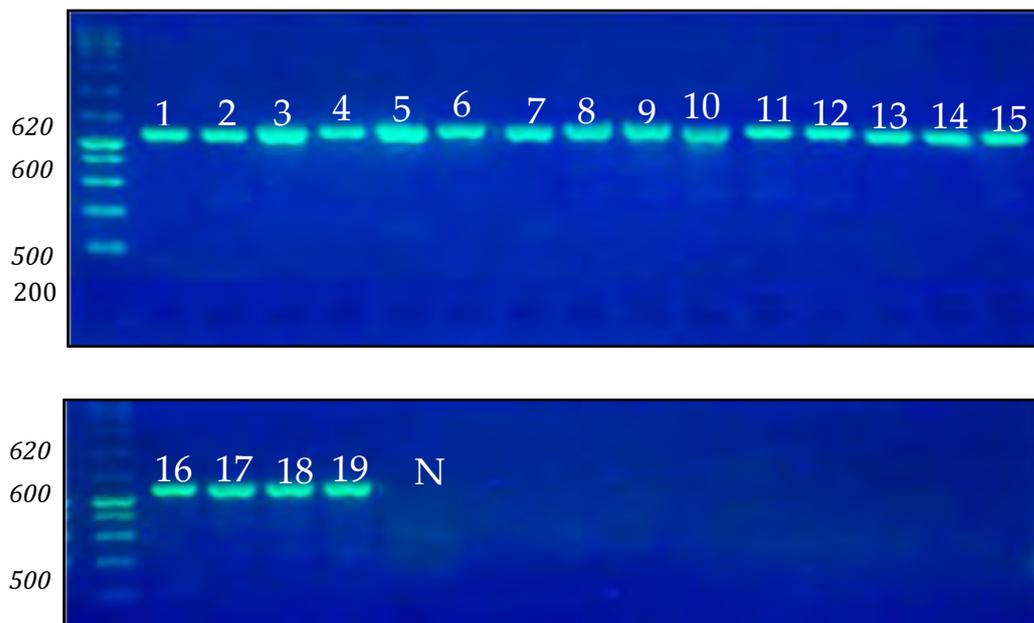


Figure 2. DNA products amplified by polymerase chain reaction (PCR) from fungi isolated (1-19) from the wastewater treatment plant.

The nucleotide sequence analyses of the multiplexed DNA produced by the fungal isolate were shown in the results. Making utilization of (the BLAST) program proves that all the fungal isolates belong to the fungus *A. caespitosus*. Analysis results showed the nucleotide sequences generated from the identified. *A. caespitosus* isolates. The similarity rate was 100%. Among isolates (1, 2, 3), the similarity percentage was 100% between isolates (4, 5, 6), while the similarity percentage was 99% between isolates (1, 2, 3) and (4,5 and 6) diagnosed in this study. As shown in Figure (3)

A. caespitosus

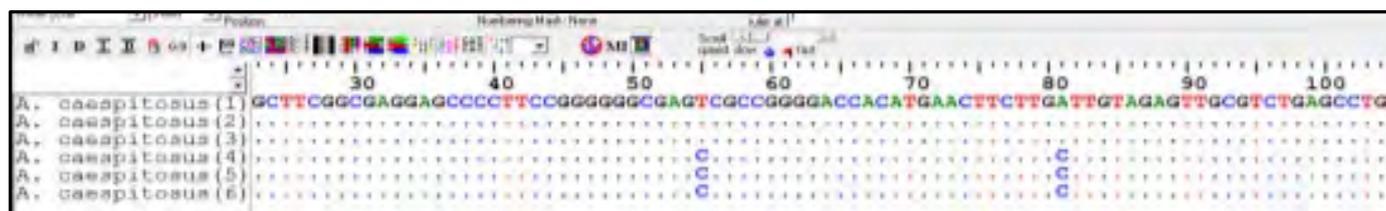


Figure 3. Nucleotide sequence alignment of the PCR products amplified by (PCR) from *A. caespitosus* isolates (1, 2, 3, 4, 5, and 6) isolated in this study.

The numbers on the right side of the fungi name refer to the sequences of nitrogen bases in the DNA products of the fungi in this experiment.

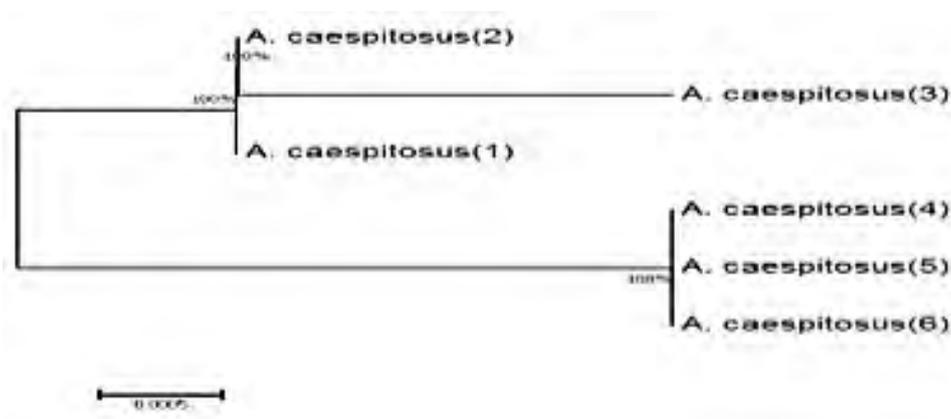


Figure 4. A phylogenetic tree shows the genetics between the *A. caespitosus* isolates (1, 2, 3, 4, 5, and 6) isolated from the wastewater treatment plant.

Fungus	Isolate or strain name.	Origin	The most similar sequences in the GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>A.caespitosus</i>	BAB-6587	India	MF319914	100
<i>A.caespitosus</i>	5H0205	Thailand	KT385755	100
<i>A.caespitosus</i>	K Air-29	Slovakia	KM063244	99
<i>A.caespitosus</i>	TSF04	India	HE653994	99
<i>A.caespitosus</i>	AS20	Saudi Arabia	MT328529	99
<i>A.caespitosus</i>	AS21	Saudi Arabia	MT328531	99
<i>A.caespitosus</i>	NRRL 1929	USA	NR_131288	99
<i>A.caespitosus</i>	CBS 103.45	Japan	AB267813	99
<i>A.caespitosus</i>	DTO 325-C1	Netherlands	KU866669	98

<i>A.caespitosus</i>	UOA/HCPF11 625	Greece	KC253948	98
<i>A.caespitosus</i>	CBS 654.74	Egypt	KU866578	98
<i>A.caespitosus</i>	SRRC 308	USA	AY373841	98
<i>A.caespitosus</i>	SQU-MA12	Oman	KU945912	98
<i>A.caespitosus</i>	CSVNU_JP3	India	MT107145	98
<i>A.caespitosus</i>	CCTU1164	Iran	KY046248	98
<i>A.caespitosus</i>	EGJMP17	India	KF234003	98
<i>A.caespitosus</i>	EF652428	Saudi Arabia	LN812957	98
<i>A.caespitosus</i>	1071	USA	KT826651	98
<i>A.caespitosus</i>	KAUH10	Saudi Arabia	LN827684	97

Table 2. Comparison between the similarity ratios of *Aspergillus caespitosus* isolates from a wastewater treatment plant with the other isolate of the same fungi previously recorded in NCBI.

Isolation of *A.caespitosus* * fungus isolates in this study.

Fungus	Isolate or strain name.	Origin	The most similar sequences in the GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>A. flavus</i>	A1	USA	CP051065	100
<i>A. flavus</i>	K54A	USA	CP051089	100
<i>A. flavus</i>	VCG1	USA	CP051097	100
<i>A. flavus</i>	NRRL 2999	Uganda	CP051033	100
<i>A. flavus</i>	ST3	India	MT292809	100
<i>A. flavus</i>	NRRL 3357	USA	CP044617	100
<i>A. flavus</i>	ADI B9	Pakistan	MK139781	100
<i>A. flavus</i>	DTO 389-C8	Netherlands	MH279451	100
<i>A. flavus</i>	AFc35	Benin	KC964101	100
<i>A. flavus</i>	DMGS7	India	MW020891	100
<i>A. flavus</i>	SF6	Nigeria	MF668181	100
<i>A. flavus</i>	176 1 B2	Brazil	KP784374	99
<i>A. flavus</i>	GFRS16	China	MT447484	99
<i>A. flavus</i>	DTO 213-I2	Netherlands	MH279408	99
<i>A. flavus</i>	MUM:10.200	Portugal	HQ340101	99
<i>A. flavus</i>	NA-DY34	Viet Nam	MF599709	99
<i>A. flavus</i>	SG_4	Italy	MN845198	99
<i>A. flavus</i>	KSRCT-BTMS5	India	MT509808	99
<i>A. flavus</i>	Maci262	France	MG745384	99
<i>A. flavus</i>	SG_10	Italy	MN845204	99
<i>A. flavus</i>	ZGCL17	Pakistan	KT970478	99

Table 3. Comparison between the similarity ratios of *Aspergillus flavus* isolates from a wastewater treatment plant with the other isolate of the same fungi previously recorded in NCBI.

Isolation of *A.flavus* * fungus isolates in this study.

The result showed that using the BLAST program, the nucleotide sequence analyses of the PCR-amplify-produced fungal show that all isolates belong to *Trichoderma asperellum*—analysis results of the nucleotide sequences generated from the identified. *Trichoderma asperellum* isolates show. The similarity isolates between (9, 10, and 11) are 100%. They were diagnosed in this study (Figure 5).

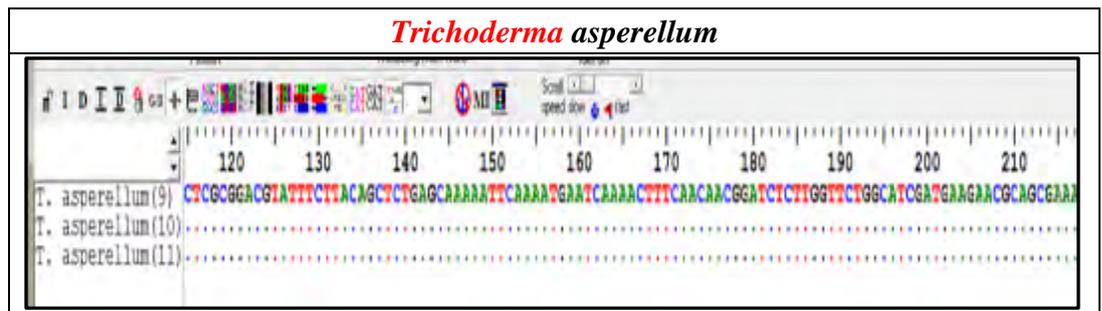


Figure 5. Nucleotide sequence alignment of the PCR products amplified by (PCR) from *T. asperellum* isolates (9,10 and 11) isolated in this study.

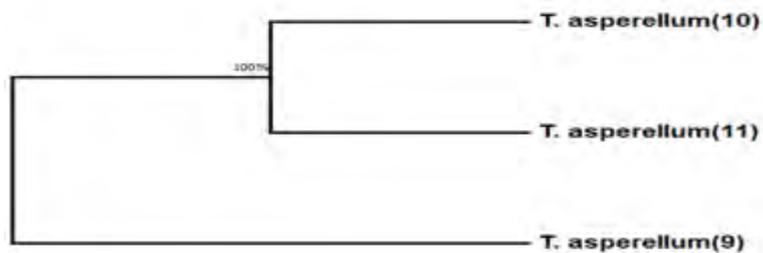


Figure 6. The phylogenetic tree shows the genetic relationships of *T.asperellum* (9, 10, and 11) isolates. This experiment isolates it from the wastewater treatment plant.

Fungus	Isolate or strain name.	Origin	The most similar sequences in the GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>T.asperellum</i>	19MT-04-3	Indonesia	LC514692	100
<i>T.asperellum</i>	IIPRCPT-94	India	MK841023	100
<i>T.asperellum</i>	ECK8	India	MK253266	100
<i>T.asperellum</i>	US 18S	USA	MH130213	100
<i>T.asperellum</i>	CBS 125572	Peru	MH863552	100
<i>T.asperellum</i>	TR24	India	MH400817	100

<i>T.asperellum</i>	TL1	Brazil	KU341017	100
<i>T.asperellum</i>	T337	Mexico	KP059114	100
<i>T.asperellum</i>	TUB F-755	Austria	AY857217	100
<i>T.asperellum</i>	CPTTrZC-12	Colombia	MG687498	100
<i>T.asperellum</i>	TV255	Venezuela	KP263716	100
<i>T.asperellum</i>	TF1	Brazil	KU341007	100
<i>T.asperellum</i>	ASP5	Egypt	KC898194	100
<i>T.asperellum</i>	TS-RP	Morocco	MW074111	100
<i>T.asperellum</i>	ITS1F_837	Poland	MW713493	99
<i>T.asperellum</i>	RIZ11-3S	Nigeria	MW250198	99
<i>T.asperellum</i>	G93	India	MW812028	99
<i>T.asperellum</i>	TAS107	Pakistan	MW785568	99
<i>T.asperellum</i>	Ta31KR	Malaysia	MW543025	99
<i>T.asperellum</i>	JP2	Malaysia	MW082791	99

Isolation of *T.asperellum* * fungus isolates in this study.

Table 4: Comparison between the similarity ratios of *Trichoderma asperellum* isolates from a wastewater treatment plant with the other isolate of the same fungi previously recorded in NCBI.

Fungus	Isolate or strain name.	Origin	The most similar sequences in the GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>A.tubingensis</i>	ZMXR30	China	MT446135	100
<i>A.tubingensis</i>	ZMQR16	China	MT446097	100
<i>A.tubingensis</i>	M1	China	MH055392	100
<i>A.tubingensis</i>	NEF10	India	MT322427	99
<i>A.tubingensis</i>	BJR6	China	MT856267	99
<i>A.tubingensis</i>	DGY03	China	MH055394	99
<i>A.tubingensis</i>	37	Nigeria	MH345877	99
<i>A.tubingensis</i>	RT95IT	Mexico	MW193215	99
<i>A.tubingensis</i>	KIF 1	Indonesia	MW466769	99
<i>A.tubingensis</i>	ND5	Zimbabwe	MG659599	99
<i>A.tubingensis</i>	EX2019-M10	China	MT495451	99
<i>A.tubingensis</i>	AS181	South Korea	LC467944	99
<i>A.tubingensis</i>	CMXY25850	Netherlands	MG991653	99
<i>A.tubingensis</i>	HKAS 93727	Thailand	KX165340	99
<i>A.tubingensis</i>	1210	China	KF435032	99
<i>A.tubingensis</i>	IFO 4308	Japan	AP024428	98
<i>A.tubingensis</i>	RCZ2B-2	Nigeria	MW260084	98

<i>A.tubingensis</i>	NBRC 31125	Japan	LC573619	98
<i>A.tubingensis</i>	NBRC:4407	Japan	LC573617	98
<i>A.tubingensis</i>	NBRC:4050	Japan	LC573615	98

Isolation of *A.tubingensis** fungus isolates in this study

Table 5. Comparison between the similarity ratios of *Aspergillus tubingensis* isolates from a wastewater treatment plant with the other isolate of the same fungi previously recorded in NCBI.

Fungus	Isolate or strain name.	Origin	The most similar sequences in the GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>A.terrus</i>	MSEF93	China	KT310990	100
<i>A.terrus</i>	R7	Iran	MN944451	99
<i>A.terrus</i>	4100062L51-1	South Korea	MN559622	99
<i>A.terrus</i>	MSEF75	China	KT310979	99
<i>A.terrus</i>	DTO 403-C9	Italy	MT316343	99
<i>A.terrus</i>	QCX-28	China	MK418744	99
<i>A.terrus</i>	ATCC 1012	USA	NR_131276	99
<i>A.terrus</i>	A1S4_D36	Malaysia	JX501361	99
<i>A.terrus</i>	UOA/HCPF 10536	Greece	FJ878634	99
<i>A.terrus</i>	wb464	Austria	AF455426	99
<i>A.terrus</i>	2aWF	India	MH196570	99
<i>A.terrus</i>	FJAT-31011	China	KU687809	99
<i>A.terrus</i>	LPSC 1180	Argentina	KF753943	99
<i>A.terrus</i>	NRRL 680	USA	EF669618	99
<i>A.terrus</i>	H15	Germany	AY939788	99
<i>A.terrus</i>	AY839	Namibia	MG250398	99
<i>A.terrus</i>	A8	Australia	JN129182	99
<i>A.terrus</i>	RGS	Egypt	MW282328	99

Isolation of *A.terrus* * fungus isolates in this study.

Table 6. Comparison between the similarity ratios of *A.terrus* isolates from a wastewater treatment plant with the other isolate of the same fungi previously recorded in NCBI.

Fungus	Isolate or strain name.	Origin	The most similar sequences in the GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>A.alternate</i>	KNUZS2	South Korea	MK108918	100
<i>A.alternate</i>	E20	India	MT524319	99

<i>A.alternate</i>	1	Poland	MW720803	99
<i>A.alternate</i>	JN10	China	MN589744	99
<i>A.alternate</i>	HETIAO-04	China	KJ002058	99
<i>A.alternate</i>	TJZYM-341	China	MW008923	99
<i>A.alternate</i>	19-4d-1	China	KX073994	99
<i>A.alternate</i>	R	Iran	MG198619	99
<i>A.alternate</i>	ET 90	Turkey	MK752741	99
<i>A.alternate</i>	OISB-1	Pakistan	MH553296	99
<i>A.alternate</i>	fung2	Poland	MT635274	99
<i>A.alternate</i>	XBC1-3	China	MH588263	99
<i>A.alternate</i>	WZ-267	China	MN856385	99
<i>A.alternate</i>	Aa-23	India	MK979375	99
<i>A.alternate</i>	PAK37	Pakistan	KT280010	99
<i>A.alternate</i>	GG3F23	India	KY949584	99
<i>A.alternate</i>	RdKyA-4b	India	MF116306	99
<i>A.alternate</i>	5-F36	China	MW081364	99
<i>A.alternate</i>	GG2F35	India	KY419541	99
<i>A.alternate</i>	ZLVG 331	Slovenia	HE774489	99

Isolation of *A. alternate* * fungus isolated in this study.

Table 7. Comparison between the similarity ratios of *Alternaria alternata* isolates from a wastewater treatment plant with the other isolate of the same fungi previously recorded in NCBI.

Fungus	Isolate or strain name.	Origin	The most similar sequences in the GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>A.niger</i>	COF01	China	KP764197	100
<i>A.niger</i>	ZMQR6	China	MT446087	99
<i>A.niger</i>	F8143	China	MN429196	99
<i>A.niger</i>	T8	India	MN180811	99
<i>A.niger</i>	2-1	China	MK898825	99
<i>A.niger</i>	mkh-40	Iran	MG775228	99
<i>A.niger</i>	GF6	India	MG759551	99
<i>A.niger</i>	S13	Brazil	MG654699	99
<i>A.niger</i>	BPb7	China	KP940594	99
<i>A.niger</i>	BPb8	China	KP940595	99
<i>A.niger</i>	BPb6	China	KP940593	99
<i>A.niger</i>	BPb4	China	KP940591	99
<i>A.niger</i>	MO-25	Turkey	KF939141	99
<i>A.niger</i>	AL-25 18S	Mexico	KC341970	99

<i>A.niger</i>	YLA3	Thailand	LC496501	99
<i>A.niger</i>	ORTO514	Turkey	MW418321	99
<i>A.niger</i>	BNYG	Egypt	LC582533	99
<i>A.niger</i>	45	Nigeria	MH345885	99
<i>A.niger</i>	J8M-31	China	JN226924	99
<i>A.niger</i>	ND4	Zimbabwe	MG659598	99

Isolation of *A. niger* * fungus isolated in this study.

Table 8. Comparison between the similarity ratios of *Aspergillus niger* isolates from a wastewater treatment plant with the other isolate of the same fungi previously recorded in NCBI.

	Isolate or strain name.	Origin	The most similar sequences in the GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>Acremonium sp.</i>	20	Germany	AJ557731	100

Isolation of *Acremonium sp.* * fungus isolates in this study.

Table 9. Comparison between the similarity ratios of *Acremonium sp* isolates from a wastewater treatment plant with the other isolate of the same fungus previously recorded in NCBI.

Fungus	Isolate or strain name.	Origin	The most similar sequences in the GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>C.sphaerospermum</i>	H89	Oman	MN947604	100
<i>C.sphaerospermum</i>	C5-03	Japan	AB572902	100
<i>C.sphaerospermum</i>	H91	Oman	MN947606	99
<i>C.sphaerospermum</i>	CCTU1121	Iran	KY046241	99
<i>C.sphaerospermum</i>	JnUBD27	Bangladesh	MH393182	99
<i>C.sphaerospermum</i>	6018	Brazil	KX363452	99
<i>C.sphaerospermum</i>	CCTU1124	Iran	KY046243	99
<i>C.sphaerospermum</i>	CCTU1125	Iran	KY046242	99
<i>C.sphaerospermum</i>	WM 05.11	Australia	EF568045	99
<i>C.sphaerospermum</i>	1254	East Pacific O	AM176719	99
<i>C.sphaerospermum</i>	SCSIO z030	China	KX258804	99
<i>C.sphaerospermum</i>	SD-26	India	MF467882	99
<i>C.sphaerospermum</i>	TSY0853	Japan	AB572898	99
<i>C.sphaerospermum</i>	Cla02	Japan	AB572904	99

<i>C.sphaerospermum</i>	NS0138	Japan	AB572894	99
<i>C.sphaerospermum</i>	H6	Oman	MN947602	99
<i>C.sphaerospermum</i>	26R-5-F04	Japan	KX958081	99
<i>C.sphaerospermum</i>	Cla15	Japan	AB572906	99
<i>C.sphaerospermum</i>	C4-11	Japan	AB572901	99
<i>C.sphaerospermum</i>	TSY0379	Japan	AB572896	99
<i>C.sphaerospermum</i>	NH1426	Japan	LC375369	99
<i>C.sphaerospermum</i>	SW67	Germany	MH482916	99
<i>C.sphaerospermum</i>	F23T3IIIA	Brazil	MW533017	99
<i>C.sphaerospermum</i>	AUMC 10865	Egypt	MN826828	98

Isolation of *C.sphaerospermum* * fungus isolated in this study

Table 10. Comparison between the similarity ratios of *Cladosporium sphaerospermum* isolates from a wastewater treatment plant with the other isolate of the same fungi previously recorded in NCBI.

Fungus	Isolate or strain name.	Origin	The most similar sequences in the GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>A.oryzae</i>	KVCET7	India	KJ941129	100
<i>A.oryzae</i>	DTO 213-C8	Netherlands	MH279400	99
<i>A.oryzae</i>	M45	Viet Nam	MH746006	99
<i>A.oryzae</i>	NRRL 35226	USA	EF634406	99
<i>A.oryzae</i>	RIB 40	Japan	AP007173	99
<i>A.oryzae</i>	RIB 40	Japan	AP007172	99
<i>A.oryzae</i>	NRRL 506	USA	AF459735	99
<i>A.oryzae</i>	CBS 100925	France	MF668185	99
<i>A.oryzae</i>	GCU-DAB-S19.2	Pakistan	KU312066	99
<i>A.oryzae</i>	Y1	China	MF374341	99
<i>A.oryzae</i>	ZGCL12	Pakistan	KT964480	99
<i>A.oryzae</i>	ASOP GRD113	India	JX110980	99
<i>A.oryzae</i>	NRRL 35191	USA	EF591304	99
<i>A.oryzae</i>	NRRL 447	USA	EF661560	99
<i>A.oryzae</i>	ZGCL43	Pakistan	KT970479	99

Isolation of *A.oryzae* * fungus isolated in this study

Table 11. Comparison between the similarity ratios of *A.oryzae* isolates from a wastewater treatment plant with the other isolate of the same fungi previously recorded in NCBI.

DISCUSSION

It shows that the highest percentage of 100% genetic similarity for *A. caespitosus* isolates (1,2,3,4,5,6) was with *A. caespitosus* isolates previously isolated from India and Thailand (MF319914 and KT385755, respectively), followed by the diagnosed fungal isolate in Slovakia (KM063244). India (HE653994), Kingdom of Saudi Arabia (MT328529), with a similarity rate of 99%, although genetically distant from the isolate of *A. caespitosus* isolated from Saudi Arabia (LN827684, with a difference of 97%. Also, It showed the proportion of similarity between this isolate and isolates from the world that has been recorded (NCBI). Furthermore, these isolates were not recorded in Iraq. Table 3. shows by comparing the DNA base the sequence of the dual-stranded DNA from *A. flavus* isolate (7,8) with the data at the (NCBI) that the highest similarity percentage (100%) was with the fungus isolates isolated from USA (CP051065, CP051089, CP051097) Uganda, India and China (CP051033, MT292809 and CP047255), respectively. It was also found that the lowest genetic similarity percentage (99%) was for the fungal isolates isolated from India (MT509808, France, Italy, and Pakistan(MG745384, MN845204, KT970478). Respectively. These isolates from wastewater were not recorded in the Arab nations and Iraq.

The results presented in Table 4. show that the highest percentage of 100% genetic similarity for *T. asperellum* (9,10,11) isolates were with *T. asperellum* isolates previously isolated from Indonesia (LC514692) India (MK841023, MK253266), and the USA (MH130213) Isolates were recorded in the Arab world 100% similarity from Egypt (KC898194) and Morocco (MW074111). Although genetically distant from the isolate of *T. asperellum* isolated from India (MW493185) and Malaysia (MW082791) with a difference of 99%, The above Table Shows the proportion of similarity between this isolate and isolates from across the world that has been recorded (NCBI). It was not recorded in the Arab nations and Iraq. The results presented in Table 5. were also presented by comparing the sequence of DNA's nitrogenous bases double for the *A. tubingensis* isolate (12) with data available in the (NCBI) that the highest genetic similarity rate of 100% with Previously isolated fungus isolates from China (MT446135, MT446097, MH055392) followed by the diagnosed fungus isolates from India (MT322427, MT443912) China (MT856267, MH055394), Nigeria (MH345877) and Mexico (MW193215) with a similarity rate of 99% The above Table It showed the proportion of similarity between this isolate and isolates from across the world that has been recorded (NCBI). It was not recorded in the Arab nations and Iraq.

The results presented in Table 6. were also presented by comparing the sequence of the DNA's nitrogenous bases double for the *A. terreus* isolate (13) with data available in the (NCBI) that the highest genetic similarity rate of 100% with Previously isolated fungus isolates from China (KT310990) followed by the diagnosed fungus isolates from Iran (MN944451), South Korea (MN559622), China (KT310979, MK418744), Italy (MT316343), USA (NR_131276) and Egypt (MW282328) with a similarity rate of 99% The above Table It showed the proportion of similarity between this isolate and isolates from across the world that has been recorded (NCBI), where it was not recorded in Iraq.

According to Table 7, comparing the series of the DNA's nitrogenous bases double for the *A. alternate* isolate (16) with the data available in the (NCBI) the highest genetic similarity rate of 100% with Previously isolated fungus isolates from South Korea (MK108918) followed by the diagnosed fungus isolates from India, Poland (MT524319, MW720803) China (MN589744, KJ002058, MW008923, KX0739949) and Iran (MG198619) with a similarity rate of 99% The above Table It showed the proportion of similarity between this isolate and isolates from across the world that has been recorded (NCBI), where it was not recorded in the Arab nation and Iraq.

The results shown in Table 8 comparing the series nitrogenous bases of the DNA double *A. niger* isolates (14, 15) with the available Information in (NCBI) show that the highest genetic similarity rate of 100% with Previously isolated fungus isolates from China (KP764197), followed by the diagnosed fungus isolates in China (MT446087, MN429196) India (MN180811) with a similarity of 99% and also recorded in Egypt (LC582533) with a similarity rate of 99%, The above Table It showed the proportion of similarity between this isolate and isolates from across the world that has been recorded (NCBI), where it was not recorded in Iraq.

Table 9 shows that by comparing the DNA base and the sequence of the dual-stranded DNA from *Acremonium* sp. isolate (19) with the data at the (NCBI) only one isolate was recorded in the world, with a genetic similarity rate of 100%, with a fungus isolate previously isolated from Germany (AJ557731), where no recorded in the Arab world and Iraq.

The results presented in Table 10 were also presented by comparing the sequence of the DNA's nitrogenous bases double for the *C.sphaerospermum* isolate (17) with data available in the NCBI that a highest genetic similarity rate of 100% with Previously isolated fungus isolates from Oman (MN947604), Japan (AB572902) followed by the diagnosed fungus isolates from Oman (MN94760) Iran (KY046241, KY046243), Bangladesh (MH393182), Brazil (KX363452) and Egypt (MN826828) with a similarity rate of 99% The above Table It showed the proportion of similarity between this isolate and isolates from across the world that has been recorded (NCBI).. Where it was not recorded in Iraq.

Table 11 are, comparing by the series of the DNA's nitrogenous bases double for the *A.oryzae* isolate (18) rate of 100% with Previously isolated fungus isolates from India (KJ941129) followed by the diagnosed fungus isolates from Netherlands (MH279400), Viet Nam (MH746006), USA (EF634406) Japan (AP007173) with a similarity rate of 99% The above Table It showed the proportion of similarity between this isolate and isolates from across the world that has been recorded (NCBI), where it was not recorded in the Arab nation and Iraq.

CONCLUSIONS

It is concluded from this study that there is an unlimited diversity of types of fungi in the wastewater treatment plant in Al-Barakia, Najaf. It is also concluded from this learning that all fungi isolates were genetically different from each other. The results proved that these isolates were previously registered in the center, as mentioned above. However, not all isolates were registered in Iraq. In this study, the technique of PCR was used in many previous studies to diagnose many organisms, including fungi, to get free of diagnostic harm depending on the morphological features of fungi¹².

Although morphological diagnosis helps to confine the fungi understudy into smaller sets before using other diagnostic ways, there are some problems associated with a morphological diagnosis of fungi as they require excellent experience in this area and a lot of time and effort. Since some fungal species are found very close to each other in some morphological features, the diagnostic process is more complicated¹⁵. Moreover, fungi are affected by many environmental conditions that may alter the shapes, sizes, and colors of the spore and fungal colony¹⁹.

Differences in DNA sequences of the ITS region (internal transcription spacer)²⁰. They were highly effective and have been exploited to diagnose several fungi types. PCR-based identification has been used extensively in previous studies in diagnosing fungi such as *Acremonium sp*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus niger*^{21,22,23}

Funding: "This research received no external funding."

Acknowledgments: I would like to express my sincere gratitude to Prof. Dr. Nihad Habeb Mutlak for his direct proposal on research and supervision and for giving me absolute confidence and guidance throughout this work. I extend my thanks and appreciation to Asst. Prof. Dr. Aqeel Nazal AL-Abedy for Financial and scientific assistance in completing this work

Conflicts of Interest: "The authors declare no conflict of interest."

REFERENCES

1. Metcalf & Eddy, Burton, F. L., Stensel, H. D., & Tchobanoglous, G. Wastewater engineering: treatment and reuse 2003. McGraw Hill.
2. Crini G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. Progress in polymer science. 2005 Jan 1;30(1):38-70.
3. Cox M, Négré P, Yurramendi L. Industrial liquid effluents. INASMET Tecnalia, San Sebastian. 2007;283.
4. Hussien, S. A. ; Doosh, . K. S.. Extraction And Purification Of B-Galactosidase From (Ziziphus Spina-Christi). JLSAR 2022, 3, 12-22.
5. Metcalf, Leonard, Harrison P. Eddy, and Georg Tchobanoglous. Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse **1991**. Vol. 4. New York: McGraw-Hil,.
6. Krantz, D. and Kifferstein, B., Water pollution and society; 2005. Jungtiné Karalystè

7. Henze M, Comeau Y. Wastewater characterization. Biological wastewater treatment: Principles modeling and design. 2008 Sep 1:33-52.
8. Kusters-van Someren MA, Samson RA, Visser J. The use of RFLP analysis in classification of the black Aspergilli: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. *Curr. Genet.* 1991 Jan;19(1):21-6.
9. Gielkens M, Visser J, de Graaff L. Arabinoxylan degradation by fungi: characterization of the arabinoxylan-arabinofuranohydrolase encoding genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*. *Curr. Genet.* 1997 Jan;31(1):22-9.
10. Hawksworth, D.L.; P.M. Kirk; B.C. Sutton and D.M. Pegler. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 8th edition. CAB International Mycology Institute, Egham. 1995. C/589.203 H3
11. Ali, H.H., AL-Rawi, K., Khalaf, Y., Alaraji, S., Aldahham, B., Awad, M., Al-ani, O., Al-ani, F., Ali, A.T. Serum Caveolin-1 Level is Inversely Associated with Serum Vaspin, Visfatin, and HbA1c in Newly Diagnosed Men with Type-2 Diabetes. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 11 (2), pp. 299-309.
12. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>.
13. Symoens F, Bouchara JP, Heinemann S, Nolard N. Molecular typing of *Aspergillus terreus* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *J. Hosp. Infect.* 2000 1 April;44(4):273-80.
14. Zuccaro A, Summerbell RC, Gams W, Schroers HJ, Mitchell JI. A new *Acremonium* species associated with *Fucus* spp., and its affinity with a phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* clade. *Stud Mycol.* 2004 Jan 1;50:283-97.
15. Abdullah AA, Dewan MM, AL-Abedy AN. Genetic variation of some isolates of *Cladosporium sphaerospermum* isolated from different environments. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2019 1 November (Vol. 388, No. 1, p. 012016). IOP Publishing.
16. Zhang S, Zhao X, Wang Y, Li JI, Chen X, Wang A, Li J. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* in the infected cucumber plants and soil. *Pak. J. Bot.* 2012;44(4):1445-51.
17. Prasad G, Kumar V, Dwivedi SK. Antifungal activity of some selected medicinal plants against *Fusarium solani* causing wilt and rot in Pearl millet. *Asian J Bio Sci.* 2018 Apr;13(1):21-7.
18. Hussain DF, Mutlag NH. Assessment the ability of *Trichoderma harzianum* Fungi in Bioremediation of some of Heavy Metals in Waste Water. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2021 1 June (Vol. 790, No. 1, p. 012087). IOP Publishing.
19. Yu JH, Butchko RA, Fernandes M, Keller NP, Leonard TJ, Adams TH. Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr. Genet.* 1996 May;29(6):549-55.
20. A. Jassim, A., I. Al-Jugifi, W. Gradually Increasing In Lighting Intensity On Characteristics Of Ross 308 Broiler Carcass And Some Internal Organs. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 205-213. doi: 10.32649/ajas.2023.179730.
21. Neamah SK, Alwan SL, AL-Abedy AN. Molecular diagnosis of new *Aspergillus niger* isolates causing degradation of pomegranate (*Punica granatum*) trees in Iraq. *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 2020 Dec 31:79-84.
22. Torrance, L., Cowan, G. H., McLean, K., MacFarlane, S., Al-Abedy, A. N., Armstrong, M., ... & Bryan, G. J. (2020). Natural resistance to Potato virus Y in *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Theoretical and Applied Genetics*, 133, 967-980.
23. Viterbo A, Montero M, Ramot O, Friesem D, Monte E, Llobell A, Chet I. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (T. harzianum T-203). *Curr. Genet.* 2002 Nov;42(2):114-22.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Mutlag N.; Hussain D. New Records in Iraq and Arab Nations for some Fungi Isolated from Al-

Barakia wastewater treatment plant in Al-Najaf Province. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 61.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.61>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Diversity of Butterflies associated with Brassicaceae crops in Basra, Iraq

Faisal Nasser Jaber¹, Aqeel Alyousuf^{1*}, and H. H. Al-Saffar²

¹ Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq; faisal.nasser@uobasrah.edu.iq.

² Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Barah, Iraq

³ Iraq Natural History Research Center and Museum, University of Baghdad, Iraq 2; dr.hanaa66@uobaghdad.edu.iq

* Correspondence: aqeel.alyousuf@okstate.edu

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.62>

ABSTRACT

The study aimed to investigate the seasonal presence and characterization of the group of butterflies (abundance, richness and biodiversity) in the agroecosystem of Brassicaceae plants in the Basra province. Two different ecosystem sites (Karmat Ali at the sedimentary habitat and Al-Zubair region at the desert habitat) were sampled during the growing season of 2020/2021. There are 823 and 507 individuals at the Karmat Ali and Al-Zubair sites, respectively; the specimens consist of 9 butterflies belonging to four families. The most abundant family was Nymphalidae (60%), followed by Lycaenidae (28%) and Pieridae (9%), while Hesperidae recorded the lowest relative abundance of 3%. The highest butterfly population was recorded for *Vanessa Carudi*, while *Pieris rapae* had the lowest density. The results showed differences in abundance, species richness, and Diversity of butterflies at the sites. The highest values of Diversity and richness were at Karmat Ali, compared to the Al-Zubair region. The study of butterflies' abundance and biodiversity indices indicated that environmental factors and the polyculture plantations support the butterfly population in agricultural habitats.

Keywords: Basra; Biodiversity; Brassicaceae; Butterflies; Shannon index; Richness.

INTRODUCTION

Butterflies are considered adequate ecological representatives for the invertebrates¹⁻⁴ and clear evidence of the changes in the environmental quality. Butterflies also play critical ecological roles in natural and agricultural habitats; they perform basic ecosystem services⁵⁻⁷ by recycling essential nutrients (nitrogen, potassium and phosphorus) which are required by crops; adult butterflies usually suck the nectar, and larvae feed on the leaves of different plants of the agricultural landscapes, then releasing their feces containing some of these nutrients⁸⁻¹¹. Also, butterflies exist in the food chain of many vertebrates, such as birds and lizards¹², and they host many parasites, which decrease the pest populations^{13, 14}.

In the last few decades, the population of butterfly species has declined dramatically worldwide due to environmental changes and habitat destruction of¹⁵. For example, the number of butterflies in the United States has decreased sharply due to global warming and environmental changes^{16, 17}; the population of the western monarch is declining at an estimated rate of 1.6% annually; and more than 450 species of butterflies, including the western monarch butterflies, have declined by 99.9% since the 1980s¹⁸. A declining population of

butterfly species was also observed in Europe¹⁹; for example, 76% of the 59 species of migratory and endemic butterflies in the United Kingdom between 1976 and 2014²⁰. The development of ecological indices is essential in the field of biodiversity conservation. Butterflies quickly respond to ecosystem disturbance. Thus, they have been specified as significant biological indicators for evaluating the biodiversity of natural and agricultural habitats and monitoring the response of the ecosystems to environmental change and degradation²¹.

Globally, the decline in the number of butterfly species and habitat losses has led to an increased consciousness of conserving butterflies and their habitat²². Due to the critical role of butterflies, which provide essential environmental services to crops and native wild plant species in many ecosystems, extensive research on the habitat requirement of butterflies is essential to promoting conservation efforts^{23,24}. Therefore, the conservation and the Diversity of butterfly species (especially the pollinators) requires a broad understanding of their foraging behavior and their spatio-temporal distribution in agricultural habitats²⁵; however, most specialized butterfly species usually depend on a limited set of host plants for their larval stage, or they use a limited number of nectar sources, even when a large number of nectar-producing plants are available^{26,27}; butterflies also tend to use areas within the site where host plants are located near nectar sources or chose the host plants for laying eggs on the host plants close to the nectar sources; thus the correlation of egg laying and feeding on nectar must be studied according to the abundance of the host plants and nectar sources²⁸. Despite the Diversity of butterflies in many natural habitats and their importance, especially concerning their ecological, behavioral, and functional role (especially pollination)^{5,8}, little research has been done about the role of butterflies on the Biodiversity in Iraq²⁹⁻³². In agricultural ecosystems, many butterfly species play an essential role as pollinators of several crops that humans depend on for their livelihoods^{33,34}; and no published data describe the Diversity of butterflies present in agricultural habitats in Iraq. The current study aimed to investigate the seasonal presence and characterization of the group of butterflies (abundance, richness and biodiversity) in the agroecosystem of Brassicaceae plants in the Basra province.

MATERIALS AND METHODS

Study Sites

Two sites were chosen to study butterflies' seasonal activity and Biodiversity in Basra Province, southern Iraq, during the 2020-2021 growing season. The first site represented the agroecosystem of the sedimentary plain habitat³⁵, at the region of Karmat Ali; a field in agricultural station of the College of Agriculture at the University of Basra, close to Shatt Al-Arab river, was chosen as a permanent station No. 1 (30 25 45.1" N, 47 55 52.1" E), Where different crops are grown annually, in addition to the presence of trees such as date palm and Jujube. The second site represented the agroecosystem of the desert habitat³⁵, which was designated for the cultivation of the tomato crop and some leafy crops, mainly in Basra province; a field was chosen in Al-Zubair region as a permanent station No. 2 (30 39 5.47" N, 47 42 34.32" E). Each field (12 x 60 m²) was prepared, divided into plots, and planted with seven Brassicaceae crops (White radish *Raphanus sativus* subsp. *acanthiformis*, Arugula *Eurica Sativa*, rapeseed *Brassica napus*, mustard *Brassica carinata*, broccoli *Brassica oleracea*, variety *italica*, cauliflower *Brassica oleracea*, variety *botrytis*, cabbage *Brassica oleracea*, variety *capitata*).

Butterfly community composition and seasonal activity

During the butterfly flight season, Butterflies were monitored and collected for each species at each site biweekly during the sampling period of the growing season of 2020/2021 by using the insect net. Butterflies were sampled between 8:30 and 12:30 am and transferred to the laboratory for identification; specimens were kept in the insect collection box after hardening and recording all the necessary information. Butterfly species

were diagnosed using taxonomic keys^{36,37}. Butterfly Relative abundance was estimated for each species at both studied sites³⁸.

$$Ra (\%) = (N/Ns) \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

Where Ra= Relative abundance, N = the number of individuals of one species in the sample, Ns = the total number of individuals.

Biodiversity indices

Four ecological indices were used to measure the biodiversity of the butterfly community in the agroecosystems of Brassicaceae plants. The values of the biodiversity indices for the butterflies were calculated during the agricultural season from 1/11/2020 to 1/4/2021:

Shannon Diversity Index (H)

The diversity index values were calculated according to the equation mentioned in³⁹.

$$H = -\sum P_i \ln P_i \dots \dots \dots (2)$$

Where H = the value of Diversity, P_i = the ratio of the number of individuals of each species to the total number.

The Shannon-Wiener index value usually is between 1.5 and 3.5 for ecological data and rarely exceeds 4.0.

Richness index (D)

The value of the Richness index was calculated according to the equation given in⁴⁰:

$$D = S/\sqrt{N} \dots \dots \dots (3)$$

Where D = the value of Richness, S = number of species, N = total number of individuals in the sample

Evenness index (J)

The Evenness index was determined according to⁴¹:

$$J = H/\log(S) \dots \dots \dots (4)$$

Where J = the Evenness value, H = value of the index of Diversity, S = number of species

Dominance index (d)

This index was calculated according to the equation in⁴²:

$$d = N \max / N \dots \dots \dots (5)$$

Since d = the value of Dominance, N max = number of individuals of the dominant species, N = total individuals in the sample.

The reciprocal of the index, 1/d, is often used so that an increase in the index's value is accompanied by an increase in Diversity and a decrease in dominance.

Statistical analysis

The results of Butterflies-seasonal activity were analyzed according to ANOVA; then, the averages were compared using the least significant difference at a probability level 0.05.

RESULTS

Butterfly community composition and seasonal activity

The study of the community composition of butterflies showed that the total numbers of individuals collected were 823 and 507 individuals at the Karmat Ali and Al-Zubair sites, respectively; the specimens consist of 9 species of butterflies belonging to four families of the order Lepidoptera (Table 1); the results of Table (2) indicated that there were significant differences ($P < 0.05$) among the butterflies populations associated with Brassicaceae plants; butterflies showed highest population of 4.71 individuals/ month at Karmat Ali, compared to 3.28 individuals/ month in the Al-Zubair region. However, the highest butterfly population was recorded for *Vanessa cruda*, which reached 12.73 individuals/ month. At the same time, *Belenois aurora* had the lowest density, with an average of 0.2 individuals/ month during the growing season. *V. cardui* recorded the highest rate of 15.55 individuals/ month in the Karmat Ali site, while *B. aurora* had the lowest rate of 0.2 individuals/ month at both study sites.

Also, the results showed significant differences ($P < 0.05$) in the densities of butterfly species during the growing season in the two study stations (Table 3); the highest population of butterfly species was in March, with an average of 4.21 individuals/month, while the lowest density was found in January, reaching 3,065 individuals/month in both study sites. The highest rate of butterflies was recorded in the Karmat Ali area in March, with an average of 5.73 individuals/month, compared to the lowest number of 2.08 individuals in December. However, in the Al-Zubair area, the highest and lowest populations of 5.58 and 1.37 individuals were found in December and February, respectively.

Butterfly	Family
<i>Danaus chrysippus</i>	Nymphalidae
<i>Vanessa cardui</i>	Nymphalidae
<i>Colias croceus</i>	Pieridae
<i>Pieris rapae</i>	Pieridae
<i>Belenois aurora</i>	Pieridae
<i>Tarucus callinara</i>	Lycaenidae
<i>Zizeeria karsandra</i>	Lycaenidae
<i>Lampides boeticus</i>	Lycaenidae
<i>Parnara guttata</i>	Hesperiidae

Table 1. Butterflies associated with Brassicaceae crops in Basra Province.

Species	Population Density (Indiv./month)		Mean
	Karmat Ali	Al-Zubair	
<i>Danaus chrysippus</i>	8.35	4.3	6.33
<i>Vanessa cardui</i>	15.55	9.9	12.73
<i>Colias croceus</i>	2.40	1.10	1.75
<i>Pieris rapae</i>	0.75	0.65	0.70
<i>Belenois aurota</i>	0.20	0.20	0.20
<i>Tarucus callinara</i>	3.80	2.25	3.03
<i>Zizeeria karsandra</i>	5.40	8.15	6.78
<i>Lampides boeticus</i>	4.30	1.65	2.98
<i>Parnara guttata</i>	1.60	1.30	1.45
Mean	4.71	3.28	
LSD	0.55		1.24

Table 2. Population density of butterfly species in the two study sites during the growing season 2020-2021.

L.S.D. for interaction butterflies and regions (1.759).

Site	Population Density (Indivi./month)				
	Nov.	Des.	Jan.	Feb.	Mar.
Karmat Ali	3.80	2.08	4.63	4.95	5.73
Alzuber	3.60	5.58	1.50	1.37	2.70
Mean	3.70	3.83	3.06	3.16	4.21
LSD	0.88				

Table 3. The seasonal activity of butterfly species in the two study areas 2020-2021.

L.S.D. for interaction Months and sites (1.24).

The results of Table (4) showed that there were significant ($P < 0.05$) differences among the populations of butterfly species; the butterfly *V. carudi* was numerically superior during the growing season; the density was 16.88 individuals in March; however, the species *Belenois aurota* has not been recorded during the season except in November, with an average of 1.00 individuals/month.

Butterfly	Population Density (Indivi./month)				
	Nov.	Des.	Jan.	Feb	Mar.
<i>Danaus chrysippus</i>	5.75	6.62	8.75	6.12	4.37
<i>Vanessa cardui</i>	4.00	14.37	12.37	16.00	16.88
<i>Colias croceus</i>	4.75	1.62	0.75	1.12	0.05
<i>Pieris rapae</i>	1.25	1.12	0.37	0.37	0.37
<i>Belenois aurota</i>	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Tarucus callinara</i>	0.00	3.75	3.37	3.12	4.87
<i>Zizeeria karsandra</i>	13.75	5.50	2.75	3.00	8.88
<i>Lampides boeticus</i>	3.75	3.37	1.87	1.75	4.12
<i>Parnara guttata</i>	2.75	1.87	0.37	0.12	2.12

Table 4. The seasonal activity of butterfly species in Basra province during the growing season 2020-2021.

L.S.D. for interaction Butterflies and Months (2.78).

Relative abundance

The results of Table (5) showed that the highest relative abundance was recorded for the butterfly *V. cardui* on the crops of the Brassicaceae during the growing season 2020-2021, at a rate of 38.72%, followed by the butterfly *Danaus chrysippus*, with the relative abundance of 16.76%; while the lowest relative abundance was recorded for the *Pieris rapae*, with an average of 1.05%. The results of the study also showed that the family Nymphalidae was the most abundant, reaching 60%, followed by Lycaenidae (28%) and Pieridae (9%), while Hesperidae recorded the lowest relative abundance of 3% (Figure 1).

Butterfly	Karmat Ali	Al-Zubair	Relative abundance %
	Captured butterflies		
<i>Danaus chrysippus</i>	157	124	16.76
<i>Vanessa cardui</i>	311	140	38.72
<i>Colias croceus</i>	9	20	2.93
<i>Pieris rapae</i>	14	20	1.05
<i>Belenois aurota</i>	50	0	5.03
<i>Tarucus callinara</i>	104	112	12.93

<i>Zizeeria karsandra</i>	73	80	7.14
<i>Lampides boeticus</i>	76	52	12.03
<i>Parnara guttata</i>	29	16	2.18

Table 5. The relative abundance of butterflies associated with the Brassicaceae crops in Basra during the growing season of 2020-2021.

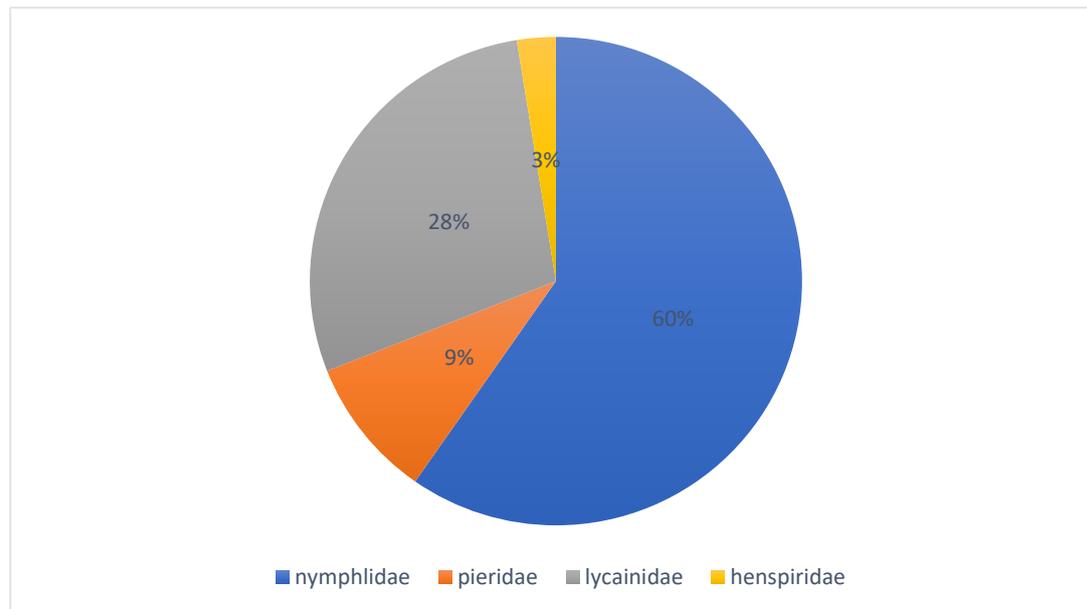


Figure 1: Relative abundance of butterflies' families associated with the Brassicaceae crops in Basra during the growing season of 2020-2021.

Butterflies Biodiversity (Ecological indices)

Spatial Diversity

The results of Table (6) indicated that the ecological indices had a slight variation between the study stations; the highest values of Diversity and richness were 1.79 and 1.19 at Karmat Ali, compared to the values of 1.65 and 0.96 in the Al-Zubair region. The highest values of dominance and Evenness were 0.40 and 0.75 in the Al-Zubair region, and the lowest values of 0.38 and 0.66, respectively, were in Karmat Ali.

Ecological index	Karmat Ali	Al-Zubair
Taxa_S	9	7
Individuals	823	507
Shannon_H	1.79	1.65

Evenness_e^H/S	0.66	0.75
Richness	1.19	0.96
Dominance	0.38	0.40

Table 6. Butterflies Biodiversity in Karmat Ali and Al-Zubair regions, 2020-2021.

Temporal Diversity

The results of the temporal Diversity of butterfly species in the Karmat Ali region (Table 7) indicated that the butterflies' highest value of Diversity was 1.80 in November; however, the lowest value was 1.45 in February. The highest value of richness (1.47) was recorded in March, and the lowest (1.19) was in November. The results revealed butterflies' lowest degree of dominance (0.29) and highest evenness value (0.86) in February. In contrast, the highest value of dominance (0.53) and lowest value of Evenness of species (0.54) was found in November.

Ecological index	Nov.	Des.	Jan.	Feb	Mar.
Taxa_S	7	7	8	8	9
Individuals	152	77	187	198	229
Shannon_H	1.80	1.66	1.59	1.45	1.73
Evenness_e^H/S	0.86	0.75	0.61	0.54	0.63
Richness	1.19	1.38	1.34	1.32	1.47
Dominance	0.26	0.39	0.41	0.53	0.43

Table 7. Butterflies biodiversity during the growing season at Karmat Ali region, 2020-2021.

At the Al-Zubair region (Table 8), the temporal Diversity of butterfly species differed from that of the Karmat Ali site; the highest and lowest values of Diversity were 1.80 and 1.21 in January and February, respectively. The lowest value of richness was recorded in January (1.32), while the lowest was found in November (0.52). In December, the highest degree of dominance (0.46) and lowest Evenness (0.72) of butterflies were recorded. However, the lowest value of dominance (0.28) and highest Evenness (0.96) was found in November and January, respectively.

Environmental index	Nov.	Des.	Jun.	Feb	Mar.
Taxa_S	3	7	7	4	4
Individuals	47	215	93	53	99

Shannon_H	1.06	1.62	1.80	1.21	1.31
Evenness_e^H/S	0.96	0.72	0.86	0.84	0.93
Richness	0.52	1.12	1.32	0.76	0.65
Dominance	0.43	0.46	0.28	0.45	0.34

Table 8. Butterflies Biodiversity during the growing season at Al-Zubair region, 2020-2021.

DISCUSSION

The community composition of butterflies associated with Brassicaceae plants was very similar depending on the butterfly species at the Karmat Ali and Al-Zubair sites; nine species of butterflies were recorded belonging to four families of the order Lepidoptera; the results of the study indicated that the family Nymphalidae was the highest relative abundant, followed by Lycaenidae and Pieridae; while Hesperidae was lower abundant (Figure 1); Nymphalidae is represented by two important species, *V. carudi* and *Danaus chrysippus*, which prefer open field cultivations compared to greenhouses⁴³; in this study, *V. carudi* which is one of the relative generalist species⁴³ had the highest butterfly population and was the most abundant throughout the sites, while *P. rapae* was less abundant and had low density during the growing season. The current study's findings indicated that a small number of butterfly species occurred in Brassicas fields in both sites of the sedimentary and desert habitats. Several investigations indicated that agroecosystem habitats usually supported poor communities of butterfly species^{44,45,46} explained that the agroecosystem usually supported very few butterfly species (generally 5–50), which is characterized by a high population of butterflies. However, another study about the butterflies in Dohuk Province, northern Iraq, showed the presence of 49 species belonging to seven families: Papilionidae, Pieridae, Libytheidae, Nymphalidae, Satyridae, Lycaenidae and Hesperidae³².

The seasonality results indicated that the highest rate of butterflies was recorded in the Karmat Ali area in March, and the lowest number was found in December. In contrast to the Al-Zubair site, the highest and lowest populations of butterflies were observed in December, and the lowest populations were recorded in February (Table 3-5). Depending on field observation, the most abundant butterfly, *V. carudi* (Nymphalidae), a generalist species, was regularly recorded collecting floral resources on several weeds in the blooming stage; they were observed making extended visits to flowers of Malow Malva parviflora in December in Al-Zubair. The results of this study confirmed that the 1st site (Karmat Ali), cultivated with different plantations and located at the river edge, had high Diversity and population densities. In contrast, the 2nd site (Al-Zubair), which had an enormous monoculture plantation, stressed fewer species of butterfly community^{47,48}. However, the seasonal variation of butterfly species populations at these two different sites could be attributed to the cyclic changes in climate elements of temperature and precipitation monthly⁴⁹⁻⁵¹. The butterflies' seasonal activity usually coincides with the peak of the flowering stage of host plants⁵²⁻⁵⁴.

Overall, butterflies' Diversity and richness varied between the study sites; the Karmat Ali site hosted a higher diversity and richness of butterfly species than the Al-Zubair site. The differences in butterflies' richness and Diversity were attributed to the differences in region characteristics (agricultural landscape, plantations, and river vicinity of Brassica plants), in addition to the influence of environmental factors⁵⁵.

CONCLUSIONS

The lack of large areas of natural habitats in Basra province and the incidence of rare and uncommon butterfly species pushes it urgent that efforts should be focused on conserving biodiversity through the maintenance and improvement of natural and agricultural habitats; it was noticed that *P. rapae*, which was abundant years ago in Basra, is the least abundant now. The current study offers specific encouragement that the Brassicaceae plants support the butterfly's community even with a small number of butterfly species; nine species belong to Nymphalidae, Lycaenidae, Pieridae, and Hesperidae associated with the above plant family. Due to the findings, the butterfly species have specific habitat requirements; the species diversity of butterflies in the agroforestry systems of Karamat Ali (sedimentary habitats) is much higher than that of the Al-Zubair region (desert habitats); the study of butterflies abundance and biodiversity indices indicated that environmental factors and the polyculture plantations support the butterfly's population in the natural and agricultural habitats. Depending on the present study, the use of butterfly species indicates the agricultural landscape's biodiversity.

Author Contributions: Conceptualization, F. N. J. and A.A.; H. H. A methodology, F. N. J. and A.A.; H. H. A; software, A.M.M.; validation, F. N. J. and A.A.; formal analysis, A.M.M. and A.A.; investigation, A.M.M. and A.A.; resources, A.M.M. and A.A.; data curation, F. N. J. and A.A.; writing—original draft preparation, F. N. J. and A.A.; writing—review and editing, A.A.; visualization, A.A.; supervision, A.A.; project administration, A.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data supporting this study's findings are available from the corresponding author, Aqeel Alyousuf, upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank the growers who let us conduct this study in their orchards.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Kumar S, Simonson SE, Stohlgren TJ. Effects of spatial heterogeneity on butterfly species richness in Rocky Mountain National Park, CO, U.S.A. *Biodivers. Conserv.* 2009;18(3):739-63. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9536-8>
2. Kremen C. Assessing species assemblage indicator properties for monitoring natural areas. *Ecol Appl.* 1992;2(2):203-17. <https://doi.org/10.2307/1941776>
3. Kremen C. Biological inventory using target taxa: a case study of the butterflies of Madagascar. *Ecol Appl.* 1994;4(3):407-22. <https://doi.org/10.2307/1941946>
4. Van Swaay CA, Dennis EB, Schmucki R, Sevilleja C, Balalaikins M, Botham M, et al. The E.U. Butterfly Indicator for Grassland species: 1990-2017. Technical report. 2019. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34330.98240>

5. Schmidt N, Roland J. Moth diversity in a fragmented habitat: importance of functional groups and landscape scale in the boreal forest. *Annals of the Entomological Society of America*. 2006;99(6):1110-20. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2006\)99\[1110:MDIAFH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2006)99[1110:MDIAFH]2.0.CO;2)
6. Sharma M, Sharma N. Suitability of butterflies as indicators of ecosystem condition: a comparison of butterfly diversity across four habitats in Gir Wildlife Sanctuary. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2017;4(3):1-12.
7. Yu-Feng M, Khan Z, Perveen F, Rafi MA, Shah SW, Xiao-Hong S, et al. Biodiversity of butterflies in Tangi Charsadda, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Pak. J. Zool* .2020;52(3):835. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20190326090338>
8. Brito MM, Ribeiro DB, Raniero M, Hasui E, Ramos FN, Arab A. Functional composition and phenology of fruit-feeding butterflies in a fragmented landscape: Variation of seasonality between habitat specialists. *J. Insect Conserv.* 2014;18(4):547-60.
9. Sharma S, Dalip K, Mansotra JP. Role of butterflies in shaping an ecosystem: why to protect them. *Biodivers. Conserv.* 2020;39:44.
10. Sagi N, Hawlena D. Arthropods as the Engine of Nutrient Cycling in Arid Ecosystems. *Insects*. 2021;12(8):726. <https://doi.org/10.3390/insects12080726>
11. Kagata H, Ohgushi T. Carbon to nitrogen excretion ratio in lepidopteran larvae: relative importance of ecological stoichiometry and metabolic scaling. *Oikos*. 2012;121(11):1869-77. <https://doi.org/10.2307/41686652>
12. Hanspach J, Loos J, Dorresteyn I, von Wehrden H, Moga CI, David A. Functional diversity and trait composition of butterfly and bird communities in farmlands of Central Romania. *Ecosyst. Health Sustain* 2015;1(10):1-8. <https://doi.org/10.1890/EHS15-0027.1>
13. van Nouhuys S, Shaw M, Stefanescu C. Parasitoids of European butterflies. *Ecology of butterflies of Europe*: Cambridge University Press; 2009. p. 130-56.
14. Toro-Delgado E, Hernández-Roldán J, Dincă V, Vicente JC, Shaw MR, Quicke DL, et al. Butterfly–parasitoid–hostplant interactions in Western Palaearctic Hesperidae: a D.N.A. barcoding reference library. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2022. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlac052>
15. Warren MS, Maes D, van Swaay CAM, Goffart P, Van Dyck H, Bourn NAD, et al. The decline of butterflies in Europe: Problems, significance, and possible solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(2):e2002551117. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002551117>
16. Forister M, Halsch C, Nice C, Fordyce J, Dilts T, Oliver J, et al. Fewer butterflies seen by community scientists across the warming and drying landscapes of the American West. *Science*. 2021;371(6533):1042-5. <https://doi.org/10.1126/science.abe5585>
17. Robinet C, Roques A. Direct impacts of recent climate warming on insect populations. *Integrative zoology*. 2010;5(2):132-42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2010.00196.x>
18. University of Arizona. Dramatic decline in western butterfly populations linked to fall warming. *ScienceDaily* Retrieved September 7, 2022 from www.sciencedaily.com/releases/2021/03/210304145405.htm. 2021. www.sciencedaily.com/releases/2021/03/210304145405.htm.

19. Stefanescu C, Torre I, Jubany J, Páramo F. Recent trends in butterfly populations from north-east Spain and Andorra in the light of habitat and climate change. *Journal of Insect Conservation*. 2011;15(1):83-93. <https://doi.org/10.1007/s10841-010-9325-z>
20. Fox R, Brereton T, Asher J, August T, Botham M, Bourn N, et al. *The State of the U.K.'s Butterflies 2015*. 2015.
21. Gonzalez D, Pinto L, Sousa D, Oliveira I, Oliveira PS. Butterfly species richness and Diversity on tourism trails of Northeast Portugal. *Journal of Entomological Science*. 2017;52(3):248-60.
22. Thogmartin WE, Wiederholt R, Oberhauser K, Drum RG, Diffendorfer JE, Altizer S, et al. Monarch butterfly population decline in North America: identifying the threatening processes. *Royal Society open science*. 2017;4(9):170760. <https://doi.org/10.1098/rsos.170760>
23. Munyuli MT. Pollinator biodiversity in Uganda and in Sub-Sahara Africa: Landscape and habitat management strategies for its conservation. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 2011;3(11):551-609.
24. Ellis S. U.K. Conservation Strategy 2025 Appendix 5 U.K. Landscape Conservation Progress. 2018. . <https://doi.org/10.1017/S1742758409990233>
25. Kuefler D, Haddad NM, Hall S, Hudgens B, Bartel B, Hoffman E. Distribution, population structure and habitat use of the endangered Saint Francis Satyr butterfly, *Neonympha mitchellii francisci*. *The American Midland Naturalist*. 2008;159(2):298-320. [https://doi.org/10.1674/0003-0031\(2008\)159\[298:DPSAHU\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2008)159[298:DPSAHU]2.0.CO;2)
26. Jansen SH, Holmgren M, van Langevelde F, Wynhoff I. Resource use of specialist butterflies in agricultural landscapes: conservation lessons from the butterfly *Phengaris (Maculinea) nausithous*. *Journal of Insect Conservation*. 2012;16(6):921-30. <https://doi.org/10.1007/s10841-012-9479-y>
27. Brückmann SV, Krauss J, Steffan-Dewenter I. Butterfly and plant specialists suffer from reduced connectivity in fragmented landscapes. *Journal of Applied Ecology*. 2010;47(4):799-809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01828.x>
28. Vargas H, Benítez H. Egg Phenology of a Host-Specialist Butterfly in the Western Slopes of the Northern Chilean Andes. *Neotropical Entomology*. 2013.
29. Kemal M, Koçak A. A synonymous and distributional list of the Lepidoptera of Iraq based on the infosystems of the Cesa. *Priamus*. 2018;17(2114):208.
30. Augul RS. Insect pollinators in different regions of Iraq. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2016;4(2):391-402.
31. Khudhur FA. Faunistic study of butterflies (Lepidoptera, Papilionoidea) of Sulaymaniyah Province, Kurdistan-Iraq. *Biodiversity Data Journal*. 2022;10. <https://doi.org/10.3897/BDJ.10.e82612>
32. Said NT, Çiftçi MC, Seven E. A preliminary list of butterflies (Lepidoptera, Rhopalocera) from Duhok (Northern Iraq). *Transactions of the American Entomological Society*. 2018;144(3):637-44. <https://doi.org/10.3157/061.144.0313>
33. Katumo DM, Liang H, Ochola AC, Lv M, Wang Q-F, Yang C-F. Pollinator diversity benefits natural and agricultural ecosystems, environmental health, and human welfare. *Plant Diversity*. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2022.01.005>

34. Stanley DA, Gunning D, Stout JC. Pollinators and pollination of oilseed rape crops (*Brassica napus* L.) in Ireland: ecological and economic incentives for pollinator conservation. *Journal of Insect Conservation*. 2013;17(6):1181-9. <https://doi.org/10.1007/s10841-013-9599-z>
35. A. Al-ani, H., S. Asker, A., S. Hseen, N. The Effect Of Using Anabasis Articulate Extract And Melatonin Hormone Locally In Vaginal Sponges On The Reproductive Performance Of Local Iraqi Ewes. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 214-223. doi: 10.32649/ajas.2023.179739.
36. Abbas M. Distribution and taxonomy of butterflies of district Skardu [NWFP] Pakistan. 2000.
37. Wiltshire EP. *Lepidoptera of Iraq*. The Ministry of Agriculture Government of Iraq, Nicholas Kaye, Ltd, London. 1957;162.
38. Ali, H.H., AL-Rawi, K., Khalaf, Y., Alaaraji, S., Aldahham, B., Awad, M., Al-ani, O., Al-ani, F., Ali, A.T. Serum Caveolin-1 Level is Inversely Associated with Serum Vaspin, Visfatin, and HbA1c in Newly Diagnosed Men with Type-2 Diabetes (2022) *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 11 (2), pp. 299-309.
39. Shannon E, Wiener W. *The mathematical theory of communication* university of Illinois press Urbana Illinois, pp: 117. 1963.
40. Margalef R. Diversity and stability: a practical proposal and a model of interdependence. *Bookhaven Symp Biol*. 1969;22:25-37.
41. Pielou EC. *Mathematical ecology*. John Wiley, New York 385pp. 1977.
42. Omar Khaled Attallah, Thafer Thabit Mohammed and Nasr Nuri Al-Anbari. Effect of Adding Grape Pomace and Resveratrol on Some Physiological Traits and Gene Expression to Prevent Hemorrhagic Fatty Liver Syndrome in Laying Hens . I.O.P. Conference Series: Earth and Environmental Science.2022, 1060 (1), 012076. doi:10.1088/1755-1315/1060/1/0120
43. Cuadrado M. Assessing year-round phenology and reproduction of the migratory painted lady butterfly, *Vanessa Cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae), in a Mediterranean area in southern Spain. *European Journal of Entomology*. 2021;118. <https://doi.org/10.14411/eje.2021.029>
44. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>
45. van Swaay CA, Nowicki P, Settele J, Van Strien AJ. Butterfly monitoring in Europe: methods, applications and perspectives. *Biodiversity and Conservation*. 2008;17(14):3455-69. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9491-4>
46. Elbers JP, Bossart J. Occurrences of forest butterflies in the farm bush savannah outside a forest reserve in Ghana, West Africa. *International Journal of Tropical Insect Science*. 2009;29(3):141-50. <https://doi.org/10.1017/S1742758409990233>
47. Panjaitan R, Drescher J, Buchori D, Peggie D, Harahap IS, Scheu S, *et al*. Diversity of butterflies (Lepidoptera) across rainforest transformation systems in Jambi, Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2020;21(11). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211117>
48. Ghanim, I. .; Ebrahim, S. E. . Preparing Of Bio-Cement Mortar By Using *Bacillus Licheniformis* Bacterial Cells. *JLSAR* 2022, 3, 23-29
49. Checa MF, Levy E, Rodriguez J, Willmott K. Rainfall as a significant contributing factor to butterfly seasonality along a climatic gradient in the neotropics. *BioRxiv*. 2019:630947. <https://doi.org/10.1101/630947>

50. Halali S, Halali D, Barlow HS, Molleman F, Kodandaramaiah U, Brakefield PM, et al. Predictability of temporal variation in climate and the evolution of seasonal polyphenism in tropical butterfly communities. 2021. <https://doi.org/10.1111/jeb.13895>
51. Grøtan V, Lande R, Engen S, Saether B-E, Devries P. Seasonal cycles of species diversity and similarity in a tropical butterfly community. *The Journal of Animal Ecology*. 2012;81:714-23. [10.1111/j.1365-2656.2011.0195.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.0195.x)
52. Toftegaard T, Posledovich D, Navarro Cano J, Wiklund C, Gotthard K, Ehrlén J. Butterfly-host plant synchrony determines patterns of host use across years and regions. *Oikos*. 2018;128. <https://doi.org/10.1111/oik.05720>
53. Wiklund C, Åhrberg C. Host Plants, Nectar Source Plants, and Habitat Selection of Males and Females of *Anthocharis cardamines* (Lepidoptera). *Oikos*. 1978;31(2):169-83.
54. Ghosh S, Saha S. Seasonal diversity of butterflies with reference to habitat heterogeneity, larval host plants and nectar plants at Taki, North 24 Parganas, West Bengal, India. *World Scientific News*. 2016(50):197-238.
55. Posledovich D, Toftegaard T, Wiklund C, Ehrlén J, Gotthard K. Phenological synchrony between a butterfly and its host plants: Experimental test of effects of spring temperature. *Journal of Animal Ecology*. 2017; 87. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12770>

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Jaber, F. N., Alyousuf A. and Al-Saffar, H. Diversity of Butterflies associated with Brassicaceae crops in Basra, Iraq. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 62. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.62>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

First record of *Fusarium brachygibbosum* as a causal agent of seed decay and damping-off disease on cotton in Iraq and Control using some bioagents

Aymen Jasim Mahi¹, Yasir Naser Alhamiri^{2,*}

¹ Plant Protection Department/Agriculture College/University of Kerbala / Karbala / Iraq; men.j@s.uokerbala.edu.iq.

² Plant Protection Department/Agriculture College/University of Kerbala / Karbala / Iraq; yasir.naser@uokerbala.edu.iq.

* Correspondence: yasir.naser@uokerbala.edu.iq; Tel.: (009647801677856)
Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.63>

ABSTRACT

The results of the isolation and identification of pathogens accompanying the symptomatic seeds and seedlings of cotton showed that the most common fungus was *Fusarium brachygibbosum*. Molecular identification of the studied fungus was performed using the universal primers: the results of the genetic analysis revealed the identities of the fungus as follows: a 100% identity for *F. brachygibbosum* that was deposited at the GenBank under accession number ON738702.1. This fungus has shown high pathogenicity against cotton seeds and seedlings by severely reducing their Germination and growth and treating cotton seeds with the biological factors of *Trichoderma* spp. It revealed a high efficiency in reducing disease incidence and increasing cotton germination percentage. *Trichoderma viride* showed the highest ability to increase seed germination to 94.44%.

In comparison, the lowest ability reached 77.77 % in *Trichoderma pseudokoningii* and *Trichoderma reesei*—the results of extracting toxins from the filters of *Trichoderma* spp. The study's use of trichodermin and Gliotoxin showed the presence of trichodermin and Gliotoxin in large quantities. The percentage of toxin inhibition was significant against the growth of pathogenic fungi. The highest percentage of inhibition was 86.1% for the isolate *Trichoderma koningiopsis*, and the lowest percentage was 66.65% for the isolate *Trichoderma reesei*. As for the effect of isolates of resistant fungus on the Pathogen in the field, the highest germination rate was 100%, and the inhibition rate was 0.00% when using the biological preparation prepared from the isolates (*T. viride*, *T. pseudokoningii*, *T. koningiopsis* and *T. reesei*).

Keywords: *Fusarium brachygibbosum*; *Trichoderma* spp.; Trichodermin; gliotoxin; Biological control.

INTRODUCTION

Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is one of the most important economic fiber crops, which is essential in agriculture and trade and which is grown to obtain fiber, which is used in the textile industry, and for obtaining oil from its seeds: ¹. Cotton has a tremendous economic place in the world in general and Iraq in particular, as it is considered one of the cash crops that generate profits for farmers and its uses in many industries, ². The cotton crop production in Iraq was estimated in the summer of 2020 to be 22 tons, with a cultivated area estimated at 60 dunums. The average yield per acre was 366.7. ³ Diseases caused by soil-borne fungi can significantly impact almost all crops ⁴, including cotton, and those that occur in the early stage of seedling growth have been a significant determinant of cotton production worldwide, ⁵. As indicated previously, ⁶ eight isolates of *Fusarium* spp. were isolated from the roots of cotton seedlings and had a high pathogenicity on two cotton cultivars, causing seedling death. In addition, many *Fusarium* species caused various diseases such as

seed rot, preemergence damping-off, and stem and root rot^{7,8}. In another study, the fungus *Fusarium brachygibbosum* was found to be a causative agent of cotton seedlings' death,⁹. Some types of *Trichoderma* spp. have shown the ability to produce secondary metabolites such as Gliovirin, Gliotoxin, Trichodermin, Viridin, Viridol, koniginins, Pyrones, Peptaibols and others, which are characterized by their high biological control ability via inducing apoptosis in fungal pathogens. It is considered one of the critical antibiotics because it can antagonize and inhibit the growth of pathogens,^{10,11}. Trichodermin is one of the compounds that inhibit the growth of many plant pathogens,¹². Recent research indicates that Gliotoxin is a determinant of pathogen virulence and is vital in protecting biological crops,¹³. Therefore, the study aimed to isolate and diagnose the fungus that causes Seed decay and seedling damping in cotton and evaluate the efficacy of different types of *Trichoderma* spp against the Pathogen. This study aimed to identify the causal agent of the seed decay and damping-off disease on cotton and control it utilizing some biological control agents.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of fungi

Fungi were isolated from rotting seeds and infected or dead cotton seedlings before and after emergence and were washed well, superficially sterilized by sodium hypochlorite at a concentration of 2% for two minutes, then washed well with sterile distilled water to remove the remnants of the sterile solution, then the excess water was removed using sterile filter paper. Then, the sterilized parts were transferred by sterile forceps to Petri dishes containing the nutrient medium P.D.A. With five seeds or parts of the infected seedling roots for each dish and five replicates, the dishes were incubated at 25 ± 2 ° C. After four days. The developing fungal colonies were examined under the microscope for their diagnosis and preservation. After isolating fungi from cotton seeds and seedlings, they were purified on several dishes by a single spore method using the Streak-plate method. The dishes were incubated in the incubator at a temperature of 25 ± 2 °C for two days, after which the germinated colonies were taken. It was transferred to new dishes containing P.D.A medium was incubated for five days,¹⁴. The fungal colonies that appeared were examined using a compound light microscope and then diagnosed phenotypically based on morphology and microscopic characteristics and by following the taxonomic keys mentioned previously,¹⁵⁻¹⁷.

Antagonism testing of isolates of the fungus *Trichoderma* spp. against the fungus *F. brachygibbosum* in vitro:

The antagonistic ability of four isolates of *Trichoderma* spp. It was obtained from previous studies in the Pathology laboratory at the College of Agriculture, as it was tested against the fungus (*F. brachygibbosum*) that causes seed rot disease and the death of cotton seedlings. In the double culture method,¹⁸, a petri dish with a diameter of 9 cm containing the P.D.A. culture medium was divided into two equal parts. The center of the first section of the dish was inoculated with the pathogenic fungus inoculation, where a 0.5 cm diameter piece was taken from the fungus culture at the age of seven days, while the center of the section was inoculated. The other is from the dish with a 0.5 cm diameter piece from the fungus culture *Trichoderma* spp. At the age of seven days, the experiment was carried out with four replicates, and the dishes were placed in an incubator at a temperature of 25 ± 2 ° C for one week. The antagonistic ability was estimated according to the scale of Bell, which consists of five degrees,¹⁹:

<u>Degree</u>	<u>Specifications</u>
---------------	-----------------------

- 1-The biological control fungus covers the entire dish area without allowing the fungus to grow Pathogen.
- 2- The biological control fungus covers two-thirds of the plate area and covers the fungus Pathogen, the remaining third of the dish.
- 3- The biological control fungus covers half the plate area, and the fungus Pathogen covers the other half.
- 4- The biological control fungus covers one-third of the plate area, while the fungus covers one-third. Pathogen the remaining two-thirds of the plate.
- 5- Pathogenic fungus covers the dish.

The biological agent is considered antagonistically adequate when it shows a degree of antagonism equal to 1 to 2 with the isolates of the pathogenic fungus. The percentage of inhibition was calculated by measuring the radius of the colony of the biological fungus towards the Pathogen, compared to the control treatment. According to the following Abbot equation, 20, 21:

$$\text{Percentage of inhibition} = \frac{\text{Average colony radius in Control} - \text{Average colony radius in treatment}}{\text{Average colony radius in Control}} \times 100$$

Quantitative and qualitative determination of Trichodermin and Gliotoxin using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The quantitative and qualitative estimation process was carried out in the Ministry of Science and Technology laboratories using an HPLC device model (SYKAMN) (German). Mobile phase: Isocratic acetic acid: acetonitrile: D.W(2:68:30) (V\V) Flow rate: at 1ml/min column : C18-ODS(25cm*4.6mm) UV-Vis meter: nm254 The concentration is calculated using the following equation:

$$\text{Sample Concentration} = \frac{\text{Standard Substance Concentration} \times \text{Sample Area} \times \text{Standard Substance Area}}{\text{Number of Dilutions} / \text{Sample Volume}}$$

Effect of Trichodermin and Gliotoxin in inhibiting fungal growth *F. brachygibbosum*

To study the effect of Trichodermin and Gliotoxin in inhibiting the Diameter growth of the pathogenic fungus isolate, the fungal filtrate of the isolates of the biological fungus Trichoderma sp. The selected medium of liquid Potato Sucrose Broth (P.S.B.) was prepared in the laboratory. This medium was prepared by boiling 200 gm of potatoes per liter of water for 30 minutes. The filtrate was taken, and we added 10 gm of sucrose, mixed well, closed tightly and sterilized with an autoclave at a temperature of 121 °C and a pressure of 15 pounds for 20 minutes and after the end of the sterilization period. It was left until the temperature reached 45 ° C. It was placed in closed plastic test tubes of 50 ml capacity, each of which was inoculated with 3 pieces (0.5 cm) of all fungal isolates individually, were taken from seven-day-old colonies grown on P.D.A. medium

with 3 tubes / fungal isolate, then placed in the incubator at a temperature of $25 \pm 2^\circ$ for fifteen days and then kept in the refrigerator until use. Then, the medium was filtered using filter paper (Whatman filter paper No.4), the centrifugation process was carried out, and the filtrate was centrifuged at a speed of 2000 rpm for five minutes. Then, the extract was filtered using a 0.22 mm micron mellipore filter ²².

The filtrate of each fungal isolate was added at the rate of 2 ml to the Petri dishes, and then 10 ml of the P.D.A. was poured over it, stirring the plates with a capillary movement to mix the filtrate with the medium. Three replicates were made for each treatment, Considering the existence of a control treatment that was P.D.A. + 2 ml sterile distilled water only. The treatments were placed in the incubator at $25 \pm 2^\circ \text{C}$. After the growth of the control treatment of each fungal isolate was completed, the diameter growth of the pathogenic fungus was measured. By taking the growth rate of two perpendicular diagonals passing from the center of the dish and the percentage of inhibition according to the following equation: 2

average colony diameter with Control - average colony

$$\text{Inhibition of inhibition} = \frac{\text{diameter with treatment}}{\text{colony diameter percentage in Control}} \times 100$$

Testing the synergistic effect of the combination of isolates of the fungus *Trichoderma* spp. Producers of Trichodermin and Gliotoxin against isolates of field pathogenic fungi in greenhouse

This test was performed on four isolates of *Trichoderma* spp as well as testing its antagonistic ability by testing the antagonistic ability in the laboratory and the field against pathogenic fungi on M.E.A. culture media and their ability to produce the mycotoxin Trichodermin and Gliotoxin, which did not show any indications of antibiotics among them. For this experiment, a mixture of soils was sterilized by autoclave At a temperature of 121°C and a pressure of 15 pounds for an hour and two consecutive days. Then, it was placed in plastic pots) size 2 kg) and moistened with water. The soil was treated with biological preparations for the fungus *Trichoderma* spp Single and combined, grown on corn grits and the integrated combination of the four isolates of the fungus *Trichoderma* spp represented by the biological preparation, and by placing 10 g (total) for three replicates for each sample 7 days before sowing the superficially sterilized cotton seeds 10 seeds/pot, and (10 g for sample) of the pathogenic fungus was placed for each pot grown on millet medium, two days before planting:

The percentage of disease was measured two weeks after the start of the experiment according to the following equation: 3

$$\text{Infection percentage} = \frac{\text{Number of infected plants}}{\text{The total number of plants}} \times 100$$

The percentage of disease severity was measured according to equation ²³ as follows: 4

$$\text{Severity percentage} = \frac{\text{Sum (number of plants per grade x grade number)}}{\text{Total number of plants x Highest Degree}} \times 100$$

Molecular diagnosis of *Fusarium brachygibbosum* on cotton

Molecular diagnosis was made of the fungal isolate that showed significant pathogenicity and high virulence against seed germination and damping-off cotton seedlings diagnosed phenotypically and tentatively under study. Molecular diagnosis of these isolates was done by analyzing the D.N.A. base sequences of the ITS region and comparing them with previously diagnosed isolates. After, it was sent to the South Korean company Macrogen to determine the nucleotide sequence. After receiving the nucleotide sequences of the fungal isolate, the nucleotide sequences were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to compare them with the data available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) within the Gen Bank, which belong to the identical fungal isolates, which has been diagnosed globally. Fungal isolates that did not match the nucleotide sequences 100% were registered at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Genetic kinship analyses were also carried out using the MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) program to analyze the isolates and draw a kinship tree between each of these isolates and similar isolates registered at the (NCBI) Center (the phylogenetic tree of the type Neighbor-joining, which was built from the sequence The molecular nucleotide of the ITS region of each of the isolates (Table 5 and Figure 4).

Statistical designs for laboratory and field experiments

Complete randomized design (C.R.D.) was used for all experiments conducted under controlled conditions (laboratory experiments and greenhouse experiments), and the data were analyzed using the (S.A.S.) Statistical Analysis System program after converting percentages to the angular transformation and the significant differences between the averages were compared using the L.S.D. test Below the level of significance of 0.05

RESULTS

Antagonistic ability test of *Trichoderma* spp. in vitro against the fungus *F. brachygibbosum*

The antagonistic ability of (4) pre-selected isolates was tested from the interaction test among isolates of *Trichoderma* spp. Two isolates produce Gliotoxin, and two produce Trichodermin against the pathogenic fungus *Fusarium brachygibbosum*, were isolates of *Trichoderma* spp. High antagonistic ability against pathogenic fungi under laboratory conditions, the highest antagonistic ability was 94.44% for isolate *T. viride* on pathogenic fungus *Fusarium brachygibbosum*, and the lowest antagonistic ability was 77.77 for *T. pseudokoningii* and *T. reesei* isolates. In contrast, isolate *T. koningiopsis* had 88.88% antagonistic ability. (Table 1 and Figure 1).

S.	% inhibition	The percentage of inhibition of <i>F. brachygibbosum</i>
1	Control Negative (of fungus colony growth)	100
2	Control (without any addition)	00.00
3	Pathogen + <i>T.viride</i>	88.88

4	Pathogen + <i>T.pseudokoningii</i>	77.77
5	Pathogen + <i>T.koningiopsis</i>	94.44
6	Pathogen + <i>T. reesei</i>	77.77
	L.S.D. 0.05	5.040

Table 1. Antagonistic ability test of *Trichoderma* spp. Isolates. In vitro against the fungus *F.brachygibbosum*.

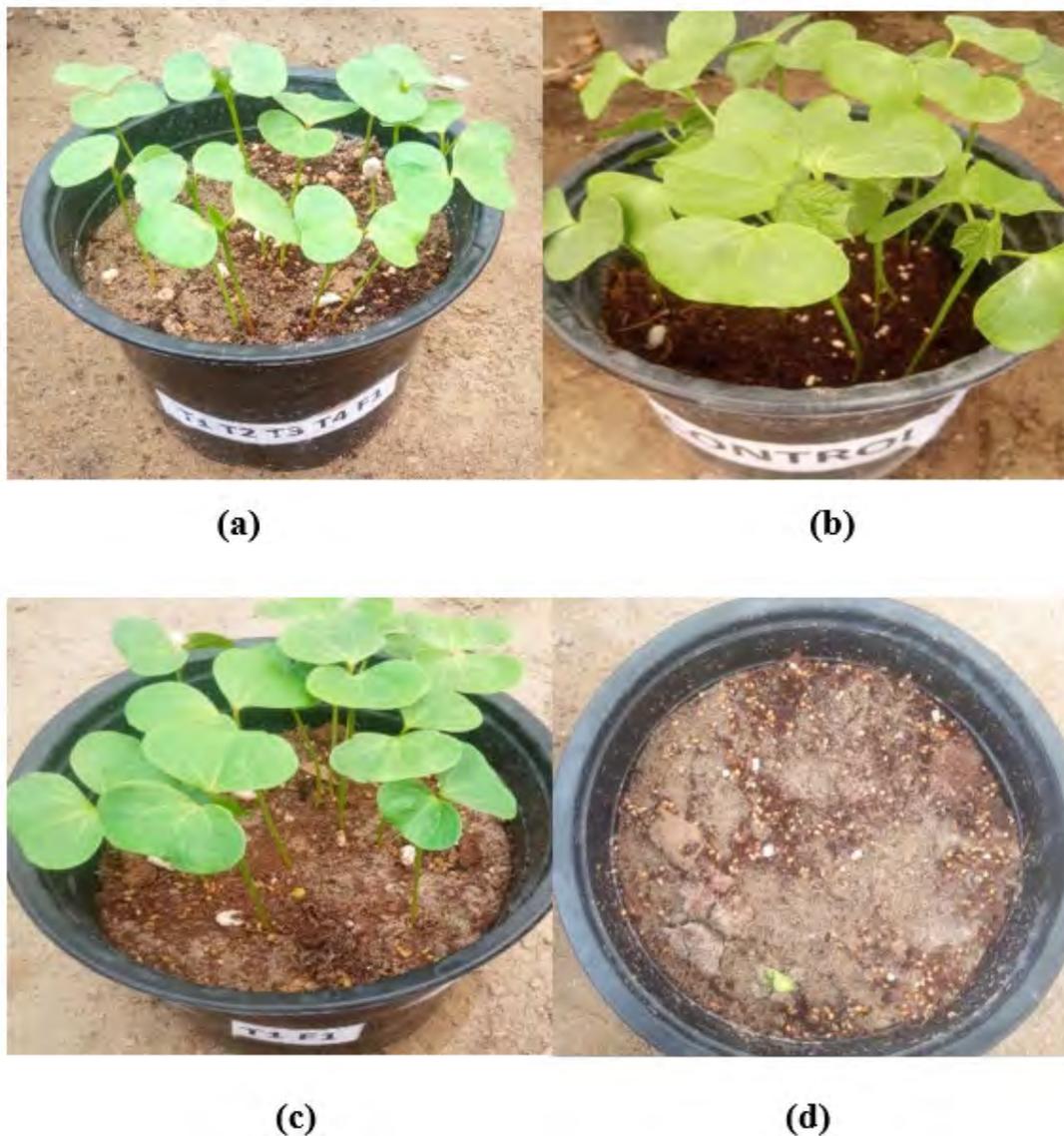


Figure 1. (a) *T.viride* + *T.pseudokoningii* + *T.koningiopsis* + *T. reesei* + *F. brachygibbosum* ; (b) Control without adding ; (c) *T.viride* + *F. brachygibbosum*; (d) *F. brachygibbosum* (only).

Effect of Trichodermin and Gliotoxin in Inhibiting Diameter Growth of Pathogenic Fungi Isolates The results showed that the effect of Trichodermin and Gliotoxin in the Leachate of the fungus *Trichoderma* spp has a clear and significant difference in inhibiting the growth of pathogenic fungi compared to the growth of pathogenic fungi without the addition of *Trichoderma* spp. The results on the fungus *F.brachygibbosum* had the highest inhibition rate of 86.1% for isolate *T. koningiopsis*, and the lowest inhibition rate was 66.65% for *T. reesei* (Table 2 and Figure 2).

S.	Treatments	The percentage % of inhibition of <i>F.brachygibbosum</i>
1	The Pathogen, without any additions	0.00
2	Pathogen + Leachate <i>T.viride</i>	83.30
3	Pathogen + Leachate <i>T.pseudokoningii</i>	69.44
4	For pathogen + Leachate <i>T.koningiopsis</i>	86.1
5	Pathogen + Leachate <i>T. reesei</i>	66.65
L.S.D. 0.05		6.33

Table 2. The effect of Trichodermin and Gliotoxin in inhibiting the Diameter growth of pathogenic fungi isolates on P.D.A. culture media in vitro.

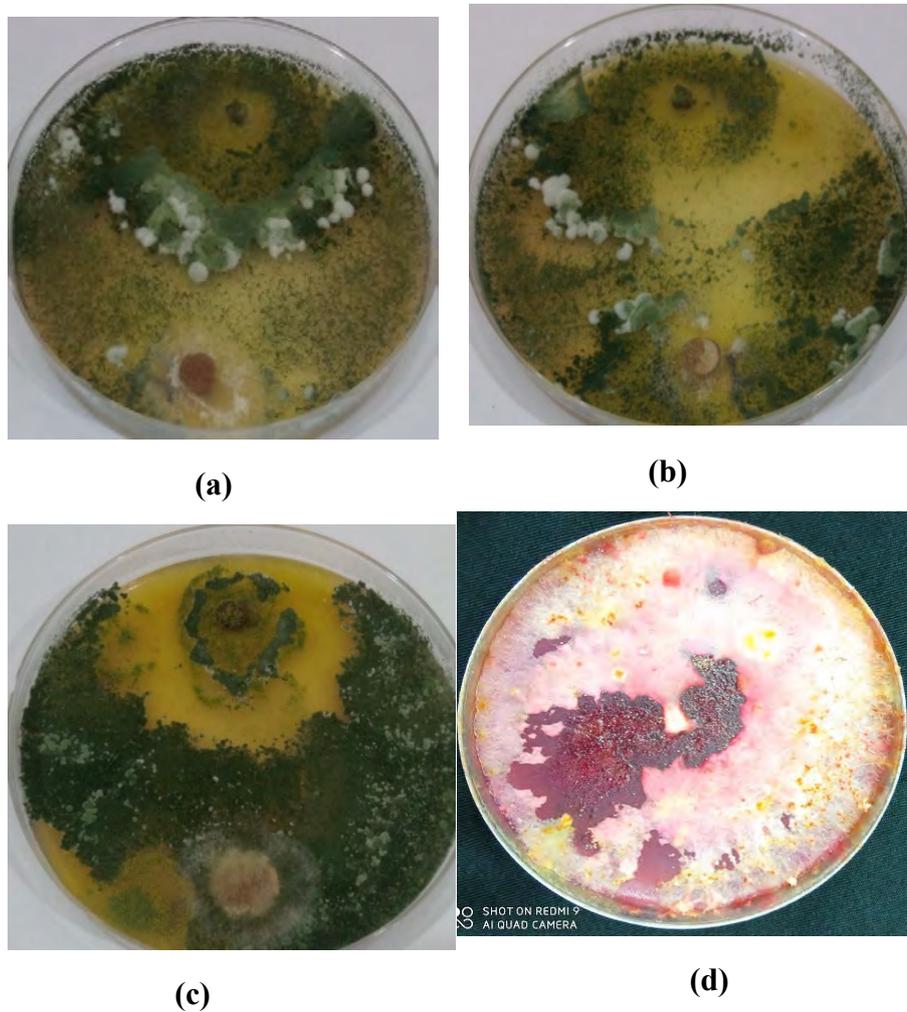


Figure 2. (a) T1+ *F.brachygibbosum*; (b) T2+*F. brachygibbosum*; (c) (T3+ *F. brachygibbosum*); (d) Control *F. brachygibbosum*.

Testing the synergistic effect of the combination between isolates of the fungus *Trichoderma* spp. Producing Trichodermin and Gliotoxin against pathogenic fungal isolates in the field in plastic pots

The results showed the antagonistic ability of isolates of *Trichoderma* spp. Against pathogenic fungal isolates in plastic pots, there was a significant difference between the resistant fungus and the pathogenic fungus, which gave the highest germination rate of cotton seeds when using *Trichoderma* spp. Isolates alone when the seeds were treated with the pathogenic fungus *Fusarium brachygibbosum* was followed by isolates of *T.pseudokoningii*, *T.koningiopsis* and *T. reesei*, with a seed germination rate of 86.66% and inhibition rate of 13.33% for each isolate. The fungus *Trichoderma* spp showed high resistance against the pathogenic fungus *Fusarium brachygibbosum* when using synergistic combinations of isolates of *Trichoderma* spp. The results showed the highest germination rate of 100% and inhibition rate of 0.00% when using the biological preparation from isolates (*T. viride* and *T. pseudokoningii*, *T.koningiopsis* and *T. reesei*), followed by (T1+T2+T3) and (T1+T2+T4), (T1+T3+T4), (T2+T3+T4) and (T1+T2) combinations with a percentage of Germination was 96.66%. The inhibition rate was 3.33, while the germination percentage of (T1+T3), (T1+T4), (T2+T3) and (T3+T4) isolates was 93.33%, and the inhibition percentage was 6.66%. The lowest germination percentage in the combination was 90% for isolate (T2 + T4), and the inhibition rate was 10%. It was noticed that there was a significant difference compared to the germination rate when adding the Pathogen only, which amounted to 10%, and the inhibition rate was 90%. The infection rate and disease severity results significantly differed when adding *Trichoderma* spp isolates compared to the infection rate of the plant pathogenic fungus *Fusarium brachygibbosum* without adding resistant fungus. Where there was an effect of *Trichoderma* spp isolates on the growth of pathogenic fungi when added alone, the highest infection rate was 20%, and the highest disease severity was 15.55% for isolate *T. reesei* The infection rate and disease severity decreased when using combinations of *Trichoderma* spp isolates, reaching the highest infection rate of 16.66% and the highest severity 10% disease for the combination (T.2) + (T.3), the lowest infection rate is 3.33%, and the severity of the disease is 3.33% for the combination (T.1) + (T.2) + (T.3) + (T.4). Table (3),

Treatment	germination percentage of seeds	Inhibition percentage	Percentage of infection	infection severity percentage
Comparison Control (without any additions)	100	0.00	0.00	0.00
Add the Pathogen only <i>F. brachygibbosum</i>	10	90	96.66	91.11
Pathogen + Fungus (T.1) <i>T.viride</i>	93.33	6.66	10	7.77
Pathogen + Fungus (T.2) <i>T.pseudokoningii</i>	86.66	13.33	13.3	4.44
Pathogen + Fungus (T.3) <i>T.koningiopsis</i>	86.66	13.33	16.66	14.44
Pathogen + Fungus (T.4) <i>T. reesei</i>	86.66	13.33	20	15.55
Pathogen + Fungi (T.1) + (T.2)	96.66	3.33	6.66	4.44

Pathogen + Fungi (T.1) + (T.3)	93.33	6.66	10	7.77
Pathogen + Fungi (T.1) + (T.4)	93.33	6.66	13.33	8.88
Pathogen + Fungi (T.2) + (T.3)	93.33	6.66	16.66	10
Pathogen + Fungi (T.2) + (T.4)	90	10	16.66	12.22
Pathogen + Fungi (T.3) + (T.4)	93.33	6.66	13.33	8.88
Pathogen + Fungi (T.1) + (T.2) + (T.3)	96.66	3.33	6.66	4.44
Pathogen + Fungi (T.1) + (T.2) + (T.4)	96.66	3.33	10	7.77
Pathogen + Fungi (T.1) + (T.3) + (T.4)	96.66	3.33	6.66	4.44
Pathogen + Fungi (T.2) + (T.3) + (T.4)	96.66	3.33	13.33	6.66
Pathogen + Preparation (T.1) + (T.2) + (T.3) + (T.4)	100	0.00	3.33	3.33
L.S.D. 0.05	13.98	2.389	4.211	2.841

Table 3. Synergistic effect test between isolates of *Trichoderma* spp. The mycotoxins producing Gliotoxin and trichodermin reduce the incidence and severity of *F. brachygibbosum* infection on cotton seedlings in the field.

The results of Table (4) showed that the fungus *Trichoderma* spp. The mycotoxins producing Gliotoxin and Trichodermin significantly affected the growth Standards of cotton seedlings compared to plant growth when *F. brachygibbosum* was added only without the resistant fungus. In contrast, *Trichoderma* spp isolates affected the characteristics of fresh vegetative weight, dry weight and seedling length, where the highest fresh vegetative weight of cotton seedlings was 6 g, dry vegetative weight 3 g, seedling length 38 cm for the combination (T.1) + (T.2) + (T.3) + (T.4), and the lowest fresh vegetative weight 3 g and dry vegetative weight 1 g and weight Dry root 0.5 gm and 29 cm long for *T. koningiopsis*—the effect of isolates of the fungus *Trichoderma* spp.

S	Treatment	The soft weight of the seed (gm)	The dry weight of the shoot	Dry weight of the root system	plant height(cm)
1	Comparison Control (without any additions)	5	2	1	35
2	Add the Pathogen only <i>F. brachygibbosum</i>	0.5	0.1	0.1	6
3	Pathogen + Fungus (T.1) <i>T.viride</i>	4	2	0.5	38
4	Pathogen + Fungus (T.2) <i>T.pseudokoningii</i>	4	1.5	1	34
5	Pathogen + Fungus (T.3) <i>T.koningiopsis</i>	3	1	0.5	29

6	Pathogen + Fungus (T.4) <i>T. reesei</i>	4	2	0.75	36
7	Pathogen + Fungi (T.1) + (T.2)	4	2	0.5	32
8	Pathogen + Fungi (T.1) + (T.3)	4	2	0.5	36
9	Pathogen + Fungi (T.1) + (T.4)	4	2	0.75	35
10	Pathogen + Fungi (T.2) + (T.3)	3	1	0.5	33
11	Pathogen + Fungi (T.2) + (T.4)	5	2.5	1	43
12	Pathogen + Fungi (T.3) + (T.4)	4	2	0.5	34
13	Pathogen + Fungi (T.1) + (T.2) + (T.3)	3	1	0.5	32
14	Pathogen + Fungi (T.1) + (T.2) + (T.4)	4	2	0.75	34
15	Pathogen + Fungi (T.1) + (T.3) + (T.4)	4	2	0.75	34
16	Pathogen + Fungi (T.2) + (T.3) + (T.4)	4	2	0.5	33
17	Pathogen + Preparation (T.1) + (T.2) + (T.3) + (T.4)	6	3	1	38
L.S.D. 0.05		2.538	2.162	1.098	3.866

Table 4. Synergistic effect test between isolates of *Trichoderma* spp. Mycotoxin producing Gliotoxin and Trichodermin in some growth Standards of field cotton seedlings infected with *F. brachygibbosum*.

Description of the fungus *F. brachygibbosum*

The fungus *F. brachygibbosum* appeared equally red on the dish, and from below, the dish is dark red, as described by Padwick 0, and a slightly sharp apex and basal cells of a foot-like shape,²⁴.



Figure 3. *Fusarium brachygibbosum*.

Molecular diagnosis of *F. brachygibbosum* on cotton

It was noticed by comparing the nucleotide sequence of the D.N.A. bundle of the fungus *Fusarium brachygibbosum* Y.N.147Aymen) isolated from cotton seeds and seedlings with the data available in the Center for Biotechnology Information (NCBI) that the percentage of genetic similarity reached (100%) with all isolates of *F. brachygibbosum* (Table 5).

N.	Isolate name	Isolate name	Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	date of registration NCBI
1	<i>F.brachygibbosum</i>	Y.N.147Aymen	Iraq	ON738702.1	100%	16/7/2022
2	<i>F.brachygibbosum</i>	DLP41S3a1	India	MK757199.1	100%	11/4/2019
3	<i>F.brachygibbosum</i>	24B	Poland	MK752430.1	100%	27/1/2020
4	<i>F.brachygibbosum</i>	S2590	Malaysia	MG575493.1	100%	2/9/2018
5	<i>F.brachygibbosum</i>	FB-2(F)	Canada	MH789988.1	100%	28/8/2018
6	<i>F.brachygibbosum</i>	BMS1	Morocco	ON642071.1	100%	7/7/2022
7	<i>F.brachygibbosum</i>	UOA/HCPF 16982	Greece	ON181983.1	100%	12/4/2022
8	<i>F.brachygibbosum</i>	4BF	Mexico	MN365015.1	100%	27/8/2019
9	<i>F.brachygibbosum</i>	Ked1	Morocco	MH999442.1	100%	1/11/2018
10	<i>F.brachygibbosum</i>	MH127Trs	Turkey	MK817053.1	100%	30/9/2019

Table 5. Comparison of nucleotide base sequence similarity ratios for the ITS gene region of the fungus isolates *F. brachygibbosum* (Y.N.147Aymen).

Figure (4), represented by the genetic tree, showed that the isolate (Y.N.147Aymen) appeared in the same clade in which the Indian isolate (MK757199.1) appeared and with separate branches (clades) from the Moroccan and Turkish isolates (MH999442.1 and MK817053.1) respectively due to genetic divergence between them.

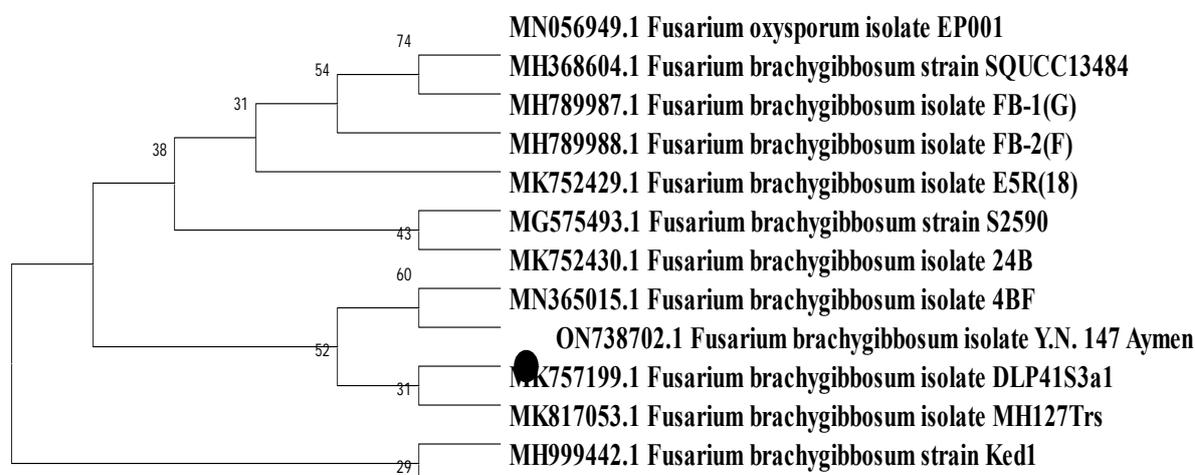


Figure 4. Phylogenetic tree of *F. brachygibbosum* fungus Y.N.147Aymen.

DISCUSSION

Antagonistic ability test of *Trichoderma* spp. in vitro against the fungus *F. brachygibbosum*

The high antagonistic efficiency of *Trichoderma* spp. Species of pathogens are attributed to the formation of many secondary metabolites, including antibiotics such as gliotoxin, viridin and Trichoderma, which have been shown to have antifungal activity to control various soil-borne pathogens. Conclude that *Trichoderma* spp. It has an antagonistic property in controlling pathogens, ²⁵⁻²⁷.

Effect of Trichodermin and Gliotoxin in inhibiting Diameter growth of pathogenic fungi isolates

These results are attributed to the effect of toxins produced by synergistic fungal isolates. These results are consistent with the previous study, ²⁸, In which the effect of toxins produced by the synergistic isolates of *Trichoderma* spp in inhibiting pathogenic fungi on okra was demonstrated.

Testing the synergistic effect of the combination between isolates of the fungus *Trichoderma* spp. Producing Trichodermin and Gliotoxin against pathogenic fungal isolates in the field in plastic pots

The decrease in infection rate and disease severity in combinations of resistant fungus isolates is due to the increase in the amount of Gliotoxin and Trichodermin produced from compatible isolates with each other, which significantly affects the inhibition of the growth of plant pathogenic fungi and protection of plants from infection. The growth Standards of cotton seedlings were improved considerably due to the plant-induced growth by the fungus *Trichoderma* spp. Previous studies supported these results conducted ^{29,30} on the effect of *Trichoderma* isolates and other bioagents in inhibiting pathogens, inducing pest control and increasing Germination and growth in cucumber plants.

CONCLUSIONS

This study showed isolation and identification of the fungus *F. brachygibbosum* was first recorded as a cause of seeds decay and seedlings damping off on cotton, where the fungus isolated from seeds and seedlings showed high virulence in attacking cotton seedlings and significantly reduced both germination and growth rates, but the treatment of seeds with isolates of *Trichoderma* spp. It has proven highly efficient in reducing infection percentage and increasing germination and growth rates in cotton seedlings. *F. brachygibbosum* isolate was diagnosed morphologically and molecularly by analyzing the D.N.A. base sequences of the ITS region after it was sent to the South Korean Macrogen Company to determine the nucleotide sequence. The deposit number of this isolate was in the GenBank (ON738702.1) and compared with previously diagnosed isolates. The results of the synthesis of isolates of the bio-resistant fungus *Trichoderma* spp. (*T. viride*, *T. pseudokoningii*, *T. koningiopsis*, *T. reesei*) High efficiency against the fungus *F. brachygibbosum*. The results of extracting toxins from the Leachates of *Trichoderma* spp used in the study showed the presence of Trichodermin and Gliotoxin in large quantities, and the percentage of toxin inhibition in the filtrates had laboratory inhibition. *Trichoderma* spp isolates also affected fresh vegetative weight, dry weight and seedling length characteristics. The study also showed the effectiveness of all treatments used to prevent the growth of pathogenic fungi.

Author Contributions: Conceptualization, A.M. and Y.A.; methodology, A.M.; validation, Y.A.; formal analysis, A.M.; writing—original draft preparation, A.M.; supervision, Y.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Data supporting reported results can be found at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ON738702.1>

Acknowledgments: The authors would like to thank the administrative of the Plant Protection Department, Agriculture College, University of Kerbala.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Javied, M. A.; N. Ashfaq, M. A. Haider, F. Fatima, Q. Ali, A. Ali, and A. alik. Agrobacterium-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using dmo gene for enhanced tolerance against dicamba pesticide. *Biol. Clin. Sci. Res. J.* **2021**, *1*,2708-2728.
2. Gneit, M. K. A geographical analysis of climate change in the change of cotton yield in Wasit Governorate. *Lark Magazine.* **2021**, *2*(41), 1093–1059.
3. Lahuff, A.A. First report of *Fusarium proliferatum* causing stem and root rot on lucky bamboo (*Dracaena braunii*) in Iraq, Hell. *Plant Prot.* **2019**, *12*, 1–5.
4. Goulart, A.C.P. Reação de cultivares de algodoeiro a *Rhizoctonia solani* na fase de plântula e benefícios do tratamento de sementes com fungicidas. *Summa Phytopathologica, Botucatu*, **2016**, *42*, 4, 308-312.
5. Dawoud, T.M.; Yassin, M.A.; El-Samawaty, A.R.M.; Elgorban, A.M. Silver nanoparticles synthesized by *Nigrospora oryzae* showed antifungal activity. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**. *28* (3), 1847-1852.
6. Lahuff, A. A.; Jaafar, O. H.; Al-mosoy, M.; Hameed, Z. L..First record of the crown rot fungus *Fusarium equiseti* affecting *Triticum aestivum* L. and *Aptenia cordifolia* in Iraq. *Asian J. Agric. Biol.* **2018**, *6* (4): 543-548.
7. Abdulmoohsin, R. G.; Lahuf, A. A.; Husain, Y. N. and Hameed, Z. L. Bioefficiency of some indigenous biocontrol agents against *Rhizoctonia solani* causing cowpea seed rot and preemergence damping-off. *I.O.P. Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **2019**. *388*, 012011.doi:10.1088/1755-1315/388/1/012011.
8. Le, D. P.; Tran, T. T.; Gregson, A.; Jackson, R. TEF1 sequence-based diversity of *Fusarium* species recovered from collar rot diseased cotton seedlings in New South Wales, Australia. *Australas. Plant Pathol.* **2020**. *49*(3), 277-284.
9. A. Al-Badawi, S., T. Al-Wasity, R. AN .Economic Analysis Of The Most Important Variables Affecting Agricultural Employment In Iraq For The Period (1998 - 2019). *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; *21*(1): 224-249. doi: 10.32649/ajas.2023.179764
10. Lahuff, A. A.; Kareem, A. A.; AL-Sweedi, T. M. and Alfarttoosi, H. A. Evaluation the potential of indigenous biocontrol agent *Trichoderma harzianum* and its interactive effect with nanosized ZnO particles against the sunflower damping-off pathogen, *Rhizoctonia solani*. *I.O.P. Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **2019**, *365*, 012033. doi:10.1088/1755-1315/365/1/012033.
11. Tijerino, A. et al. Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genet. Biol.* **2011**.*48*,3, 285-296.
12. Sulaiman, E. D.; Youns, A. N. Study the Mechanisms of Parasitism and Antagonism of Different Bio-control Agents Against *Sclerotinia sclerotiorum*, the Causal Organism of White Rot Disease on Eggplant in the Laboratory. *Tikrit J. Agric. Sci.* **2019**,*47-56* ,(1)18

13. Tomah, A. A.; Abd Alamer, I. S.; Li, B.; Zhang, J. Z. A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: A new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper. *Biol. Control*, **2020**, *145*, 104261.
14. Odeh A.; Abdalmoohsin R.G.; AL-Abedy A.N. Molecular identification of *Fusarium brachygibbosum* and some isolates of *Trichoderma* spp. *Int. J. Pharmaceut. Res.* **2021**, *13*(1):1390-6.
15. Leslie, J. F.; Summerell, B. A. *Fusarium* laboratory workshops--A recent history. *Mycotoxin Res.* **2006**, *22*(2), 73.
16. Pandian, J. D.; Singh, G.; Kaur, P.; Bansal, R.; Paul, B. S.; Singla, M.; Sharma, M. Incidence, short-term outcome, and spatial distribution of stroke patients in Ludhiana, India. *Neur. J.* **2016**. *86*(5), 425-433.
17. Diaz-Najera, J. F.; Serna, S. A.; Bahena, A. M.; Cruz, E.B.; Hernandez, M.V.; Gomez, O.G.; Aragón, D.F. First Report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) Causing Wilt Disease of *Phaseolus vulgaris* in Mexico. *Plant Dis.* **2021**, *105*,710.
18. Baker, K. F.; Cook, R. J. *Biological control of plant pathogens*; WH Freeman and Company: U.S.A., 1974; pp.34-49.
19. Bell, D. E. Regret in decision making under uncertainty. *Oper. Res.* **1982**, *30*(5), 961-981.
20. Abbot, D. S. Analytical investigation of the decrease in the size of the habitable zone due to a limited CO₂ outgassing rate. *Astrophys. J.* **2016**. *827*(2), 117.
21. Altindag, M.; Sahin, M.; Esitken, A.; Ercisli, S.; Guleryuz, M.; Donmez, M. F.; Sahin, F. Biological control of brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholdria*, and *Pseudomonas* application under in vitro and in vivo conditions. *Biol. Control.* **2006**, *38*(3), 369-372.
22. Konda, P. V. *Magellan: Toward building entity matching management systems*; The University of Wisconsin-Madison: Madison, U.S.A., 2018; pp. 122-133.
23. McKinney, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric. Sci.* **1925**, *XXXI*, 827-840.
24. Ibraheem M W, Muhaimed A R, Mohammed Th. T. Leg cuts from Awaasi lambs fed a diet with varying levels of *Rhus coriaria* L., Physical dissection and chemical composition. *Revis Bionatura* 2022;*7*(4) 4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.4>.
25. Kareem, H. J.; Al-Araji, A. M. Evaluation of *Trichoderma harzianum* biological Control against *Fusarium oxysporum* f. sp. melongenae. *Iraqi J. Sci.* **2017**, *58*(4B), 2051-2060.
26. Inovejas, R. C.; Divina, C. C. Methanol extract and nanocomposite of *Trichoderma* sp. as a potential bio-control against *Fusarium moniliforme* in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Int. J. Agric Technol.* **2018**, *14*, 99-108.
27. Thabit S S, Awad M M, Abdulateef S M. Effects of In-Ovo Injection of sialic acid on Chick's embryonic development and physiological traits. *Revis Bionatura* 2023;*8* (2) 49. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.49>.

28. Ali, A. F. .; Mohammed, T. T. .; Al-Bandar, L. K. . The Role Of Optifeed®, Vêo® Premium, And Oleo-biotec® In Diets For Improvement Of The Production Performance Of Male Broilers In Heat Stress. *JLSAR* 2022, 3, 32-36.
29. Al-Bahrani, Sh. A. M. Molecular diagnosis of some isolates of *Trichoderma* spp. isolated from the governorates of Iraq, producing the mycotoxin Gliotoxin and evaluating its effectiveness against some pathogens of cucumber plant diseases. MSc. Thesis, College of Agriculture, University of Karbala, Karbala, 2021.
30. Abdalmoohsin, R.G.; Alhumairy, Y.N.; Abood, N.T.; Lahuf, A.A. Bioefficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Saccharomyces cerevisiae* against *Pythium aphanidermatum* under laboratory and greenhouse aquaculture conditions in cucumber plants, *Cucumis sativus*. *Biopestic. Int.* **2019**, *15*, 15–22.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Mahi, A.; Alhamiri, Y. First record of *Fusarium brachygibbosum* as causal agent of seeds decay and damping-off disease on cotton in Iraq and control it using some bioagents. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 63. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.63>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Antibacterial and Antifungal Activities of *Apis mellifera* L. Honey, Propolis, Royal Jelly in Iraqi Kurdistan Region

Banaz Abdulla¹, Rukhosh Rashed², Rebwar Hamasalih³, Tishk Shekh Faraj^{4,*}, Nashmil Rashid⁵, Hozan Hamamurad⁶

¹ University of Salahaddin/ College of Education/ Department of Biology/ Erbil/ Iraq; banaz.abdulla@su.edu.krd.

² University of Sulaimani/ College of Agricultural Engineering Science/ Department of Horticulture/ Sulaymaniyah/Iraq; rukhosh.rashid@univsul.edu.iq.

³ University of Salahaddin/ College of Education/ Department of Biology/ Erbil/ Iraq; rebwar.hamasalih@su.edu.krd.

⁴ University of Sulaimani/ College of Agricultural Engineering Science/ Department of Horticulture/Sulaymaniyah/ Iraq; tishk.shekhfaraj@univsul.edu.iq.

⁵ University of Sulaimani/ College of Agricultural Engineering Science/Department of Animal Science/ Sulaymaniyah/Iraq; nashmil.010016@univsul.edu.iq.

⁶ University of Salahaddin/ College of Agriculture Engineering Science/ Department of Plant Protection/Erbil/ Iraq; hozan.hamamurad@su.edu.krd.

* Correspondence: tishk.shekhfaraj@univsul.edu.iq.

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.65>

ABSTRACT

This study was conducted at a laboratory in the Biology, College of Education, University of Salahaddin, from February to May 2022 to investigate propolis, honey and royal jelly's chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. The honeybee production extract showed that Gram (+) bacteria were more resistant to the antibacterial compounds of honey and propolis than Gram (-) bacteria and fungi. *E. coli* was a more sensitive isolate than all the other bacteria examined against the honey types tested. At the same time, it revealed more resistance against all types of propolis. Royal jelly with honey displayed more antimicrobial activity than other bee products and exhibited superior activity; the minimum inhibitory concentration of honey and propolis samples ranged from 32 to 512 µg/mL. The MIC value of the most effective honey (Honey 1, Honey 2 and Royal jelly) was 32 µg/mL. The lowest concentration of Qaladze propolis was (32 µg/mL) for *E. coli* ATCC 25922, followed by 128 µg/mL in some other propolis types.

Keywords: *Apis mellifera*; antimicrobial activities; honey; propolis; royal jelly.

INTRODUCTION

The honeybee (*Apis mellifera* L.) is the most common floral visitor. It is a critical insect that pollutes broad agricultural and wild plant species¹ sectors. In addition, bees were used as a source of unique, natural, multi-functional products such as honey, propolis and RJ². Bee products have been known for their nutritional and medicinal values from ancient up to the present time.

The natural sweetener (Honey) has a unique chemical structure, and its characteristics are affected by the plant's source and geographical origin, as well as climatic, processing, and storage circumstances. Honey mainly comprises carbohydrates and water, affecting its shelf life and features like color, flavor, density,

viscosity, hygroscopicity, and crystallization. Other components in honey include nitrogen compounds, minerals, organic acids, vitamins, volatile chemicals, and various bioactive molecules that alter sensory and physical properties and biological potential³. An essential characteristic of honey is its multifactorial antibacterial action.⁴ This property of honey has a fundamental relationship with the botanical origins of honey^{5,6,7,8,9}. Honey H₂O₂ is a key antibacterial component in honey. Under aerobic circumstances in diluted honey, H₂O₂ is created via glucose oxidase (GOX)-mediated glucose oxidation to gluconic acid¹⁰.

Propolis is an adhesive product created by honeybees to guard and build their hives¹¹. This product's chemical compositions and biological properties are affected by several factors like sources of plants, geographical location, and collecting seasons^{12,13,14}. This sticky material has been used traditionally in many different human daily aspects such as home remedies, toothpaste, mouthwashes, creams, drops, dietary supplements, anti-putrefactive, antipyretic agents, antiseptic, wound healing agents, tuberculosis treatment, cold syndrome, treatment of burns, acne, herpes simplex and genitals, neurodermatitis, antifungal activities in ocular and vaginal infections¹⁵. Kapare stated that raw propolis contains different components¹⁶. Bankova divided bee glue into six types: poplar propolis, Brazilian green propolis, birch propolis, red propolis, pacific propolis and Canarian propolis¹². According to phytochemical screening, propolis contains anthraquinones, flavonoids, glycosides, alkaloids, fatty acids, saponins, triterpenes, tannins and volatile oils. In addition, pharmacologically, propolis can act as an antibacterial, antitumor, anticancer, antioxidant and anti-inflammatory¹⁵. The constituents of 100gm of propolis according to comprise resins (50%), wax (30%), essential oils (10%), pollen (5%) and various organic compounds (5%)¹⁶.

RJ is a creamy product secreted by the cephalic gland of worker bees to feed individual larvae in the hive in various proportions that performs a substantial role in caste differentiation^{17,18}. For the first three days, it is used to feed all individual larvae, and queen larvae are exceptionally longer and continue feeding, lasting five days¹⁹⁻²². RJ comprises principally of water (60–70%), proteins (18%), carbohydrates (11%–23%), lipids (4%–8%), and mineral salts (1.5%)²³. This product is widely used in many areas, such as commercial medical products, healthy foods and cosmetics in various countries. It has been shown to have antibacterial, anti-inflammatory, vasodilative, hypotensive effects, disinfecting activity, antioxidant activity, anti-hypercholesterolemic activity, and anticancer characteristics²⁴. Pavel stated that RJ contains a particular protein known as a royalizing protein that acts as a solid antibacterial in vitro against Gram-positive bacteria¹⁷ due to the lack of study on the critical natural products Honey, Propolis, and RJ in Iraqi Kurdistan bees. The current study attempts to visualize the antimicrobial functions of these products.

MATERIALS AND METHODS

Propolis samples

Propolis samples were collected from *A. mellifera* hives at five different regions (Chami Rezan, Penjwen, Qaladze, Sharbazher, and Qandil) in the Sulaimani governorate, Iraqi Kurdistan region.

Extraction of the propolis samples

Raw propolis samples were dried, cleaned from impurities, ground to fine powders, weighed and mixed with 70% ethyl alcohol (1:5 w/v) in a sealed container at 37°C away from light with shaking twice a day for 20 days for extraction²⁵. Then, the supernatant liquid was filtered with Whatman No. 1 filter paper; the alcohol evaporated with a Rota vapor under a vacuum and was freeze-dried by lyophilizer. The samples were kept in a clean, airtight brown bottle in a refrigerator at -20 °C until use.

Honey sampling

Three samples of *A. mellifera* honey (fresh honey taken directly from the hives, honey purchased from the local markets, and honey with RJ) were collected from the study areas.

Honey sample preparation

Samples were prepared from crude honey and purified from bee wax, brood, and dead bees using sterile gauze. To study the susceptibility of microorganisms to different samples of honey, 75% (v/v) honey solution from the strained table honey was used.

Microorganisms test

Antimicrobial activities of the propolis and honey were carried out using the agar well diffusion technique. Three bacteria species (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*) with their standard strains (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *A. baumannii* ATCC 19608) in addition to a fungus *Candida albicans* with its standard strain (*C. albicans* ATCC10231) were used in the current study. The strains were purchased from the Media Center in Erbil.

Assigning of antimicrobial activities of propolis and honey

The agar well diffusion test was achieved following the methodology of²⁶. A sterile cotton swab inoculated saline solution was used to culture bacteria and fungi in Potato dextrose agar plates and Mueller Hinton. The extra fluid was absorbed by plates left on the bench. A six-millimeter sterilized cork borer made a 4 mm deep well in the sealed agar medium. One hundred and fifty mL of honey and propolis (H1: Honey 1, H2: Honey 2, RJH: Royal jelly with honey, PCR: Propolis Chami Rezan, PP: Propolis Penjwen, PQ: Propolis Qaladze, PSH: Propolis Sharbazher, PQD: Propolis Qandil) in addition to the control were taken with a micropipette at various levels (12.5, 25, 50, 75, and 100%) which applied to the wells within the plates. Deionized water (negative control) and positive control (Ciprofloxacin (5 µg/mL) and fluconazole (25 µg/mL)) were put in the wells equally. The plates were incubated at 37°C for 24 hrs. One isolate for each species (*A. baumannii*, *A. baumannii* ATCC 19608, *E. coli*, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans*, and *C. albicans* ATCC 10231) was assessed for its antimicrobial ability after 24 hours to evaluate the bee product effects on microbial growth. The inhibition zone diameters of the samples within the wells were measured with a caliper.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The identification of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was calculated using the broth microdilution method^{26,27}. The Mueller Hinton broth that showed a high inhibition zone against the test microorganisms was diluted by 3 mL or 3 µg/mL to create the stock honey solution (75%), which was used to evaluate the least effective antibacterial activity concentration. Based on the stock solution, a two-fold serial dilution was created. The turbidity of an 18–24 hrs. bacterial culture was compared with the 0.5 McFarland standard for standardizing and using. The 96 polystyrene wells microtiter plate detected the MIC against tested microbial strains. Then, 100 mL of different concentrations of propolis and honey (8, 16, 32, 64, 128, 256, and 512) µg/mL from the stock honey solution were pipetted (1024 µg/mL) in a series of microtiter plate wells. 40 mL of the standardized inoculum suspensions were pipetted into each test well.

In contrast, the positive control well also included 40 mL of microorganisms for comparison purposes and the broth in the negative control well. After vortexing, the microtiter plate well was incubated for 24 hours at 37°C. Clear wells were utilized as the wells with the lowest propolis and honey concentrations that prevented bacterial development compared to the control wells.

DPPH radical scavenging activity

The free radical capturing activity of created compounds was measured using the method of^{28,29}. The ability of the compounds to scavenge electrons from DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) indicates their activities. Solutions of different concentrations (400, 600, 800 and 1000) µg/mL of the propolis, honey, and a standard solution of 0.004% of DPPH were stored in the dark. With different concentrations of the compounds, 2 mL

of DPPH was mixed and left at room temperature in the dark for 60 min to complete the reaction. The mixture showed absorbance at 517 nm using a UV-visible spectrometer. The standard agent used was Ascorbic acid. The equation below was used to determine the percentage of inhibition.

$$DPPH \text{ radical scavenging activity } \% = \left[1 - \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Statistical analysis

Antimicrobial activities were measured according to (IBM SPSS) statistics for Windows, version 26.0. at (p -value<0.05). Three replicate samples were used on two different occasions. Results were expressed as means \pm standard error (M \pm SE). Mean values within a row with different letters (a–e) significantly differ for p -value < 0.05.

RESULTS

The antimicrobial activities of honey products were determined against Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. Most samples showed measurable antibacterial activity, as shown in (Table 1).

MG	H1	H2	RJH	PQD	PQ	PCR	PSH	PP
AB	11 \pm 6.09 ^a	23 \pm 3.93 ^b	1.4 \pm 0.24 ^c	1.4 \pm 0.24 ^c	4.6 \pm 3.1 ^d	5 \pm 2.25 ^d	6.4 \pm 3.1 ^d	9.6 \pm 2.15 ^a
AB ATCC 19608	14.6 \pm 3.82 ^a	9.8 \pm 5.02 ^b	5.6 \pm 2.01 ^c	3.8 \pm 1.46 ^c	6.8 \pm 2.53 ^c	3.8 \pm 2.31 ^c	3.8 \pm 2.31 ^c	8.8 \pm 2.08 ^b
EC	25 \pm 2.23 ^a	27.6 \pm 2.03 ^a	27.2 \pm 2.59 ^a	0 \pm 0.00 ^b	1.8 \pm 1.8 ^b	2.2 \pm 2.2 ^b	2.4 \pm 2.4 ^b	5.6 \pm 2.33 ^c
EC ATCC 25922	11.2 \pm 6.88 ^{a, d}	28 \pm 2.25 ^b	1.4 \pm 0.244 ^c	2.4 \pm 2.4 ^c	2.4 \pm 2.4 ^c	3.6 \pm 3.6 ^c	2.2 \pm 2.2 ^c	9.6 \pm 4.65 ^d
SA	4.8 \pm 2.13 ^a	3.2 \pm 1.95 ^a	10 \pm 5.53 ^b	4.4 \pm 2.29 ^a	6.6 \pm 3.07 ^c	7.6 \pm 3.32 ^c	3.4 \pm 2.4 ^a	3 \pm 2.0 ^a
SA ATCC 25923	5.8 \pm 3.58 ^{a, c}	6.4 \pm 2.94 ^a	19.8 \pm 6.93 ^b	3.8 \pm 2.37 ^c	4.2 \pm 2.8 ^c	7.6 \pm 3.32 ^a	2.4 \pm 1.47 ^c	6.2 \pm 4.84 ^a
CA	4.6 \pm 0.6 ^a	1.8 \pm 0.8 ^b	24.8 \pm 1.85 ^c	5.2 \pm 0.2 ^a	8.4 \pm 3.04 ^d	6.6 \pm 3.55 ^d	9.2 \pm 2.28 ^d	17.2 \pm 4.65 ^c
CA ATCC 10231	17.8 \pm 7.08 ^a	26.2 \pm 3.87 ^b	28.8 \pm 1.01 ^b	3.4 \pm 0.4 ^c	3.4 \pm 0.4 ^c	3.2 \pm 0.2 ^c	3.2 \pm 0.2 ^c	3.4 \pm 0.4 ^c

Table 1. In vitro antimicrobial activity of different honey and propolis against clinical microbial isolates. MG-Microorganisms; H-Honey; RJH-Royal Jelly Honey; PQD-Propolis Qandil; PQ-Propolis Qaladze; PCR-Propolis CHamiRezan; PSH-Propolis SHarbazher; PP-Propolis Penjwn; AB - Acinetobacter baumannii; EC - Escherichia coli; SA - Staphylococcus aureus; CA - Candida albicans.

Gram (+) bacteria were more resistant to the antibacterial compounds of honey and propolis than Gram (-) and yeasts. *S. aureus* among the Gram-positive and *A. baumannii* ATCC 19608 among Gram-negative bacteria were more resistant to the bee products tested. Furthermore, *E. coli* was more sensitive against the honey types than the others while revealing more resistance against all types of propolis.

Table and Figure 1 illustrate the statistical analysis of the bee product types' antimicrobial activities (inhibition zone diameter (IZD) mm). RJH displayed more significant antimicrobial activity than other bee products and exhibited a superior activity (IZD range, 1.4–28.8%) compared to Honey 2 and Honey 1, which showed IZD ranges of 1.8–28% and 4.6–17.8%, respectively. A particular difference was recorded against *C. albicans*

ATCC 10231 (IZD of RJH, 28.8%, vs. IZD of the other Bee products). However, the Qandil Propolis type was inactive against *E. coli* (IZD 0.00%) than the other species tested (IZD range, 1.4-5.2%).

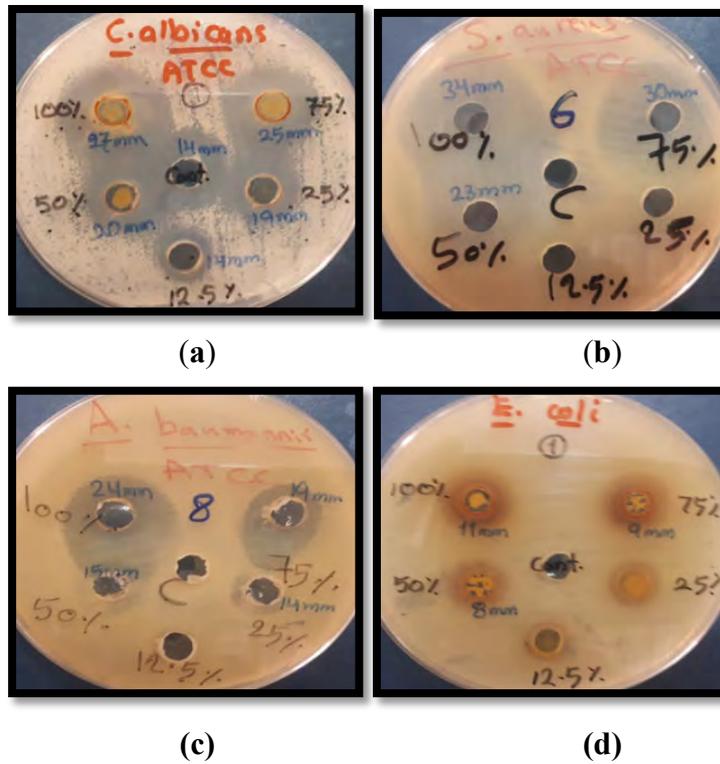
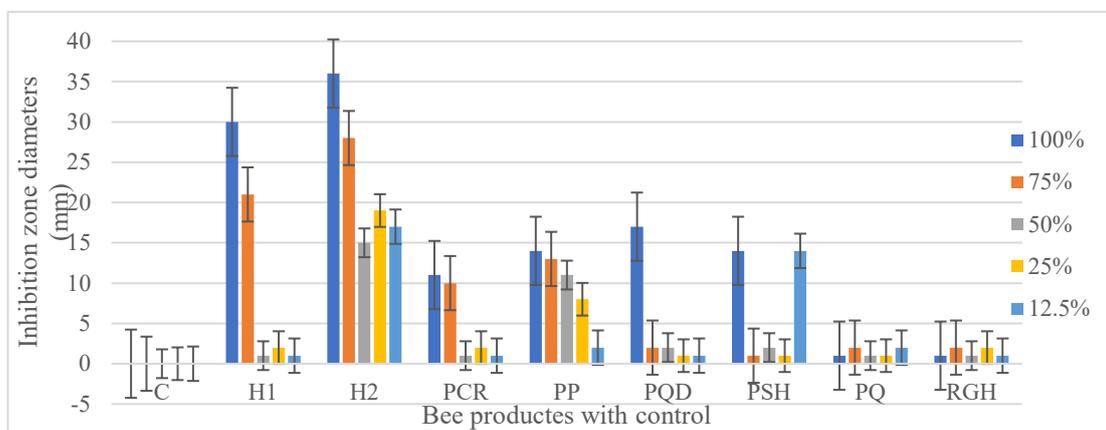
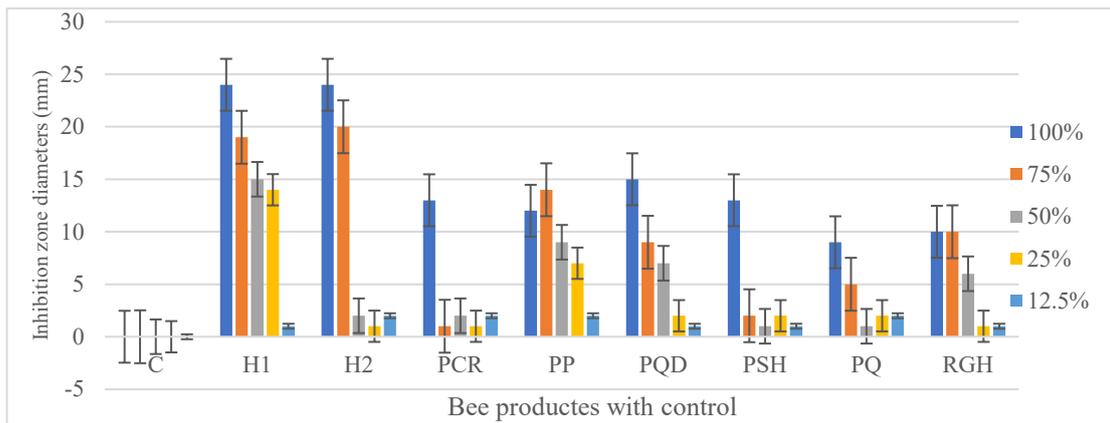


Figure 1. The diameter of inhibition zones (mm) of some pathogenic and standard microorganisms in different concentrations of different bee products. a - *C. albicans*; b - *S. Aureus*; c – *A. baumannii*; d - *E. coli*.

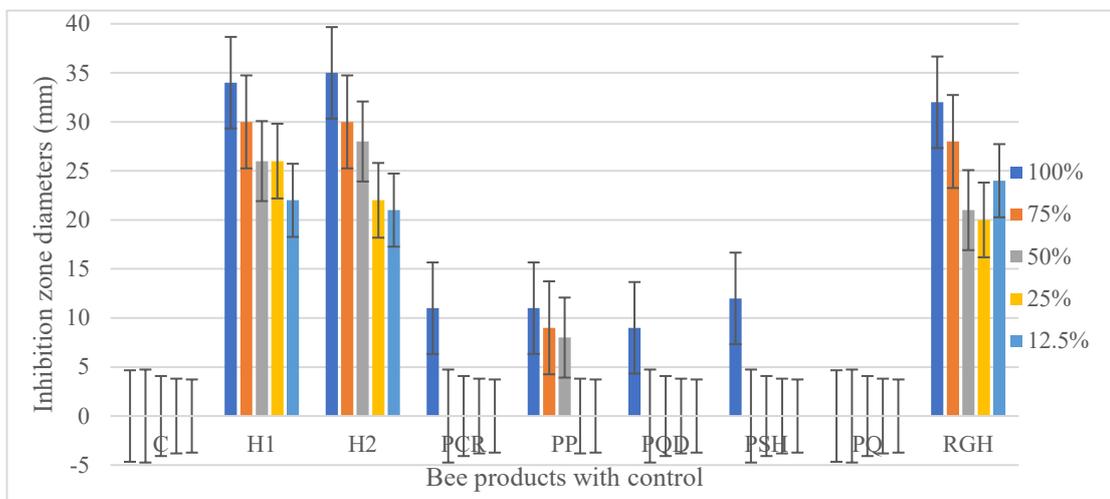
When the growth of microbial isolates was established in the presence of bee product concentrations of 12.5, 25, 50, 75, and 100%, a significant reduction in growth was consistently observed at 100% concentrations of honey 2 against each of both strains of *A. baumannii* and *E. coli* (Figure 2). At the same time, Less effect was observed on growth against *S. aureus* and *C. albicans* compared to the control group. Remarkably, RJH was the most effective in preventing growth and was already active at 12.5-100% against *S. aureus* and *C. albicans* (p -value < 0.05) compared with the control. The RJH revealed less growth inhibition towards other microbial growth than the control.



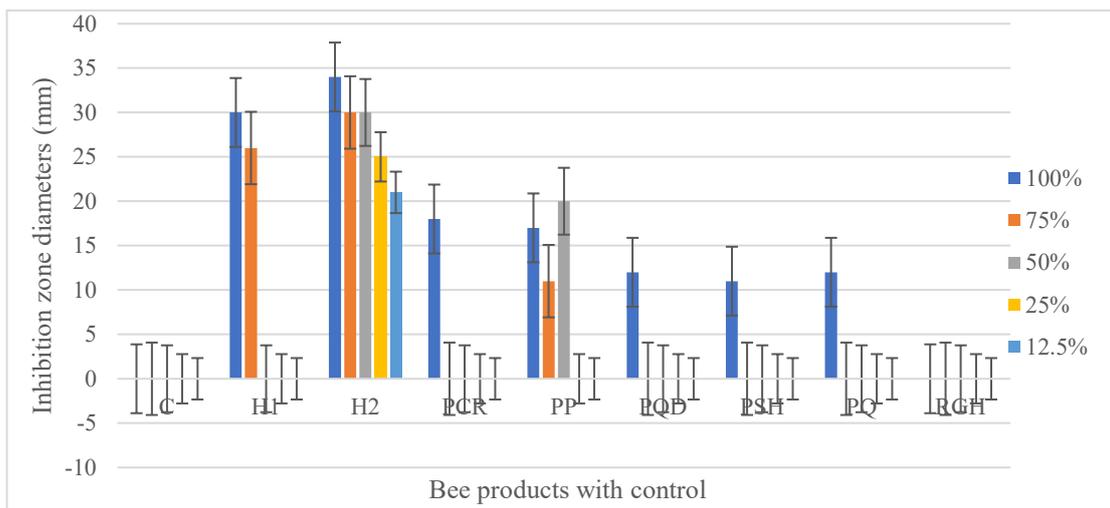
(a)



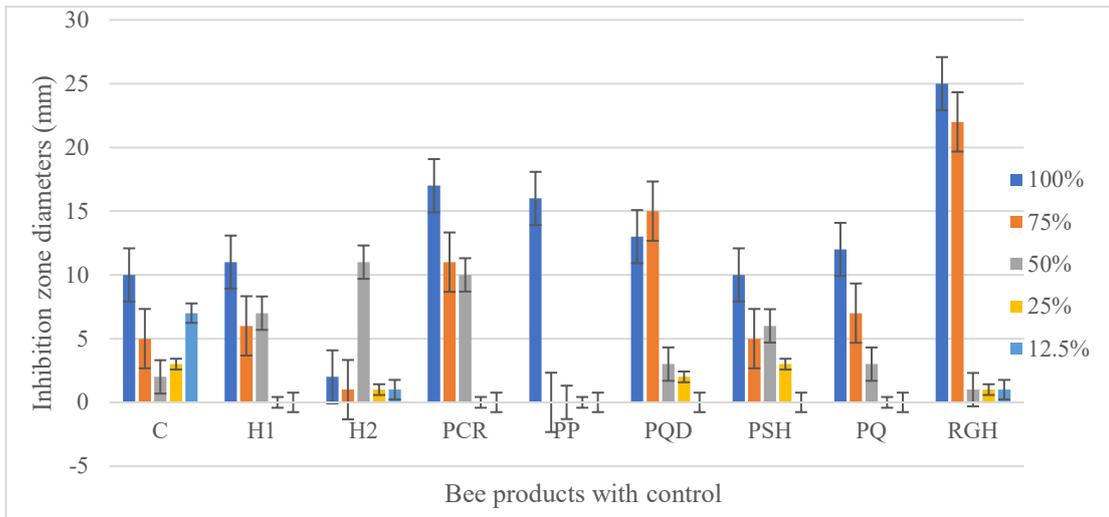
(b)



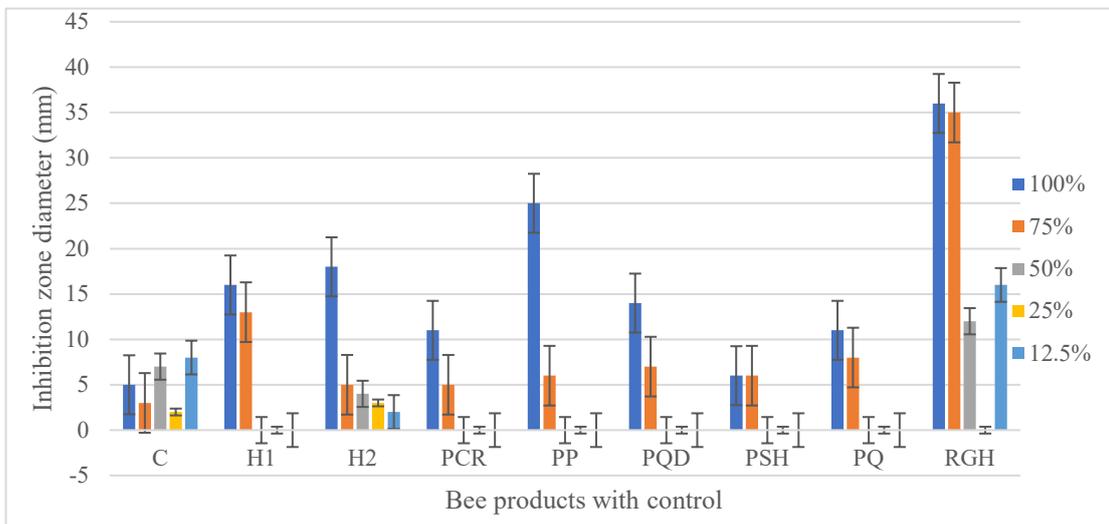
(c)



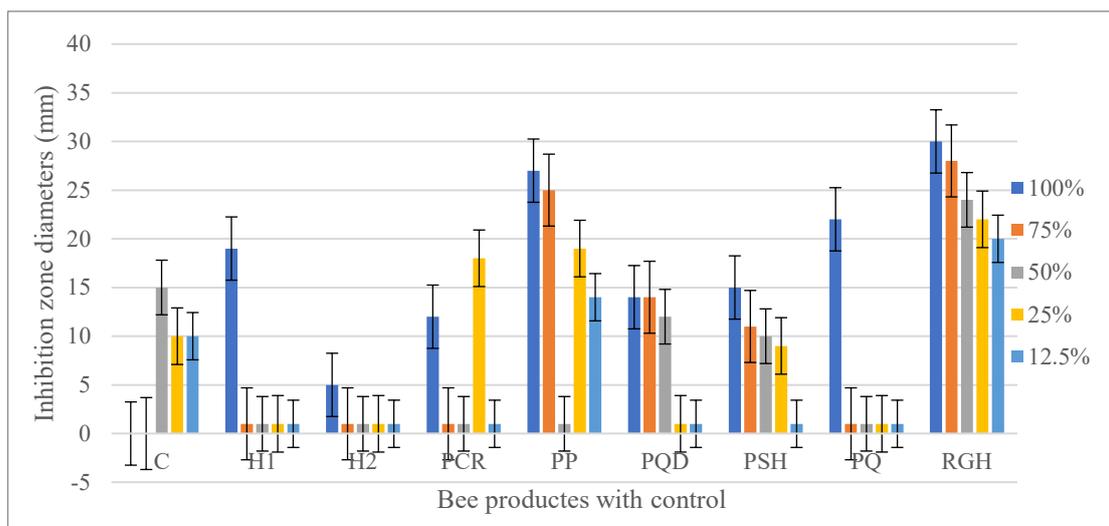
(d)



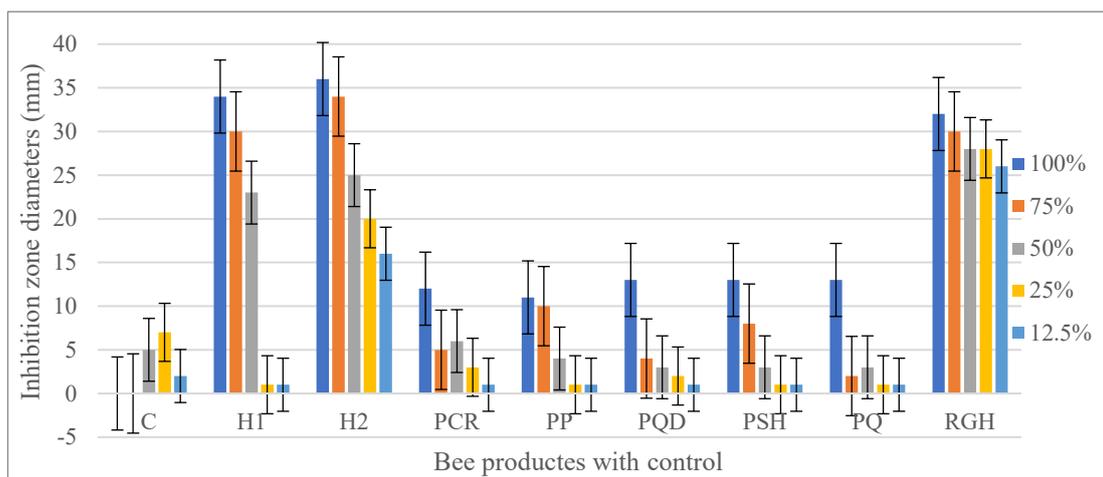
(e)



(f)



(g)



(h)

Figure 2. Effect of different types and concentrations of honey and propolis on microbial growth: Inhibition of microbial development against *A. baumannii* (a), *A. baumannii* ATCC 19068 (b), *E. coli* (c), *E. coli* ATCC 25922 (d), *S. aureus* (e), *S. aureus* ATCC 25923 (f), *C. albicans* (g), and *C. albicans* ATCC 10231 (h); Inhibition zone diameters of the concentration 100% (blue), 75% (orange), 50% (grey), 25% (yellow), and 12.5% (green) grown for 24 hours in Mueller-Hinton agar. Error bars represent means \pm standard deviation (SD). Compared to the control, the dotted histograms represent non-significant values (p -value >0.05). C – control; H1 - Honey 1; H2 - Honey 2; PCR - Propolis Chami Rezan; PP - Propolis Penjwen; PQ - Propolis Qaladze; PSH - Propolis Sharbazher; PQD - Propolis Qandil; RGH - Royal Gel Honey.

Determination of MIC of bee products

The MIC of honey and propolis samples ranged from 32 to 512 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2). The MIC value of the most effective honey (Honey 1) was 32 $\mu\text{g/mL}$ for *A. baumannii* ATCC 19608, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* and *S. aureus* ATCC 25923. Also, the MIC of Honey 2 was 32 $\mu\text{g/mL}$ for *A. baumannii*, *A. the* ATCC 19608, *S. aureus*, and *S. aureus* ATCC 25923, and the RJH recorded the same MIC value for *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* and *C. albicans* ATCC 10231. The lowest concentration of propolis (32 $\mu\text{g/mL}$) was revealed in PQ for *E. coli* ATCC 25922, followed by 128 $\mu\text{g/mL}$ in some other propolis types. The low concentrations of honey (diluted honey) used were effective at (32 $\mu\text{g/mL}$).

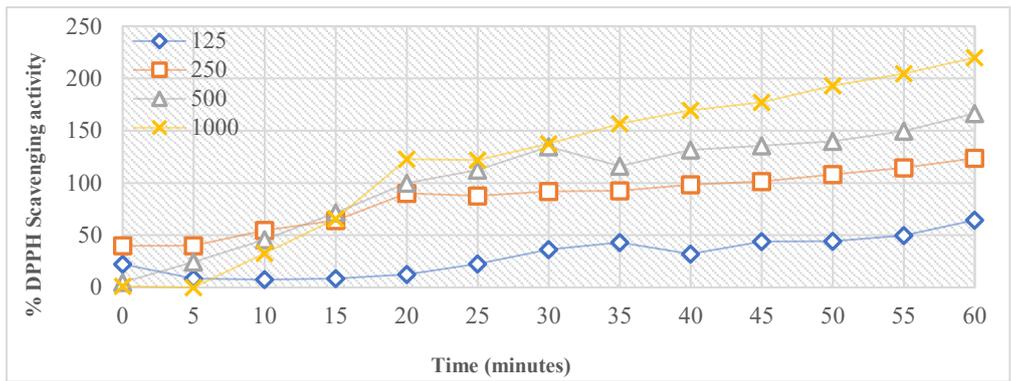
Microorganisms	Propolis extract					Honey extract		
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	PQD	PQ	PCR	PSH	PP	H1	H2	RJH
AB	512	128	256	512	512	64	32	256
AB ATCC 19608	256	512	128	512	512	32	32	64
EC	512	128	256	128	512	128	64	256
EC ATCC 25922	512	32	256	512	128	32	128	32
SA	512	128	256	512	512	32	32	256
SA ATCC 25923	256	512	128	512	512	32	32	128
CA	512	256	512	512	256	128	128	32
CA ATCC 10231	256	512	128	256	512	256	128	32

Table 2. Susceptibility of microbial strains to propolis and honey collected from diverse geographical locations in the Iraqi Kurdistan Region. AB - *Acinetobacter baumannii*; EC - *Escherichia coli*; SA - *Staphylococcus aureus*; CA - *Candida*

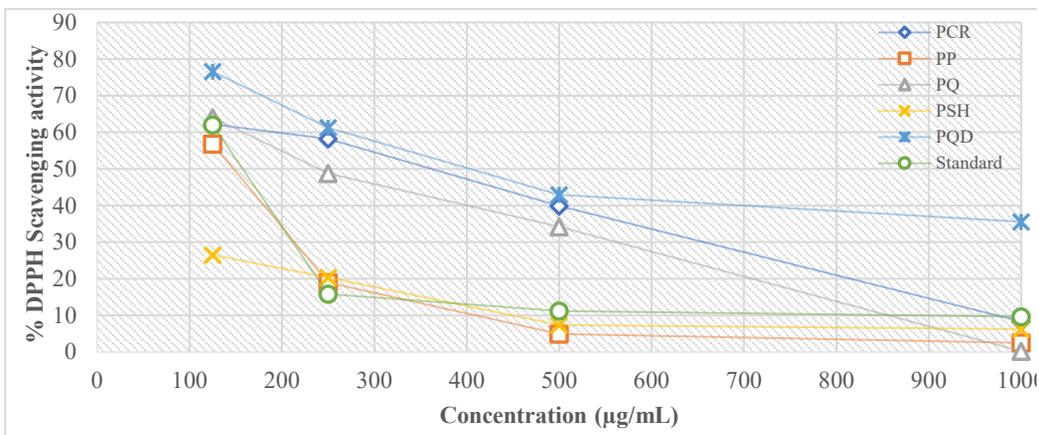
albicans; MIC - Minimum Inhibitory Concentration; PQD - Propolis Qandil; PQ - Propolis Qaladze; PCR - Propolis Chami Rezan; PSH - Propolis Sharbazher; PP - Propolis Penjwen; H1 - Honey 1; H2 - Honey 2; RJH - Royal Jelly Honey.

DPPH Radical Scavenging Activity

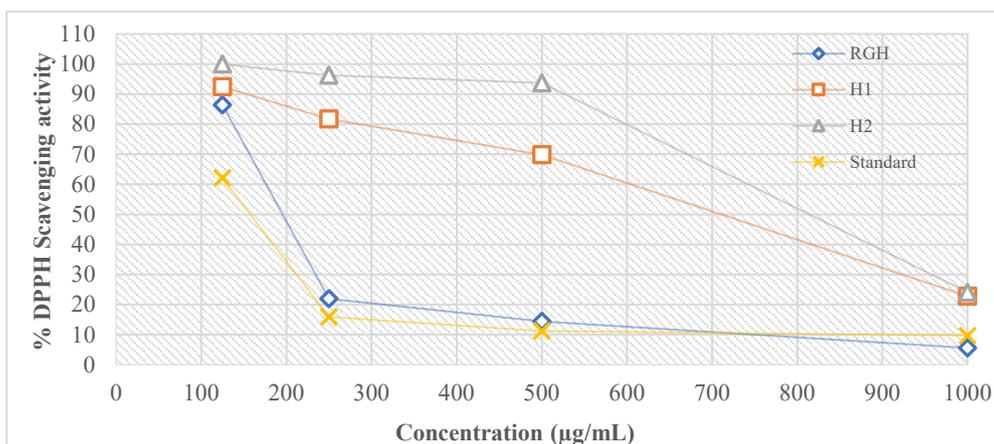
Figure 3 demonstrates the percentage of residual DPPH radical in the examined honeybee product samples. In this investigation, PP ($IC_{50} = 140 \mu\text{g/mL}$) exhibited the most muscular DPPH radical scavenging activity with the lowest EC_{50} , followed by RJH ($IC_{50} = 190 \mu\text{g/mL}$), PQ ($IC_{50} = 250 \mu\text{g/mL}$), PCR ($IC_{50} = 375 \mu\text{g/mL}$), and PQD ($IC_{50} = 400 \mu\text{g/mL}$). Honey 1 and 2 recorded the maximum value of IC_{50} (700 and 825 $\mu\text{g/mL}$, respectively). PSH shows the lowest DPPH radical scavenging activity with an IC_{50} value of 900 $\mu\text{g/mL}$. All findings were compared to Ascorbic acid standards' IC_{50} value (150 $\mu\text{g/mL}$). Therefore, PP's antioxidant activity was more potent than the IC_{50} value of ascorbic acid.



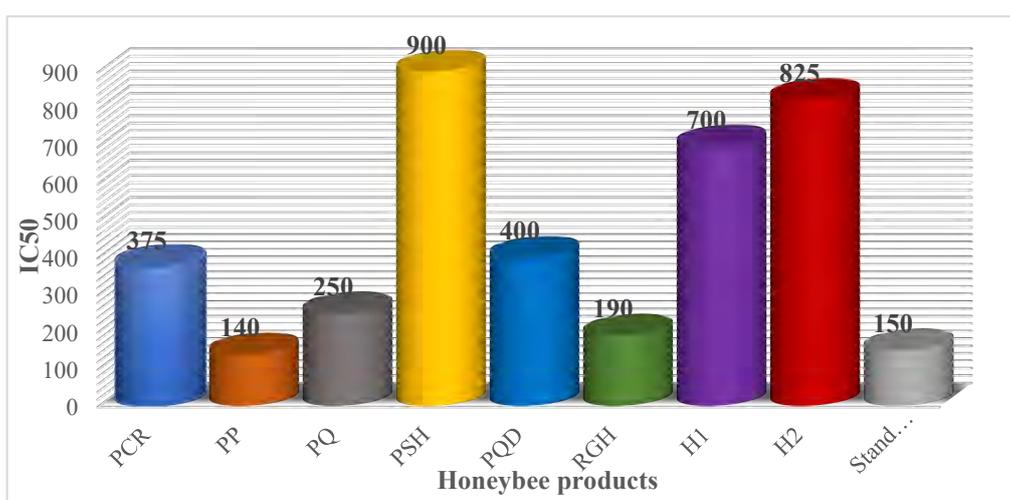
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 3. DPPH Radical Scavenging Activity; a. Effect of time on percentage DPPH inhibition at different concentrations, b and c. % of all compound's inhibition at different concentrations, d. EC₅₀ value of the honeybee products with the standard. H1 - Honey 1; H2 - Honey 2; PCR - Propolis Chami Rezan; PP - Propolis Penjwen; PQ - Propolis Qaladze; PSH - Propolis Sharbazher; PQD - Propolis Qandil; RGH - Royal Jelly Honey.

DISCUSSION

Propolis, honey and royal jelly bee products act as antifungal and antibacterial agents due to their contents of various biochemicals. The antimicrobial effect of honey could be explained by two mechanisms: hydrogen peroxide (H₂O₂) dependent and independent pathways. Concerning the first one, H₂O₂ is produced by glucose oxidase in honey, which metabolizes carbohydrates and causes the antimicrobial activity of honey. On the other hand, in the peroxide-independent pathway, the physical-chemical characteristics of honey, like high viscosity and sugar content, are considered the two factors giving honey the capability of antibacterial effect³⁰. Education of moisture in the environment causes bacterial dehydration by osmotic pressure. Studies show that in infant patients suffering from gastroenteritis, their recovery time is reduced significantly when given honey instead of glucose solution⁴⁶. The reason may be due to the high sugar content in honey that improves electrolytes and water reabsorption in the intestine. In addition, the low PH level ceases microbial growth^{31,32}. Also, the results agree with³³, who indicated the antibacterial potency of some popular honey types such as

Tualang and Manuka. Tualang, at low concentration, for instance, could be used to control the growth of some bacteria types such as *S. Typhi*, *Shigella flexneri*, and *E. coli*.

Pasupuleti found that propolis influences microorganism biological activities like permeability of the cellular membrane, producing ATP, breakdown of the membrane, and lowering the mobility of bacteria^{34, 36} European propolis exhibited antifungal properties against some *Candida* strains, which agrees with our results; however, German propolis showed the weakest consequence on yeast cells (MFC > 5 µg/mL)^{35, 37} Peptides in RJ work as an antimicrobial agent, disrupting the structure of cell membranes. Fontana et al.³⁷ demonstrated that RJ contains royalisin (antibacterial protein), which prevents it from contamination with Gram-positive bacteria.

Diverse diameters of inhibition zone (IZD) were recorded for the products. Differences in the activities of honey products may be due to their compositions and environmental factors such as geographical location, harvesting time, storage conditions, bee colony health, and age^{38,39,40,41}.

The honey product's antimicrobial effectiveness against microbial growth after 24 hours was assessed here, and the RJH was recorded as superior to other products. The RJH comprises honey and royal jelly; this mixture strengthens RJH and acts as the strongest antipathogenic compared to the other products. This could be because honey and royal jelly contain various bioactive compounds that are more powerful against pathogens even at low concentrations^{42,39}.

Minimum inhibition concentration of the products exhibited significant results in some products and not in others. The lowest value of MIC was (32 µg/mL). This can be referred to as the activations of glucose oxidase enzymes and floral-origin catalase, which hydrolyze honey's glucose to produce H₂O₂. This creates high oxidative stress, which is helpful in the determination of bacterial growth^{10,43}.

DPPH is a stable organic free radical that loses its absorption band at 517 nm when it accepts an electron or another free radical type. This experiment is widely employed to determine the antioxidant potential of natural products, especially honeybee components. The efficacy of honeybee products in reducing DPPH was assessed, and IC₅₀ values were described as the quantity of honeybee product methanol extract required for a 50% reduction in DPPH. In addition, it can be stated as residual DPPH, which refers to the amount of unreduced DPPH radical⁴⁴. Our study revealed incredible results, especially for the product PP compared to the control. This outcome disagrees with Kurek et al.'s finding⁴⁵, which indicated that the EC₅₀ of the control ascorbic acid was more effective than propolis. In contrast, the variations among different sources of propolis showed various DPPH radical scavenging activities. For example, the lowest EC₅₀ was found in Turkish propolis (EC₅₀ = 0.325 µg/mL), compared to Romanian propolis 1, 2, 3, and 4, which recorded (EC₅₀ = 0.355 µg/mL, EC₅₀ = 0.365 µg/mL, EC₅₀ = 0.440 µg/mL, and EC₅₀ = 0.460 µg/mL) respectively.

CONCLUSIONS

In conclusion, Gram-positive bacteria are much more resistant to the antibacterial compounds of honey and propolis than Gram-negative bacteria and fungi. *E. coli* are more sensitive isolates than all other bacteria examined against the honey types tested while revealing more resistance against all types of propolis. RJ with honey displayed greater antimicrobial activities than the other types of bee products. The minimum inhibitory concentration of honey and propolis samples ranges from 32 to 512 µg/mL, while that of the most effective honey (Honey 1, Honey 2 and RJ) is 32 µg/mL. The lowest concentration of propolis types (32 µg/mL) is revealed in Qaladze propolis for *E. coli* ATCC 25922, followed by 128 µg/mL for other propolis types.

Author contribution: Conceptualization, Banaz Abdulla and Rebwar Hamasalih; Methodology, Banaz Abdulla and Rebwar Hamasalih; software, Rebwar Hamasalih; validation, Banaz Abdulla and Rebwar Hamasalih; Formal analysis; Rebwar Hamasalih; investigation, Rukhosh Rashid and Tishk Shekh Faraj; resources, Rukhosh Rashid and Tishk Shekh Faraj; data curation, Rebwar Hamasalih and Hozan Hamamurad; writing, Tishk Shekh Faraj, Banaz Abdulla and Rebwar Hamasalih; writing—review and editing, Tishk Shekh Faraj; visualization, Rukhosh Rashid; supervision, Banaz Abdulla, Rukhosh Rashid and Rebwar Hamasalih; project administration, Banaz Abdulla, Rukhosh Rashid, Rebwar Hamasalih, Tishk Shekh Faraj, Nashmil Rashid, Hozan Hamamurad. Funding acquisition, Banaz Abdulla, Rukhosh Rashid and Tishk Shekh Faraj. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgment: The authors are grateful to the University of Salahaddin/College of Education/Departments of Biology and University of Sulaimani / College of Agricultural Engineering Science/department of Horticulture for providing vital support regarding the Laboratory and field. We also thank people from all studied sites for providing samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Hung, K.L.J.; Kingston, J.M.; Albrecht, M.; Holway, D.A.; Kohn, J.R. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc R Soc B Biol Sci* **2018**, *285*, (1870). doi:10.1098/rspb.2017.2140
2. Neov, B.; Georgieva, A.; Shumkova, R.; Radoslavov, G.; Hristov, P. Biotic and abiotic factors associated with colonies mortalities of managed honey bee (*Apis mellifera*). *Diversity* **2019**, *11*, 1–16. doi:10.3390/d11120237
3. Machado De-Melo, A.A.; Almeida-Muradian, L.B. de.; Sancho, M.T.; Pascual-Maté, A. Composición y propiedades de la miel de *Apis mellifera*: una revisión. *J Apic Res* **2018**, *57*, 5–37. doi:10.1080/00218839.2017.1338444
4. Majtan, J.; Sojka, M.; Palenikova, H.; Bucekova, M.; Majtan, V. Vitamin C enhances the antibacterial activity of honey against planktonic and biofilm-embedded bacteria. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25040992
5. Adams, C.J.; Boulton, C.H.; Deadman, B.J.; Farr, J.M.; Grainger, M.N.C.; Manley-Harris, M.; Snow, M.J. Corrigendum to Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey *Carbohydrate. Res.* **2008**, *343*,(4), 651-659 (DOI:10.1016/j.carres.2007.12.011). *Carbohydr Res.* *344*(18). doi:10.1016/j.carres.2009.08.008
6. Mavric, E.; Wittmann, S.; Barth, G.; Henle, T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res* **2008**, *52*, 483–489. doi:10.1002/mnfr.200700282
7. Holt, S.; Johnson, K.; Ryan, J.; Catchpole, O.; Zhang, S.; Mitchell, K.A. New Zealand Kanuka Honey has high levels of methylglyoxal and antimicrobial activity. *J Altern Complement Med* **2012**, *18*, 203–204. doi:10.1089/acm.2011.0685
8. Bucekova, M.; Buriova, M.; Pekarik, L.; Majtan, V.; Majtan, J. Phytochemicals-mediated production of hydrogen peroxide is crucial for high antibacterial activity of honeydew honey. *Sci Rep* **2018**, *8*(1). doi:10.1038/s41598-018-27449-3
9. Bucekova, M.; Jardekova, L.; Juricova, V.; Bugarova, V.; Di Marco, G.; Gismondi, A.; Leonardi, D.; Farkasovska, J.; Godocikova, J.; Laho, M.; et al. Antibacterial activity of different blossom honeys: New findings. *Molecules* **2019**, *24*. doi:10.3390/molecules24081573
10. White, J.W.; Subers, M.H.; Schepartz, A.I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *BBA - Biochim Biophys Acta* **1963**, *73*, 57–70. doi:10.1016/0006-3002(63)90359-7
11. Wagh, V.D. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Sci* **2013**, 2013. doi:10.1155/2013/308249
12. Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 1–2. doi:10.1016/j.jep.2005.05.004
13. Sforcin, J.M.; Bankova, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 253–260. doi:10.1016/j.jep.2010.10.032
14. Popova, M.; Vassya, S. B.; Stefan, B.; Iva, T.; Christo, N.; Gian, Luigi, M., Anna-Gloria, S. Original article Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie* **2007**, *38*, 306–311.

15. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>
16. Al-Rawi, K.F., Ali, H.H., Guma, M.A., Alaaraji, S.F.T., Awad, M.M. The Relationships of Interleukin-33, Ve-Cadherin and Other Physiological Parameters in Male Patients with Rheumatoid Arthritis (2022) *Pertanika Journal of Science and Technology*, 30 (1), pp. 123-140.
17. Pavel, C.I.; Mărghițaș, L.A.; Bobiș, O.; Dezmirean, D.S.; Șapcaliu, A.; Radoi, I.; Mădaș, M.N. Biological Activities of Royal Jelly - Review. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol* **2011**, 44, 108–118. <http://www.spasb.ro/index.php/spasb/article/view/560>
18. Moritz, R.; Southwick, E.E.M. *Bees as superorganisms: an evolutionary reality*: Springer Science & Business Media, **2012**.
19. Najim, Y. S. .; Mohammed, T. T. .; Hussain, F. M. . The Impact Of Varying Azolla Dosages On Male Broilers Diets In Terms Of Economic Feasibility And Physiologic Performance. *JLSAR* 2022, 3, 42-45
20. Shorter, J.R, Geisz, M.; Özsoy, E.; Magwire, M.M.; Carbone, M.A.; Mackay, T.F.C. The effects of royal jelly on fitness traits and gene expression in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **2015**, 10,1–10. doi:10.1371/journal.pone.0134612
21. Yang, W.; Tian, Y.; Han, M.; Miao, X. Longevity extension of worker honey bees (*Apis mellifera*) by royal jelly: Optimal dose and active ingredient. *PeerJ* **2017**, 2017. doi:10.7717/peerj.3118
22. Kunugi, H.; Ali, A.M. Royal jelly and its components promote healthy aging and longevity: From animal models to humans. *Int J Mol Sci* **2019**, 20,1–26. doi:10.3390/ijms20194662
23. Tokunaga, K.; hiko, Yoshida, C.; Suzuki, K, michi.; Maruyama, H.; Futamura, Y.; Araki, Y.; Mishima, S. Antihypertensive effect of peptides from Royal Jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* **2004**, 27, 189–192. doi:10.1248/bpb.27.189
24. Ramadan, M.F.; Al-Ghamdi, A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *J Funct Foods* **2012**, 4, 39–52. doi:10.1016/j.jff.2011.12.007
25. Gonsales, G.Z.; Orsi, R.O.; Fernandes, A.; Rodrigues, P.; Funari, S.R.C. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* **2006** 12, 276–284. doi:10.1590/S1678-91992006000200009
26. Moussa, A.; Nouredine, D.; Saad, A.; Abdelmelek, M.; Abdelkader, B. Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pac J Trop Biomed* **2012**, 2(7):554–557. doi:10.1016/S2221-1691(12)60096-3
27. Boateng, J.; Diunase, K.N. Comparing the antibacterial and functional properties of cameroonian and manuka honeys for potential wound healing-have we come full cycle in dealing with antibiotic resistance? *Molecules* **2015**, 20. doi:10.3390/molecules200916068
28. Hamasalih, R.M.; Abdulrahman, ZFA Antibiofilm potency of ginger (*Zingiber officinale*) and quercetin against *staphylococcus aureus* isolated from urinary tract catheterized patients. *Appl Ecol Environ Res* **2020**, 18,219–236. doi:10.15666/aeer/1801_219236
29. Samad, M.K.; Hawaiz, F.E. Synthesis, characterization, antioxidant power and acute toxicity of some new azo-benzamide and azo-imidazolone derivatives with in vivo and in vitro antimicrobial evaluation. *Bioorg Chem* **2019**, 85,431–444. doi:10.1016/j.bioorg.2019.01.014
30. Ayoob, M.M.; Hussein, A.J.; Samad, M.K.; Dege, N.; Hawaiz, F.E.; Mohamed, S.K.; Hussain, F.H.S. Synthesis, Antibacterial and Antioxidant Activity of Azo-Oxazolone and Their Ring Opening Azo-Benzamide Derivatives. *Curr Org Synth* **2020**, 18, 493–505. doi:10.2174/1570179417666201218163435
31. Nader, R.A.; Mackieh, R.; Wehbe, R.; Obeid, D. E,l.; Sabatier, J.M.; Fajloun, Z. Beehive products as antibacterial agents: A review. *Antibiotics* 2021, 10, 1–25. doi:10.3390/antibiotics10060717
32. Kwakman P.H.S, Velde AA te, Boer L, Speijer D, Christina Vandenbroucke-Grauls MJ, Zaat SAJ. How honey kills bacteria. *FASEB J* **2010**, 24, 2576–2582. doi:10.1096/fj.09-150789
33. Ratiu, I.A.; Al-Suod, H.; Bukowska, M.; Ligor, M.; Buszewski, B. Correlation study of honey regarding their physicochemical properties and sugars and cyclitols content. *Molecules* **2020**, 25, p 34. doi:10.3390/molecules25010034
34. Ramón-Sierra, J.; Martínez-Guevara, J.L.; Pool-Yam, L.; Magaña-Ortiz, D.; Yam-Puc, A.; Ortiz-Vázquez, E. Effects of phenolic and protein extracts from *Melipona beecheii* honey on pathogenic strains

- of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Sci Biotechnol* **2020**, 29, 1013–1021. doi:10.1007/s10068-020-00744-4
35. Pasupuleti, V.R.; Sammugam, L.; Ramesh, N.; Gan, S.H. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 2017. doi:10.1155/2017/1259510
36. AL-Ani, I.; Zimmermann, S.; Reichling, J.; Wink, M. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines* **2018**, 5,2. doi:10.3390/medicines5010002
37. Jia, F.; Wang, J.; Zhang, L.; Zhou, J.; He, Y.; Lu, Y.; Liu, K.; Yan, W.; Wang, K. Multiple action mechanism and in vivo antimicrobial efficacy of antimicrobial peptide Jelleine-I. *J Pept Sci* **2021**, 27. doi:10.1002/psc.3294
38. T. Jebri, N., Boden, R., Braungardt, C. Remediation Technique For Cadmium Contaminated Groundwater: A Systematic Review. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 1-18. doi:10.32649/ajas.2023.178800.
39. Feknous, N.; Boumendjel, M. Natural bioactive compounds of honey and their antimicrobial activity. *Czech J Food Sci* **2022**, 40(3):163–178. doi:10.17221/247/2021-CJFS
40. Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M.C.; González-Viñas, M.A.; P-C.M.S. No Title Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chem* **2009**, 112:1022–1030. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.036>
41. Chang, X.; Wang, J.; Yang, S.; Chen, S.; SY Antioxidative, antibrowning and antibacterial activities of sixteen floral honeys. *Food Funct* [Internet] **2011**, 2:541–546. doi:<https://doi.org/10.1039/C1FO10072F>
42. Feknous, N.; Ouchene, L.L.; Boumendjel, M.; Mekhancha, D.E.; Boudida, Y.; Chettoum, A.; Boumendjel, A.; Messarah, M. Local honey goat milk yoghurt production. Process and quality control. *Food Sci Technol* **2022**, 42:1–10. doi:10.1590/fst.26621
43. Didaras, N.A.; Karatasou, K.; Dimitriou, T.G.; Amoutzias, G.D.; Mossialos, D. Antimicrobial activity of bee-collected pollen and bee-bread: State of the art and future perspectives. *Antibiotics* **2020**, 9(11):1–29. doi:10.3390/antibiotics9110811
44. Zainol, M.I.; Mohd, Yusoff, K.; Mohd, Yusof.; MY Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complement Altern Med* **2013**, 13. doi:10.1186/1472-6882-13-129
45. Kurek-Górecka, A.; Keskin, Ş.; Bobis, O.; Felitti, R.; Górecki, M.; Otręba, M.; Stojko, J.; Olczyk, P.; Kolayli, S.; Rzepecka-Stojko, A. Comparison of the Antioxidant Activity of Propolis Samples from Different Geographical Regions. *Plants* **2022**, 11,1–17. doi:10.3390/plants11091203
46. Abdulrhman, M.A.; Mekawy, M.A.; Awadalla, M.M.; Mohamed, A.H. Bee honey added to the oral rehydration solution in treatment of gastroenteritis in infants and children. *J Med Food* **2010**, 13, 605–609. doi:10.1089/jmf.2009.0075

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Abdulla B.; Rashed R.; Hamasalih R., Faraj T., Rashid N., Hamamurad H. Antibacterial and Antifungal Activities of *Apis mellifera* L. Honey, Propolis, Royal Jelly in Iraqi Kurdistan Region. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 65. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.65>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Effect of mixing ratios and spraying with microelements on the growth and yield of forage for a mixture of oats and clover

Israa. S. Mohammed¹, Lamiaa, M.S. Al-Freeh*²

¹College of Agriculture/ Basrah University/ Basrah/ Iraq; israasaud2020@gmail.com

² College of Agriculture/ Basrah University/ Basrah, Iraq; lamiaa@gmail.com

*Correspondence; israasaud2020@gmail.com

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.67>

ABSTRACT

A field experiment was carried out in the fields of the Agricultural Research Station-College of Agriculture, University of Basra, during the winter season of 2021-2022. To study the effect of seeding rates of both oats and Egyptian clover with mixing percentages of 100% oats, 75% oats + 25% clover, 50% oats + 50% clover, 75% clover + 25% oats, 100% clover as the first factor and microelements at a concentration of 1500, 3000 and 4500 ppm as a second factor. The time for spraying with micro-elements was in the branching stage, 7-10 days after the first spray and 7-10 days after the second spray. The experiment was carried out in a factorial experiment with three replications, according to a randomized complete block design, RCBD. Three cuttings were taken during the crop's growth period. The height of the oats and clover plants, the number of oat tillers, the number of clover branches, the weight ratio of leaves to tillers and stems, and the amount of green and dry forage were measured. The results of the study showed that the different ratios of mixing oats and clover crops contributed to the production of the studied traits; 50% of oats + 50% of clover in the second cutting recorded the highest yield of green fodder (66.84 tons ha⁻¹) and dry fodder yield (22.37 tons ha⁻¹). As for the effect of concentrations of microelements, the level of 4500 ppm achieved superiority in all growth characteristics of all cutting, and the highest yield was recorded in green fodder (65.57 tons ha⁻¹) and dry forage (22.44 tons ha⁻¹) at the second cutting. 50% oats + 50% clover at the level of 4500 ppm gave the highest yield for green fodder (69.66 tons ha⁻¹) and dry (24.81 tons ha⁻¹).

Keywords: Mixture; Spraying; micro-nutrients; green fodder; *Avena sativa*; Clover.

INTRODUCTION

Managing forage field crops, including forage mixtures and mixture ratios of cereal crops and forage legumes, is essential in producing abundant forage yields, especially in cropping systems with limited external inputs. This can be attributed to some potential benefits of mixture farming systems, such as higher productivity. Improved livestock feed quality through the complementary effects of two or more crops grown at the same time on the same land area ¹, Improving soil fertility by adding nitrogen by fixing this element by legumes in addition to reducing the damage caused by pests of various kinds ² and giving better resistance to sloughing,

in addition to the fact that the cereals protect legumes from frost. The mixture has a different growth period, which leads to the provision of green fodder for a relatively more extended period ³.

Determining the optimal mixing ratios will reduce the degree of competition and give a clear indication of the amount of response and mutual benefit between the plant species that make up the forage mixture during the different stages of growth, which is reflected in the production of abundant and more fodder. A balance in its nutritional value due to its high protein content and low fibre content, Increasing the yield per unit area of forage and the elements it contains comes through multiple means, including breeding, improvement and genetic programs and the development of agricultural technologies such as the use of different seeding rates and their application to forage mixtures, and since the forage mixture consists of plants belonging to two different families in growth, namely the grassy family (oats), and the legume family (Clover), each of the plant density of these two components is important in providing nutritionally balanced fodder from feed mixtures, the primary motive for cultivating fodder mixtures ⁴ and other matters that may affect the performance of the forage mixture are the nutrients of different types, which effect on the activity of plants and increase their effectiveness, and therefore all of these factors may affect the quantity and quality of yield due to their impact on many of the biological processes that take place inside the plant and thus increase the biomass of the plant ⁵.

The interest in plant nutrition and the search for new sources of nutrition in the addition of micro-nutrients to the plant is one of the necessary elements for plant growth that the plant needs in small quantities compared to what it needs from N, P and K such as zinc, iron, copper, manganese and molybdenum, which significantly affect the vital and physiological processes, as they are essential for its growth and development. It increases its resistance to diseases and enters into the composition of enzymes or forms auxiliary factors, and its availability has a positive impact on improving plant growth and increasing its productivity in quantity and quality ⁶.

Accordingly, the use of different proportions of the feed mixture for each oat and clover with different concentrations of microelements (iron, copper, zinc, manganese, molybdenum) in this experiment was to choose the most appropriate composition of the feed mixture and to know the extent of the effect of microelements on growth and yield characteristics, as well as on the interaction between the forage mixture and the elements and its effect on the yield.

MATERIALS AND METHODS

A field experiment was carried out to study the effect of mixing seed ratios of different forage mixtures of oats (Shifa) variety with Egyptian clover (Mosqawi) as the first factor (100% oats, 75% oats + 25% clover, 50% clover + 50% oats, 75% clover +25%. Oats and 100% clover) and spraying with micro-elements (1500, 3000 and 4500 ppm) as a second factor on the growth and yield of green forage. I performed a factorial experiment. A randomized complete block design with three replications was used. The experiment soil was analyzed to determine its chemical and physical properties, estimated according to ^{7 and 8} (Table 1).

Adjective	PH	Soil	water	OM	N	P	K	clay	silt	sand
Unit		E. C. (dc/m)	E. C. (dc/m)	g kg ⁻¹	Available (mg/kg)			gm Kg ⁻¹		
Value	7.37	8.62	3.20	1.95	32.00	2.89	0.51	360	510	130

Table 1. The physical and chemical properties of the experimental soil and irrigation water.

The land designated for agriculture was prepared by plowing it with two orthogonal plows at a depth of 30 cm, and the soil was smoothed using disc harrows. The planting date was 1/11/2021. Phosphate fertilizer was added all at once when planting with an amount of (100 kg P⁻¹) in superphosphate (21% P)⁹. Nitrogen fertilizer was added with an amount of (120 kg N ha⁻¹) in the form of urea fertilizer (46%N) in two equal doses, the first after seedling emergence (30 after sowing) and the second in the elongation stage¹⁰. The irrigation process was carried out according to the plant's needs at one weekly irrigation. The hoeing and weeding operations were carried out manually whenever the need arose.

The spray solution was prepared by dissolving the required weight of the fertilizer, and the concentrations used were 1500, 3000, and 4500 parts per million. The elements were sprayed in three stages, which are in the branching stage (45 days after planting), after the first cutting (7-10 days) and after the second cutting (7-10 days)—spraying nutrients based on the specified concentrations of them. The plants were 60 days after planting (the first cutting), 45 days from the first cutting (the second cutting) and 40 days from the second cutting (The third cut). The following characteristics were studied: plant height, the number of tillers and branches, the weight of leaves, and the weight of tillers or stems green and dry forage. GenStat Program was used for statistical analyses ($p > 0.05$).

RESULTS

Effect of Seeding Rates

The results shown in Table No. 2 indicate the significant effect of the different mixing ratios on the height of oats and clover plants, as the mixing ratio of 100% for oats was given the highest height oats plants (67.49 and 70.80 cm) for the first and second cuttings respectively, while in the third cutting the mixing percentage was recorded as 50% Oats + 50% clover had the highest height of oats plants (66.69 cm), without a significant difference from 100% oats (65.38 cm). The mixing ratio of 100% of clover showed the highest plant heights of 45.58, 57.69 and 61.25 cm for the three cuts, respectively. The mixing ratio was measured as 100% oats and recorded the most significant number of tillers for three cuts, as it gave 526.6, 574.4 and 560.0 tiller m⁻² for the three cuts, respectively. 100% with clover recorded the most significant number of branches, which amounted to 440.41, 460.6 and 476.6 branches m⁻² for three cuts, respectively. The results of Table 2 indicated that the ratios of 75% oats + 25% clover and 50% oats + 50% clover were superior. The highest percentage of leaf weight/oat tillers weight was recorded in the first and third cuttings, reaching 60.67 and 59.39% for the first cut and 59.05 and 59.90% for the third cut, respectively.

In the second cut, the percentage of mixing 50% oats + 50% clover was superior, and the most significant percentage was 58.94%. The treatment was superior to 50% oats + 50% clover in the first cutting, and the highest percentage of leaves/branches of clover was 61.49%. In the second and third cuttings, the mixing ratio exceeded 25% oats + 75% clover; the highest percentage was 72.14% and 67.02 for the two cuttings followed. The treatment was superior to 50% oats + 50% clover in the yield of green fodder and recorded 59.37- and 66.84-tons ha⁻¹ for the first and second cuttings respectively, while in the third cutting, the mixing ratios were 50% oats + 50% clover and 25% oats + 75% clover in the superiority and recorded the highest yield, which amounted to 58.05- and 58.25-tons ha⁻¹, respectively. The mixing ratio also exceeded 50% oats + 50% clover in the first cut and recorded the highest dry forage yield, which amounted to 18.71 tons ha⁻¹. As for the second and third cuttings, the two forgetful of mixing 50% oats + 50% clover and 25% oats + 75% clover and recorded

the most significant dry fodder yield amounting to 22.37- and 22.29-tons ha⁻¹ in the second cutting, 22.08- and 21.37-ton ha⁻¹ in the third cuts respectively.

Effect of Micronutrient Fertilization

The results in Table 3 indicate no significant effect of the difference in the concentrations of microelements on the height of oats and clover plants in the first cutting. The second and third cuttings exceeded 4500 ppm, and the highest heights of oats were recorded at 71.99 and 66.26 cm for the two plants, respectively. The highest height of clover plants was 56.33 and 58.54 cm for the two cuttings, respectively, without significant difference from the level of 3000 ppm (55.78 cm) in the third cutting. The level exceeded 3000 ppm gi, giving it the most significant number of tillers for oats, which amounted to 487.3 tillers m⁻² at the first cut. There were no significant differences between the levels 1500 and 4500 in the number of tillers at the exact cutting (466.3 and 466.9 tillers m⁻²). The levels of micronutrient fertilization did not significantly affect the number of oat tillers in the second cut.

In contrast, in the third cut, the level exceeded 4500 ppm, and the most significant number of tillers was 487.1 tiller m⁻², the level exceeded 4500 ppm, and the most significant number of branches of clover plants was 375.88. and 437.0 and 427.2 tiller m⁻² branches of the three cutting, respectively. The level exceeded 4500 ppm in the ratio of the weight of leaves/oats and scored the highest percentage of 59.70, 53.00 and 60.18% for the three cuttings, respectively.

In comparison, the level of 1500 ppm recorded the lowest percentage of 57.32, 49.92 and 56.42% for the three cutes, respectively. The spray with a concentration of 4500 ppm in the first and second cutes produced the highest percentage of leaf/branch weight of clover plant by giving 58.94 and 64.13% for the two cuttings, respectively. In contrast, in the third cutting, the first level exceeded (1500ppm) and recorded the highest percentage of leaf weight/stem weight, which amounted to 67.19 %. The level exceeded 4500 ppm and recorded the highest green forage yield of 57.31, 65.57- and 56.95 tons ha⁻¹ for the three cutes. The level of 1500 ppm recorded the highest dry forage yield of 17.05 tons ha⁻¹ in the first cut, while the level exceeded 4500 ppm, recording the highest dry forage yield of 22.44- and 20.44-tons ha-1, respectively, for the second and third cutting.

The Effect of the Interaction Between Seed Rates and Levels of Trace Elements

The results of Table 4 showed that the interaction between the proportions of mixing and fertilization with microelements significantly affected the height of oats and clover plants in the first cut. The mixing ratio exceeded 100% of oats at 3000 ppm; the highest height of oats plants was recorded at 67.84 cm. In the second cut, the mixing ratios were 100% oats, 75% oats + 25% clover, and 50% oats + 50% clover at the level of 4500 ppm of microelements, and they recorded the highest height of oats plants reaching 75.76, 72.28 and 73.77 cm, respectively, without significant difference between them. In the third cutting, the mixing ratios of 100% oats, 50% oats + 50% clover were superior at the level of 4500 ppm, and they recorded the highest height of oats plants, reaching 72.39 and 66.84 cm, respectively, without significant difference between them. In the first cut, the mixing ratio of 100% clover at all levels of microelements (1500, 3000 and 4500 ppm) was significantly superior. The highest height of clover plants was recorded, reaching 45.68, 45.52 and 45.54 cm for the three levels, respectively, while in the second cutting, the mixing percentage was 100%.

Clover at the level of 4500 ppm, and the highest height of the clover plant was 64.54 cm. In the third cutting, the mixing ratio of 100% clover and 50% oats + 50% clover at 4500 ppm, recording the highest height of

clover, 67.13 and 60.71 cm for the two ratios, respectively. 100% oats and the level 4500 ppm recorded the most significant number of oat tillers, 564.4 per m², without a significant difference from the same mixing ratio at the level of 3000 ppm (538.30 tillers.m²) in the first cutting. In contrast, in the second cutting, the mixing ratio exceeded 100 oats at the three levels of concentrations of microelements, recording the most significant number of oat tillers. They were 568.7, 567.9, and 577.50 per m² for the three concentrations, respectively, without significant differences.

The mixing ratio was superior to 100 oats at the 3000 and 4500 ppm levels (the third cut), and the most significant number of oats tillers was recorded at 566.00 and 581.00 per m² for the two levels, respectively, without significant difference between them. The results of Table 4 indicate the superiority of the mixture percentage of 100% clover at the levels 3000 and 4500 ppm in the first cut, recording the most significant number of branches of clover plants, which amounted to 442.16 and 458.62 branches m² for the two levels respectively. In contrast, the mixture was unique to 100% clover in the second and third cuttings. The level is 4500 parts per million, and the most significant number of branches was recorded, which amounted to 482.20 and 496.00 branches m², respectively. The combination of 50% oats + 50% clover at the level of 4500 ppm in the first cutting recorded a significant superiority, recording the highest percentage of leaf/branch weight of clover. It amounted to 63.99%, while in the second cutting, the percentage was superior to 25% oats + 75% clover at 4500 ppm. It gave 68.45% without significant difference from the mixing ratio of 50% oats + 50% clover at levels 3000 and 4500 ppm (64.57 and 67.33%). Also, in the third cut, the percentage exceeded 25% oats + 75% clover at the level of 4500 ppm, and the highest percentage of leaf weight/clover branch weight was recorded at 74.67%.

The mixing ratio was superior to 75% oats + 25% clover in the first cuts at 3000 and 4500 ppm levels. The most significant percentage of leaf weight/ oats tillers weight was 60.80 and 62.89% for the two levels, respectively, without a significant difference from the mixing ratio of 50% oats + 50% clover at levels 1500 and 4500 ppm, which recorded 59.97 and 62.26% for the two levels respectively, In the second twice cuts, the mixing ratio exceeded 50% oats + 50% clover at the levels 3000 and 4500 ppm, and recorded the most significant percentage of 59.25 and 59.89% for the two levels, respectively, while in the third cuts, the mixing percentages were 50% oats + 50% clover and 25% oats. +75% clover at the level of 4500ppm, recording the highest percentage of leaf weight/tillers weight of 62.10 and 61.04%, respectively.

The results of Table 4 indicated that the mixing ratio of 50% oats + 50% clover was superior at the level of 4500 ppm in the first cutting, recording the highest yield of green fodder that amounted to 62.31 tons ha⁻¹. In comparison, in the second cutting, the same mixing ratio exceeded at the levels of 3000 and 4500 ppm, recorded 67.42- and 69.66-tons ha⁻¹ without a significant difference from the mixture of 25% oats + 75% clover at the level of 4500 ppm (667.22 tons ha⁻¹). In contrast, in the third cutting, the mixing ratios exceeded 50% oats + 50% clover and 25 % oats + 75% clover at 4500 ppm. It gave the largest green forage yield, reaching 61.35- and 60.29-tons ha⁻¹ for the mixing proportion sequentially. In the first stage, the mixing ratio exceeded 50% oats + 50% clover at levels 1500, 3000 and 4500 ppm, and the largest amount of dry forage yield was recorded.

Amounting to 18.49, 18.93- and 18.70-tons ha⁻¹ for the three mixing ratios sequentially and without significant difference between them, while in the second cut, the mixture of 50% oats + 50% clover at the level of 4500 ppm was superior, recording the most significant yield of dry forage. It amounted to 24.81 tons ha⁻¹, while in the third cutting, the percentage exceeded 50% oats + 50% clover at the levels 3000 and 4500 parts. In million, 22.10 and 23.19 tons of ha⁻¹ were recorded for the two levels, respectively (Table 4).

Traits	Plant height (Cm)		No. Oats tillers m-2	No. clover branch m-2	Leaves Wt. / branch Wt. %	Leaves Wt. / tiller Wt. %	green fodder yield ton ha-1	Dry fodder yield ton ha-1
	Oats	Clover						
Seeds rate								
Oats(%100)	67.49	-	526.6	-	-	53.85	53.15	15.22
Oats :clover (25:75)	62.34	41.41	439.1	231.08	53.43	60.67	57.09	16.73
Oats :clover (50:50)	63.11	41.11	472.6	362.36	61.49	59.39	59.37	18.71
Oats :clover (75:25)	61.72	41.03	466.9	403.92	58.21	56.81	57.55	17.10
clover (%100)	-	45.58	-	440.41	55.61	-	52.97	14.45
L.S.D(0.05)	3.280	1.860	26.96	5.298	0.984	1.689	1.648	0.954
Second cutting								
Oats(%100)	70.80	-	574.4	-	-	45.38	62.33	20.30
Oats :clover (25:75)	68.62	52.93	509.9	332.7	55.40	54.05	64.31	20.43
Oats :clover (50:50)	69.72	52.56	478.3	404.5	64.73	58.94	66.84	22.37
Oats :clover (75:25)	64.26	43.10	366.2	450.2	67.02	47.38	64.29	22.44
clover (%100)	-	57.69	-	460.6	63.02	-	61.25	20.99
L.S.D(0.05)	2.305	2.996	22.07	10.20	0.993	0.823	1.435	0.922
Third cutting								
Oats(%100)	65.38	-	560.0	-	-	56.37	52.37	16.78
Oats :clover (25:75)	57.74	54.90	509.0	365.1	58.57	59.05	55.87	18.96
Oats :clover (50:50)	66.69	56.34	449.0	377.6	68.60	59.90	58.05	22.08
Oats :clover (75:25)	59.65	48.14	373.4	423.3	72.14	58.30	58.25	21.37
clover (%100)	-	61.25	-	476.6	62.48	-	50.67	18.97
L.S.D(0.05)	3.906	5.044	22.65	6.77	1.148	0.886	1.167	0.650

Table 2. Effect of seed rates on green and dry forage growth and yield for oats and clover.

Traits	Plant height (Cm)		No. Oats tillers Tiller m ⁻²	No. clover branch Branch m ⁻²	Leaves Wt. / branch Wt. %	Leaves Wt. / tiller Wt. %	green fodder yield ton ha ⁻¹	Dry fodder yield ton ha ⁻¹
	Oats	Clover						
Micronutrient levels	First Cutting							
1500ppm	64.32	42.34	466.3	340.42	55.42	57.32	54.92	17.05
3000ppm	62.82	42.17	487.3	362.02	57.20	56.01	55.85	16.46
4500ppm	63.86	42.33	466.9	375.88	58.94	59.70	57.31	15.82
L.S.D(0.05)	2.840	NS.	NS.	4.588	0.852	1.463	1.276	0.739
	Second cutting							
1500ppm	66.04	51.15	485.2	383.7	61.06	49.92	61.94	20.29
3000ppm	67.02	55.78	484.4	415.2	62.44	51.40	63.89	21.09
4500ppm	71.99	58.54	477.0	437.0	64.13	53.00	65.57	22.44
L.S.D(0.05)	1.996	4.368	NS.	17.67	0.860	0.713	1.112	0.714
	Third cutting							
1500ppm	58.17	51.15	459.6	396.8	67.19	56.42	53.55	18.76
3000ppm	62.67	55.78	471.4	408.0	63.54	58.61	54.62	19.70
4500ppm	66.26	58.54	487.1	427.2	65.61	60.18	56.95	20.44
L.S.D(0.05)	3.383	4.368	19.62	5.86	0.994	0.767	0.904	0.503

Table 3. Effect of fertilization with microelements on green and dry fodder growth and yield for a mixture of oats and clover.

Micronutrient Levels	Seeds rate	Plant height (Cm)		No. Oats tillers Tiller m ⁻²	No. clover branch Branch m ⁻²	Leaves Wt./ branch Wt. %	Leaves Wt. / tiller Wt. %	green fodder yield ton ha ⁻¹	Dry fodder yield ton ha ⁻¹
		Oats	Clover						
		First cutting							
1500 Ppm	Oats(%100)	67.42	-	477.2	-	-	54.02	50.40	16.91
	Oats : clover (25:75)	65.00	39.67	461.1	211.06	52.23	58.31	57.27	16.47
	Oats : clover (50:50)	63.51	41.57	449.3	346.40	58.49	59.97	57.88	18.49

	Oats : clover (75:25)	61.36	42.45	477.4	383.76	56.73	57.00	57.62	17.80
	clover (%100)	-	45.68	-	420.45	54.24	-	51.41	15.58
3000 Ppm	Oats(%100)	67.84	-	538.3	-	-	52.15	54.50	14.57
	Oats : clover (25:75)	58.77	42.79	444.4	235.23	53.33	60.80	56.47	17.28
	Oats : clover (50:50)	62.71	41.42	476.3	363.94	61.99	55.93	57.93	18.93
	Oats : clover (75:25)	61.71	38.96	490.4	406.76	57.44	55.16	56.58	16.46
	clover (%100)	-	45.52	-	442.16	56.03	-	53.79	15.04
4500 Ppm	Oats(%100)	67.21	-	564.4	-	-	55.39	54.55	14.19
	Oats : clover (25:75)	63.25	41.77	411.8	246.95	54.74	62.89	57.52	16.45
	Oats : clover (50:50)	62.86	40.35	492.3	376.72	63.99	62.26	62.31	18.70
	Oats : clover (75:25)	62.10	41.68	432.9	421.24	60.46	58.28	58.47	17.03
	clover (%100)	-	45.54	-	458.62	56.58	-	53.71	12.75
	L.S.D(0.05)	5.681	3.238	46.70	9.177	1.704	2.926	2.854	1.653
Second cutting									
1500 Ppm	Oats(%100)	68.41	-	568.7	-	-	43.18	59.83	19.67
	Oats : clover (25:75)	66.38	45.56	536.5	320.3	55.52	51.35	63.37	19.32
	Oats : clover (50:50)	67.58	45.24	480.5	351.5	62.29	57.68	63.44	20.59
	Oats : clover (75:25)	62.06	42.45	355.0	428.7	65.61	47.46	62.00	21.41

	clover (%100)	-	53.35	-	434.5	60.83	-	61.94	20.46
3000 Ppm	Oats(%100)	68.50	-	567.9	-	-	45.38	61.36	19.89
	Oats : clover (25:75)	67.20	54.67	525.8	323.4	55.59	54.59	65.70	20.61
	Oats : clover (50:50)	68.42	54.76	472.4	414.9	64.56	59.25	67.42	21.71
	Oats : clover (75:25)	63.96	42.31	362.4	457.7	67.01	46.38	63.66	22.33
	clover (%100)	-	55.18	-	465.0	62.59	-	61.33	20.93
4500 Ppm	Oats(%100)	75.76	-	577.5	-	-	47.59	65.79	21.33
	Oats : clover (25:75)	72.28	58.57	467.2	354.5	55.08	56.22	63.85	21.35
	Oats : clover (50:50)	73.77	57.68	482.0	447.1	67.33	59.89	69.66	24.81
	Oats : clover (75:25)	66.77	44.54	381.3	464.3	68.45	48.31	67.22	23.12
	clover (%100)	-	64.54	-	482.2	65.65	-	61.36	21.59
	L.S.D(0.05)	4.992	5.189	38.22	17.67	1.720	1.426	2.486	1.597
Third cutting									
1500 Ppm	Oats(%100)	61.50	-	533.1	-	-	54.75	51.06	16.13
	Oats : clover (25:75)	53.25	50.34	508.5	353.6	59.50	57.42	55.17	17.47
	Oats : clover (50:50)	65.68	50.58	433.3	370.0	67.55	57.92	55.13	20.94
	Oats : clover (75:25)	52.23	45.34	363.5	407.7	69.51	55.60	56.63	20.84
	clover (%100)	-	58.35	-	456.1	72.21	-	49.76	18.40
3000	Oats(%100)	62.24	-	566.0	-	-	56.74	51.71	16.42

Ppm	Oats : clover (25:75)	57.82	56.03	496.6	359.2	56.67	59.76	56.11	19.40
	Oats : clover (50:50)	67.56	57.73	460.3	374.2	68.71	59.67	57.66	22.10
	Oats : clover (75:25)	63.05	51.10	362.9	420.7	72.23	58.24	57.84	21.46
	clover (%100)	-	58.26	-	477.7	56.55	-	49.80	19.14
4500 Ppm	Oats(%100)	72.39	-	581.0	-	-	57.62	54.33	17.79
	Oats : clover (25:75)	62.14	58.35	521.9	382.5	59.55	59.96	56.33	20.01
	Oats : clover (50:50)	66.84	60.71	453.5	388.7	69.53	62.10	61.35	23.19
	Oats : clover (75:25)	63.69	47.97	393.7	441.6	74.67	61.04	60.29	21.82
	clover (%100)	-	67.13	-	496.0	58.68	-	52.44	19.38
	L.S.D(0.05)	6.765	8.737	39.23	11.72	1.989	1.534	2.020	1.125

Table 4. The effect of the interaction between levels of micronutrient fertilization and seeding rates on the growth of the forage mixture of oats and clover.

DISCUSSION

A field experiment was applied to determine the effect of different mixing ratios of oats and clover crops and different concentrations of a group of microelements on the growth and yield of green and dry forage. The results indicated that both factors had a significant effect in most of the studied traits, as the percentage of single mixing for both crops was superior to (100% oats and 100% clover) and recorded the highest plant height and the most significant number of tillers and branches for both crops with a significant difference from the other mixing ratios, and the reason can be attributed to the reason This leads to an increase in the production of dry matter in the case of monoculture as a result of the lack of competition between plants, and then increasing the ability of the plant to absorb water and nutrients from the soil, which was reflected in an increase in the efficiency of the photosynthesis process and stimulating stem cells to divide and elongate, and the survival of oats and clover plants within the single system It gave it a higher number of strands and branches than it is in the overlapping condition, which allowed it to grow well, which was reflected in an increase in its ability to branch as a result of obtaining its nutritional requirements in the soil better than the treatments that included mixing oats with clover at high seeding rates that led to an increase in competition between plants

and then The lack of their ability to branch, that the increase in the process of branching or tillering the plant with the increase in seeding rates is originally due to the increase in the number of seeds per unit area, which was reflected in Positively on the formation of saplings and their competition with other plants, and this result agreed with ^{30 11, 5} who indicated the superiority of monoculture in increasing the number of stems of clover at the expense of mixed cultivation with grass crops. In the first cut, the seeding rates with the most significant percentage in favor of oats (75% oats + 25% clover) were superior in the ratio of leaf weight/tillers weight (60.67%) or branches for oats and clover. In the second and third cuttings, the seeding rates with a high percentage of clover were a higher percentage of leaf/stem weight, as the mixing ratio gave 25% oats + 75% clover the highest ratio of leaf weight/branch weight of clover (72.14%) at the third cutting, The reason for the decrease in the ratio of leaves/branches of clover in the first cutting of the mixture mentioned above may be attributed to the small number of branches of clover in the early stages of growth are insufficient to produce a large number of branches, in addition to the cessation of the activity of the basal buds during this stage, and the increase of this characteristic in the later cuts explains the extent to which clover plants benefit from the protection of the accompanying oats in their early stages of growth, which gives a valuable indicator of livelihood for placing the legume and cereal plants in a mixed manner to obtain nutritional value forage. High, and the reason for the increase in the ratio of leaf weight/weight of clover branches in the last mowing can be attributed to the increase in the number of branches (476.6 branches m⁻²) and thus the increase in the number of leaves and leaf area and thus better plant growth and this result was in agreement with ^{5, 12}.

The equal percentage of seeds for both crops (50% oats + 50% clover) exceeded the green and dry fodder yield, recording the highest weights. The reason for the increase in both green and dry yields can be attributed to the increase in the number of tillers and branches of oats and clover per unit area and the increase in the height of oats plants, which contributed to raising the forage yield to the level of moral superiority of intercropping cultivation over single cultivation at the three cuttings. Besides, the increase in the mixing rates compared to the single rates differed from one mowing to another. The increase in green fodder after the first cut by the effect of the seed mixture can be attributed to the increase in plant density. Planting high seeding rates led to an increase in the number of plants of the forage mixture per unit area, which was positively reflected in the forage yield. This result was in agreement with ^{13,11, 5, 14}.

The obtained results indicate that the high levels of micronutrients concentrations (4500ppm) had a significant role in increasing all the studied growth characteristics, as the 4500ppm level contributed to the increase in the average plant height, number of branches and rims, and the ratio of leaf/stem or tillers weight for both clover crops and oats, The reason for the increase in plant height may be attributed to the increase in the level of fertilization with microelements to the role of iron in increasing the efficiency of the photosynthesis process by increasing the content of chlorophyll in the plant in addition to its role in the formation of many essential compounds in the photosynthesis process such as cytochromes and ferredoxins ¹⁵. This result agrees with ^{16 17} in the role of iron in increasing the height, in addition to the positive effect of manganese in improving growth characteristics and is a critical element in photosynthesis ⁶. This result agrees with ¹⁸. The micro-elements contributed to the increase in the number of branches. The reason may be attributed to the role of microelements in increasing photosynthesis and then increasing the vegetative total and stimulating the growth of branches, as well as their role in increasing the readiness and absorption of nutrients and increasing their content in the plant, which leads to an increase in the activity of vital activities and an increase in meristem cell division, which gives a significant and rapid vegetative and root growth with a high efficiency in absorbing nutrients more ¹⁹. Micro-elements also have a role in the formation and division of plant cells. Then, their

elongation and increased cleavage^{20,21} are due to the increased branching of plants with an increase in the amount of fertilizer to encourage the growth of roots, which is directly related to the increase in the number of tillers^{22,29}. Increasing the height of oats and clover and the number of tillers and branches when increasing the fertilization with microelements had a positive effect on the ratio of leaves to clover branches through the optimal exploitation of the produced and accumulated materials by directing them to build the most effective plant parts such as leaves instead of using them to increase the weight of the stems at the expense of the weight of the leaves

This resulted in better growth of the leaves. Then an increase in their weight, which was reflected in an increase in their ratio to the vegetative part, As well as the role of the basic micro-elements in physiological processes such as photosynthesis and the formation of amino and nucleic acids and energy compounds in addition to the formation of living organelles such as mitochondria and chloroplasts and encouraging the division, expansion and elongation of cells, which means the formation of good vegetative and root growth that increases vegetative characteristics whose increase leads to an increasing number of leaves and their weight per plant²³ and this agrees with²⁴, the positive role of fertilization with microelements on growth characteristics, which was reflected in the superiority of growth characteristics and thus led to the superiority of the yield of green and dry forage^{25,28}.

CONCLUSIONS

We conclude that the cultivation of forage crops in the form of a mixture with equal seeding rates between oats and clover under levels of up to 4500 ppm of micronutrients gives a high forage yield of nutritional and economic value.

Author Contributions: “Conceptualization, ISRAA and LAMIAA; methodology, ISRAA; formal analysis lamia investigation lamina.; resources ISRAA.; data curation, ISRAA.; writing—original draft preparation, lamiaa; writing-review and editing, ISRAA and LAMIAA.; visualization, lamiaa.

Funding: This research is not externally funded.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The study did not report any data.

Acknowledgments: University of Basrah, College of Agriculture, Department of Field Crops

Conflicts of Interest: The author declares no conflict of interest.

REFERENCES

1. Lithourgidis, A.S., D.N. Valchostergios, C.A. Dordas, C.A. Damalas.2011. Including them in fertilizers. *Agro-Chemicals Report*, 111 (1): 15-22.
2. Ghosh, P.K.2004. Growth, yield, competition and economics of groundnut / cereal fodder intercropping systems in the semi-arid tropics of India. *Field crops research*, 88(2-3), 227-237.

3. Aasen, A., V. Baron, G. Clayton. Dick and D. McCartney. 2004. Swath grazing potential of spring cereals, peas and mixtures with other species. *Can. J. Plant Sci.* 84: 1051-1058.
4. Radwan, M. A. and al-Fakhri, A. Q. (1976). Forage and pasture crops. Part Two, Dar Al-Kutub Institution for Printing and Publishing, University of Mosul, Ministry of Higher Education and Scientific Research, Iraq.
5. AL-Temimi, S.A.N.2019. Response of the mixture of Oats (*Avena sativa* L.) with Egyption berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) of phosphate – fertilizer and seed rates. Master Thesis. College of Agriculture - University of Basrah.
6. Al-Nuaimi, S. N. A. 2000. Principles of Plant Nutrition. University of Al Mosul. Ministry of Higher Education and Scientific Research (translator).
7. Page Jr, R. E., & Metcalf, R. A. (1982). Multiple mating, sperm utilization, and social evolution. *The American Naturalist*, 119(2), 263-281.
8. Black. CA 1965. Methods of soil analysis part2. Agronomy 9 SSSA. ASA. Madison. Wisconsin. USA.
9. Alabdalsayid, K. K., & Al-Freeh, L. M. 2021. Effect of Phosphate Fertilization and Iron Spraying on Growth Parameter and Yield of Oat (*Avena Sativa* L.). In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 923, No. 1, p. 012086). IOP Publishing.
10. Al-Hasnawi, A. S. A., 2016. Effect of nitrogen fertilizer levels, planting distances between lines and seed rate on growth and productivity of oats (*Avena sativa* L.). Master Thesis. College of Agriculture - University of Al-Muthanna.
11. Al-Mandalawi, H. M., 2017. Response of the ratios of the forage mixture clover (*Medicago sativa* L.) and oats (*Avena sativa* L.) to different levels of nitrogen fertilizer. Master thesis, College of Agriculture, University of Al-Muthanna.
12. S. F. Al-jughafy, A., Sh. J. Alobaidy, B. Effect Of Osmo-Hardening Seed On K And Na Concentration And Some Growth Properties Of Wheat Under Salt Stress. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 32-43. doi: 10.32649/ajas.2023.179713.
13. Mansour, H. N. and Kharbit H. Kh., 2017. The effect of some agricultural operations on the yield of green and dry forage and its nutritional value in the forage mixture (oats, clover, millet). *Al-Furat Journal of Agricultural Sciences*, College of Agriculture - University of Baghdad, Vol. 9(4): 1189-1200.
14. Al-Ziyadi, A. J. S. 2020. Effect of specific weight of seeds resulting from sowing dates on seed viability, growth and yield of four barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.). Master Thesis. College of Agriculture - University of Al-Muthanna.
15. Ghanim, I. .; Ebrahim, S. E. . Preparing Of Bio-Cement Mortar By Using Bacillus Licheniformis Bacterial Cells. *JLSAR* 2022, 3, 23-29.
16. Alrawi, D. S. A. 2021. Interactive Effect of Cultivar and Foliar Application with Potassium and Zinc Nano and Normal Fertilizers in Oat Productivity. PhD thesis. faculty of Agriculture College of Agriculture - University of Anbar.
17. Yousef, Amal Naoum and Hassan Ali Abdul Reza. 2000. Effect of Claw Iron Fe-EDDHA on the formation of root nodes and the growth of the alfalfa plant. *Ibaa J of Agric Rese* 10(2):158-169.
18. Al-Asadi, K. K. J., 2014. Effect of spraying different levels of iron and zinc on growth and yield of barley (*Hordeum vulgare* L.). Under the Conditions of Basra Region, *Dhi Qar J of Agric Rese*, 3(2): 246-257.

19. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>.
20. Yaseen, M., W. Ahmed, M. Arshad and Q. Ali. 2011. Response of wheat (*Triticum aestivum* L.) to foliar feeding of micronutrients .*ijavms*. 5(2): 209-220.
21. Jasim, R. T., Issa, F. H. and Jalab, Y. K. 2021. Effect of nano NPK and mineral fertilizer on yield and components of three barley cultivars. *Al-Muthanna J. For Agric Sci*. 8(4):218-224.
22. Meghana S, Kadalli GG, Prakash SS and Fathima PS. 2019. Effect of micronutrient mixture on growth and yield of aerobic rice. *International J of Chem Studies*, 7(2): 1733-1735.
23. Alaaraji, S.F.T., Awad, M.M., Ismail, M.A. Study the association of asprosin and dickkopf-3 with KIM-1, NTpro-BNP, GDF-15 and CPP among male iraqi with chronic kidney disease (2020) *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11 (5), pp. 10-17.
24. Kadalli, M. S., Prakash, SS and Fathema PS. 2019. Effect of micronutrient mixture on growth and yield of aerobic rice. *International J of Chem Stu*.7(2): 1733-1735.
25. Al-Hadithi, I. Kh., Fawzi, M. and Ali A. A. A. 2003. The effect of foliar fertilization with micronutrients on the yield of two cultivars of wheat grown in gypsum soils under center pivot irrigation system. *The Iraqi Journal of Soil Sciences*: (1): 98-105.
26. Sharifi, R., Mohammadi, K., & Rokhzadi, A. (2016). Effect of seed priming and foliar application with micronutrients on quality of forage corn (*Zea mays*). *Environmental and Experimental Biology*, 14(4), 151-156.
27. Al-Freeh, L. M.2021. Influence of spraying with humic acid and the number of cutting on Forage Yield of Oat (*Avena sativa* L.). *Indian Ecological Society*. 48(18):86-89.
28. Alzrgani, M. S. M. and Khrbeet, H.KH. 2021. Effect of Foliar Application of Boron on Growth Yield and Yield Components of Four Varieties of Oats *Avena sativa* L. *Al-Muthanna J. For Agric Sci*. 8(4):25-37.
29. Torrance, L., Cowan, G. H., McLean, K., MacFarlane, S., Al-Abedy, A. N., Armstrong, M., ... & Bryan, G. J. (2020). Natural resistance to Potato virus Y in *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Theoretical and Applied Genetics*, 133, 967-980.
30. AI- Zergawy, M.A.A. (2016). Effect of foliar an – Nebras colloidal fertilizer at different growth stages on growth, yield and yield compnent of Barley (*Hordeum vulgare* L) . *Basrah J. Agric. Sci.*, 29(2): 502-513.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Mohammed I. S., Al-Freeh L. S. Effect of mixing ratios and spraying with microelements on the growth and yield of forage for a mixture of oats and clover. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 67. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.67>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Response of maize grain yield and components to foliar iron nanoparticle application

Naeem A. Mutlag^{1*}, Adawiya S. M. Al-Raw², Mohammed D.Y. El-Jubouri³, Saddam H. Cheyed⁴

¹University of Fallujah 1; naeem-admin@uofallujah.edu.iq.

²College of Agricultural Engineering Sciences - University of Baghdad. Iraq:

³Al-Karkh University of Science.

⁴College of Agricultural Engineering Sciences - University of Baghdad.

Iraq: Saddam.hakeem@coagri.uobaghdad.edu.iq.

*Correspondence: naeem-admin@uofallujah.edu. Available from.

<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.70>

ABSTRACT

During the spring season of 2021, a field experiment was conducted at the College of Agricultural Engineering Sciences - University of Baghdad (Abi Ghraib location). To investigate the impact of nano iron concentrations and their application dates on the yield and its components of maize. A factorial experiment was carried out in a split-plot arrangement. The main plots occupied the spraying dates (beginning of the male flowering stage, 50% female flowering and completion of female flowering) and symbolized in sequence. At the same time, the iron concentrations (0, 100, 200 and 300 mg. L⁻¹) occupied sub-plots according to RCBD with three replicates. The results revealed that the dates of spraying nano iron substantially influenced most of the features tested. The early date (beginning of the male flowering stage) gave the highest average length of the ear (16.374 cm), the number of rows per ear (16.3 row ear⁻¹), and the number of grains per ear (563.4 grain ear⁻¹) and the total grain yield of 6.096 tons ha⁻¹. The results also showed that the concentrations of nano iron 300 mg L⁻¹ were superior in all the characteristics of the yield components and the grain yield, as it produced the most significant average for ear length, number of rows, number of grains per row, number of grains in the ear, weight of 500 grains, and total grain yield. It is concluded from this study that spraying at the beginning of the flowering stage is the most responsive to spraying the nano iron element, especially at the concentration of 300 mg L⁻¹.

Keywords: Nano iron; flowering stage; ear length; grain yield

INTRODUCTION

The maize crop is one of the vital grain crops that occupy the first place in terms of cultivated area and production and has a high nutritional value for humans and animals because its grain contains carbohydrates, proteins, oil, salts, minerals and vitamins, as well as being used as a raw material in many industries such as the manufacture of oils, starch and biofuels. Despite the importance of the crop, the gap between the amount of production and its needs in Iraq is still significant due to the low production rate. Among the most important reasons for the low productivity is the failure to use the genotypes appropriate to the cultivated environment and scientific methods for crop management and providing nutrients. The most important of these micronutrients is iron since maize is one of the crops sensitive to iron deficiency. Iron makes up 80% of chloroplast and helps metabolize RNA¹.

Foliar application is one of the methods used to provide nutrients to the plant by spraying. It is distinguished by its ease and speed, as well as its cost-effectiveness in terms of added fertilizers and labs, with the ability to add them simultaneously when symptoms of deficiency appear on the plant and reduce the risk of environmental pollution². It is also one of the most effective ways to deliver nutrients to the plant when the roots cannot supply them³. Iron is an activator of oxidation and reduction enzymes in the chain of electron transfer in the processes of active respiration and absorption, and of many other enzymes such as catalase and peroxidase, in addition to its role in the absorption of adequate nitrogen, which leads to an increase in leaf area and the production of proteins that help in building chlorophyll⁴. The technology of nano-fertilizer, compared to the mineral fertilization process, is essential in increasing the activity of photosynthesis processes and making up for the lack of nutrients the plant needs. In addition to being environmentally friendly and less expensive, converting fertilizers added to nanoscale by changing their biological and chemical properties facilitates their absorption by the cell walls of plants. It supplies the soil with nutrients for a more extended period, as well as reducing environmental pollution problems⁵. Kobayashi *et al.*⁶ noted that iron absorbed by plants from mineral soils is not sufficient for its needs despite its availability, as iron moves from the roots after absorption to the target parts and appears yellowing of young leaves as iron moves to the buds through the xylem and then to the old leaves by the process of transpiration and pressure root. It also takes part in most biological activities, such as respiration, production of chlorophyll, and photosynthesis. It is a cofactor for enzymes involved in electron or oxygen transport because iron is required for biological activities but is harmful in excess. Singh *et al.*⁷ mentioned that using nano iron sprayed on the plant at various growth phases substantially influenced increasing vegetative growth and the yield and its components. Golshahi *et al.*⁸ showed that iron is one of the determinants of plant survival, and its presence is reduced in highly acidic areas because of its active participation in physiological and metabolic processes necessary for plant growth. Al-Shaheen *et al.*⁹ indicated the effect of iron nanoparticles on maize yield. It increased the transfer of processed materials from the source (leaves) to the sink (grain) by increasing the rate of chlorophyll in leaves and accelerating the photosynthesis process, growth and productivity, thus increasing the yield. The goal was to investigate the influence of nanoiron concentrations and the timing of their spraying on maize yield and components.

MATERIALS AND METHODS

During the spring season of 2021, a field experiment was conducted in the experimental field of the College of Agricultural Engineering Sciences - University of Baghdad (Abi Ghraib site) to study the effect of nano iron concentrations and the dates of their application on maize yield and its components. The seeds of maize, cultivar Buhuth 106, were planted in furrows (75 cm apart) and 25 cm between plants, with a plant density of 53,333 plants ha⁻¹. A factorial experiment was carried out in a split-plot arrangement. The spraying dates occupied main plots (beginning of the male flowering stage, 50% female flowering and completion of female flowering) and symbolized in sequence (D1, D2, and D3). In comparison, the iron concentrations (0, 100, 200 and 300 mg L⁻¹) were allocated to the sub-plots based on the randomized complete design with three replications and symbolized in sequence (Fe0, Fe1, Fe2 and Fe3). The experimental unit was 3×2 m with 4 furrows, and the total number of treatments was 12 and 36 experimental units. A distance of 2m was left between one block and 1 m between one treatment and another. Nano iron was prepared by dissolving (1) gm in (1) liter of water. The quantities of 100, 200, and 300 ml were withdrawn, and the solution was completed to (1) liter to prepare the above concentrations, and distilled water was used as a control treatment. The spraying was done in the early morning until the plants were completely saturated.

Studied traits:

- The ear length was computed using the average length of the ears from the middle furrow of ten plants, which were taken randomly from the experimental unit.
- Number of rows in ear: It was determined by averaging the number of rows of grains for the 10 ears of plants chosen randomly in the experimental unit.
- Number of grains in a row: It was estimated using the average number of grains in a row for the 10 ears of plants chosen at random from the experimental unit.
- The number of grains ear⁻¹: Calculated as an average of ten plants from the mid-furrow.

- Weight of 500 grain (gm): After years of harvesting, 500 grains from each experimental unit were combined and measured on a scale.
- Total grain yield (ton. ha⁻¹): extracted from the yield of individual plants yield x number of plants/hectare and weight-adjusted based on moisture of 15.5%¹⁰.

RESULTS

Ear length

The two spraying dates at the beginning of the male flowering stages (D1) and 50% of the female flowering (D2) were significantly superior, with the highest average ear lengths of 16.37 cm and 16.190 cm, respectively (Table 1). Meanwhile, for the lowest average length of the ear (15.70 cm) for the treatment (D3), there were no statistically significant changes between the two spraying treatments, D1 and D2. Early spraying may have given a greater opportunity to stimulate plant growth and increase the ear length. This result was confirmed by¹¹, who obtained a considerable increase in ear length after spraying the plant with nutrients at the start of ear development. The results showed that the increase in the concentrations of iron nanoparticles gave a gradual increase in the length of the ear after it was 13.53 cm when the control treatment reached the highest length of the ear at the concentrations 200 and 300 mg L⁻¹ with an average of 17.42 and 17.40 cm, respectively. The treatment (D1Fe2) showed that spraying nano iron with a concentration of 200 mg L⁻¹ on the first date gave the highest ear length of 18.30 cm.

Spraying dates	Fe (mg. L ⁻¹)				Mean (D)
	Fe ₀	Fe ₁	Fe ₂	Fe ₃	
D ₁	13.92	16.28	18.30	16.36	16.37
D ₂	13.67	16.40	17.28	18.05	16.19
D ₃	13.92	15.19	16.69	17.78	15.70
Mean	13.83	15.96	17.42	17.40	
LSD	D	Fe	Fe × D		
0.05	0.41	0.513	0.793		

Table 1. Effect of foliar nano-iron and particle application on ear length.

Number of rows in the ear

The first and second dates (D1 and D2) showed significant superiority in the number of rows for the ears (16.30 and 16.09 row ear⁻¹, although the average number of rows was lowest on the third date (D3), at 15.51 rows, ear⁻¹ (Table 2). Also, all iron concentrations outperformed the control treatment; the highest concentration of 300 mg L⁻¹ gave it the highest number of rows of 17.33 ear⁻¹. While there were no significant differences in the interaction of study factors.

Spraying dates	Fe (mg. L ⁻¹)				Mean (D)
	Fe ₀	Fe ₁	Fe ₂	Fe ₃	
D ₁	13.92	16.28	17.14	17.87	16.30
D ₂	13.67	16.40	16.92	17.36	16.09
D ₃	13.92	15.19	16.19	16.75	15.51
Mean	13.83	15.96	16.75	17.33	
LSD 0.05	D	Fe	Fe × D		
	0.41	0.48	NS		

Table 2. Effect of foliar nano-iron and particle application on number of rows per ear

Number of grains. Row⁻¹

There were no statistically significant differences between spraying dates and the interaction of study variables. While nano iron showed significant superiority in all its concentrations over the control treatment. The increase in iron concentrations was accompanied by an increase in the number of grains per row until it reached its highest average of 36.24 grain row⁻¹ at the nano iron concentration of 300 mg L⁻¹(Table 3).

Spraying dates	Fe (mg. L-1)				Mean (D)
	Fe ₀	Fe ₁	Fe ₂	Fe ₃	
D ₁	13.92	16.28	33.72	37.86	34.18
D ₂	13.67	16.40	34.59	35.43	32.88
D ₃	13.92	15.19	34.50	35.44	33.16
Mean (Fe)	13.83	15.96	34.27	36.24	
LSD 0.05	D	Fe	Fe × D		
	0.41	1.32	NS		

Table 3. Effect of foliar nano-iron and particle application on number of grains. Row⁻¹

Number of grains. Ear⁻¹

The first date of spraying produced the highest average amount of grains per ear (563.4 grain ear⁻¹), which was reduced when spraying was delayed until it reached the lowest average amount of grains per ear on the third spraying date (Table 4). The concentration of nano-iron 300 mg L⁻¹ gave the highest average number of grains (628.3 grains ear⁻¹) and showed a significant difference between the other concentrations and the control treatment, which produced the lowest mean of 408.7 grains.

Spraying dates	Fe (mg. L-1)				Mean (D)
	Fe ₀	Fe ₁	Fe ₂	Fe ₃	
D ₁	13.9	16.28	577.6	676.6	563.4
D ₂	13.6	16.40	584.7	614.9	535.4
D ₃	13.9	15.19	558.7	953.4	513.3
Mean	13.8	15.96	573.7	628.3	
LSD 0.05	D	Fe	Fe × D		
	0.41	24.0	NS		

Table 4. Effect of foliar nano-iron and particle application on number of grains. ear⁻¹.

Weight of 500 grain(gm)

The two dates (D1 and D2) gave the highest weight for 500 grains, 100.94 and 102.90 gm, respectively, with a significant difference from the third date, with the lowest average for grain weight of 93.27 g (Table 5). According to the findings, increasing the concentrations of iron nanoparticles resulted in a significant increase in the weight of 500 grains, after it was 93.23 gm for the control treatment, reached the highest weight at concentrations 200 and 300 mg L⁻¹ with an average of 103.09 and 101.02 gm, respectively. The findings show a significant interaction, and it seems that spraying 200 mg L⁻¹ in the first date (D1Fe2) produced the maximum value of grain weight (107.21 gm), which varied considerably from the treatment (D3Fe1), which produced the lowest rate of 84.00 gm.

Spraying dates	Fe (mg. L ⁻¹)				Mean (D)
	Fe ₀	Fe ₁	Fe ₂	Fe ₃	
D ₁	13.92	16.28	107.21	98.93	100.94
D ₂	13.67	16.40	102.35	106.25	102.90
D ₃	13.92	15.19	99.71	97.88	93.27
Mean	13.83	15.96	103.09	101.02	
LSD 0.05	D	Fe	Fe × D		
	0.41	3.95	6.15		

Table 5. Effect of foliar nano-iron and particle application on number of grains. ear⁻¹.

Total grain yield (ton. ha⁻¹)

The first spraying date was significantly superior, with the highest average total grain yield of 6.096 tons. ha⁻¹, compared to the other two dates, with the last date giving the lowest average grain yield of 5.130 tons. ha⁻¹. The findings indicate that increasing the concentrations of iron nanoparticles resulted in a significant increase in overall grain yield after 4.061 tons ha⁻¹ for the control treatment reached the highest grain yield at the concentration of 300 mg L⁻¹ with an average of 6.765 tons ha⁻¹. According to the statistically significant interaction between the two parameters, spraying at a concentration of 300 mg L⁻¹ on the first date resulted in the greatest value of grain production, which was 7.132 tons. ha⁻¹.

Spraying dates	Fe (mg. L ⁻¹)				Mean (D)
	Fe ₀	Fe ₁	Fe ₂	Fe ₃	
D ₁	13.92	16.28	6.61	7.13	6.10
D ₂	13.67	16.40	6.38	6.97	5.90
D ₃	13.92	15.19	5.94	6.20	5.13
Mean (Fe)	13.83	15.96	6.31	6.77	
LSD 0.05	D	Fe	Fe × D		
	0.41	0.33	0.60		

Table 6. Effect of foliar nano-iron and particle application on total grain yield (ton. ha⁻¹).

DISCUSSION

The addition of nano iron leads to an increase in the activity of photosynthesis processes by increasing the chlorophyll content in the leaves and increasing the ability of the crop to resist different stress conditions. As a result, there was an increase in the number of fertilized florets due to its indirect effect of increasing the size of the vegetative cover and the number of grains per row. This finding supports what Radwan et al. ¹² concluded in their study of the response of some types of hybrid maize to mineral and nano fertilization, through which they concluded that adding mineral fertilizer in the soil by foliar spraying of nano fertilizer recorded the highest values for the number of rows in the soil. The ear and number of grains in each row were compared to the control treatment. This increase was reflected in the number of grains in the ear. This superiority is attributed to the effect of iron on stimulating dormant flowers and aiding in fertilization, which led to the distribution of nutritional quantities on all grains equally, which led to a prolongation of the period of accumulation of dry matter in the seeds and giving them the highest average number of grains ¹³. The addition of nano iron led to an increase in the weight of 500 grains of maize, grain yield and dry weight of the plant, and this may be because the spraying is at the beginning of the male flowering stage and 50% of the female flowering, which is one of the critical stages in the life of the plant, and this raises the effectiveness. The plant is in the process of photosynthesis, which increases the efficiency of the source (leaves) towards the sink (seeds). This result is consistent with previous research ¹⁴, which indicated that the foliar application in the flowering and fruit formation stage increased the weight of 500 corn kernels. This superiority can be

attributed to the effect of nano iron, which has a high efficiency in targeting functional work centers by penetrating cell membranes and working on the synthesis of chlorophyll and promoting energy and its transfer, which helps in cell division, increasing the height of the plant and leaf area, increasing the amount of dry matter, and then increasing the weight of grains and yield—grain^{9,15}.

CONCLUSIONS

It is concluded from this study that spraying iron element at the beginning of the flowering stage is the best, which was directly reflected in improving the characteristics of the components of the yield, which led to an increase in the grain yield, confirming that this stage is one of the sensitive and essential stages of the crop. The great response of the maize crop to spraying with iron is noted, especially at the higher concentration used in the study, which indicates the possibility of the crop responding to higher concentrations of iron.

Author Contributions: The following statements should be used: "Conceptualization, Naeem Mutlag. and Saddam Jiyad.; methodology, Saddam Jiyad.; software, Mohammed Youssef.; validation, Naeem Mutlag., Mohammed Youssef. and A Mustafa.; formal analysis, A Mustafa.; investigation, Naeem Mutlag.; resources, Saddam Jiyad.; data curation, A Mustafa.; writing—original draft preparation, A Mustafa.; writing—review and editing, Naeem Mutlag.; visualization, Saddam Jiyad.; supervision, Naeem Mutlag.; project administration, Naeem Mutlag, Mohammed Youssef, A Mustafa, and anSaddam Jiyad; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study because the research was not applicable.

Informed Consent Statement: “Not applicable

Data Availability Statement: You might exclude this statement if the study did not report any data.

Acknowledgments: Agricultural Fields Administration Officer at the College of Agriculture - University of Baghdad.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

REFERENCES

1. Ibrahim, H. I. Mahmoud.; Plant samples collected and analyzed. First edition. Dar Al-Fajr for publication and distribution. Egypt, **2010**.
2. Gateal, A. A.; M, H. Hamza and A. K. Hussein.; Effect of Spraying Several Concentrations of Yungrin Leaf Fertilizer on the Growth and Yield of Three Cultivars of Maize (*Zea mays* L.). Annals of RSCB, **2021**; 25(4):11946 – 11955.
3. Martin, P.; Micro nutrient deficiency in Asia and the pacific Borax Europe limited. UK.AT. IFA. Regional Conference for Asia and the Pacific. Singapore. **2002**; November.18-20.
4. Jin, Z.; Wang, M.; Wu L.; Wu, J.; Shi, C.; Impacts of combination of foliar iron and boron application on iron biofortification and nutritional quality of rice grain. J. Plant Nutria. **2008**; 31(9): 1599-1611.
5. Meena, D. S. and B. N. Aravinda Kumar.; "Bio efficacy of nano zincsulphide (Zns) on growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus*l.) and nutrient status in the soil. Bioinfo Publication. **2017**; 9(6):3795-3798.
6. Kobayashi T, Nozoye T, Nishizawa NK. Iron transport and its regulation in plants. Free Radic Biol Med. **2019**; Mar;133:11-20. doi: 10.1016/j.freeradbiomed. 10.439. Epub **2018**; Oct 29. PMID: 30385345.

7. Singh, M.D.; G. Chirag, P. Prakash,; M.H. Mohan,; G. Prakasha and K. Vishwajith.; Nano-fertilizers is a new way to increase nutrients use efficiency in crop production. *Inter. J. of Agric. Sci.*, **2017**; 9(7): 3831– 3833.
8. Golshani, S.; Gholamalizadeh, A.; Mir, N., and Ghorbani, M. The effect of foliar application of iron sources on growth parameters, iron concentration and activity of some enzymes of sorghum. *J. of Water and Soil*, **2017**; 31(5). 10.22067/JSW.V31I5.64432.
9. Al-Shaheen, M. R.; Hamad, R. M.; Abdaly, M. M. A.; and Al-Rawi, O. H. Assessment the impact of iron nanoparticles and dry yeast extract on the corn (*Zea maize* L.). *J. of Physics: Conference Series*, **2020**;1535(1):012052). IOP Publishing.
10. Hamad, H.M., Shabeeb, Z.A., Awad, M.M. Expressions of CD274 (PD-L1) and CD47 rReceptors on the sSurface of bBlast cCells in AML pPatients (2022) *Iraqi Journal of Science*, 63 (6), pp. 2373-2387.
11. Al-Janabi, Y. A.; N. M. Abood.; M, I. Hamdan. The Effect of Amino Acids and The Date of Planting on Yield and Some Yield Components of Three Maize Varieties. *IOP Conference Series Earth and Environmental Sci.*, **2021**; 904(1):012066. doi: 10.1088/1755-1315/904/1/012066.
12. Alkhateeb, A. R. .; Ibrahim, W. .; Taha, A. A. . Correlation Between Udder Conformation With Daily Milk Yield Of Buffaloes. *JLSAR* 2021, 2, 61–65.
13. S. Jalal, B., M. Ahmed, K. Field Survey And Molecular Detection Of Viruses Associated With Squash Mosaic Disease In Erbil Provence. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 64-70. doi: 10.32649/ajas.2023.179716.
14. AL-Shumary, A. M.; Ali, H. A.; and AL Abdulla, S. A. effect of spraying concentrations of integrated nano-fertilizer on growth and yield of genotypes of corn (*Zea maize* L.). *Muthanna J. of Agric. Sci.*, **2019**; 7 (2): 114, 121.doi: 10.18081/MJAS/2019-7/114-121.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Mutlag, N. A.; Al-Rawi A.S.M.; El-Jubouri M.D.Y.; Cheyed, S. H. Response of maize grain yield and components to foliar iron nanoparticle application. *Revista Bionatura* 2023. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 70. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.70>

Publisher’s Note: Bionatura stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Isolation and Molecular Diagnosis of *Enterobacter cloacae* and *Kineococcus radiotolerans* from Red Clover nodules and evaluation of the prepared inoculum from them as a stimulator for plant growth

Shaimaa A. M. Ali^{1,*}, Abdulkareem E. S. Alkurtany², Muqdad Salih Jasim³, Abdullah Abdulkareem Hassan³

¹ Department of Food Sciences/ College of Agriculture/ Tikrit University/ Iraq;

² Department of Soil and Water Resources Sciences/ College of Agriculture/ Tikrit University/ Iraq; Alkurtany@tu.edu.iq. ORCID/0000-0001-6233-8566

³ Department of Plant Protection/ College of Agriculture/ Tikrit University/ Iraq; md@tu.edu.iq; drabdullah.has67@tu.edu.iq

* Correspondence: shaimaa@tu.edu.iq ; 096407729283329.
Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.71>

ABSTRACT

To obtain biological inoculum that promotes plant growth and contributes to a clean environment and sustainable agriculture, twentyone samples were collected from the root nodes of the red clover plant (*Trifolium paratens*) grown in gypsiferous soils at the Research Station of the Department of Soil Sciences and Water Resources - Faculty of Agriculture - University of Tikrit, samples were cultured in the medium of YEMA. Two isolates belonging to *Enterobacter cloacae* and *Kineococcus radiotolerans* were diagnosed phenotypically and molecularly. The diagnosis was confirmed by analyzing the nitrogen bases sequence of the DNA of the 16S rRNA gene. It was recorded in the National Center Biotechnology Information (NCBI) with the numbers MN310027.1 and KT216573.1 respectively, these isolates were activated and tested their efficiency as a bio-stimulant by testing their ability to dissolve insoluble phosphate compounds and produce indole acetic acid and chelating compounds, the results showed the ability of all isolates to produce indole acetic acid (IAA), chelating compounds, and solubility of phosphates, *E. cloacae* isolate outperformed *K. radiotolerans* isolates in these parameters, as it gave *E. cloacae* solubilization of phosphate and IAA production of 40.3 mg p L⁻¹ and 11.2 µg ml⁻¹ respectively, and it showed a high output of the chelating compounds compared to the treatment inoculated with *K. radiotolerans*, which gave 27.20 mg p L⁻¹ and 7.21 µg ml⁻¹, and medium production of iron chelating compounds, the results also showed the superiority of the inoculated treatments over the uninoculated treatments in the percentage of germination, the speed of germination, the length of tomato seedlings, the dry weight of the Shoot and root parts and the number of leaves, and the results showed the superiority of the inoculated treatment with *E. cloacae* significantly on *K. radiotolerans* isolate.

Keywords: *Enterobacter cloacae*; *Kineococcus radiotolerans*; Molecular Diagnosis; Bacterial inoculation; Eggplant seedlings.

INTRODUCTION

Producing healthy and robust seedlings of vegetable crops is the first pillar for obtaining early and high production, especially for crops that reproduce by seedling methods, such as eggplants, tomatoes and peppers, as this method provides an excellent opportunity for early production and economy in the number of seeds,

obtaining high production, and excluding diseased and weak seedlings¹. The problem in the production of vegetable crops is their dependence on chemicals (fertilizers, pesticides and hormones) to encourage their growth, increase production, and resist various pathogens. Therefore, the trend was to use natural, non-chemical, organic or biological environmentally friendly products that stimulate seed germination, encourage plant growth, increase resistance to diseases, reduce the use of chemical products, and contribute to a clean environment and sustainable agriculture; the result is healthy and robust seedlings that are the basis for high production and early vegetable crops^{2,3}. Many studies demonstrated the ability of plant growth-promoting rhizobacteria PGPR species to stimulate the growth of different crops and increase their yield and resistance to diseases through various mechanisms such as nitrogen fixation, solubilization of insoluble phosphorous and potassium compounds and the production of growth regulators such as IAA and chelating compounds through that stimulate and encourage plant growth^{4,5}.

Enterobacter cloacae is a bacterial genus that inhabits the Rhizosphere zone, in the crust and inside the root. The effectiveness of this bacteria can be utilized in the field of biofertilization and sustainable agriculture. It has been developed and counted among the best-studied genera of bacteria that encourage plant growth PGPR⁶. This bacterium encourages plant growth through various mechanisms, including nitrogen stabilization and the production of growth regulators such as Indol Acetic Acid (IAA), Cytokines, Gibberellins, and other amines. Thus, it helps to develop roots and to increase the absorption of water and nutrients by plants⁷. *K. radiotolerans* is a gram-positive, coccoid-shaped, motile organism isolated from a radioactive work area. It is an orange-pigmented bacterium that is catalase-positive, oxidase, and urease-negative; it can bear high levels of resistance to gamma-radiation⁸; the capabilities to produce secondary metabolites and enzymes for biotechnological and agricultural applications make it one of the most essential microbes among prokaryotes⁹. To produce healthy and active eggplant seedlings, this study evaluated the inoculum prepared from two local bacterial isolates in stimulating seed germination and encouraging the growth of eggplant seedlings.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Bacteria from root nodules

Twenty-one samples were collected from the root nodules of the red clover plant grown in gypsiferous soils at the Research Station of the Department of Soil Sciences and Water Resources - Faculty of Agriculture - University of Tikrit; the roots were thoroughly washed with water to get rid of the stuck dust, then the nodules were washed with water several times and then with 95% ethyl alcohol for 5-10 seconds, the nodules were immersed in 0.01% HgCl₂ for 2 minutes¹⁰, the nodules were transferred to sterile dishes and then pulverized with a small volume of sterile distilled water using glass rod to obtain a bacterial suspension, then 1 ml of bacterial suspension was planted on the medium of YEMA and then the dishes were incubated at a temperature of 28°C for 3 – 7 days^{11,12}.

Identification of Bacteria

Biochemical and Phenotypic Diagnosis

Phenotypical and microscopic tests were carried out that included colony shape, colony color, bacterial cell shape, and Gram stain, as well as some biochemical tests that involved the catalase, oxidase, and urea hydrolysis test¹³.

Genomic DNA Extraction

To extract genomic DNA, a swab of 100 mg was used from a newly grown pure colony (24 hours old). DNA was extracted using Kit type ZR Fungal / Bacteria / Yeast DNA Miniprep™ (Zymo Research, USA, block number 17045), and then the 16s RNA gene was doubled using the PCR polymerase chain reaction. With the use of 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 and 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3 primers, the primers were prepared by Integrated DNA Technologies Company (Canada), the polymerase chain reaction was carried out with a volume of 25 µl as follows: 1.5 µl DNA, 5 µl Taq PCR PreMix (Intron, Korea), 1 µl from each primer (10 picols), and then distilled water was added to complete the volume of 25µl. As for the reaction program, it included 40 cycles, and each cycle included the following: a) Initial Denaturation at a temperature

of 95°C for 5 min, b) Denaturation -2 at a temperature of 95°C for 45 sec, c) Annealing at 58°C for 45 sec. d) Extension-1 at 72°C for 45sec, e) Extension -2 at 72°C for 7 min.

A thermal polymerization device (PCR system, Gene Amp Applied Biosystem, 9700) was used in the replication process. The PCR product was separated using electrophoresis on a 1.5% agarose gel. Then, the bands were revealed using ultraviolet light (302nm) after staining with a red stain (Intron Korea)¹⁴.

Nucleotide Sequence and Congruence

The nucleotide sequencing process was carried out at the National Instrumentation Center for Environmental Management (http://nicem.snu.ac.kr/main/?en_skin=index.html) using a DNA sequencer (Applied Biosystem, DNA sequencer3730XL). To study the congruence of the resulting sequence of the genetic tree tag, the BLAST program available on the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the Mega X program were used. The comparison was made with the nucleotide sequences recorded in the genome bank. The isolates were recorded in the genome bank with the numbers *E. cloacae*-1103 and *K. radiotolerans*-1100, as a global number was recorded for each isolate.

Efficiency of bacterial isolates in dissolving phosphate and producing indole acetic acid and iron chelating compounds:

The efficiency of the isolates in dissolving phosphate according to the method shown by ¹⁵, producing indole acetic acid described by ¹⁶ and the production of iron chelating compounds¹⁷.

Steps for preparing the bacterial inoculum

Pure isolates of young bacterial culture 24 hours old *E. Cloacae* and *K. radiotolerans* were grown in 500 ml flasks containing 300 ml of nutrient broth liquid media. The cultures were incubated in a shaking incubator at 28° C at a speed of 100 cycles minute⁻¹ for 3-5 days; the numbers of bacterial cells were counted by dilution and plate counting to ensure that the bacterial number reached the threshold number of 10⁸ CFU.ml⁻¹ ¹⁸. Sterilize the seedling medium and adjust the pH by adding 5% calcium carbonate. Seedling dishes were filled with sterilized peat moss, and the eggplant seeds were sterilized by washing them well with water several times to remove the fumigated substance sticking to their surfaces and removing it entirely. Then, it was soaked in a solution of 0.01% HgCl₂ for 30 seconds to eliminate the organisms on their surfaces; then, it was washed well with water 3-4 times to remove the remaining traces of the sterile material. Eggplant seed variety Kamer was sown in seedling dishes by placing a seed in each hole; then, the seedling dishes were inoculated according to the treatments by injecting 3 ml of the inoculum into each hole around the seeds; the experiment was carried out in the greenhouse within the design of the randomized complete design (CRD) with three replicate to study the effect of inoculation with two local bacterial isolates in promoting the growth of eggplant seedlings (*Solanum melongena*).

Studied traits

The following traits were evaluated: germination percentage, germination speed, according to Kotowski (1969), dry root and vegetative weight (gm seedling-1), number of plant leaves (leaf. plant-1), and seedlings height.

RESULT

Biochemical and Phenotypic Diagnosis

Two isolates belonging to the genera *E. cloacae* and *K. radiotolerans* were diagnosed from the root nodules of red clover. Table (1) shows the phenotypic characteristics and some biochemical tests adopted in the diagnosis. The results showed that *E. cloacae* were negative for Gram stain and oxidase and Urea hydrolysis tests. At the same time, they were positive for the Catalase test, and their colonies appeared in a circular white color 13. As for *K. radiotolerans*, it was positive for the Gram stain and Catalase test and negative for both the Oxidase and Urea hydrolysis test. As for their colonies, their shapes vary according to the age of the

cell. When they are young, the colonies appear in a smooth and wet circular shape, but with time, they turn into rough and dry colonies that appear in an irregular mass ⁸.

Characters	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Kineococcus radiotolerans</i>
Colony morphology	Rounded colony- entire edge	Young colonies are moist, smooth and round but transition into a rough, dry, raised colony mass of irregular shape over prolonged incubation.
Pigmentation	White(yellowish)	Orange
Gram staining	Negative	Positive
Cells shape	Rod-shaped	Coccioid
Catalase	+	+
Oxidase	-	-
Urea hydrolysis	-	-

Table 1. Some morphological properties and biochemical tests of *Enterobacter cloacae* and *Kineococcus radiotolerans*.

Nucleotide Sequence and Congruence

Figure (1) shows the Phylogenetic tree that demonstrates the affinity of *E. cloacae* with global isolates recorded in the National Center for Biotechnology Information (NCBI). When comparing the genetic similarity with the nearest isolate, *E. cloacae* strain Xuyi_379_1, which carries the global number MN310027 from China, it shows that the similarity ratio reached 99.39, which indicates the accuracy of diagnosing bacteria recorded in this study with a genetic difference of 0.61%.

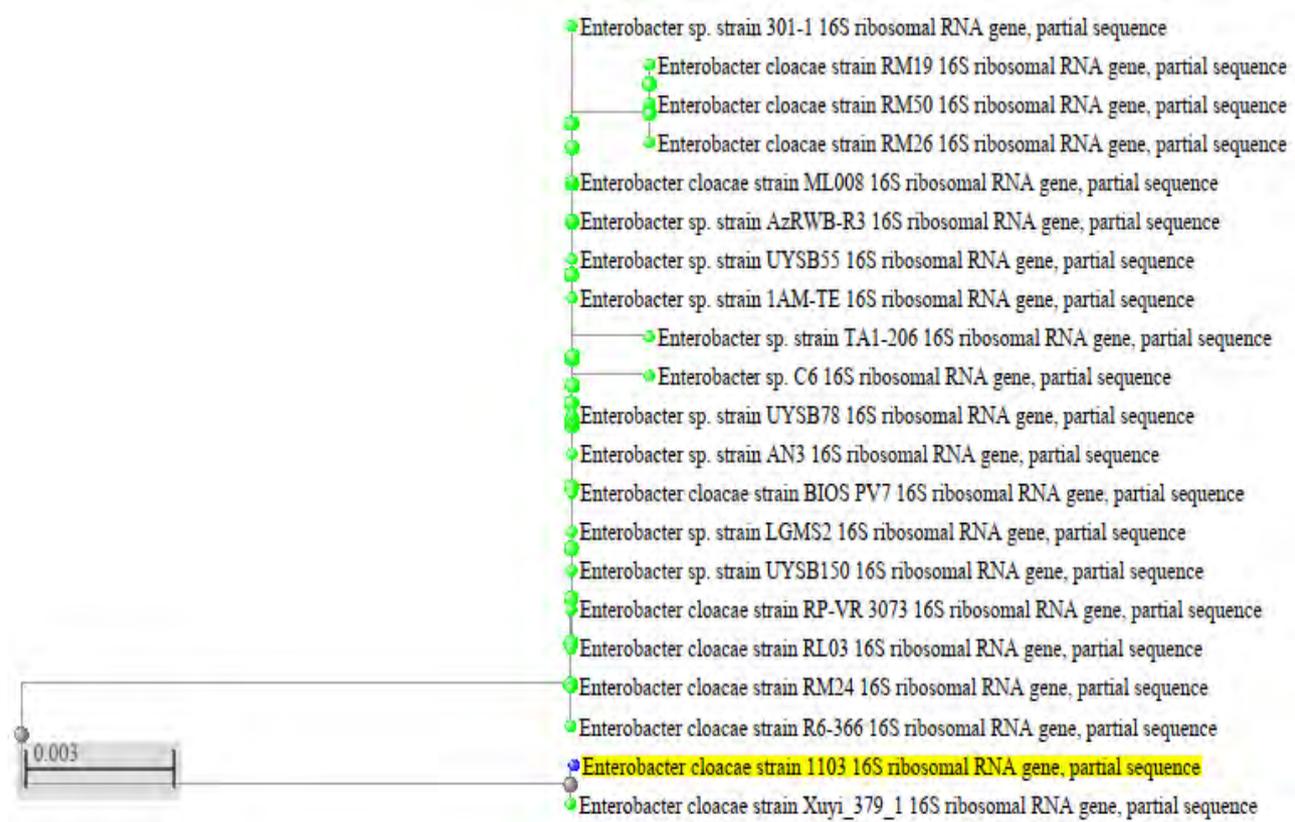


Figure 1. Genetic tree of *Enterobacter cloacae* isolate compared with world strain.

Figure (2) shows the genetic tree that demonstrates the affinity of *K. radiotolerans* bacteria with global isolates recorded in the National Center Biotechnology Information (NCBI) when comparing the genetic similarity with the nearest isolate, *K. radiotolerans* strain LAP2-29, which carries the global number KT216573.1 from Pakistan, it was found that the similarity ratio was 99.74%, which indicates the accuracy of the diagnosis of the bacteria recorded in this study with a genetic difference of 0.26%.

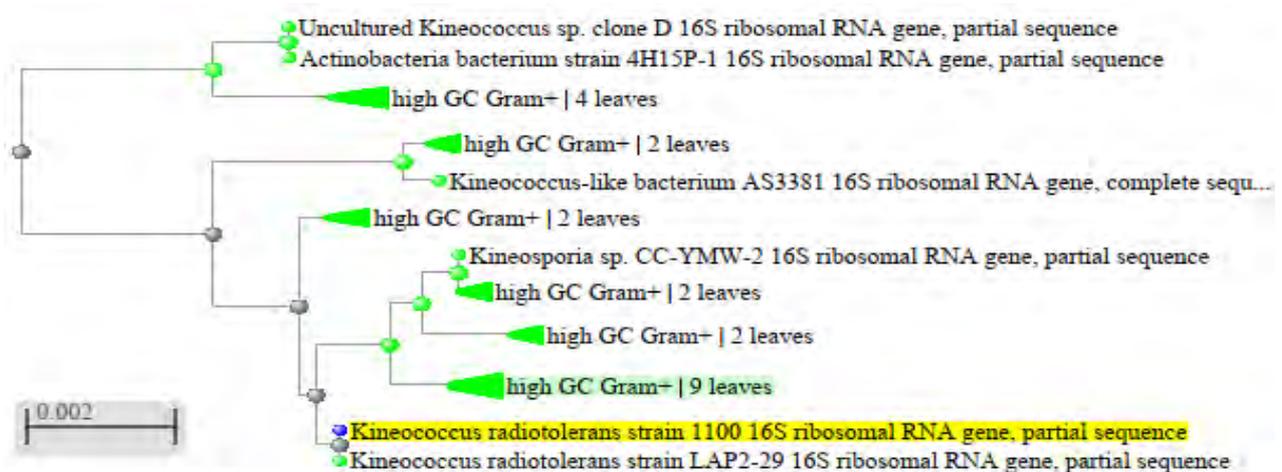


Figure 2. Genetic tree of *Kineococcus radiotolerans* isolates compared with world strain.

It is evident from Table (2) that all isolates could dissolve insoluble phosphate compounds. It appears from the Table that *E. cloacae* bacteria gave the highest solubility of phosphate at 40.3 mg p L⁻¹ and outperformed the rest of the isolates *K. radiotolerans*, which gave 27.20 mg p L⁻¹, as it appears from the results that the gram-negative treatments are superior to the gram-positive treatments in phosphorylation, it appears from the Table the ability of two isolates to produce indole acetic acid and chelating compounds. *E. cloacae* is superior to *K. radiotolerans*, as it gave an indole production rate of 11.2 µg ml⁻¹ compared to the value of 7.2 µg ml⁻¹ for *K. radiotolerans*.

Isolates	Indole Acetic Acid (IAA)µg.ml	Phosphate solubilizing (mg p L ⁻¹)	Iron chelating
<i>Enterobacter cloacae</i>	11.2	40.3	++
<i>Kineococcus radiotolerans</i>	7.21	27.20	++

Table 2. Efficiency of bacterial isolates in solubilizing phosphate, Indole Acetic Acid and iron chelating compound production.

Percentage and speed of germination of eggplant seeds

Table (3) shows the effect of inoculation with bacterial inoculum on the speed and rate of germination of eggplant seedlings. It is clear that inoculation of seedling growth medium with the prepared inoculum had a significant effect on the rate and the speed of germination, the superiority of the inoculated treatments over the uninoculated treatment was significant in the rate of germination and the speed of germination, the Table shows the superiority of the treatment inoculated with bacteria *E. cloacae* over the rest of the treatments in the rate of germination as it gave 68.75%. In comparison, the treatments inoculated with *K. radiotolerans* and Control were 63.30% and 62.20% respectively.

Treatments	Germination speed(day)	Germination percentage
Control	14.20	62.20 %
<i>E. cloacae</i>	13.81	68.75 %
<i>K. radiotolerans</i>	14.00	63.30%x
LSD 0.05	0.37	0.47

Table 3. Effect of inoculation with Bacterial inoculum in percentage and speed of germination of eggplant seeds (seedling/day).

Growth Traits

Table (4) shows that the inoculated treatments were significantly superior to the un-inoculated treatment in fresh and dry weight of the shoot and root system, it appears from the Table the superiority of the treatment inoculated with *E. cloacae* bacteria over the rest of the treatments in fresh and dry weight of the shoot and root system, as the treatment inoculated with *E. cloacae* bacteria gave the traits mentioned above 0.49 gm seedling

¹, 0.07 gm seedling⁻¹, 0.11 gm seedling⁻¹, 0.020 gm seedling⁻¹, respectively, compared with the uninoculated treatment which gave 0.28gm seedling⁻¹, 0.01 gm seedling⁻¹, 0.07gm seedling⁻¹, 0.001gm seedling⁻¹ respectively.

Treatments	Root dry weight	Root fresh weight	Vegetative dry weight	Vegetative fresh weight
Control	0.001	0.07	0.01	0.28
<i>E. cloacae</i>	0.020	0.11	0.07	0.49
<i>K. radiotolerans</i>	0.010	0.08	0.02	0.30
LSD 0.05	0.001	0.02	0.01	0.02

Table 4. Effect of inoculation with Bacterial inoculum in fresh and dry weight of vegetative and root parts of tomato seedlings (gm seedling⁻¹).

Table (5) shows that the inoculated treatments were significantly superior to the uninoculated treatment in plant height and number of leaves, it appears from the Table, the superiority of the treatment inoculated with *E. cloacae* bacteria over the rest of the treatments in plant height, number of leaves, as the treatment inoculated with *E. cloacae* bacteria gave the traits mentioned above 6.22 cm plant⁻¹, 4.25 leaf plant⁻¹ respectively, compared with the uninoculated treatment which gave 4.62 cm plant⁻¹, 3.25 leaf plant⁻¹ respectively.

Treatments	plant height(cm seedling ⁻¹)	number of leaves(leaf plant ⁻¹)
Control	4.62	3.25
<i>E. cloacae</i>	6.22	4.25
<i>K. radiotolerans</i>	5.77	4
L.S.D 0.05	0.19	0.24

Table 5. Effect of inoculation of Bacterial inoculum in seedling height (cm seedling⁻¹) and number of leaves (leaf plant⁻¹).

DISCUSSION

Phosphorus is the second necessary element after Nitrogen in terms of importance and quantity needed by the plant; this element is found in the form of insoluble organic and mineral compounds that are not available for plants. The ability of bacterial isolates to dissolve insoluble phosphate compounds may be due to the ability of these isolates to produce organic acids^{20, 21, 22}, as it appears from the results that the treatments inoculated with gram-negative bacteria were superior to the gram-positive treatments in phosphate solubilizing, this confirmed by^{23, 24}. The hormone indole acetic acid is one of the essential plant hormones. It directly affects growth, cell division, and root formation. It increases the length and density of the root system, Which leads to an increase in the surface area of the root absorption zone, which enables the root to reach the nutrients in the medium in which it grows²⁵. The difference in the amount of indole produced by different bacterial isolates can be attributed to the genetic variation of these isolates, as they belong to different species, which is reflected

in their biological properties, including their secretions in the growth medium. It was also evident from the results of Table 2 that all bacterial isolates are capable of producing chelating compounds because they were able to grow on an iron chelating medium and that the two isolates, *E. cloacae* and *K. radiotolerans*, showed medium susceptibility to iron chelation and gave medium growth on the medium, The difference in isolates in their production of chelating compounds is due to the variation in their genetic composition, which caused their difference in growth on the iron chelating medium, which is due to the difference in the amount of iron chelated from the medium²⁶. The reason for the superiority of treatments inoculated with bacterial isolates over non-inoculated ones in the percentage of eggplant seed germination and the speed of germination can be attributed to the encouraging mechanisms for seed germination possessed by the bacterial isolates, especially the production of the hormone indole acetic acid IAA (Table 1), and the role of indole acetic acid in stimulating germination of seeds, cell division and elongation, and an increase in the rate and speed of germination²⁷, as for the superiority of the treatment of inoculation with *E. cloacae* bacteria over the rest of the treatments, it is due to its high production of indole acetic acid, while the decrease in the rate and speed of germination when inoculated with *K. radiotolerans* bacteria is due to its low production of IAA (Table 1).

The superiority of treatments inoculated with bacterial isolates over non-inoculated treatments in seedling height, number of leaves, and the fresh and dry weight of the vegetative and root part of tomato seedlings could be due to all bacterial isolates possessing different mechanisms to encourage plant growth, such as dissolving insoluble phosphate compounds and producing indole acetic acid IAA And iron chelating compounds (Table 1), phosphorous plays a crucial role in many vital processes such as photosynthesis, respiration, energy transfer, and enters the formation of DNA and RNA.

The reason for the superiority of the inoculated treatments over the uninoculated in the studied growth traits can be attributed to the possession of these isolates to various stimulating mechanisms such as the response of phosphate compounds, the production of indole acetic acid IAA and chelating compounds as shown in Table (1). These results are consistent with what was found by^{28, 29}. The increase in seedling height, number of leaves, and fresh and dry weight of eggplant seedlings as a result of inoculation with the prepared inoculum from bacterial isolates may be due to the direct and indirect mechanisms possessed by these isolates to encourage plant growth (Table 1), which include the solubilizing of phosphate compounds, liberation of plant-ready phosphorous, and secretion of Stimulants to the medium such as IAA enhance the growth of running hairs and build a dense root system, which reflects positively on the process of absorbing nutrients from the growth medium, which is reflected in improving plant growth and increasing root and vegetative weight, both soft and dry³⁰, The increase in the studied growth characteristics of tomato seedlings can be attributed to the release of chelating compounds siderophores that contribute to the protection and protection of nutrients, especially iron, and making them available in the traction area and accessible for the plant²⁵.

CONCLUSIONS

We concluded from this study that the efficiency of *E. cloacae* and *K. radiotolerans* prepared inoculum encouraged the growth and production of eggplant seedlings. It also concludes the superiority of the inoculum prepared from *E. cloacae* bacteria over the *K. radiotolerans*. Thus, we recommend the adoption of this inoculum to produce robust, active, and healthy seedlings by relying on the biological inoculum, which will reduce high-cost chemical products and cause significant damage to the environment and human health.

Author Contributions: Formal analysis, Abdulkareem E. S. Alkurtany; investigation, Shaimaa A. M. Ali; resources, Abdullah Abdulkareem Hassan; data curation, Muqdad Salih Jasim; writing—original draft preparation, Shaimaa A. M. Ali; writing—review and editing, Muqdad Salih Jasim; visualization, Abdullah Abdulkareem Hassan; supervision, Abdulkareem E. S. Alkurtany; project administration, Shaimaa A. M. Ali; funding acquisition, Abdulkareem E. S. Alkurtany. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank the staff of the Soil and Water Resources Sciences Department, College of Agriculture, and the University of Tikrit for their support and advice in some parts of the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Radhi, Nasser Jubair and Hayder, Sadaq Jaafer. Effect of germination media and Agriculture pot diameter on growth parameters and yield of sweet pepper var. "California Wonder" grown in plastic house. *Kufa Journal of Agricultural Sciences*. (2011),3(2),36-42.
2. Ziena M.Abdul-Qader, Kareem M.Rabie and Huda S. Husni. Efficacy of Bio-fertilizer and Chemical Fertilization on Flavonoids Distribution in Different Plant Parts of *Stevia rebaudiana* (Bertoni.). *bionatura journal*. (2022),7(2/20).
3. Moustaine, M., Elkahkahi, R., Bebbouazza, A., benkirane, R. and Achbani E.H. Effect of Plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth in tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) and characterization for direct PGP abilities in Morocco. *International Journal of Environment Agriculture and Biotechnology*. (2017) ,2(2) ,590-596.
4. Alkurtany, A. E. S and H. K. N. Alwandawi. Evaluation of prepared inoculum from local isolates of *Pseudomonas* bacteria on growth traits of tomato plant in gypsiferous soil. *Global Proceedings Repository American Research Foundation. The 11th International Scientific Conference*.9-10 December. Istanbul. Turkey. (2017).
5. Khalil, Khalil Khalid and Abdul Kareem Eraibi Sabaa Alkurtany. Isolation and identification of *Pseudomonas* Bacteria Promoting plant Growth from Rhizosphere of some Plants Growth in Gypsiferous Soils in Salah-Aldin Governorate. *Journal of Tikrit University for Agriculture (JTUAS)* .(2018),18(1),124-136.
6. Khalifa, A. Y. Z., Alsyeeh, A. M. , Almalki, M. A. and Saleh,F. A.Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non- nodulating *Medicago sativa*. *Saudi J.Biol. Sci.*(2016). 23, 79-86.
7. Kumar, V., Jain, S. K., Chaturvedi, S.,Kaushal, P. Bacterial endophytes of rice (*Oryza sativa* L.) and their potential for plant growth promotion and antagonistic activities .*S. Afr. J. Bot.* (2020), 134: 50-63.
8. Phillips, R.W., J. Wiegel, C.J. Berry, C. Fliermans, A.D. Peacock, D.C. White, and L.J. Shimkets. *Kineococcus radiotolerans* sp. nov., a radiation resistant, Gram-positive bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2002), 52:933-938.
9. Salwan, R. and Sharma, VMolecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in Actinobacteria . *Microbiological Research*. (2020) , 231.
10. Somasegaran, P. and Hoben,H.J.*Handbook for rhizobia:methods in Legume- Rhizobium Technology*. Springer Science and Business Media, New York.(1994),450.
11. Naamala,j.,Jaiswal,S.K. and Dakora,F.D.Microsymbiont diversity and phylogeny of native bradyrhizobia associated with soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodulation in Soth African soils. *Syst. Appl. Microbiology*.(2016),39: 336-344.
12. Al-Rawi, K.F., Ali, H.H., Guma, M.A., Alaaraji, S.F.T., Awad, M.M.The Relationships of Interleukin-33, Ve-Cadherin and Other Physiological Parameters in Male Patients with Rheumatoid Arthritis (2022) *Pertanika Journal of Science and Technology*, 30 (1), pp. 123-140.
13. Collee, JG; Faser , A.G. Marmion ; BP and Simmons , A. *Practical Medical Microbiology*.14th ed.Churchill Livingstone. (1996) .

14. Miller, C.S., K.M. Handley, K.S. Wrighton, K.R. Frischkorn, B.C. Thomas and J.F. Banfield Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PloS one*. (2013),8(2):e56018.
15. Alkhateeb, A. ; Ibrahim, W. I.; Taha, A. E. . Body Conformation With Daily Milk Yield Relationship On Buffaloes. *JLSAR* 2022, 3, 1-5.
16. Patten, C.L. and Glick, B. R Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of host plant root system. *APP Environ. Microbiol.* (2002),48:3795-3801.
17. Payne, S. M. Synthesis and utilization of Sidrophores by *Shigella flexneri*. *J. Bacterial.* (1980), 143: 1420-1424.
18. Alkurtany, A. E. S., Mahdi, W. M. and Ali, S. A. M. The efficiency of prepared Biofertilizer from local isolate of *Bradyrhizobium* sp. on growth and yield of mungbean plant .*Iraqi Journal of Agricultural Sciences*. (2018),49(5):722-730. DOI:<http://doi.org/10.36103/ijas.v49i5.22>
19. Sh. Kader, J. Study The Effect Of Foliar Application Of Gibberellic Acid (Ga3) And Liquid Calcium On Growth And Fruit Quality Of Pomegranate Trees (*Punica Granatum L.*) Cv. Sawa. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 71-86. doi: 10.32649/ajas.2023.179717.
20. Nasr, S. H. , Mousa, M. A. and Marzouk, M. W. Yasser Quantitative and Qualitative Analysis of Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Fungi. *Egyptian Journal of Botany*. (2021), 61(1):167-176.
21. Satyaprakash M , Nikitha T, Reddi E U, Sadhana B and Satya Vani S. Phosphorous and phosphate solubilizing bacteria and their role in plant nutrition. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* (2017),6: 2133-2144.
22. Alkurtany A E S, Altai SHM and Al samarra NSH. phenotypic and molecular diagnosis of rhizobium bacteria isolated from vigna unguiculata plants grown in gypsiferous soils and testing their efficiency in producing indole acetic acid, chelating compounds and dissolving phosphates. *Biochem. Cell. Arch.* (2022),22(1):1979-1987.
23. Abdel Rahman, Salwa , Hoda, Yusef and Hassan Dhaini. Phosphate solubilization potential of Rhizosphere Soil Bacteria and their Possible Use as Biofertilizers. *Egyptian Journal of Botany*. (2021)61(2): 655-668.
24. Kalayu,G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers *Internal Journal of Agronomy*. (2019) 7,1-14.
25. Hayat R , Ahmed I and Sheirdil R A .An overview of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. In: Ashraf M, Oztürk M, Ahmad MSA, Aksoy A (eds) *Crop production for agricultural improvement*. Springer, Berlin. (2012), 557–579.
26. Khalil, KK and Alkurtany ES AbdulKareem. Isolation and identification of *Pseudomonas* Bacteria Promoting plant Growth from Rhizosphere of some Plants Growth in Gypsiferous Soils in Salah-Aldin Governorate. *Journal of Tikrit University for Agriculture Sciences(JTUAS)*. (2018), 18(1):124-136.
27. Kamble K D and Galero D K. Indolacetic acid production from *Pseudomonas* sp. Isolated from Rhizosphere of garden plants in Amaravati. *Int. Adv.Pharmacy Bio. Chem.* (2015),4(1):23-31.
28. Almaghabi, Omar A. , Massoud, Samia I. , Abdelmoneim, Tamer S. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse condition. *Saudi Journal of Biological Sciences.* (2013), 20, 57- 61.
29. Torrance L, Cowan GH, McLean K, MacFarlane S, Al-Abedy AN, Armstrong M, Lim TY, Hein I, Bryan GJ. Natural resistance to Potato virus Y in *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Theoretical and Applied Genetics*. 2020 Mar;133:967-80.
30. Verma JP, Yadav J, Tiwari K N. Enhancement of nodulation and yield of chickpea by co-inoculation of indigenous mesorhizobium spp. and Plant Growth–Promoting Rhizobacteria in Eastern Uttar Pradesh. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* (2012). 43: 605–621.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Ali S. A. M.; Alkurtany A. E. S.; Jasim M. S., Hassan A. A. Isolation and Molecular Diagnosis of *Enterobacter cloacae* and *Kineococcus radiotolerans* from Red Clover nodules and evaluate the prepared inoculum from them as a stimulator for plant growth. Revis Bionatura 2023;8 (4) 71.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.71>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Effect of spraying with silicon, humic acid, and proline on the safflower tolerance (*Carthamus tinctorius* L.) to salt stress

Qadesia Alabdulwahed¹*, Kadhim Huthily²

¹ Field Crops Department/ College of Agriculture/Al-Basrah University; qadesia.81@gmail.com; 0000-0003-2509-0180

² Field Crops Department/ College of Agriculture/Al-Basrah University; husam.alshawi.75@gmail.com

* Correspondence: husam.alshawi.75@gmail.com

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.72>

ABSTRACT

The experiment was carried out in the winter of season 2021-2022 in the research field of the College of Agriculture - University of Basra (latitude 30.57° North and longitude 47.80°) to study the effect of foliar spraying of silicon, humic acid, and proline on the endurance of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to salt stress. The experiment was carried out by distributing eight treatments of foliar spraying. Silicon (Si) was sprayed at a concentration of 800 ppm, humic acid (H) at a concentration of 80 ppm, and proline (P) at a concentration of 100 ppm. The studied treatments included control (C), Si, H, P, SiH, SiP, HP, and SiHP) on two soils with salinity (7.63 and 14.24 ds m⁻¹) randomized complete block design with three replicates. The seeds of safflower (Cv. Gila) were planted in the two soils. The results showed significant superiority of the triple treatment (SiHP) in all studied traits, as it recorded the highest mean of height (156.3 cm), number of bells in the plant 59.11, number of seeds in the bell (59.17), weight of 500 seeds (24.30 g), seeds yield (10549 kg seeds ha⁻¹) and biological yield (27582 kg ha⁻¹) with a significant increase over the control treatment, which amounted to 64.2 cm, 26.08 bell plant⁻¹, 24.90 seed bell⁻¹, 14.03 g, 1725 kg seeds ha⁻¹ and 6594 kg.ha⁻¹ respectively—superiority of the proline treatment in all studied traits. Salinity decreased the number of seeds in the plant, the weight of 500 seeds, and seed yield. The foliar spray with the above treatments has proven its effectiveness and efficiency in growth and yield and increased salinity tolerance, in addition to the fact that these materials are environmentally friendly.

Keywords: Foliar Spraying; Salinity; Silicon; Humic acid; proline.

INTRODUCTION

Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) is a multi-use crop; it can grow in arid and semi-arid environments because of its tolerance to drought stress, salinity, and lower and higher temperatures¹. Salinity is considered one of the significant abiotic stresses affecting crop production. Approximately 50% of farmlands and 20% of the world's agricultural land are salt-affected². Salinity inhibits crop growth and productivity via limiting photosynthesis and energy conservation imbalance³. Salinity causes an increase in the osmotic pressure of the soil solution, toxicity to some ions, especially sodium and chloride, or an imbalance of ions inside the plant.

The attempt to increase the yield of the safflower crop and its tolerance to salt stress can be achieved through the use of nutrients that are not harmful to the environment, such as the use of silicon, which⁴ indicated its role in reducing the harmful effects of salinity and drought and in improving the efficiency of photosynthesis. Several studies have suggested positive growth effects of silicon nutrition, increased biomass, yield, and pollination⁵. Humic acid, which is a biostimulant, can also be used as it increases the plant's ability to grow and photosynthesize by enhancing the absorption of water and nutrients from the soil^{6,7}. It was also found that spraying proline on plants enhanced growth with increased biomass and improved photosynthesis, which occurred under saline stress conditions, due to the positive role that proline plays by reducing the absorption of sodium and chlorine ions and enhancing potassium ion absorption⁸. Foliar spraying is preferred because soil salinity affects the absorption of water and nutrients from the soil⁹. Since the soils of central and southern Iraq have high concentrations of salts that make them unsuitable for the cultivation of many field crops, and for the lack of studies in the southern region on the effect of spraying with silicon, humic acid, and proline on the growth and yield of safflower under those conditions, the aim or target.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out in the research field of the College of Agriculture - University of Basrah / Karma Ali site (latitude 30.57° N and longitude 80.47 °) in the winter of the 2021-2022 study. The first factor included spray solutions with silicon (800 ppm), humic acid (80 ppm), and proline (100 ppm), and the second factor included two soils that differ in their salinity on the tolerance of safflower (Cv. Gila) to saline stress. Eight single and combination treatments were used as foliar applications, including control (C), silicon (Si), humic acid (H), proline (P), silicon +, humic acid (SiH), silicon + proline (SiP), humic acid + proline (HP) and silicon + humic acid + proline (SiHP) and two soils the first with salinity 7.63 ds m⁻¹ (S1) and the second with salinity 14.24 ds m⁻¹ (S2) the experiment was applied using a randomized complete block design (RCBD) with three replicates (blocks), each block includes eight spray treatments with 24 experimental units for the first soil and 24 experimental units for the second soil. After the soil was prepared by plowing, smoothing and modifying, random samples were taken from different field areas to estimate some physical and chemical properties (as shown in Table 1).

Properties	pH	ECe	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ⁼	N	P	K
1 st soil	7.44	7.63	20.3	17.8	46.5	4.2	49.3	28.1	53.3	5.2	122.3
2 nd soil	7.58	14.24	32.4	33.8.	85.7	6.3	104.3	37.5	55.4	5.4	143.3
			Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ⁼	N	P	K
			20.3	17.8	46.5	4.2	49.3	28.1	53.3	5.2	122.3
Unit		ds m ⁻¹	Meq l ⁻¹								

Table 1. Some Chemical and Physical Properties of Soil.

Each experimental unit had dimensions of 3 * 2.4 meters, containing four lines with a length of 3 meters; the distance between one line and another was 0.6 m. and 0.25 m within. The seeds were planted on 5/11/2021, and one plant was left in each hole. Fertilizers were added equivalent to 240 kg N ha⁻¹ (in two batches) with 60 kg P ha⁻¹ and 120 kg K ha⁻¹. The eight treatments used were sprayed in three stages; after 40, 70, and 100 days of planting, 10 plants were selected from each experiment to study the different traits. The data were analyzed using the SPSS program ver. 23, and the least significant difference (LSD P<0.05) to compare the means.

RESULTS

Plant height

The analysis of variance (Table 8) and the results of Table (2) showed that all spraying treatments, whether single, double, or triple, had a positive and significant effect and led to an increase in plant height compared to the control. The highest height for the safflower plants (156.3 cm) was recorded using the SiHP treatment with an increase of 143.5 % compared to the control, which recorded the lowest value (64.2 cm.). The data in Table 2 and analysis of variance (Table 8) indicate no significant effect of salinity on plant height, perhaps because the plant height values were calculated as an average of all effects resulting from adding the studied treatments that weakened and reduced the effect of salinity. The interaction between spraying treatments and salinity treatments significantly affected plant height. SiHP treatment in non-saline and saline soil recorded the highest height, reaching 154.7 and 157.9 cm. respectively.

Treatments	C	Si	H	P	SiH	SiP	HP	SiHP	Mean
S1	75.4	99.8	100.6	111.0	116.4	129.0	137.1	154.7	115.5
S2	52.9	86.9	91.3	118.3	124.6	146.4	148.0	157.9	115.8
Mean	64.2	93.4	96.0	114.7	120.5	137.7	142.6	156.3	
L.S.D (P<0.05)	Treatments 8.5			Salinity NS.			Interaction 12.03		

Table 2. Effect of spraying solutions (silicon, humic acid and proline) and salinity and their interaction on the plant height (cm.)

Number of bells

The results of the first factor in Table 3 indicate the significant effect of spraying combination SiHP, as it recorded the highest average number of bells per plant, reaching 59.11 bell plant⁻¹, with an increase of 126.64% compared to the lowest average recorded in the control treatment, which gave 26.08 bell plant⁻¹. As for the binary treatments SiH, SiP and HP, it is noticeable that they significantly outperformed the control treatment with an increase of 92%, 106.86% and 112.54%, respectively. No significant difference was observed between the SiP and HP treatments, but they were significantly superior to the SiH treatment. The results of the first factor showed a significant superiority of the single treatment average P compared with the averages of silicon and humic acid, with an increase of 12.26% and 31%, respectively. Table 3 shows a significant difference between treatment S1 and treatment S2, with an increase of 11.50%.

The interaction between spraying the three substances and salinity significantly affected the number of bells per plant, and the treatment SiHP in S1 soil gave the most significant number of bells in the plant, reaching 62.30 bell plant⁻¹.

Treatments	C	Si	H	P	SiH	SiP	HP	SiHP	Mean
S1	31.57	47.43	44.53	53.53	51.00	55.03	56.47	62.30	50.23
S2	20.60	40.97	35.27	51.00	49.33	52.87	54.40	55.93	45.05
Mean	26.08	44.20	39.90	52.27	50.17	53.95	55.43	59.11	————
L.S.D (P<0.05)	Treatments 2.74			Salinity 1.11			Interaction 3.88		————

Table 3. Effect of spraying solutions (silicon, humic acid and proline) and salinity and their interaction on several bells in the plant.

Number of seeds in bell

The results of Table 4 indicate the significant effect of spraying silicon, humic acid, and proline or their interaction on the number of seeds in the plant, which led to an increase compared to the control. The number of seeds in the bell recorded using the SiHP treatment reached 59.17 seed bell-1, with a rise of 137.63% compared to the control, which gave the lowest value of 24.90 seed bell-1. The increase in the rest of the treatments ranged from 59.84% by spraying humic acid to 105.46% by using humic acid + proline.

It is also noted from Table 4 that the increase in soil salinity (S2) led to a decrease in the number of seeds per bell to 41.67 compared to 47.45 seeds per bell at soil S1, with a reduction of 18%.

The interaction between spraying the three substances and salinity significantly affected the number of seeds per bell, and the treatment SiHP in S1 soil gave the most significant number of seeds in the bell, reaching 62.33.

Treatments	C	Si	H	P	SiH	SiP	HP	SiHP	Mean
S1	992.2	2011.0	2072.2	2555.2	2376.6	2770.0	2951.4	3883.4	2383.4
S2	378.2	1461.2	1166.2	2371.8	2402.5	2375.3	2723.6	3132.3	1877.2
Mean	649.4	1725.1	1588.0	2463.5	2390.6	2569.6	2835.8	3497.5	
L.S.D (P<0.05)	Treatments 175.7			Salinity 87.9			Interaction 248.5		

Table 4. Effect of spraying solutions (silicon, humic acid and proline) and salinity and their interaction on seed number in bell.

Weight of 500 seed

The statistical analysis results (Table 8) showed the significant effect of spraying silicon, humic acid, or proline (individually or mixing them) in increasing the weight of 500 seeds. The data in Table (5) showed that all spraying treatments led to an increase in seed weight compared to the control; the SiHP treatment recorded the highest weight of 500 seeds, reaching 24.3 gm with a significant increase of 73 % over the control, which gave 14.03 gm. As for the rest of the treatments, it led to an increase in weight, and the percentage of increase was between 32% when spraying humic acid and 53% when spraying HP.

Other results in Table 5 indicate a significant decrease in seed weight by 5.2% due to the high salinity (S2) level, where the treatment recorded 19.34 g per 500 seeds. At the same time, it was 20.40 g in the S1 interaction.

Treatments	C	Si	H	P	SiH	SiP	HP	SiHP	Mean
S1	14.90	20.33	20.13	21.37	20.23	21.07	20.77	24.40	20.40
S2	13.17	17.60	16.90	20.13	19.93	20.70	22.10	24.20	19.34
Mean	14.03	18.97	18.52	20.75	20.08	20.88	21.43	24.30	
L.S.D (P<0.05)	Treatments 1.28			Salinity 0.64			Interaction NS.		

Table 5. Effect of spraying solutions (silicon, humic acid and proline) and salinity and their interaction on the weight of 500 seeds.

Seeds yield

The results of the analysis of variance (Table 8) explained the significant effect of spraying silicon or humic acid or proline (individually or mixing them) in increasing the seed yield. The results in Table 6 showed the superiority of the SiHP treatment in recording the highest seed yield per unit area, amounting to 10549 kg seeds ha⁻¹ with a significant increase that reached more than five times the yield recorded in the control (which gave 1725 kg seeds ha⁻¹). As for the other treatments, a significant increase was recorded compared to the control.

From the results, the single factor most influential in increasing the yield was the proline spray, which recorded 7254 kg. ha⁻¹, followed by the silicon treatment. In general, the double mixtures gave a higher yield than spraying the agents individually, especially in HP treatments, which recorded a yield of 8213 kg. ha⁻¹. As for the effect of soil salinity, there was a significant decrease in seed yield by 23.8% for saline soil (S2), which gave 5522.3 kg. ha⁻¹ compared to 7248.4 kg. ha⁻¹ for non-saline soil (S1). The interaction between spraying treatments and soil salinity significantly affected the seed yield, and the treatment SiHP planted in non-saline soil recorded the most outstanding seed yield of 13302 kg. ha⁻¹, with a significant difference from all other interactions. The results recorded here are a summation and a reflection of the results recorded for the number of seeds per plant, the weight of 500 seeds, and the different effects produced by the studied treatments.

Treatments	C	Si	H	P	SiH	SiP	HP	SiHP	Mean
S1	2523	5712	5028	7700	7251	7842	8626	13302	7248
S2	927	3776	2951	6808	6899	7217	7801	7796	5522
Mean	1725	4744	3990	7254	7075	7529	8213	10549	
L.S.D (P<0.05)	Treatments 932.7			Salinity 466.4			Interaction 1319.1		

Table 6. Effect of spraying solutions (silicon, humic acid, and proline) and salinity and their interaction of seed yield (kg. ha-1).

Biological yield

The results of the statistical analysis in Table 8 indicate that the spraying materials, whether single, double or triple, had a significant and positive effect and led to an increase in the biological yield compared to the control treatment. It is noted from the data in Table 7 that the triple spray (SiHP) recorded the highest biological yield of 27582 kg. ha⁻¹ significantly increased more than three times compared to the control treatment, which gave 6594 kg. ha⁻¹. Regarding the effect of individual factors, proline spraying was the most

effective in increasing the biological yield, which gave 16413 kg. ha⁻¹ with an increase of 149% compared to the control, followed by silicon (12541 kg. ha⁻¹) and then humic acid (10783 kg. ha⁻¹). As for the dual spraying, the treatment HP recorded a biological yield of 20468 kg. ha⁻¹. Soil salinity did not affect the biological yield of safflower, perhaps because it did not affect plant height (Table 2).

The interaction between spraying treatments and soil salinity significantly affected the biological yield, and the therapy SiHP planted in non-saline soil recorded the most significant biological yield of 29702 kg. ha⁻¹, with a significant difference from all other interactions.

The factors that affect growth characteristics, including plant height yield, will impact the biological yield.

Treatments	C	Si	H	P	SiH	SiP	HP	SiHP	Mean
S1	9261	13371	11862	17012	17567	18179	19945	29702	17112
S2	3928	11712	5970	15813	19350	20734	20990	22546	15962
Mean	6594	12541	10783	16413	18459	19456	20468	27582	
L.S.D (P<0.05)	Treatments 2136.9			Salinity NS.			Interaction 3022.0		

Table 7. Effect of spraying solutions (silicon, humic acid, and proline) and salinity and their interaction on biological yield (kg. ha⁻¹).

S.O.V	d.f	Plant height	No. bells plant ⁻¹	No. seeds plant ⁻¹	Weight of 500 seeds	Seeds yield	Biological yield
Block	2	25.45	1.00	9642.4	3.21	3323351.4	2864071.6
T	7	5510.90**	682.70**	4459360.1**	51.97**	45747158.8**	255080041.4**
S	1	1.08	322.92**	2431305.1**	13.44**	35754090.2**	15882652.5
T*S	7	280.39**	19.58*	146890.1**	3.33	4088217.2**	11884165.8*
Error	30	75.39	7.83	32159.2	1.70	906285.0	4756811.5

Table 8. Analysis of variance represented by mean square for the studied traits.

DISCUSSION

Even in saline soils, the effect of spraying silicon, humic acid, and proline was evident in increasing the plant's tolerance to salt stress, as an increase in plant height was observed with the spraying of these substances. This result is consistent with what ¹⁰ observed regarding the effect of silicon on the height of safflower plants. Silicon plays an essential role in many vital processes within the plant, the most important of which is improving photosynthesis efficiency, increasing the roots' effectiveness in absorbing water and nutrients, and increasing its tolerance to biotic and abiotic stress conditions ^{5, 13}. Also, humic acid, a biostimulant, can increase the plant's ability to grow and photosynthesize by enhancing water absorption and nutrients from the soil ⁷. The most significant effect of proline, which works on the osmotic balance during stress, is that it improves the activity of red antioxidants, reduces the absorption of sodium and chlorine ions, and enhances potassium absorption ⁸. The number of bells per plant decreased when the salt concentration in the soil increased. This, of course, comes from the negative impact of salinity, whether in reducing the rate of absorption of water and

nutrients from the soil or from the nutritional imbalance within the plant, as well as the negative impact of salinity on many physiological processes, that salinity hinders protein synthesis and metabolism and causes oxidative stress (ROS) that leads to oxidation of fats and proteins¹¹. The number of seeds in the bell is due to the role of the studied factors in increasing the content of chlorophyll and the rate of photosynthesis, changing the behavior of stomata and reducing the rate of transpiration in leaves, which means an increase in the efficiency of photosynthesis in the different stages of growth, leading to flowering, to the stage of flowering and seed formation, and the transfer of the products of the photosynthesis process to the seeds with greater efficiency.

The most important observation is that spraying the above materials helped increase the seed's weight, even in saline soils, in proportions similar to those in non-saline soils. Proline, an amino acid, plays an essential role in plants. It protects the plants from various stresses and helps them recover more rapidly. Silicon plays a vital role in many biological processes within the plant, the most important of which is improving photosynthesis efficiency, increasing roots' effectiveness in absorbing water and nutrients, and increasing its tolerance to biotic and abiotic stress conditions^{12, 14}. Proline, an amino acid, is highly beneficial in plants exposed to various stress conditions. Besides acting as an excellent osmolyte, proline plays three significant roles during stress, i.e., as a metal chelator, an antioxidative defense molecule and a signaling molecule^{15, 16}.

CONCLUSIONS

Based on what the results of the study gave of the beneficial effect of foliar spraying with silicon, humic acid and proline in promoting growth and seed yield under saline stress conditions, even with a high salt concentration in the soil, it was recommended to use the combination (SiHP) in safflower productivity. More studies can be conducted on other plants to confirm the results obtained.

Author Contributions: Formal analysis, Kadhim Huthily.; investigation, Kadhim Huthily.; resources, Qadesia Alabdulwahed.; data curation, Qadesia Alabdulwahed.; writing—original draft preparation, Qadesia Alabdulwahed.; writing—review and editing, Qadesia Alabdulwahed.; visualization, Qadesia Alabdulwahed.; Kadhim Huthily.; supervision, Kadhim Huthily.; project administration, Qadesia Alabdulwahed.; funding acquisition, Qadesia Alabdulwahed. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors thank the staff of the Field Crops Department, College of Agriculture, and the University of Basrah for their support and advice in some parts of the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1-Zanetti, F., Angelini, L. G., Berzuini, S., Foschi, L., Clemente, C., Ferioli, F., Tavarini, S. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) a winter multipurpose oilseed crop for the Mediterranean region: Lesson learned from on-farm trials. *Ind. Crops Prod* **2022**, 184, 115042.

- 2-**Munns, R, Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **2008**, 59:651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>.
- 3-**Zhu, J. K. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* **2016**, 167:313–324.
- 4-**Ahmadi, K., Shojaeeyan, A., Omidi, H., Amini Dehaghi, M., Azadbakht, F. The effect of salicylic acid, and potassium nitrate on germination characteristics, photosynthetic pigments and seedling proline seedlings of two safflower cultivars under salinity stress. *Env. Stresses Crop Sci* **2020**, 15(1), 247-257. doi: 10.22077/escs.2020.3593.1882.
- 5-**Korndörfer, G. H.; Lepsch, I. Effect of silicon on plant growth and crop yield. In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndorfer GH (eds) silicon in agriculture. *plant sci. Elsevier, Amsterdam* **2001**, pp 133–147.
- 6-**Nabi, H. A. A., Obaid, A. K. Effect of Humic Acid on Some growth Characteristics and Green Yield of Two Hybrids of Broad bean (*Vicia faba* L.). *Basrah J. Agric. Sci* **2019**, 32, 256-261.
- 7-**Heydari, M., Moghadam, H. R. T., Ghooshchi, F., Modarres-Sanavy, S. A. M., Kasraie, P. Foliar Application of Humic Acid and Some Exo-and Endophytic Growth Hormones on Yield, Yield Components and Fatty Acid Composition in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under Drought Stress. *J. Agric. Sci* **2021**, 27(4), 500-508.
- 8-**El Moukhtari, A., Cabassa-Hourton, C., Farissi, M., Savouré, A. How does proline treatment promote salt stress tolerance during crop plant development? *Front. Plant. Sci* **2020**, 11, 1127.
- 9-**Hajihashemi, S., Skalicky, M., Brestic, M., Pavla, V., Cross talk between nitric oxide, hydrogen peroxide and calcium in salt-stressed *Chenopodium quinoa* Willd. At seed germination stage. *Plant Physiol. Biochem* **2020**, 154, 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.022>.
- 10-**Amiri A., Bagheri A., Khajeh M., Najafabadi Pour F., Yadollahi P. Effect of silicone foliar application on yield and antioxidant enzymes activity of safflower under limited irrigation conditions. *J. Crop prod. Reas* **2014**, 5(4):361- 372.
- 11-** Alaaraji, S.F.T., Mohisen, M.A., Awad, M.M. Assessment serum levels of neopterin, IL-6, IL-1 β , hs-CRP, TNF- α and MMP 9 in iraqi rheumatoid arthritis patients (2020) *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11 (12), pp. 88-93.
- 12-**Meena, V. D.; M. L. Dotaniya; Vassanda Coumar; S. Rajendiran; Ajay; S. Kundu , A. subba Rao. A case for silicon fertilization to improve crop yields in tropical soils. *Proc. Natl Acad. Sci, India Section B: Biological Sci* **2014**, 84(3):505-518.
- 13-** Sahib, A. A.; Hussein, K. O.; Hameed, D. M. .; Salih, E.; Kareem, H. . Diffuse Anxiety Syndrome In Those With Stomach Ulcers In Samawa City’s. *JLSAR* **2022**, 3, 6-11.
- 14-**Hassan, H. H., Huthily, K. H., Mohsen, K. H. Effect of Humic Acid and Silicon on some Growth Characteristics of Maize (*Zea mays* L.). *Basrah J. Agric. Sci* **2019** , 32(2), 23–32. <https://doi.org/10.37077/25200860.2019.190>
- 15-**Hayat, S.; Q. Hayat; M. N. Alyemeni, A. S. Wani; J. Pichtel , A. Ahmad. Role of proline under changing environments. *Plant Signal. Behav* **2012**, 7(11):1456-66
- 16-**Rady, M., Kusvuran, A., Alharby, H. F., Alzahrani, Y., Kusvuran, S. Pretreatment with proline or an organic bio-stimulant induces salt tolerance in wheat plants by improving antioxidant redox state and enzymatic activities and reducing the Oxidative stress. *J. Plant Growth Regul* **2019** , 38, 449–462.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Alabdulwahed, Q.; Huthily, H. Effect of spraying with silicon, humic acid, and proline on the safflower tolerance (*Carthamus tinctorius* L.) to salt stress. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 72.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.72>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Study the difference in a carcass and the relative weight of the Molar, White Pekin and Brown Iraqi local duck carcass parts.

Salah Gatea¹, Salam Altaie², Nihad Nafel^{3,*}, Thamer ALjanabi⁴, Sura Khafaji⁵

¹ Department of Animal Production/ Agriculture College/ Kerbala University/ Iraq; Email: salah.katia@uokerbala.edu.iq.

² Department of Animal Production/ Agriculture College/ Kerbala University/ Iraq; Email: salam.abood@uokerbala.edu.iq.

³ Department of Animal Production/ Agriculture College/ Kerbala University/ Iraq

⁴ Department of Animal Production/ Agriculture College/ Kerbala University/ Iraq. Email: dr.thamer.kudir@uokerbala.edu.iq.

⁵ Department of Animal Production/ Veterinary Medicine College/ AL-Qasim Green University/ Iraq; Email: sura.saif@uokerbala.edu.iq.

* Correspondence: : nihad.m@uokerbala.edu.iq.

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.73>

ABSTRACT

The existing experiment was intended to explore differences among three breeds of duck, Molar, White Pekin, and Brown Iraqi local duck, in carcass traits and some organs. Thirty ducks (n= 10 of each breed) were reared at age 2 months in an open scheme for 8 weeks. At the end of this period, before and after slaughter, the weight of all ducks had taken. The carcass, thighs, back and neck, wings, and breast were estimated by balance. Then, some slaughter organs, heart, liver, and gizzard were weighed. The statistical analysis of current data showed a significant ($P \leq 0.05$) raising in live body weight (LBW) in molar ducks compared with other breed ducks. On the other hand, the results of carcass traits recorded a significant ($P < 0.05$) increment in wings percentage in molar ducks compared with White Pekin and Brown Iraqi local ducks. Also, the statistical examination verified a significant ($P < 0.05$) increment in heart and gizzard percentages in molar ducks compared to other breeds. The regression equations were also verified for determining live body weight by slaughter traits in three breed ducks. Concluded that there are differences among Molar, Pekin, and Brown Iraqi local ducks in live body weight and carcass weight, as well as weights of some organs; also improved significantly in Molar ducks comparison with White Pekin and Brown Iraqi local ducks.

Keywords: Ducks; slaughter; breed.

INTRODUCTION

Domesticated ducks include all kinds and are an essential source of high protein quality in human consumption¹. The Molar duck is a wild bird belonging to the species of domesticated ducks and has become one of the most critical and widespread bird species in the world, especially in Europe. However, its origin remains vague. It is one of the essential duck species, considered an environmentally and economically significant bird for wild bird species, and has a high capacity to grow². Duck meat is an important source the broad nutrition of the world's population because it has a high content of nutrients, compared to chicken meat; if duck meat contains a high percentage of the protein and mineral elements, a small percentage of fat, and a high content of reds muscles fiber in the chest meat³ and a high content of fatty acids and amino acids available to build

body cells⁴. Duck meat with the best production of white bikini ducks in Asia and northern Europe, the least of which is the production of Muscovy duck meat and generators in France and Italy⁵. Meat-producing duck strains are, among them, fast-growing breeds to match genetic selection, optimal breeding system, high nutrient attics, high nutritional conversion efficiency, and high growth rate during breeding⁶, White Pekin ducks and Muscovy with the highest growth rate between ages 6 and 8 weeks, which is the fastest growth rate and a weight rate of approximately 3.5 kg⁷. The current production of duck meats has become a concentrated business in recent decades. The production system is compatible with the development of providing ducks with adequate living and producing good meat quality, as the difference in the duck production system has become dependent on a difference in the type of ground, the density of birds and the drinking system, access to water for swimming or access to the outside and lighting system and its impact on the living of ducks, growth behavior, the weight of carcass and quality of meat⁸. However, the high breeding density of ducks reduces growth behavior and bird health.

However, this study is essential, which deals with the study of differences in living body weight, carcass weight, and relative weight of carcass pieces between the types of molar ducks, white Pekin, and local brown duck in which the same attic and environmental conditions were used during the two-month breeding period.

MATERIALS AND METHODS

Thirty ducks of Molar, White Pekin and Brown Iraqi local ducks at age 2 months were reared at Karbala University/ Agriculture collage / Animal Production department from 13/9/2021 to 13/ 11/2022. The ducks were raised in an open system and supplemented with water and diet. The animals were fed identical diets formulated to meet ducks' maintenance and growth requirements (National Research Council (NRC,1994). The feeding program consisted of a starter diet until 1- 21 days continua (Crude protein 22,07% and metabolizable energy (ME, kcal/kg diet) 2890.45 kcal/kg diet) and a Finisher diet until 22-56 days continua (Crude protein 16,02% and metabolizable energy 2950.75 kcal/kg diet) of age.

After age 2 months, all ducks are weighted, and then all ducks are slaughtered. The weight of thigh, wings, carcass, back and neck, gizzard, breast, liver, and heart was measured, and the percentage weight of wings, breast, carcass, gizzard, thigh, heart, and liver. Also, the equations of the regression were calculated. Statistical analysis of The present data was tested by analyzing variance (SAS, 2001). Significant changes among groups were verified via Duncan's test at 5%.

RESULTS

Table (1) indicates moral differences ($P < 0.05$) in the rate of living body weight of the molar duck at the age of four months compared to other types of ducks, White Pekin and Brown Iraqi local duck, with the live weight rate of molar ducks being 1834.0 g and followed by the live weight rate of bikini ducks 1779.0 g and followed by the local brown duck weight rate of 1494.0 g, respectively. However, we did not find moral the differences in the weight rate of the carcass between the types of ducks, as the rate of weight of the carcass of the molar duck, White Pekin and Brown Iraqi local duck **1337.0**, 1242.0 and 1138.0 g, respectively, the high live weight rate of the molar duck may be due to having the best behavior in improving the efficiency of dietary conversion and the rate of weight increase compared to White Pekin and Brown Iraqi local duck,

Strains	Living body weight (g)	Carcass weight (g)
---------	------------------------	--------------------

Molar ducks	1834.0 a ± 72.42	1337.0 ± 60.42
White Pekin ducks	1779.0 b ± 67.64	1242.0 ± 67.72
Brown Iraqi local ducks	1494.0 c ± 51.57	1138.0 ± 56.16
Significant	0.05	NS

¹ Tables -The Data represent means ± standard error.

-The different letters in the similar column indicate significant changes at level ($P \leq 0.05$).

- NS: not significant.

Table 1. Comparative study of three strains of ducks in the live body weight (g) and carcass weight (g).

For Table (2), We also note moral differences ($P < 0.05$) in the ratio of carcass to live weight of molar ducks compared to other duck species. At the same time, we did not find moral differences between Pekin and Brown Iraqi local ducks, as the carcass's weight rate for molar ducks, White Pekin and Brown Iraqi local ducks (72.7, 0.695 and 66.6%), respectively. This is due to the high rate of the living weight of the molar ducks during the breeding period, which led to a higher percentage of carcasses compared to other types of ducks.

Strains	Carcass %	Thighs %	Wings %	Back and Neck %	Breast %
Molar ducks	72.7 a ± 0.008	14.3 ± 0.008	11.0 ± 0.003	25.3 ± 0.008	23.5 ± 0.007
White Pekin ducks	69.5 b ± 0.001	13.8 ± 0.003	10.2 ± 0.001	24.3 ± 0.004	20.4 ± 0.001
Brown Iraqi local ducks	66.6 b ± 0.002	0.140 ± 0.006	10.7 ± 0.004	24.0 ± 0.007	20.9 ± 0.004
Significant	0.05	N			S NS NS NS

² Tables - Data represent means ± standard error.

- The letters in the similar column indicate the significant changes in a level ($P \leq 0.05$).

- NS: not significant.

Table 2. Comparative study of three strains of ducks in carcass (%) and relative weight of carcass parts.

For Table (3), we also note a molar increase ($P < 0.05$) in the relative weights of the eaten pieces (heart, liver and gizzard) of molar ducks compared to other duck species, White Pekin and Brown Iraqi local ducks, as there was a moral rise in The relative weight of the heart in the molar ducks compared to other types of ducks in the study, where the relative heart weight of the molar duck White Pekin and Brown Iraqi local ducks (0.80, 0.68 and 0.65% respectively), As for the relative weight of the liver, it increased in the molar ducks compared to other birds, with the relative weight of the liver of the molar duck White Pekin and Brown Iraqi local ducks (2.7, 2.0 and 2.3%), respectively, and for weight. Relative to the gizzard increased in the molar ducks compared to other birds, as the relative weight of the sniper for molar ducks, White Pekin and Brown Iraqi local ducks (3.7, 3.0 and 2.7%), respectively, While we did not find moral differences in the relative weights of the eaten pieces between White Pekin and Brown Iraqi local ducks at the end of the study.

Strains	Heart %	Liver %	Gizzard %
Molar ducks	0.80 a ± 0.003	2.7 a ± 0.009	3.7 a ± 0.001
White Pekin ducks	0.68 b ± 0.002	2.0 b ± 0.003	3.0 b ± 0.002
Brown Iraqi local ducks	0.65 b ± 0.001	2.3 b ± 0.0005	2.7 b ± 0.003
Significant	0.05	0.05	0.05

³ Tables - Data represent means ± standard error..

- The letters in the similar columns indicate a significant change at level ($P \leq 0.05$).

Table 3. Comparative study of three duck strains in the edible viscera's relative weight (%).

DISCUSSION

The ability of molar ducks to produce a high amount of fat in the body nutrients leads to the development of body mass and a remarkable ability to adapt to environmental conditions and nature, which is a major cause of the significant increase in body weight⁹. On the other hand, it was found that the White Pekin and Brown Iraqi local duck is characterized by a low food conversion efficiency, which leads to a decrease in the average live body weight during the breeding period, and this reason shows the superiority of molar ducks in the live weight rate compared to other duck species¹⁰. In another study, he indicated that the percentage of live weight of ducks Pekin rises, and this depends on factors such as sex, genetic factors, and sex-related genes that cause an increase in body weight for ducks and that affect the strain *in vivo* weight and carcass weight¹¹. In another study, it was suggested¹² that the absorption rate of nutrients decreases in White Pekin ducks when fed an excessive or excessive diet. This moral improvement of the molar ducks may be due to the ability of the molar ducks to produce a high amount of fat in the body, subcutaneous and wing, which leads to the development of body mass and rapid growth, especially during the period of growth, which is a major cause of the significant increase in body weight⁹. However, we did not find moral differences in the measurements studied, including the percentage of breast, wing, back, neck and thighs between the duck's molar, White Pekin and Brown Iraqi local ducks. However, we found a mathematical rise in readings of these qualities studied for molar ducks compared to White Pekin and Brown Iraqi local ducks. This development in the relative weights of the eaten pieces of molar ducks compared to the White Pekin and Brown Iraqi local ducks may be due to the high rate of living body weight of the molar duck, which requires an increase in the weight of these pieces to suit the high body weight to equip it with the nutrients necessary for growth, especially since a molar characterizes the molar duck increased in the weight of the leg muscle and wing, as well as increased in the fat rate in the skin and muscle tissues with age compared to the types of ducks¹³. These pieces are also characterized by rapid growth after hatching chicks and during growth because they provide the nutrients necessary to grow and utilize the body's muscles¹⁴. In addition to muscle tissues, they develop before skeletal tissue and are an influential factor in the development of the skeletal rate¹⁵.

CONCLUSIONS

This research showed differences among Molar, White Pekin, and Brown Iraqi local ducks in the live body weight, carcass weights, and weights of some organs. Also, it improved Molar ducks significantly compared with White Pekin and Brown Iraqi local ducks. In the future, numerous investigations are required to estimate differences in ducks' reproductive traits among these breeds.

Author Contributions: A short paragraph specifying their contributions must be provided for research articles with several authors. The following statements should be used: “Conceptualization, Salam Altaie; methodology, Salam Altaie. Moreover, Salah Gatea; validation, Thamer ALjanabi; formal analysis, Salam Altaie.; investigation, Nihad Nafel.; resources, Salah Gatea.; data curation, Salam Altaie.; writing—original draft preparation, Salah Gatea.; writing—review and editing, Salah Gatea.; visualization, Sura Khafaji and Nihad Nafel.; supervision, Salam Altaie.; project administration, Thamer ALjanabi.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: “The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (Agriculture College, Kerbala University, Iraq).

Informed Consent Statement: Any research article describing a study involving humans should contain this statement “Not applicable.” for studies not involving humans.

Data Availability Statement: The study did not report any data.

REFERENCES

1. Huang, Y. H; Burt, D.W ,Chen, H.L .; Zhang, Y. M.;, Qian, W.B. The duck genome and transcriptome provide insight into an avian influenza virus reservoir species . *Nature Genetics* **2013**, 45(7) :776-783.
2. Hirschfeld , A .; Heyd , A .Mortality of migratory birds caused by hunting in Europe: bag statistics and proposals for the conservation of birds and animal welfare .*Berichte zum vogelschutz* **2005** ,42:47-74.
3. Al Assadi, M. H.; Majed , S. A. ; Shareef , H. M. Comparative study for some productive performance of Gray and Ducks were raised in Iraq. *Mesopotamia Journal of Agriculture*,**2019**. Proceedings of the 3rd International Agri. Conference, College of Agri. and Forestry, Univ. of Mosul and College of Agri. Engineering Sciences, Univ. of Duhok .**2019**, 47 (supl. I): 110-118.
4. Woloszyn,J.;Ksiazkiewicz,,J.;SkrabkaaBlonicka,T.;Haraf,G.;Biernat,J.;Kisiel,T. Comparison of amino acid and fatty acid composition of duck breast muscles from five flocks. *Archives fur Tierzucht*,**2007**, 9,194-204.
5. Food and Agriculture Organization (FAO) .**2018**.FAOSTAT:livestock primary , production quantity, duck meat . Retrieved on 7 July 2020.
6. Adeola,O. Review of research in duck nutrient utilization .Winnipeg , Manitoba,Canada,**2006**,pp.191-204.
7. Kokoszynski,D.;Arapasova,H.;Hrncar,C.;ZochowskaKujawska,J.;Kotowicz,M.;Sobczak,M. Carcass characteristics, chemical composition, physicochemical properties, texture, and microstructure of meat from spent Pekin ducks. *Poultry Science* **2019**, 99, 2., 1232-1240.
8. Alaaraji, S.F.T., Awad, M.M., Ismail, M.A. Study the association of asprosin and dickkopf-3 with KIM-1, NTpro-BNP, GDF-15 and CPP among male iraqi with chronic kidney disease (2020) Systematic Reviews in Pharmacy, 11 (5), pp. 10-17.
9. Abael-Hamid, S.E .; Abdelfattah, E.M .Effect of different dietary protein levels on some behavioral patterns and productive performance of Muscovy duck. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* **2020**,8(6): 661-667.
10. Bochno, R.;, Lewczuk, A; Wawko, E. Comparison of growth and feed conversion efficiency of Musk and Pekin ducks. *Poultry Science Abstract* **1994**, 18 CAB International, 20 (3).
11. Khafaji, S.S.; ALjanabi, T.K. ;Altaie, S.M.S. Evaluation the Impact of Different Levels of Propolis on Some Reproductive features in Iraqi Local Roosters. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* **2019**, 7(2):82-87.
12. AL-Qudsi, A., S. Alamili, H. Effect Of Using Sunflower And Canola Oils In Common Carp (Cyprinus Carpio L.) Diets On Growth Parameters, Feed Utilization And Body Composition. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 95-104. doi: 10.32649/ajas.2023.179719.
13. Bochno, R.;Murawska, D.; Brzostowska, U. Age-Related Changes in the Distribution of Lean Fat with Skin and Bones in Goose Carcasses . *Poultry Science* **2006**, 85(2) 1987-1991.
14. Murawska ,D. The effect of age on the growth rate of tissues and organs and the percentage content of edible and nonedible carcass components in Pekin ducks . *Poultry Science* **2012**, 91(8) 2030-2038.
15. Ricklefs,R.E. Adaption, constraint and compromise in avian postnatal development . *Biological Reviews* **1990**,54,269-290.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Gatea, S.; Altaie, S.; Nafel, N*.; ALjanabi, T.; and Khafaji, S. Study the difference in a carcass and the relative weight of the parts of the carcass of Molar, White Pekin and Brown Iraqi local duck. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 73. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.73>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Effect of hydrostatic pressure on some quality properties in Iraqi rams and calves' meats.

Rabeea Mahmood^{1*}, Anwer Mhannawee², Esraa Mohsen³

1 Animal Production/ Agriculture College/ University of Kerbala; Iraq.

2 Animal Production/ Agriculture College/ University of Kerbala; Anwer.mahdi@uokerbala.edu.iq, Iraq

3 General Directorate of Vocational Education/ Ministry of Education/ Iraq; eesraam1985@gmail.com.

* Correspondence; rabeea.arrubaii@uokerbala.edu.iq

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.74>

ABSTRACT

Two experiments have been conducted in this research to determine the effects of hydrostatic pressure on Iraqi rams and calves' meats. (One experiment for each kind of meat), Four treatments were designed for each experiment: control with no hydrostatic pressure, T1 with 100 bar exposed pressure, T2 with 200 bar and T3 with 300 bar. The pressures were generated and handled via a device designed and manufactured for this goal. The studied properties were water holding capacity WHC, thaw loss, fragmentation index FI, myofibril fragmentation index MFI, protein solubility and shear force. All these properties are strongly related to meat tenderness. All studied properties were affected significantly by applying hydrostatic pressure on meat samples to rams and calves' meat samples. Therefore, exposing the meat to hydrostatic pressure enhances its tenderness-related properties.

Keywords: hydrostatic pressure; tenderness; Protein solubility.

INTRODUCTION

A very high percentage of animals are culled annually for many reasons, including aging¹. Aging is the primary reason behind the worldwide decrease in tenderness in all kinds of meats. Tenderness is the first quality consumers would feel when chewing a piece of meat under the teeth². Picard and Gagaoua³ have defined it as the easiness that meat insidious compositions collapse under teeth. Tenderness is one of three attributes that determine meats' palatability, flavor, and juiciness⁴. Despite tenderness being the attribute, many researchers have tested, it is still elusive, and its subtle mechanisms are well because of the many factors that stand in the background, like age, gender, breed, species, enzyme activity and so on^{1,5}. So, many researchers focused on enhancing tenderness via developing many technical or chemical techniques that would have reflected on the meat industry field directly or indirectly².

All enhancing tenderness techniques, including both pre-slaughter and post-slaughter factors, depend on the treatments after slaughter until reaching the enzymatic analysis and far⁶. The most common tenderizing process is traditional aging, the oldest one ever, which depends upon leaving carcasses for some time to enhance their flavor and texture (ripening)⁷. Tenderizing by electrical stimulation is another technique; this process depends on fastening glycogen analysis inside muscles and producing lactic acid, whereas the muscle's pH reaches 6 before the temperature reaches 10 Celsius. That means that this process is conducted after slaughter directly^{8,9}. Mechanical tenderization is another process for tenderizing meat; it is applying meat after slaughter

to processes like hanging, mincing, cutting or even cooking; all these processes are aimed to enhance the palatability of meats by enhancing tenderness and its relatives' attributes^{10, 11}. Chemical tenderization demands adding specific chemicals to have a positive effect on tenderness. This may be salts, phosphate, or organic acid. The positive effect would occur via manipulating the meat properties related to tenderness like protein solubility, water holding capacity, collagen contents and so on^{12, 13}. Many other tenderizing processes exist, like enzymatic and ultrasonic tenderizing, and so on¹⁴. The goal of this research is to investigate another kind of tenderizing technique. Testing a process of exposing Iraqi rams and calves' meats to hydrostatic pressure and measuring the effects that can appear in tenderness-related properties that reflect the meat's tenderness status.

MATERIALS AND METHODS

Hydrostatic pressure generator device

Figure 1 refers to a locally-made device. This device can generate hydrostatic pressure by pressing water trapped inside a closed cylindrical shape container. The compressed water is in contact with meat samples inside the same container, where the meat samples go under hydrostatic pressure for a specific period, and the changes are measured afterward. The parts of the device are:

- 1- The steel frame: Holds all the device's parts and the function of assembling all other parts.
- 2- Hydraulic pump: Generates hydraulic pressure {reaches to 400 bar (Kg/cm²)}.
- 3- The cylindrical pressure container: This is the central part of the device and has two sections. The first one receives the pressure (as a compressed liquid) from the pump via specific high-pressure tubes. The second section is a cavern container containing the samples, filled with water and tidied up before being exposed to pressure. Between these two sects, there is a kit of specific rubber diaphragms to prevent oil and water from being mixed.
- 4- The pressure gauge: To measure the amount of exposed pressure by bar unit or (Kg/cm²).
- 5- The spring: Reset the device after each operation.

Experiments

Two experiments were conducted in this research. The first uses Iraqi ram meat, while the second uses Iraqi calves' meat.

Experiment one: an amount of Iraqi ram meat from the right leg (femoral) was used in this exp. Which was purchased from the local market in Kerbala / Iraq. The meats were cut into four, each weighing 300 g. Then, each part of these four was distributed to treatments.

Experiment two: an amount of Iraqi calves' meat from the right leg (round) was used in this exp. Which was purchased from the local market in Kerbala/ Iraq. The meats were cut into four, each weighing 300 g. Then, each part of these four was distributed to treatments.

Treatments

for each experiment, four treatments have been conducted:

- Control treatment CONT.: no hydrostatic pressure has been conducted at all.
- Treatment one T1: Five minutes of 100 bar hydrostatic pressure was applied to the meat samples.
- Treatment two T2: Five-minute 200 bar hydrostatic pressure was applied to the meat samples.
- Treatment three T3: 300 bar hydrostatic pressure was applied to the meat samples for five minutes.

Studied properties

- Water holding capacity WHC: what Dolatowski and Stasiak¹⁵ mentioned but with some modifications. 50 ml from each sample was taken and homogenized with distilled water for one minute and then centrifuged at 5000 rpm for ten minutes. WHC was (added water weight- removed water)/sample weight 100.
- Thaw loss percentage: which was calculated via the process of Denhertog-Meische et al.¹⁶. Samples from each treatment were weighted and frozen under -20CO under vacuum condition for two weeks in plastic bags,

then thawed in the refrigerator at 4 °C overnight, weighed again after removing thaw liquids. Thaw loss was calculated using the formula (sample weight after freezing – sample weight after thawing)/ sample weight after freezing X100.

- fragmentation index FI: FI value was measured according to Davis et al. ¹⁷. The values would be distributed from (100 to tender meats to 600 to tough meat)
- Myofibril fragmentation index MFI: as Culler et al. ¹⁸ mentioned, the MFI has been calculated.
- protein solubility: these values were evaluated according to Dentertog-Meische et al. ¹⁶, and calculated the final values via the process of Gomell et al. ¹⁹
- Shear force: as recorded by Abdulla et al. ²⁰ by using the Warner-Bratzler device. A piece of meat from each sample was taken (diameters of 2cm thick and 10 cm long), cooked in a water bath (without touching the water) for 90 minutes at 70 °C, and then cooled in the refrigerator overnight before being exposed to the W-B device. The W-B device is designed to conduct pressure to a knife edge and record the sample resistance to cut, representing the tenderness or toughness of meat samples.

Statistical analysis

All values recorded were analyzed by CRD design, and the comparison between treatments was obtained using the Duncan test.

RESULTS



Figure 1. Hydrostatic pressure generator device.

Water holding capacity WHC

Table 1 illustrates the differences between treatments in water holding capacity WHC trait. For both ram and calves meat, the treatment with 300 bars scored the highest values, 35 and 40 for both calves and rams, respectively, compared with the lowest value that belonged to the control for each experiment.

TRT.	Pressure value (bar)	WHC percentage in Iraqi calves' meat	WHC percentage in Iraqi ram meat
Cont.	zero	10 ±0.5 d	12 ±0.61 d
T1	100	20±0.1 c	23±0.21 c
T2	200	31±0.22 b	33±0.2 b
T3	300	35±0.11 a	40±0.02 a

¹T. Different letters in each column show significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

Table 1. The effect of hydrostatic pressure on WHC in Iraqi rams and calves' meats.

Thaw loss

Table 2 shows an enhancement in thaw loss (decreasing value) by applying more hydrostatic pressure for both experiments. Even though the enhancement in calves' meat was insignificant under all kinds of pressure, the pressure treatment overlapped the control (without pressure). In the rams' meat experiment, the enhancement was more noticeable even though there were no significant differences between T1 and T2. However, the values all differentiated obviously.

TRT.	Pressure value (bar)	Thaw loss value (rams meat)	Thaw loss value (calves meat)
Cont.	Zero	4.3±0.4 a	3.5±0.6 a
T1	100	3.1±0.32 b	2±0.7 b
T2	200	2.9±0.52 b	2.1±0.4 b
T3	300	2.1±0.4 c	1.8±0.5 b

²T. Different letters in each column show significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

Table 2. The effect of hydrostatic pressure on Thaw loss values in Iraqi rams and calves' meats.

Fragmentation index FI

From Table 3, it is evident that the value of IF differed significantly with increasing hydrostatic pressure. IF value Proportional reversely to meat tenderness. A high IF value means less tenderness and vice versa. The highest values were related to control treatment for calves' and rams' meat samples. That means the meats with no pressure exposure had less tenderness status. At the same time, the highest values were related to the treatment of 300 bar (T3s) for each experiment. That means the more pressure exposed, the more tender meats. Moreover, this new tenderization process could be helpful as a new technique in this process.

TRT.	Pressure value (bar)	Tenderness statue (rams meat)	FI values (rams meat)	Tenderness statue (calves meat)	FI values (calves meat)
Cont.	Zero	Rather tender	254±6 a	Rather tender	292±6.3 a
T1	100	Tender	200±4.5 b	tender	274±5 b
T2	200	More tender	199±4.7 b	More tender	199±7.7 c
T3	300	Much more tender	137±1.77 d	Much more tender	187±1.3 d

³T. Different letters in each column show significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

Table 3. The effect of hydrostatic pressure on fragmentation index (FI) values in Iraqi rams and calves' meats.

Myofibril fragmentation index MFI

TRT.	Pressure value (bar)	Tenderness statue (rams meat)	MFI (rams meat)	Tenderness statue (calves meat)	MFI (calves meat)
Cont.	Zero	Tenderness meat	55±0.88 c	Rather tenderness	50±0.09 b
T1	100	Rather tenderness	53±0.09 d	Rather tenderness	52±0.07 b
T2	200	More tenderness	66±0.34 b	Tenderness meat	68±0.07 a
T3	300	Much more tenderness	68±0.81 a	Tenderness meat	67±0.09 a

⁴T. Different letters in each column show significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

Table 4. The effect of hydrostatic pressure on myofibril fragmentation index (MFI) values in Iraqi rams and calves' meats.

It can be seen from Table 4 that the property of MFI was significantly different with pressure differences applied. The highest value was recorded in T3 (300 bar) for experiments 67 and 68 for calves' meat and rams' meat, respectively. At the same time, the lowest values belonged to control for each treatment. This means a noticeable enhancement could occur when exposing meat to hydrostatic pressure.

Protein Solubility

TRT.	Pressure value (bar)	Protein solubility Mg/g (rams meat)	Protein solubility Mg/g (calves meat)
Cont.	zero	70±0.1 a	62.3±0.1 a
T1	100	71.89±0.72 a	58.8±0.07 b
T2	200	62±0.44 b	56±0.1 c
T3	300	44.2±0.34 c	51.5±0.09 d

⁵T. Different letters in each column show significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

Table 5: The effect of hydrostatic pressure on protein solubility values in Iraqi rams and calves' meats.

Table 5 illustrates significant differences between myofibril protein solubility treatments with increasing hydrostatic pressure. The highest values came from the highest pressure and vice versa in each experiment. Otherwise, in the ram experiment, no significant differences were observed between the control treatment and T1 (100 bar), while noticeable significant differences occurred among all others.

Shear Force

The adequate force required to cut a specific piece of meat is shear. Table 6 exhibits these values for both experiments. It could be shown that the highest values were obtained from control treatments for calves 4.48 Kg and rams 4.55 Kg, respectively. At the same time, the lowest ones were from T3s at 3.39 Kg and 2.68 Kg for calves' and rams' meat samples, respectively. The results strongly confirm this research's hypothesis by relating the amount of hydrostatic pressure applied and the enhancement in tenderness as a reflection of easiness undercutting.

TRT.	Pressure value (bar)	Shear force Kg (rams meat)	Shear force Kg (calves meat)
Cont.	zero	4.550±0.07 a	5.480±0.05 a
T1	100	3.860 ±0.01 b	4.460 ±0.04 b
T2	200	3.210±0.02 c	4.100±0.08 c
T3	300	2.680±0.09 d	3.390±0.03 d

⁶T. Different letters in each column show significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

Table 6. The effect of hydrostatic pressure on shear force values in Iraqi rams and calves' meats.

DISCUSSION

The property of WHC is one of the critical properties in meat science because of its importance for both producers and consumers of meat. This trait is related to other important traits like juiciness and tenderness, so its value would affect the tenderness directly. WHC correlated with meat protein surface area, which could form a bond with water and couch it down. Meats that can catch water are often better from chemical and nutritional aspects ²¹. This experiment accorded with what was obtained by Bertram ²², who mentioned that a decrease in WHC value means a reduction in meat value on the myofibril plane—losing water after thawing had been mentioned in more than one research ²³. While Moreno et al., ²⁴ referred to the relation between this character and the statue of myofibril proteins, the bonds could be formed with water. In general, this trait is related to WHC and complemented with it. In our research, exposing hydrostatic pressure enhances these two properties.

The property of FI is considered a good indicator for measuring collagen defragmentation and other connective tissues; this is why this trait is always connected with tenderness ¹⁷. The decrease in number means more fragmentation cases decreasing in the precipitate, which means more tenderness ²⁵. This fact is ours. So, the fact abstracted from our results is that the more pressure exposed, the more tender the meats are. MFI trait differs from FI because the rise in MFI value means an increase in tenderness in contrast with FI, in which the rise in its value means a decrease in tenderness. More than one research pointed out that myofibril proteins are the majority of protein contents in striated muscles, responsible for transferring the movement to the skeleton via contraction-relaxation operation. So, myofibril proteins are continuously changing during an animal's lifetime ²⁶. From a meat science aspect, myofibril status reflects the history of pressure muscles are exposed to during animal life. For that, the ability of myofibril to fragment is related to animal age and its physiological conditions—the more the ability to fragment, the more tenderness meats obtain ²⁷. The results of this experiment showed that there is a response in the MFI trait after exposing meat samples to hydrostatic pressure.

Moreover, exposing meat to controlled hydrostatic pressure could be a new process in meat tenderization. The results were accorded with Koochmaraie and Whipple ²⁸, who said that the MFI could indicate tenderness and the carcasses' development after slaughter and rigor mortis. Exposing meat to hydrostatic pressure could be an assistant factor in shortening the period of rigor mortis and fastening and getting rid of it. This may be a good factor in the meat industry.

Protein solubility may be defined as a more profound status of myofibril fragmentation index (MFI). Myofibril protein molecules become smaller and lighter in molecular weight, so they have more ability to solubility ²⁹. The same research referred to myofibril protein solubility related to animal age and its physiological condition, rather more, type and location of the muscles in the body. Our results showed a relation between pressure and protein solubility; the more pressure applied; the more solubility recorded. Thus Exposing hydrostatic pressure is a new technique in this process. The results of these two experiments in this research came across with those of Swatland ³⁰ and Lyon and Lyon ³¹, who both referred to the relationship between shear force and meat tenderness.

CONCLUSIONS

Applying hydrostatic pressure on meat enhances the tenderness property and other related characteristics. Therefore, these results may be a starting point for developing a new tenderization process and all its other applications. It is recommended to conduct another research aiming for another kind of meat or with another amount of pressure to confirm the results.

Author Contributions: Conceptualization and methodology RM writing-original draft preparation, A. M.; writing-review and editing, EM All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study due to no humans or living animals. Regular market meat samples were used only.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Koohmaraie, M.; Gessink, G. H.; Thompson, V.F.; Taylor, R.G.; Goll, D.E. Is Z- disk degradation responsible for postmortem tenderization? *J. Anim. Sci.* 1994. 73:1351-1367.
2. Zuhair, F.; James, D.; Susan, L. M.; Alaa El-Din A. B. Applied and Emerging Methods for Meat Tenderization: A Comparative Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. CRFSFS.* 2018. Vol 0. DOI: 10.1111/1541-4337.12356.
3. Picard, B.; Gagaoua, M. Proteomic investigations of beef tenderness. In M. L. Colgrave. *Proteomics in food science from farm to fork* (pp. 177–197). Cambridge, Massachusetts, USA: Academic Press. 2017. Retrieved from <https://doi-org.ezproxy.lincoln.ac.nz/10.1016/B978-0-12-804007-2.00011-4>.
4. Thorslund, C. A. H.; Sandøe, P.; Aaslyng, M. D.; Lassen, J. A good taste in the meat, a good taste in the mouth, Animal welfare as an aspect of pork quality in three European countries. *Livestock Sci*, 2016. 193, 58–65.
5. Thabit S S, Awad M M, Abdulateef S M. Effects of In-Ovo Injection of sialic acid on Chick's embryonic development and physiological traits. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 49. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.49>.
6. A. Mahdii, B., K. Imran, F., J. Sultan, L. The Efficiency Of Microbiology In The Process Of Pesticide Biodegradation. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 105-113. doi: 10.32649/ajas.2023.179720.
7. Sitz, B. M.; Calkins, C. R.; Feuz, D. M.; Umberger, W. J.; Eskridge, K. M. Consumer sensory acceptance and value of wet-aged and dry-aged beefsteaks. *J. Anim. Sci.* 2006. 84, 1221–1226.
8. Lang, Y.; Sha, K.; Zhang, R.; Xie, P.; Luo, X.; Sun, B.; Liu, X. Effect of electrical stimulation and hot boning on the eating quality of Gannan yak longissimus lumborum. *Meat Sci.* 2016. 112, 3–8.
9. Odeh A, Abdalmoohsin RG, AL-Abedy AN. Molecular identification of *Fusarium brachygibbosum* and some isolates of *Trichoderma* spp. *Int. J. Pharmaceut. Res.* 2021 Jan 1;13(1):1390-6.
10. Pietrasik, Z.; Shand, P. J. Effect of blade tenderization and tumbling time on the processing characteristics and tenderness of injected cooked roast. *Meat Sci.* 2004. 66, 871–879.
11. Sorheim, O.; Hildrum, K. I. Muscle stretching techniques for improving meat tenderness. *Trends Food Sci Technol* . 2002. 13, 127–135.
12. Ibraheem M W, Muhaimed A R, Mohammed Th. T. Leg cuts from Awaasi lambs fed a diet with varying levels of *Rhus coriaria* L., Physical dissection and chemical composition. *Revis Bionatura* 2022;7(4) 4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.4>.
13. Oreskovich, D. C.; Bechtel, P. J.; McKeith, F. K.; Novakofski, J.; Basgall, E. J. Marinade pH affects textural properties of beef. *J. Food Sci.* 1992. 57, 305–311.

14. Sikes, A. L.; Mawson, R.; Stark, J.; Warner, R. Quality properties of pre- and post-rigor beef muscle after interventions with high frequency ultrasound. *ULTRASON. SONOCHEM.* 2014. 21, 2138–2143.
15. Dolatowski, J.Z.; Stasiak, D.M.. The effect of low and intensity ultrasound on pre-rigor meat on structure and functional parameters of freezing and thawed beef semimebranosus muscle. *Proc. 44th Int. Cong. Meat. Sci. Technol. Barcelona, Spain.* 1998.
16. Denhertog- Meischke, M.J.A.; Smulderes, F.J.M.; Vanknapen, F. The effects of electrical stimulation on the water holding capacity and protein denaturation of two bovine muscle. *J. Anim. Sci.* 1997. 75:118-124.
17. Davis, G.W.; Duston, T.R.; Smith, G.C.; Carpenter, ZL Fragmentation procedure for bovine longissimus muscle as an index of cooked steak tenderness. *J. Food. Sci.* 1980. 45:880-884.
18. Culler, R.D.; Parrish, F.C.; Smith, G.C.; Cross, HR Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. *J. Food. Sci.* 1978. 43:1177-1180.
19. Najim, Y. S. ; Mohammed, T. T. .; Hussain, F. M. . The Effect Of The Use Of Different Levels Of Azolla To Male Broilers Diets In The Productive And Physiological Performance. *JLSAR* 2022, 3, 37-41.
20. Abdulla, M.K.; Jasim, A.A.; al-rubeii Amara. MS Development a locally manufactured equipment to measure sheep meat tenderness as correlation with chemical, physical and sensory evaluation. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* 2008. Special Volume Conference, PP. 13-20.
21. Tornberg, E. Effects of heat on meat protein: implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci.* 2005. 70:493-508.
22. Bertram, H.C.; Purslow, PP; Anderson, H.J. Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: A low-field Nuclear magnetic resonance study. *J. Agri. Food Chem.* 2002. 50:824-829.
23. Boonsumrej, S.; Chaiwanichsiri, S.; Tantratian, S.; Suzuki, T.; Takai, R. Effects of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus Monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. *J. Food Eng.* 2007. 80. 292–299.
24. Moreno, T.; Perez, N.; Oliete, B.; Carballo, J.A.; Franco, D.; Monserrat, L. Effects on quality attributes of commercial veal pieces under different aging treatments. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2007. 42:373-379.
25. Cable, JR fragmentation index as an early postmortem predictor of beef tenderness. MSc. Thesis. Texas Tech. Univ, USA. 1983.
26. Bates, P.C.; Millward, D.J. Myofibril protein turnover: synthesis rate of myofibrillar and sarcoplasmic protein fractions in different muscles and the changes observed during postnatal development and in response to feeding and starvation. *Biochem. J.* 1983. 214:587-592.
27. Veiseth, E.; Shackelford, S.D.; Wheeler, T.L.; Koohmaraie, M. Technical note: comparison of myofibril fragmentation index from fresh and frozen pork and lamb longissimus. *J. Anim. Sci.* 2001. 79:904- 906.
28. Koohmaraie, M. Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteosome) purification, characterization and comparison of its effects on myofibrils with μ -calpin. *J. Anim. Sci.* 1992. 70:3697-3708.
29. Iwanowska, A.; Iwanaska, E.; Grzes, B.; Mikolajezak, B.; Pospiech, E.; Rosochacki, S.; Juszezuk-Kubiak, E.; Lyezynski, A. Changes in proteins and tenderness of meat from young bulls of four breeds at three ages over 10 days of cold storage. *Anim. Sci.* 2010. 28:13- 25.
30. Swatland, H.J. Basic science for carcass grading. VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2011. 6: 119-126.
31. Lyon, C.E.; Lyon, B.G. The relationship of objective shear values and sensory tests to changes in tenderness of broiler breast meat. *Poultry Sci.* 1991. 69:1420-1427.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Mahmood, R.; Mhannawee, A.; Mohsen, E. Effect of exposing hydrostatic pressure on some of quality properties in Iraqi rams and calves' meats. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 74.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.74>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Comparison of chemical and Sensory Characteristics of meat betties produced from three types of ducks: Muscovy, Pekin and MolarHaifa Awahd^{1*}, Zeinab Al-tememe², Manal Alsirrag³¹ College of Agriculture, Department of Animal Production, University of Kerbala, Karbala, Iraq; hayfaa.a@uo kerbala.edu.iq.² College of Agriculture, Department of Animal Production, University of Kerbala, Karbala, Iraq; zainab.mohammed@uokerbala.edu.iq.³ College of Agriculture, Department of Animal Production, University of Kerbala, Karbala, Iraq; manal.abd_alwahed@uokerbala.edu.iq.* Correspondence: hayfaa.a@uo kerbala.edu.iq; Tel.: 07713443947
Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.75>**ABSTRACT**

This study was conducted in the Animal Production department of the Agriculture College University of Karbala to compare three types of duck meat bred in the animal fields of the College (*Muscovy - Mollar - Pekini*). The slaughter was carried out in the fields of the college, and only the breasts were taken for each sample of the three species. They were minced in a home mincing machine and kept in polyethylene bags until physical and sensory tests were performed on duck meat and compared between them. The moisture content of *Molar*, *Muscovy*, and *Pekin* ducks was 74%, 73% and 56%, respectively. Results showed a higher fat content in *Pekin* meat, 36%, than the other two kinds of duck meat, *Muscovy* and *molar* meat, 23% and 24%, respectively, While *Pekin* meat had a low protein content of 14.8%. *Muscovy* and *molar* were 18% and 17% respectively. There was a positive direct correlation between the properties of protein and fat, which indicates that both the content of protein and fat are present at a very close level for *Muscovy* and *molar* meat. This indicates the superiority of these two types and the possibility of using them to manufacture meat and meat products. Despite the few differences between the studied samples, the burger manufacturing results of the three models showed the possibility of using these meats in the manufacture of meat and meat products.

Keywords: Sensory and chemical composition; *Muscovy* duck 1; *Molar* 2; *Pekin* duck.**INTRODUCTION**

Duck breeding projects spread in different parts of the world, which is a food source. It is one of the best types of meat. It is believed that ducks were domesticated more than 200 years ago And that the production of commercial ducks began a long time ago in China. Given the steady increase in the world's population, it is necessary to provide more animal protein. Therefore, the interest in duck production will form a tributary in this direction:¹ The main breeds for meat production of ducks are *Muscovy*, *Aylesbury*, *Pekin* and *Rouen*. Various crosses have taken place between these four pure breeds. Most ducks commercially produced for meat in Australia are *Pekin/Aylesbury* crosses, often *Pekin* 2. *Molar* ducks are produced by mating two types of ducks, the *Muscovy* and the *Pekinese* duck. The duration of its cycle is different from the rest of the species. *Molar* ducks eat (8-10) kilos of feed per cycle³. *Molar* ducks are characterized by their strong immunity and the ability to withstand weather fluctuations. The duration of its cycle is short, ranging from (60-70) days. *Muscovy* ducks originally

belong to Mexico, Central America, and South America and are called the Great Wood Duck or the Forest Duck.

Females weigh between 3-4 kg, 1- Adult individuals of Muscovy ducks (males and females) are characterized by a fleshy body, a broad chest and a face covered with a rough layer of red skin, and there is a fleshy swelling at the base of the beak. Muscovy ducks are one of the best meat-producing waterfowl, and the period of fattening them ranges between 12-18 weeks, depending on the required weight. The Pekinese duck: An American breed of domesticated duck bred mainly for meat, brought to the United States from China in the nineteenth century and bred in many parts of the world. Chinese type, but has a different breed. Pekin duck features:- 1. Cheapest price for Pekinese chicks, 2. Strong immunity, higher than all types of ducks, 3. Fast conversion efficiency, 4. It bears cold temperatures and fluctuating environmental conditions⁵. It is a rich source of protein: The protein content of duck meat is one of its most critical nutritional aspects, as the amount of proteins contained in 100 grams of duck meat may cover approximately 23% of the recommended daily intake of proteins⁶ in addition to being high in proteins. Quality contains various essential and non-essential amino acids. It is also a good source of vitamins and minerals: ducks contain a variety of micronutrients, such as Iron and Selenium, essential types of antioxidants that enhance the health of the immune system by helping to reduce cell damage and fight infection. Duck meat also contains small amounts of vitamin C, a group of B vitamins, While it is rich in vitamin B3, which plays a vital role in the metabolism of fats and proteins and the conversion of carbohydrates into glucose, in addition to a high amount of vitamin B12, which is an essential element in the function of nerves, and in the formation of red blood cells and the substance body genetics⁷.

This research aims to compare the physical, chemical, qualitative and sensory characteristics of the meat of the three types of Muscovy, Pekinese and Molar ducks and to know the extent to which the consumer accepts cooked burgers from the meat and its production of these species.

MATERIALS AND METHODS

The Materials and Methods should be described with sufficient details to allow others to replicate and build on the published results. Please note that the publication of your manuscript implies that you must make all materials, data, computer code, and protocols associated with the publication available to readers. Please disclose any restrictions on the availability of materials or information at the submission stage. New methods and protocols should be described in detail, while well-established methods can be briefly described and appropriately cited.

1. Preparation of raw duck meat.

Thirty male ducks (10 in each group) were used for comparison. The birds were raised in the animal field of the Department of Animal Production at the College of Agriculture, University of Karbala. The birds were slaughtered by the professors working in the field; meat from bird breasts was taken for study chemical analysis. Samples were stored in airtight polyethylene bags and placed in the refrigerator at -20°C Until it gets tested.

2. Chemical Analysis of Duck Meat.

Moisture, Protein and Fat on minced meat were studied according to the method. The moisture content was determined using the air oven drying method. Protein content was analyzed using the Kjeldahl method, and the Soxhlet method in⁹ determined fat content.

3. Preparing and cooking the burger product batties

Burgers were made from 3 different types of fresh meat, Pekin, Molar, and Muscovy, that was slaughtered in the animal production department at the agriculture college, Kerbala University. The frozen minced duck meat was thawed inside the chiller at 4 -7°C for 10 h before burger production. The chilled minced meat formula includes

The cooking method used followed¹⁰. Each burger was cooked (griddled) on a hot plate (Tefal Plancha, Groupe SEB, Canohès, France) for 10 min at medium heat. Both sides of the burger were cooked and flipped for a few minutes until a well-done cooked burger was obtained and a minimum internal temperature of 75°C was reached¹¹.

4. Evaluation of cooked burger batties

The sensory evaluation of the burger product was carried out by the Department of Animal Production / College of Agriculture assessors who have experience in this field, according to the sensory evaluation form in Figure 1, for color, flavor, tenderness, and general acceptance¹². Added a quantity of ground spices to manufacture burgers, at 0.5% for each amount.

Degree	general acceptance	Tenderness	Flavor	Color
1	Unacceptable	Very light	Unacceptable flavor	hard
2	Low acceptable	Light	Low flavor	Semi-soft
3	Middle acceptable	Acceptable	Middle flavor	Middle tender
4	Acceptable	dark	Strong flavor	Soft
5	Very acceptable	Very dark	Very strong flavor	Very soft

Table 1. Form of Sensory evaluation form for burger samples (the Iraqi standard maintenance 1580 (1990).

Statistical analysis: It used the statistical program SAS (2012)¹³.

RESULTS

Chemical composition of duck meat

Table 2 shows that the meat of (Muscovy molar) ducks has a little more protein than the (Pekin) ducks, 18% and 17%, respectively, against 14.8%. At the same time, Peking duck meat has a higher fat content of 36% compared with the meat of Muscovy and Molar ducks (23 and 24%). These results agreed with found protein, 15,18.5,17.3 respectively, fat content was 35, 23.4 and 24.3, and moisture was 49.4,56.6 and 55.8 for Pekin, Muscovy and Molar.

It was also found from Table 1 that. The significant decrease in the moisture content of the Pekin duck meat ($P < 0.05$) was 53%, compared to the Muscovy duck and Molar's 60% and 61%, respectively.

Duck breed	Protein%	Fat%	Moisture%
The Pekin	14.8±0.05	36 ± 0.33	53±1.85
The Muscovy	18.0±0.33	23±0.57	60 ±0.88
The Molar	17.0±0.33	24± 0.57	61 ±0.57
LSD	0.9489	1.762	4.2643
Significant level	0.05	0.05	0.05

The data represent the average of duplicate

Table 2. Chemical composition of duck meat.

Sensory evaluation of raw muscles

From Table 3 and Figure 1, we have noticed no significant differences between the three samples regarding flavor, as all types of meat were characterized by a good flavor and an acceptable smell by those who evaluated the meat. The same table indicates a significant decrease in Pekinese duck meat (semi-hard) tenderness compared with Molar duck meat and Muscovy (very soft and soft), respectively.

Duck breed	Tenderness	Flavor	Color	acceptable
The Pekin	Semi-hard	Good	Pink-red	Good
The Muscovy	Soft	Good	Light red	Good
The Molar	very soft	Good	Dark red	Good

Table 3. Sensory evaluation of raw muscle meat.

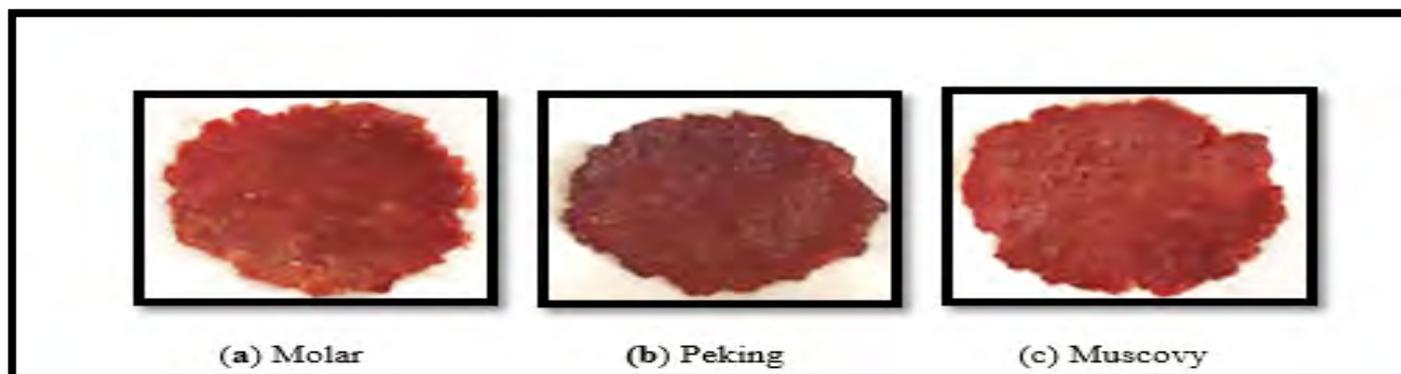


Figure 1. (a) (b) (c) Color of raw duck's meat.

Sensory and qualitative tests of cooked duck meat burgers

Table 4 shows that the texture test of Pekin and Molar cooked burgers was significantly more complex than Muscovy burger meat ($P < 0.05$). The Muscovy burger samples had higher softness and chewiness than other samples.

Duck breed	Flavor and aroma	Texture	Color	Acceptable
The Pekin	Like	higher hardness	Brightness	Like
The Muscovy	Like	higher hardness	Brightness	Like
The Molar	Like	Softness	Brightness	Like

Table 4. Sensory and qualitative tests of cooked duck meat burgers.

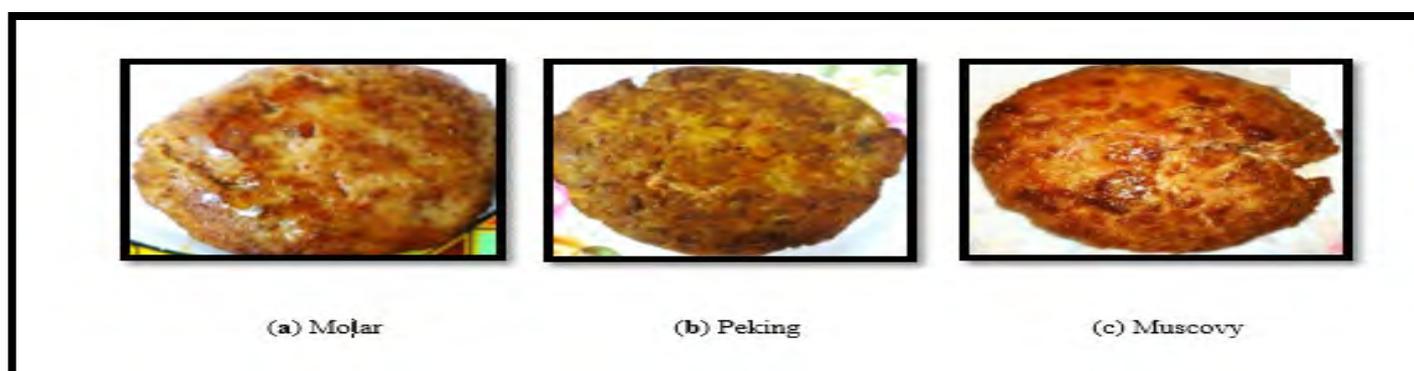


Figure 2. The burger is made from duck meat samples.

Statistical correlations between the chemical content of duck meat

From the statistical correlation analysis of the results in Figure 3, it noticed that there is an inverse correlation between the characteristic of fat and protein in the meat of Pekin duck, which means when the % of the protein in the meat increases, it leads to a decrease in the percentage of fat compared to the statistical results in Figure 5 and 6 for Muscovite ducks and Molar ducks. It was found that there is a positive direct correlation between the properties of protein and fat, which indicates that both the content of protein and fat are present at a very close level for Muscovy and Molar meat. This suggests the superiority of these two types and the possibility of using them to manufacture meat and meat products.

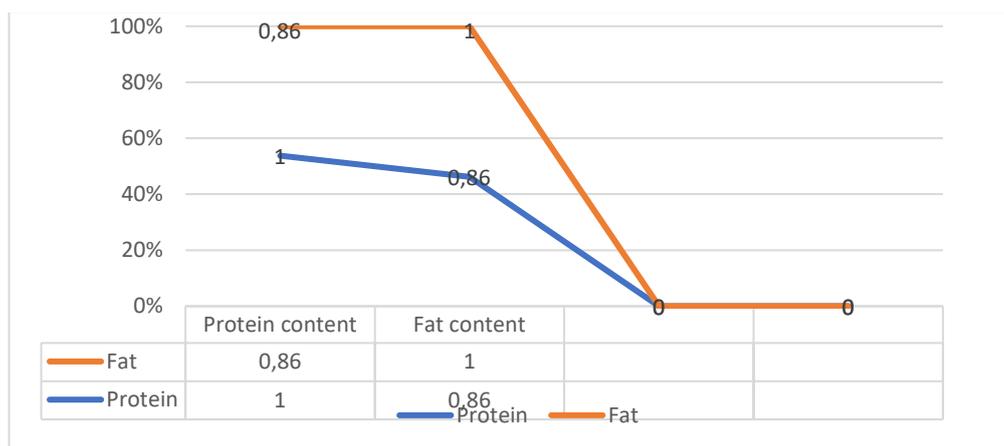


Figure 3. Statistical correlations between the chemical characteristics of Pekin duck meat

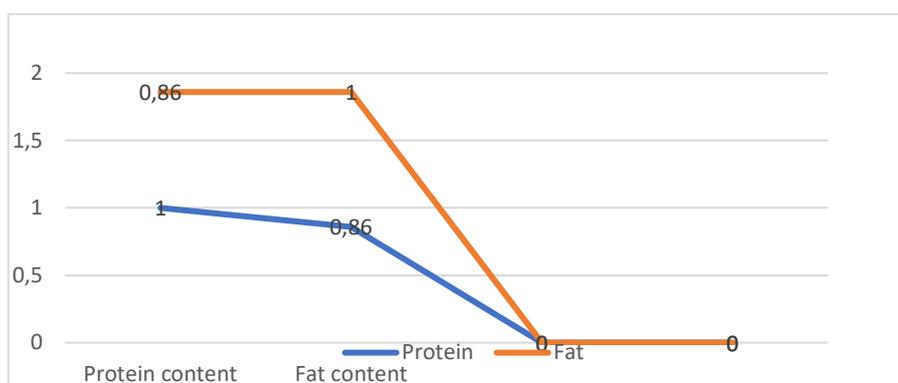


Figure 4. Statistical correlations between the chemical characteristics of The Muscovy duck meat

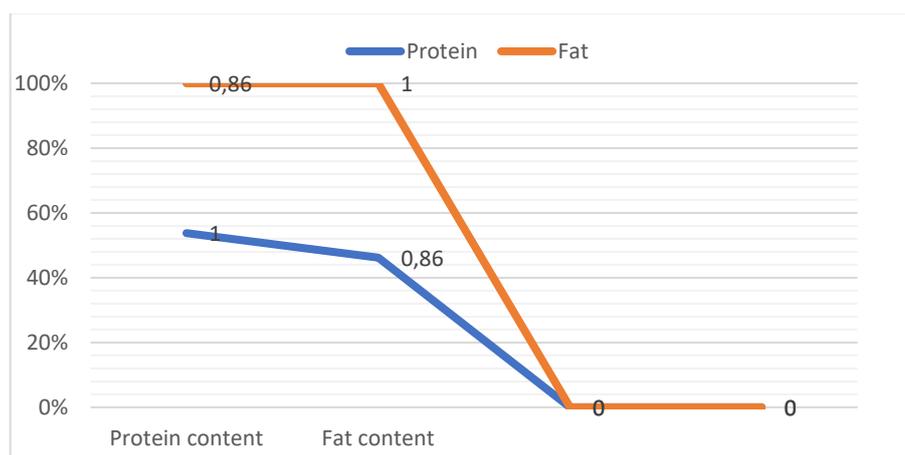


Figure 5. Statistical correlations between the chemical characteristics of The Molar duck meat.

DISCUSSION

As shown in Table 1, the decrease in moisture levels in Pekin samples may be due to genetic factors or the different types of ducks. The results in the same table found that a significant difference in fat content in raw duck meat ($P < 0.05$) was 36% for the Pekin duck meat compared to Muscovy and Molar, which was 23% and 24%, respectively.

This difference in Table 2: may be attributed to the lower moisture content of Pekinese duck meat. Sensory scores of palatability factors such as visual color, tenderness and acceptance of duck meat were determined by trained taste panelists who scored the duck meat using the sensory evaluation, also known as the affective test method⁶ Determination of color parameters. It was found that the Molar duck meat had a redness color and was darker than Pekin, which was pink, and Muscovy duck meat was light red.

However, all samples were distinguished by a red color acceptable to the consumer. These results agreed with¹⁴. the reason for these differences is due to the different types of ducks. The myosin protein is considered to be in charge of the red color in the meat, as the myoglobin is entered into the blood circulation and the remaining of it enters into the cellular tissue and gives the purple color when the myoglobin is mixed, a compound called oxyglobin is found in the blood. It is possible to have a small amount of it in The tissue after the slaughtering process, the animal's color, its type, gender, and the type of food¹⁵.

These results in Table 3 agree with our previous results for cooked duck's meat burger¹⁶. It is found in Table 3. Figure 3 (a, b, c), samples of the cooked burger were distinguished by a shiny brown color; it was difficult for the panelists to discern the difference between the colors in this study because the product's color was very similar. As for the flavor of the products, the burger produced from Muscovy duck meat was better in terms of flavor and aroma than other samples. Panelists preferred flavor and overall acceptability. These results are in concordance with¹⁶.

In general, for all samples, burgers made from duck meat had a high-fat content, and the sensory properties of the burger had material approached those of burgers made of chicken. Investing these results in the possibility of using duck meat under study to manufacture meat products by producing meat and meat products from the different ducks raised in Iraq is possible.

CONCLUSIONS

The study investigated the physicochemical and sensory properties of duck meat and duck meat burgers produced from three different duck breeds (Pekin, Muscovy, and Molar) raised in Iraq. The results revealed

significant moisture, fat content, and color differences among the duck breeds. Pekin duck meat had lower moisture and fat content than Muscovy and Molar duck meat. The cooked burger samples from all three duck breeds had a similar shiny brown color, and the panelists preferred the flavor and overall acceptability of the burger produced from Muscovy duck meat. The high-fat content and sensory properties of the duck meat burgers suggest the potential for using duck meat to manufacture meat products.

Author Contributions: Haifa Ali Awahd: formal analysis and writing and project administration Manal Abd-washed: data curation and review and editing Zeinab Al-time: methodology and investigation. I have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Animal Production (College of Agriculture, Karbala University).

Data Availability Statement: All data is available by the first author.

Acknowledgments: The authors thank Prof. Salam Merza Suhail, Instructor at the College of Agriculture/University of Kerbala. For his Cooperation and assistance in this research

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Ismail, I.; Huda, N. Ariffin, F., Ismail, N. Effect of washing on the functional properties of duck meat . *Int. J. Poult. Sci* **2010**, *9*, 556-561.
2. Shahid, M. S.; Yuqin, Wu. Xiao, Z. Duration of the flaxseed diet promotes deposition of n-3 fatty acids in the meat and skin of Peking ducks. *Food Nutr Res* **2019**, *63*: 3590.
3. Ramadhan, K.; Huda, N. and Ahmad, R. Physicochemical and sensory characteristics of burger made from duck surimi-like material. *Poultry. Science*, **2012**, *91*, 9, 2316-2323.
4. Arshad, M. S.; Kwon, J. H., Ahmad, R. S. Influence of E-beam irradiation on microbiological and physicochemical properties and fatty acid profile of frozenduck meat. *Food Sci Nutr* **2020**, *8*(2), 1020–1029.
5. Slobodyanik, V.S.; Lina, N.M., Suleymanov , S.M. ; polyanskikh, S.V. ; Maslova, Yu.F. ; Galin, R.F. Study of composition and properties of duck meat. *IOP Conf. Series: Ear and Envi Sci* **2021**, *640* , 032046.
6. Lawless, H. T. and Heymann, H., Sensory evaluation of food: Principles and Practices. 2nd ed, Springer New York Dordrecht Heidelberg London. *British Food Journal* **2010**, *102*(3):158-176.
7. Mazanowski, A.; Kisiel, T. and Gornowicz, E, Carcass quality, meat traits and chemical composition of meat in ducks of paternal strains A44 and A55. *J. Anim. Sci* **2003**, *21*:251-263.
8. Ali, M. S.; Genu, H. k.; Hang, S. Y.; Ging, Y. J.; Young, H. H.; Park, G. B. and Seon, T. J. **2007**, Compression of meat strains A44 and A55. *J. Anim. Sci* (**2003**) *21*:251-263.

9. AOAC. Officials methods of analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemist **1995**, Washington, DC.
10. Abdulateef, S. The Effect Of Some Unfavorable Behavioral Traits On The Behavior Of Broiler Chicks Is Investigated. JLSAR 2023, 4.
11. Martínez , B. ; Miranda, J. ; Vazquez, I. ; fente, C. ; Franco, C. ; rodriguez, L. and Cepeda, A.). Development of a hamburger patty with healthier lipid formulation and study of its nutritional, sensory, and stability properties. *Food and Bioproc Technol* **2009** , 5(1):200-208.
12. A. Jalal, R., E. Aziz, K. Usage Of Antimicrobial Activity Against E. Coli O157:H7 Isolated From Local Meat And Vegetables In Erbil City. Anbar Journal Of Agricultural Sciences, 2023; 21(1): 114-123. doi: 10.32649/ajas.2023.179721.
13. SAS. Statically analysis system , Users guide. Statistical. **2012** , 1th ed. SAS. L. nst. Inc. Cary. N.C. USA.
14. Ibraheem M W, AL Mjbel A A, Abdulwahid A S, Mohammed Th. T. Characterization of the influence of diet on Japanese quail. Revis Bionatura. 2022;7(4) 21. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.21>.
15. Haifa, A. A.; Manal, A. A.; Zajnab, H. A.; Rabiaa, M. M. ; Salih, A. W. ,Improving the quality of beef burger by adding thyme and rosemary powder. *J. of global pharma Technol* **2018** , 10 (11). 949 -954.
16. Ramadhan, K.; Huda, N. and Ahmad, R. Effect of number and washing solutions on functional properties of surimi-like material from duck meat. *J. of Food Sci and Technol* **2011** , 51, 256–266.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Awahd, H.; Al-tememe, Z.; Alsirrag, M. Comparison of chemical and Sensory Characteristics of meat betties produced from three types of ducks, Muscovy, Peking and Molar. Revis Bionatura 2023;8 (4) 75. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.75>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Lycopene modulates testicular injury oxidative stress and caspases upregulation induced by fenvalerate in male rats

Ali Jebur^{1,*}, Raghda El-Sayed², Fatma El-Demerdash³

¹Department of Animal Production/ Agriculture College/ Kerbala University/ Iraq; Email: blash.ali1966@gmail.com;

²Department of Environmental Studies/ Institute of Graduate Studies and Research/ Alexandria University/ Alexandria/ Egypt. Email: raghdaahmed@gmail.com

³Department of Environmental Studies/ Institute of Graduate Studies and Research/ Alexandria University/ Alexandria/ Egypt. Email: eldemerdashf@yahoo.com, eldemerdashf@alexu.edu.eg;

* Correspondence: Email: ali.b@uokerbala.edu.iq, blash.ali1966@gmail.com

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.76>

ABSTRACT

Fenvalerate (FEN) is one of the widely utilized synthetic pyrethroids that may negatively impact male fertility in animals and people, while the potential mechanism is still unknown. This study aimed to assess lycopene's potential therapeutic value in protecting male rats from testicular damage and oxidative stress caused by FEN. In our investigation, 28 male rats were randomized into four groups at random: lycopene (10 mg/kg BW), FEN (20 mg/kg BW), and lycopene plus FEN. The rats got their doses orally by gavage each day for four weeks. Animals that had consumed FEN showed high levels of hydrogen peroxide and thiobarbituric acid reactive substances, phosphatases, and aminotransferases. However, there was a considerable drop in antioxidant enzyme activity, glutathione, and protein content. Significant changes in testosterone, luteinizing and follicle-stimulating hormones, and sperm quality were also found. In addition, the expression of caspases 3 and 8 in rat testes was significantly upregulated. Biochemical, molecular, spermatological, and histological alterations have all been brought back to normal by lycopene. These findings imply that lycopene may have antioxidant and preventive properties against testicular damage brought on by FEN.

Keywords: Fenvalerate; Lycopene; Apoptosis; Semen quality; Oxidative stress.

INTRODUCTION

For many years, synthetic pyrethroids have been used as insecticides or repellents in homes and agriculture. Globally, they account for around a quarter of the market rate for pesticides¹. Initially, it was thought that the most popular type II synthetic pyrethroid, fenvalerate, is not hazardous to mammals². However, several studies suggest that the male reproductive system is damaged explicitly due to the buildup of fenvalerate in humans and animals³. A reduction in sperm characteristics and an induction in the fragmentation of DNA and chromosome aberration in spermatozoa are just a few of the fenvalerate adverse effects on semen quality⁴. The mechanism by which fenvalerate-induced poor semen quality is thought to be unknown. Possible reasons

involve reproductive endocrine disturbances, oxidative toxicity, and cell death⁵. Furthermore, it is generally accepted that normal and mature spermatogenesis depends on apoptosis regulation⁶.

Lycopene, a carotenoid with significant antioxidant potential, is a red pigment in tomatoes and other fruits and vegetables⁷. Lycopene is one of over 600 different kinds of naturally occurring carotenoids and is an aliphatic hydrocarbon⁸. Due to its lengthy, acyclic shape, severe hydrophobicity, and conjugated double bonds, lycopene can conduct its antioxidant functions. Lycopene exhibits antioxidant properties by dissolving oxygen radicals and effectively removing them, like retinol, tocopherol, and carotenoids⁹. Additionally, among models of biological membranes, superoxide radicals that resemble liposomes are ideally eliminated by lycopene. Lycopene has potent antioxidant properties outside the cell, but it also works inside the cell to prevent the oxidation of DNA, proteins, and lipids. Lycopene may interact more effectively with the active oxygen species because it has eleven double bonds conjugated in its structure instead of β -carotene's nine¹⁰. So, the present work aims to investigate the potential protective influence of lycopene against FEN-caused testicular damage in rats.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Fenvalerate (purity > 97%) was bought from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO), and lycopene (10% FS Redivivo™) was supplied by DSM Nutritional Products (Heerlen, Netherlands).

Animals and treatment

Male Wistar rats (28 rats) weighing 150-170 g were acquired from Alexandria University's Faculty of Medicine, Alexandria, Egypt. The local committee at the university gave its approval to the experimental protocol in compliance with the National Institutes of Health's ethical standards. Seven animals were kept in each cage, fed a commercial meal, and given access to unlimited tap water. The animals were acclimated (temperature, 21°C; 40–60% relative humidity and 7 AM to 7 PM photoperiod) for two weeks. Four groups of animals were used: the first group was used as the reference group and given corn oil; the second group was supplemented with lycopene (10 mg/kg b.w.); the third group was treated with fenvalerate (20 mg/kg b.w.); and the fourth group administered with lycopene one hour before FEN treatment, respectively. Lycopene and fenvalerate were dissolved in corn oil and given daily and orally via gavages for 30 days, according to Velmurugan et al. (2004)⁸ and El-Demerdash et al. (2004)⁵, respectively. The animals were weighed and given isoflurane anesthesia, and blood and testicles were collected after the experimental time. The testes were cut into three slices, with the first slice being preserved in formalin (10%) for histology, the second was kept at -20°C for biochemical research, and the third was maintained at -80°C for molecular investigation.

Blood samples

Blood samples from a heart puncture were collected, allowed to stand for half an hour at 25°C, centrifuged at 3000g for 15 minutes, and then carefully separated the clear serum and kept at -20°C until it was required for additional experiments.

Hormones analysis

The blood testosterone (T) concentration was determined using a radioimmunoassay kit (RIA TESTO CTC KIT) provided by (Dia-Sorin Company: Stillwater, Minnesota, USA) while serum luteinizing hormone (LH) level was tested utilizing RIA kits bought from NIADDK, Bethesda, MD, USA, Follicle-stimulating hormone (FSH) levels were measured by immunodiagnostic techniques and the Elisa Kit test (DiaMetra kits, Via Giustozzi, Italy).

Sperms morphometric analysis

Each testicle's left caudal epididymis was gently removed, minced in 5 mL of Hanks's Buffered salt solution, and left at room temperature for 15 minutes to let spermatozoa flow into the fluid. The sperm parameters "sperm count, normality, motility, and viability" were evaluated utilizing a microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and computer-assisted semen analysis, according to Adamkovicova et al. (2016) ¹¹.

Tissue preparation

After the treatment phase, rats from each group were dissected. Each animal's testes were removed and homogenized in 10% w/v buffer containing 1.15% KCl and 0.01 mol/L sodium-potassium phosphate (pH 7.4). The supernatants were collected and used to evaluate the activity of several enzymes after the homogenates were centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4°C.

Assessment of TBARS, H₂O₂, and GSH

By using the methods outlined by Ohkawa et al. (1979) and Velikova et al. (2000) ¹², respectively, experiments on thiobarbituric acid-reactive compounds (TBARS) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were carried out. At the same time, the Ellman method was used to measure the reduced glutathione (GSH) content ¹³.

Assessment of antioxidant enzyme activities

Superoxide dismutase activity (SOD; EC 1.15.1.1) was measured using Misra and Fridovich's method ¹⁴. The catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was determined using a double-beam spectrophotometer at 240 nm by estimating the rate of H₂O₂ degradation ¹⁵. The activity of glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) and glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activities were assessed by the method of Hafeman et al. ¹⁶. The activity of glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) was assessed using para-nitrobenzyl chloride as a substrate ¹⁷.

Assessment of aminotransferases and phosphatases activity and protein content

The activities of aspartate aminotransferase (AST; EC 2.6.1.1), alanine aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2), acid phosphatase (ACP; EC 3.1.3.2), and alkaline phosphatase (ALP; EC 3.1.3.1), as well as the protein content, were assessed using the commercially available kits supplied by Biodiagnostic Company, Egypt.

Molecular analysis using real-time PCR

Real-time PCR (qRT-PCR) was utilized to identify the relative expression of apoptotic genes (Caspase-3 and Caspase 8) in rat testis. Total RNA was extracted using a commercial kit (Gene JET RNA Purification Kit) according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, # K0731, USA). The cDNA was built up by reverse transcription utilizing a commercial kit (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase) following the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, # EP0451, USA). The qPCR mixture contained cDNA, Syber green master mix (2x Maxima, Thermo Scientific, # K0221, USA), and primers. The reference gene was the

β -actin gene (internal control). Based on rat sequences obtained from GenBank databases, the primers were created using the web-based Primer 3 database (Table 1). The relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ approach and displayed as a fold change.

Gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
Caspase3	GAGACAGACAGTGGAACTGACGATG	GGCGCAAAGTGACTGGATGA
Caspase8	AATGTTGGAGGAAAGCAATC	CATAGTCGTTGATTATCTTCAGC
β -actin	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG

Table 1. The sequences of primers for qRT-PCR.

Histopathological investigation

According to the Bancroft and Stevens¹⁸ method, testes were fixed in formalin's solution then successive paraffin sections were prepared to analyze the alterations in tissue architecture. Slides were examined under a light microscope and photographed (Olympus BX 41, Japan).

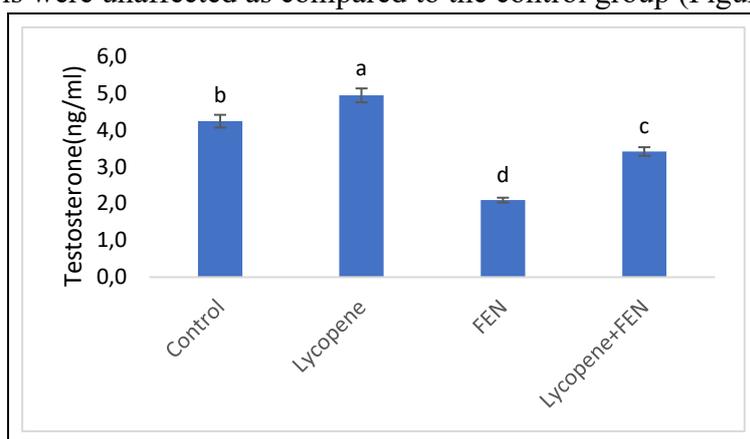
Statistical analysis

Data were all displayed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and then analyzed by SPSS software (version 22, IBM Co., Armonk, NY). The means of various groups were compared using the one-way ANOVA and Tukey's post hoc testing. $P < 0.05$ was chosen as the significance level for each experiment.

RESULTS

Hormones level

According to the results, the testosterone, LH, and FSH levels in the rat serum of the fenvalerate-treated group were significantly different from those of the reference group. In comparison to the fenvalerate group, rats given lycopene and then treated with FNP had significantly higher hormone levels. In rats given lycopene alone, the hormonal levels were unaffected as compared to the control group (Figure 1).



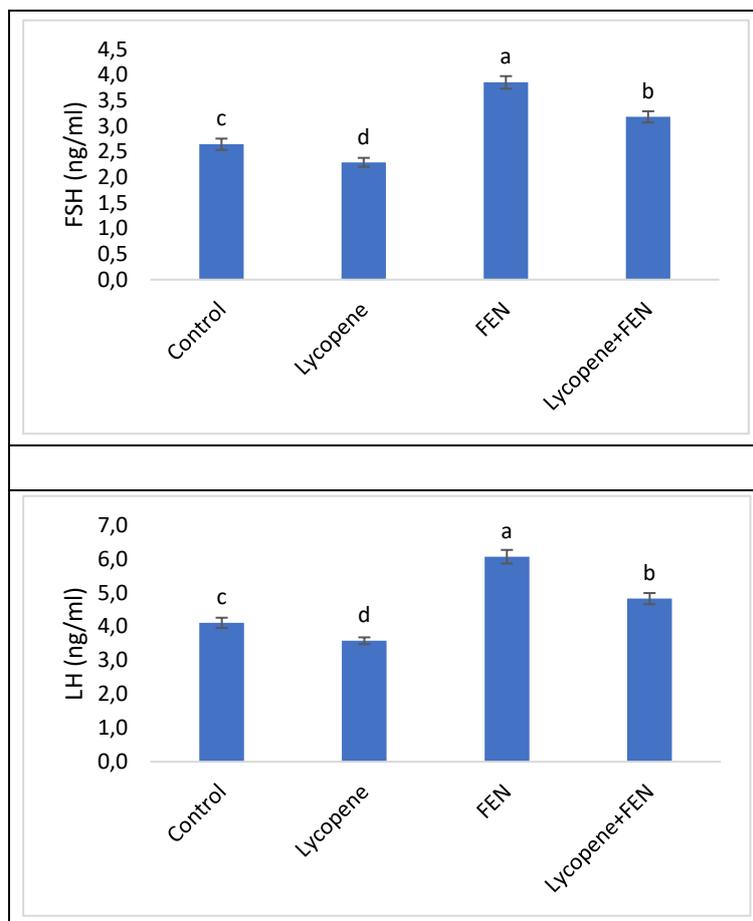


Figure 1. Hormone levels in different groups. Values are expressed as mean \pm SE of seven rats per group. Columns with different letters are significantly other at $p < 0.05$. Groups are compared as follows: Lycopene and fenvalerate (FEN) groups are compared vs the control group, while the lycopene + fenvalerate group is compared vs the fenvalerate group.

Sperm parameters

When compared to control rats, animals given fenvalerate showed significantly ($P < 0.05$) reduced levels of sperm count, normalcy, motility, and viability. Rats pretreated with lycopene and then administered FNP showed better sperm quality than those given fenvalerate (Table 2).

Parameters	Groups			
	Cont.	Lycopene	Fenvalerate	Lycopene+ Fenvalerate
Sperm count (10^6 Cells)	85.80 \pm 1.18 ^b	95.39 \pm 1.05 ^a	24.74 \pm 0.658 ^d	53.43 \pm 1.57 ^c
Normal sperm %	81.99 \pm 1.91 ^a	85.31 \pm 1.91 ^a	28.00 \pm 1.44 ^c	55.34 \pm 1.61 ^b
Motility %	83.91 \pm 3.10 ^a	90.20 \pm 2.84 ^a	22.00 \pm 0.54 ^c	51.07 \pm 1.07 ^b
Viability %	56.43 \pm 1.78 ^b	71.86 \pm 0.800 ^a	25.43 \pm 0.751 ^d	44.43 \pm 0.948 ^c

Table 2. Sperm quality in rats of different groups.

Values are expressed as means \pm SE; $n=7$ for each treatment group. Mean values within a row not sharing common superscript letters were significantly different, $p < 0.05$. Statistically significant variations are compared as follows: Lycopene and fenvalerate are compared to control while Lycopene + fenvalerate are compared to the fenvalerate group.

Oxidant stress and antioxidant biomarkers

The levels of TBARS and H_2O_2 were noticeably elevated. In contrast, SOD, CAT, GPx, GR, and GST activities, as well as GSH content, were dramatically lowered ($P < 0.05$) in the testes homogenate of rats exposed to fenvalerate as compared to controls. Additionally, animals given lycopene first and then FEN exhibited a considerable improvement in the previously evaluated indices compared to rats given FEN alone. Furthermore, compared to the control group, rats given lycopene solo showed a significant improvement of these indicators (Tables 3 and 4).

Experimental groups	Parameters		
	TBARS (nmol/g tissue)	H ₂ O ₂ (μ mol/g tissue)	GSH (mmol/mg protein)
Control	17.01 \pm 0.640c	48.65 \pm 0.707c	2.01 \pm 0.049b
Lycopene	13.47 \pm 0.501d	40.12 \pm 1.06d	2.36 \pm 0.061a
Fenvalerate	24.80 \pm 0.522a	68.69 \pm 2.357a	1.04 \pm 0.039d
lycopene + Fenvalerate	20.46 \pm 0.549b	60.38 \pm 1.746b	1.50 \pm 0.038c

Table 3. Effect of lycopene and fenvalerate and their combination on TBARS, H₂O₂, and GSH content levels in rats' testes.

Values are expressed as means \pm SE; $n=7$ for each treatment group. Mean values within a column not sharing common superscript letters were significantly different, $p < 0.05$. Statistically significant variations are compared as follows: Lycopene and fenvalerate groups are compared vs the control group, while the lycopene + fenvalerate group is compared vs the fenvalerate group.

Experiment al groups	Parameters				
	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)	GR (U/mg protein)	GST (μ mol/hr/mg protein)
Control	78.81 \pm 2.81 ^b	8.01 \pm 0.223 ^b	8.51 \pm 0.193 ^c	22.60 \pm 0.715 ^b	0.645 \pm 0.023 ^b
Lycopene	93.30 \pm 3.67 ^a	9.44 \pm 0.264 ^a	10.03 \pm 0.323 ^a	27.36 \pm 0.890 ^a	0.761 \pm 0.030 ^a
Fenvalerate	42.69 \pm 2.01 ^d	4.59 \pm 0.085 ^d	5.09 \pm 0.113 ^d	12.86 \pm 0.344 ^d	0.364 \pm 0.015 ^d
Lycopene + Fenvalerate	60.39 \pm 1.30 ^c	6.26 \pm 0.244 ^c	9.94 \pm 0.298 ^b	19.02 \pm 0.639 ^c	0.510 \pm 0.017 ^c

Table 4. Effect of lycopene and fenvalerate and their combination on the activities of antioxidant enzymes in rat testes.

Values are expressed as means \pm SE; $n=7$ for each treatment group. Mean values within a column not sharing common superscript letters were significantly different, $p < 0.05$. Statistically significant variations are

compared as follows: Lycopene and fenvalerate groups are compared vs the control group, while the lycopene + fenvalerate group is compared vs the fenvalerate group.

Aminotransferases, phosphatases activities, and protein content

The current research demonstrated that the protein content of rat testes decreased when compared to the control. At the same time, serum AST, ALT, ALP, and ACP activities were dramatically enhanced in rats treated with fenvalerate. In addition, animals given lycopene followed by FEN therapy as compared to the FEN group showed modulation in enzyme activities and protein concentration. Supplementing with lycopene did not have any discernible effects on its own (Table 5).

Experimental groups	Parameters				
	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	ACP (U/l)	Protein content (mg/g tissue)
Control	50.35±1.38c	56.89±1.45c	60.85±2.21c	9.59±0.430c	70.22±1.49a
Lycopene	52.95±1.51c	53.00±1.78c	57.00±2.51c	9.93±0.390c	73.00±1.74a
Fenvalerate	68.45±2.76a	77.69±2.630a	84.84±3.19a	13.44±0.466a	42.92±1.49c
Lycopene + Fenvalerate	56.00±0.612b	64.37±1.77b	69.43±2.97b	10.89±0.422b	57.92±1.58b

Table 5. Effect of lycopene and fenvalerate and their combination on serum AST, ALT, ALP and LDH activity and testes protein content in rats.

Values are expressed as means ± SE; n=7 for each treatment group. Mean values within a column not sharing common superscript letters were significantly different, $p < 0.05$. Statistically significant variations are compared as follows: Lycopene and fenvalerate groups are compared vs the control group, while the lycopene + fenvalerate group is compared vs the fenvalerate group.

Expression of the caspase-8 and caspase-3

The expression of caspase-8 and caspase-3 was significantly increased in rats treated with fenvalerate compared to the control group. About the FEN group, rats administered lycopene and then given fenvalerate dramatically reduced the upregulation brought on by FEN. Additionally, rats given lycopene alone showed no significant difference compared to the control group (Table 6).

Experimental groups	Parameters	
	Caspase-3	Caspase-8
Control	1.00±0.04c	1.00±0.06c
Lycopene	0.93 ±0.14c	0.97±0.02c
Fenvalerate	7.84±0.26a	6.82±0.24a
lycopene + Fenvalerate	3.14±0.11b	1.53±0.05b

Table 6. Relative gene expression of caspase-3 and caspase-8 in different groups,

Histological observation of testis

Histopathological investigation of testicular sections from control (G1) and lycopene (G2) groups demonstrated plain testes structure, complete spermatogenesis, and a significant concentration of sperm in the lumen of the seminiferous tubules. In contrast, the testicles of the FEN group had diminished spermatogenesis-differentiated and wild lumen and visibly injured seminiferous tubules (G3). Seminiferous tubules have a damaged epithelial lining, many hyperchromatic spermatogenesis, a loss of differentiated spermatogenesis, necrotic spermatozoa with large lumens, and noticeably dilated interstitial tissue with atrophied Leydig cells. Rats who received both lycopene and FEN (G4) displayed well-differentiated stages of spermatogonia cells as spermatocytes and spermatid, as well as recovering seminiferous tubules surrounded by a thin basement membrane with Sertoli cells and prominent nuclei spermatogenic cells. Blood veins, Leydig cells, and many lymphocytes could be observed in the extensive interstitial tissue, while spermatozoa were apparent in the tiny lumina (Figure 2 and Table 7).

Parameters	Gp1	Gp2	Gp3	Gp4
Disorganized seminiferous tubules	+	++	++++	++
Characterize spermatogenic cells	+++	+++	+	++
- Hyperchromatic	+	+	+++	++
- Necrotic				
- Necrotic spermatocytes	+	+	+++	++
Dilated lumen	-	-	+++	++
Dilated interstitial tissue	+	+	++++	+++
Infiltrating lymphocytes	-	-	+++	++

Mild +, moderate ++, marked +++, sever +++++

Table 7. Histopathological changes in the testes tissue of rats in different experimental groups.

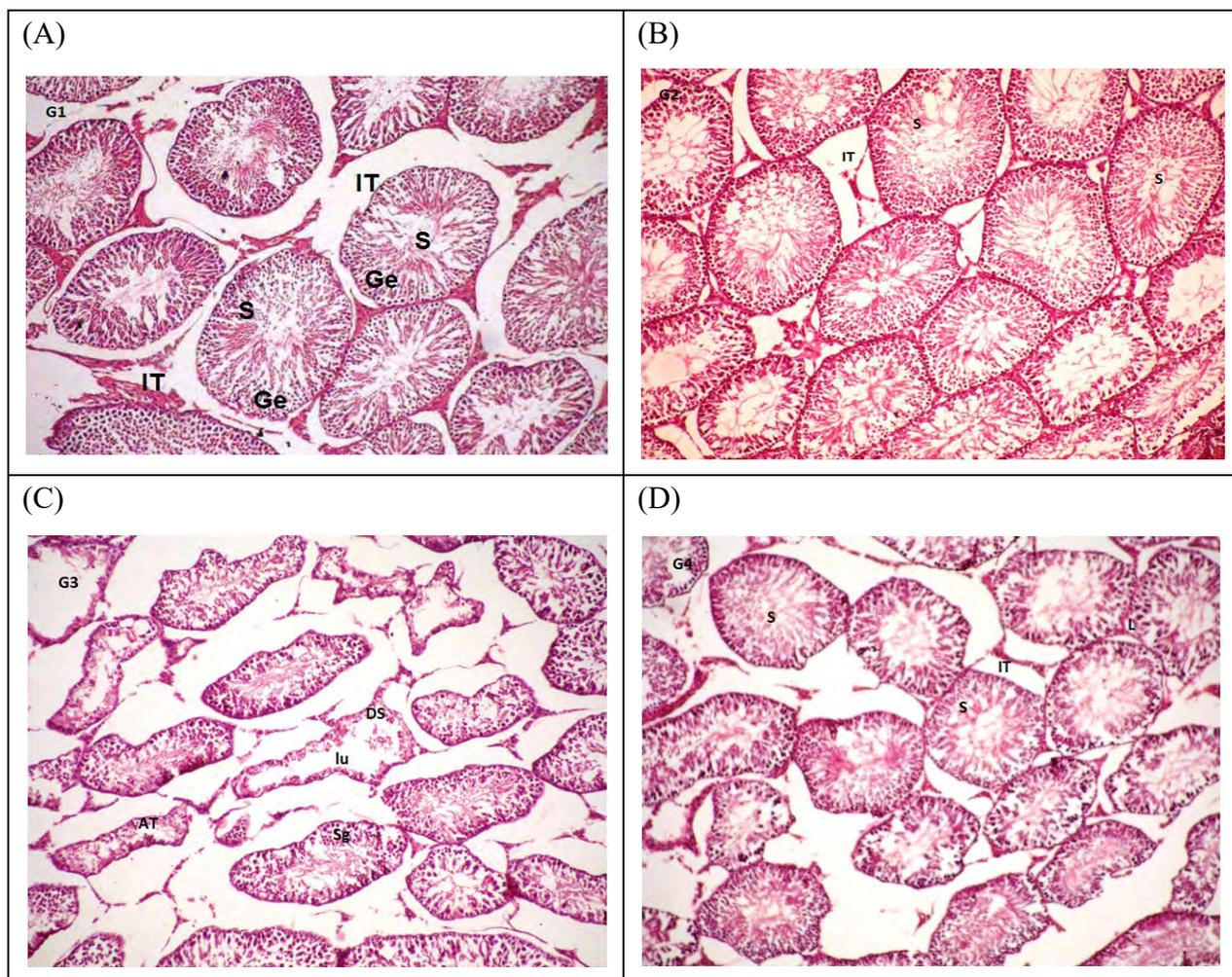


Figure 2. A&B: Rat testes sections in control (G1) and Lycopene (G2) groups revealed the standard structure of seminiferous tubules with a regular cycle of spermatogenesis. **C:** Testes sections of fenvalerate (G3) showed marked destructive seminiferous tubules with reduction of spermatogenesis differentiated (SP) and wide lumen. Marked dilated interstitial tissue and some atrophy of seminiferous tubules (AT). **D:** Testes sections in lycopene + fenvalerate group (G4) showed recovering seminiferous tubules (S) with redistributed lying spermatogenesis cells in different shapes and sizes and marked dilated interstitial tissue (IT) regulated its content. (H&E stain, 100XMagn).

DISCUSSION

It is crucial to find viable therapies for fenvalerate-induced reproductive damage since FEN exposure is a widespread public health issue. Several investigations indicated that lycopene was protective in the testes of rats exposed to contaminants such as polychlorinated biphenyl¹⁹, bisphenol A²⁰, and Benzo [a]pyrene²¹. The observed drop in testosterone levels can be viewed as a bad thing for the quality of sperm. Also, our results show that the testicular tissue uses the increase in FSH and LH levels brought on by FEN treatment as a compensatory mechanism to prevent spermatozoa alterations and cellular damage³. According to the findings of Zhang et al.²², exposure to fenvalerate significantly decreased the quality of semen, which might be connected to apoptosis of germ cells, DNA damage, a drop in testosterone levels, and cellular growth suppression. Fenvalerate also caused spermatogonial cell death and sterility in rats with damaged seminiferous tubules and testicular cells¹⁰. Furthermore, the large polyunsaturated fatty acids in spermatozoa's membranes make them susceptible to oxidative damage²³.

Because pyrethroids affect the hypothalamic-pituitary-testicular axis, they can change the levels of reproductive hormones²⁴. Testicular toxicity appears to be significantly influenced by the testes' capacity to metabolize xenobiotic²⁵. On the other hand, Cytochrome P450 performs a terminal oxidant role in several hydroxylation processes in testicular androgen production. A disruption in androgen metabolism and steroidogenesis caused changes in hormone levels after FEN treatment²⁶. Testosterone is crucial for the beginning and maintenance of spermatogenesis. Hence, its decline was accompanied by a fall in spermatogenesis. Protein kinase A is activated by the binding of LH to the Leydig cells, which stimulates the cellular messenger cAMP, which in turn activates protein kinase A that undergoes a sequence of phosphorylations to activate enzymes required for testosterone production²⁷. In addition, Sertoli cells phagocytose mature sperm in the absence of testosterone²⁸.

The antioxidant defense system protects cells against oxidative damage induced by xenobiotics due to its critical role in preserving the equilibrium of cellular function. According to numerous studies supporting our findings, pyrethroid insecticides like lambda-cyhalothrin and β -cyfluthrin produce free radicals and suppress the activity of antioxidant enzymes *in vivo* and *in vitro*²⁹. A clear indication that FEN had the potential to produce oxidative damage was the observed rise in TBARS and H₂O₂ levels as well as the failure of antioxidant enzyme activities. An early effect of oxidative stress, manifested by rising TBARS and H₂O₂ levels, is a discernible decrease in GSH levels in testes homogenate. Type II pyrethroids are famed as secondary alcohol esters that have a cyano group at the α -carbon of the alcohol moiety³⁰. Therefore, the liberation of the unstable cyanohydrins may cause FEN poisoning. The breakdown of cyanohydrins into cyanides and aldehydes could serve as free radicals source²⁹. The current finding is consistent with earlier research that suggested the oxidative damage brought on by pyrethroids might be due to their lipophilicity, which allowed them to enter cell membranes 31 quickly.

Redox cycles of GSH play a crucial role in cellular antioxidant defenses and are essential for tissues to protect themselves against ROS damage. They take part in removing ROS by serving as a substrate for different enzymes like GPx and a nonenzymatic oxygen radical scavenger³². GSH might be created from GSSG by a reaction catalyzed by GR, or it could be formed independently, and oxidants, antioxidants, and growth factors³³ control this synthesis. GPx is a crucial enzyme for cellular antioxidant defense because it contains selenocysteine³⁴. Under oxidizing circumstances, GSH is quickly converted to GSSG, which may then interact with the SH group of proteins to generate mixed disulfide via thiol/disulfide exchange. In the current study, oxidative stress caused by FEN exposure included suppression of the antioxidant defense system and increased LPO. Antioxidant enzymes play a crucial role in protecting living organisms from the harm caused by free radicals. Slight differences in the physiological levels of these antioxidant enzymes may significantly impact the resistance of cellular constituents to oxidative injury. Together with the nonenzymatic antioxidant GSH, these antioxidant enzymes work to disarm free radicals and stop oxidative cell damage³⁵. The current findings showed that FEN significantly reduced the activities of CAT and SOD. There are two possible reasons for this drop. The first entailed the direct inhibition of SOD and CAT by FEN and the second implicated consumption throughout the breakdown of the high level of H₂O₂ and other free radicals or the inhibition of the enzyme activities by them. Additionally, the considerable reduction in the activity of GST in rat testes following FEN treatment may signify scanty detoxification and is likely connected to the reduction in GSH levels as it catalyzes the binding of a range of electrophilic substrates to the GSH thiol group, resulting in minimal toxic forms³⁶. Accordingly, additional investigations have demonstrated that the overproduction of ROS caused by pyrethroid might upset the delicate balance between ROS production and antioxidant defenses²²

In the FEN-treated group, the observed increase in AST, ALT, AcP, and ALP activity was amply

demonstrated, and they were discharged into the blood following cellular injury³⁷. Lipid peroxidation weakens the permeability of cellular membranes, allowing cytoplasmic enzymes to leak out.³⁸ According to Prasanthi et al.³⁹, fenvalerate can cause cellular damage and show several significant physiological disturbances, consistent with the current investigation. The biosynthesis of energy macromolecules, detoxification, and metabolic activities depend on phosphatases (ALP, ACP). The observed alteration in ALP and ACP activity agrees with the previous finding of Rahman et al.⁴⁰ due to phosphorothionate administration. Sugár et al.⁴¹ state that the acid phosphatase enzyme is essential for various functions, such as “cellular metabolism, autolysis, differentiation, and dilatation of blood capillaries between seminiferous tubules.” Additionally, the increase in ALP activity in the testes may be brought on by cellular necrosis, which results in enzyme seepage into the bloodstream⁴⁰. Lack of cellular function and alterations in the metabolism of protein is associated with a decrease in protein content⁴². A histopathological study of the testes of FEN-exposed rats revealed abnormal architecture as a result of oxidative toxicity that caused apoptosis of germ cells, faint sperm quality, and modification in function and integrity of the gonads. In agreement, related research showed structural damage in pesticide-treated rat testes⁴³. Additionally, according to Agarwal and Allamaneni (2006)⁴⁴, the degeneration of germ and Leydig’s cells observed in the seminiferous tubule and interstitial tissues of the rats treated with fenvalerate was caused by ROS leading to apoptosis, which aids in the elimination of apparent germ cells from the testes preventing their output via caspases stimulation⁴⁵. Moreover, prolonged exposure to pyrethroids, even at dosages that are significantly lower than the residual amounts found in the food consumed, will seriously impair both general physiological processes and reproductive function⁴⁶. Lycopene is the most potent carotenoid antioxidant, shielding cells against ROS damage⁴⁷. It is also a potent scavenger of $1O_2$ and other exciting species. Energy from $1O_2$ is transferred to the lycopene molecule during $1O_2$ quenching, changing it into the energy-dense triplet form. So, lycopene may offer protection against DNA, lipid, and protein oxidation *in vivo*⁷. Regarding defending the cell from the impacts of hydrogen peroxide and nitrogen dioxide radicals, lycopene has been proven to possess potent antioxidant activity among carotenoids.

Additionally, it has been discovered that lycopene has anticancer characteristics *in vitro* and *in vivo* and lessens the consequences of oxidative stress⁸. The current findings demonstrated that therapy with lycopene alone resulted in significant modifications in some of the measured parameters and a significant increase in the antioxidant defense system. On the other hand, lycopene induced worthy amendments in lipid peroxidation marker levels in rats treated with FEN. Lycopene’s potential as an antioxidant against xenobiotics may cause its positive effects⁷. Additionally, the improvement in sperm quality is consistent with previous reports that lycopene has been proposed as a substitute therapy for sperm damage following chemotherapy (18). Ma et al. (2018)⁴⁸ hypothesized that supplementation with lycopene reversed the harmful effects of BPA on the reproductive system in a study on young mice. Furthermore, according to Boeira et al. (2015)⁴⁹, lycopene likely mediates antioxidant and anti-inflammatory actions. As a result, it may have assisted in reversing the impairment of testicular functions caused by zearalenone and permitted testosterone levels to rise once more. The observed reduction in the concentration of free radicals that lycopene prevents is connected to the reported induction of antioxidant enzymes. Additionally, reduced glutathione is a crucial nonenzymatic antioxidant essential for preserving cell integrity because of its thickening properties and role in cell metabolism. According to Bose and Agrawal (2007)⁵⁰, lycopene administration increased GSH levels, which are crucial for maintaining high GPx and GST activities. Lycopene also moderated the harmful effects of FEN due to its high antioxidant activity and free radical scavenging capacity¹⁹. Increased GSH content detoxifies reactive

chemicals through the glutathione redox cycle and guards cellular proteins against oxidation. It can be concluded that lycopene's antioxidant characteristics may be responsible for its ability to reduce the testicular toxicity caused by FEN successfully.

CONCLUSIONS

The current finding demonstrated that fenvalerate caused rat testicular injury. Apoptosis, hormonal abnormalities, oxidative stress, issues with enzymatic and nonenzymatic antioxidants, and poor sperm quality are all possible effects. Additionally, before fenvalerate treatment, lycopene supplementation modifies its harmful effects by enhancing antioxidant status, reducing ROS production, and improving testicular functioning due to its potent antioxidant activity. So, lycopene may be a potential agent with a protective effect that can be used to repair the testis damage caused by fenvalerate in rats.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the College of Agriculture, University of Kerbala, Iraq, for their continuous support and the Institute of Graduate Studies and Research, Alexandria University, Egypt, where the research work was done.

Author Contributions:

Jebur A.B.: Conceptualization, Practical Work, Data generation, Writing - Original Draft, Publication.

Raghda AE: Conceptualization, Practical Work, Data Analysis, Manuscript revision.

El-Demerdash F.M.: Conceptualization, Methodology, Manuscript revision, and investigation.

Funding: "This research received no external funding".

Institutional Review Board Statement:

Ethical approval: This manuscript includes animal experiments, and the animal handling, housing, and care, as well as the experimental protocol, were approved by the Animal Care and Ethics Review Committee at the Faculty of Medicine, Alexandria University, Alexandria, Egypt and according to guidelines of the National Institutes of Health.

Informed Consent Statement: Any research article describing a study involving humans should contain this statement "Not applicable." for studies not involving humans.

Data Availability Statement

The data used to support the findings of this study are included in the article.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

- 1- Sharma, P., Huq, A. U., & Singh, R. Cypermethrin induced reproductive toxicity in male Wistar rats: Protective role of *Tribulus terrestris*. *J. Environ. Biol.* 2013; 34(5): 857
- 2- Meeker, J. D., & Boas, M. Pesticides and Thyroid Hormones. *Encyclopedia of Environmental Health* 2011; 428–437. doi:10.1016/b978-0-444-52272-6.00589-4
- 3- Arena, A. C., Fernandez, C. D., Porto, E. M., Bissacot, D. Z., Pereira, O. C., & Kempinas, W. G. Fenvalerate, a pyrethroid insecticide, adversely affects sperm production and storage in male rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 2008, 71(23): 1550–1558. <https://doi.org/10.1080/15287390802392024>
- 4- Zhang, H., Wang, H., Ji, Y. L., Zhang, Y., Yu, T., Ning, H., Xu, D. X. Maternal fenvalerate exposure during pregnancy persistently impairs testicular development and spermatogenesis in male off-spring. *Food Chem. Toxicol.* 2010; 48(5): 1160–1169. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.02.003>
- 5- El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I., Kedwany, F. S., & Baghdadi, H. H. Role of alpha-tocopherol and beta-carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hemato-biochemical parameters, and semen quality of male rats. *Journal of J. Environ. Sci. Health., Part B* .2004; 39(3):443–459.
- 6- Xu, Y. R., Dong, H. S., & Yang, W. X. Regulators in the apoptotic pathway during spermatogenesis: Killers or guards? *J. Gene.* 2016; 582(2): 97–111. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.007>.
- 7- Torrance L, Cowan GH, McLean K, MacFarlane S, Al-Abedy AN, Armstrong M, Lim TY, Hein I, Bryan GJ. Natural resistance to Potato virus Y in *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Theoretical and Applied Genetics*. 2020 Mar ;133:967-80.
- 8- Velmurugan, B., Santhiya, S. T., & Nagini, S. Protective effect of S-allylcysteine and lycopene in combination against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity. *Pol. J. Pharmacol.* 2004; 56(2):241–246.
- 8- Bast, A., & Haenen, G. R. Antioxidant effects of carotenoids. *Int J Vitam Nutr Res.* 1998; 68(6):399–403.
- 10- Matos, H. R., Capelozzi, V. L., Gomes, O. F., Di Mascio, P., & Medeiros, M. H. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 396(2): 171–177. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2611>.
- 11- Adamkovicova, M., Toman, R., Martiniakova, M., Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2016;14-42 doi: 10.1186/s12958-016-0177-6.
- 12- Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Sci.* 2000;151: 59-66.
- 13- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82: 70-77.
- 14- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247:3170-3175.
- 15- Aebi H. Catalase in vitro. In: Packer L, ed. *Methods in Enzymology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers; 1984:121-126.
- 16- Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr.* 1974; 104:580-587.
- 17- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249:7130-7139.
- 18- Bancroft, J. D., & Stevens, A. (1990). *Theory and practice of histological techniques*, 3rd ed. London, UK: Churchill Livingstone. 1990; No. of pages: 740. ISBN: 0 443 03559 8
- 19- Ateşşahin, A., Karahan, I., Türk, G., Gür, S., Yılmaz, S., & Çeribaşı, A. O. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod. Toxicol.* 2006; 21(1):42–47
- 20- Tamilselvan, P., Bharathiraja, K., Vijayaprakash, S. and Balasubramanian, M.P. Protective role of lycopene on bisphenol A induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats, *Int J Pharma Bio Sci.* 2013; 4: 131-143.
- 21- Xu A, Wang J, Wang H, Sun Y, Hao T, Protective effect of lycopene on testicular toxicity induced by Benzo [a]pyrene intake in rats, *Toxicology.* 2019; doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152301>
- 22- Zhang J, Hu Y, Guo J, et al. Fenvalerate decreases semen quality in puberty rat through germ cell apoptosis. *Andrologia.* 2018; 50: e13079. <https://doi.org/10.1111/and.13079>

- 23- Kumar, R., Gautam, G., Gupta, N.P., Drug therapy for idiopathic male infertility: rationale versus evidence. *J. Urol.* 2006; 176: 1307-1312.
- 24- Lafuente, A., The hypothalamic-pituitary-gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food Chem. Toxicol.* 2013;59: 395–404.
- 25- DiBiasio K. W., Silva M. H., Shull L. R., Overstreet J. W., Hammock D. B. and Miller M. G. Xenobiotic metabolizing enzyme activities in rat, mouse, monkey, and human testes. *Drug Metab. Dispos.* 1991;19:227-32.
- 26- Saad, A.B., Rjeibi, I., Alimia, H., Ncibd, S., Smida, A., Zouari, N., Zourgui, L., Lithium induced, oxidative stress and related damages in testes and heart in male rats: The protective effects of *Malva sylvestris* extract. *Biomed. Pharmacother.* 2017;86:127–135.
- 27- Cheng, J., Watkins, S.C., Walker, W.H.. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells. *J. Endocrinol.* 2007; 148:2066- 2074.
- 28- Davey, R.A., Grossmann, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bed-side. *Clin. Biochem. Rev.* 2016; 37:3-15.
- 29- Jebur, A.B., El-Sayed, R.A., El-Demerdash, F.M. Ocimum basilicum Essential Oil Modulates Hemato-toxicity, Oxidative Stress, DNA Damage, and Cell Cycle Arrest Induced by β -cyfluthrin in Rat Liver. *Front. Pharmacol.* 2022; 12:784281. doi: 10.3389/fphar.2021.784281
- 30- Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML. Mech-anisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology.* 2002; 171:3–59.
- 31- Nasuti C, Cantalamessa F, Falcioni G, Gabbianelli R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology.* 2003; 191:233–244.
- 32- Tsukamoto M, Tampo Y, Sawada M, Yonaha M. Paraquat induced oxidative stress and dysfunction of the glutathione redox cycle in pulmonary microvascular endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 178:82–87.
- 33- MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mol Med.* 2001; 7:55–62.
- 34- Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57:1825–1835.
- 35- Bal R, Naziroglu M, Turk G, Yilmaz O, Kulo € glu T, Etem E, Baydas G. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of devel-oping male rats. *Cell Biochem Funct.* 2012;0:492–499.
- 36- Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>.
- 37- Ali, A. F. .; Mohammed, T. T. .; Al-Bandar, L. K. . The Role Of Optifeed®, Veo® Premium, And Oleo-biotec® In Diets For Improvement Of The Production Performance Of Male Broilers In Heat Stress. *JLSAR* 2022, 3, 32-36.
- 38- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology.* 1995; 104:129–140.
- 39- Prasanthi K, Muralidhara, Rajini PS. Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following in vitro exposure to fenvalerate and its metabolite. *Toxicol In Vitro.* 2005;AQ5 19:449–456.
- 40- Rahman, M.F. Siddiqui, M.K. Jamil, K. Acid and alkaline phosphatase activities in anovel phosphorothi-onate (RPR-11) treated male and female rats, Evidence of doseand time-dependent response, *Drug Chem. Toxicol.* 2000; 23 : 497–509.
- 41- Sugr, J. Tóth, K. Csuka, O. Gti, E. Somfai-Relle, S. Role of pesticides in hepatocarcinogenesis, *J. Tox-icol. Environ. Health.* 1979;5 : 183–191.
- 42- El-Demerdash, F.M. Jebur, A.B. Nasr, H.M. Hamid, H.M. Modulatory effect of *Turnera diffusa* against testicular toxicity induced by fenitrothion and/or hexavalent chromium in rats, *Environ. Toxicol.* 2019;34: 330–339.
- 43- Kenfack A, Ngoula F, Dzeufiet PDW, et al. Persistence of the reproductive toxicity of chlorpiryphos-ethyl in male Wistar rat. *Asian Pacific .J Reprod.* 2015; 4:37-40.

- 44-Agarwal A, Allamaneni S. Oxidative stress and human reproduction. In:Singh K, ed. Oxidative Stress, Disease and Cancer. Singapore: Mainland Press. 2006; 687-703.
- 45- Almeida, C., Correia, S., Rocha, E., Alves, Â., Ferraz, L., Silva, J., ... Barros, A. Caspase signalling pathways in human spermatogenesis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2013; 30(4): 487–495. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9938-8>
- 46- Ravula AR, Yenugu S. Effect of oral administration of a mixture of pyrethroids at doses relevant to human exposure on the general and male reproductive physiology in the rat. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021; Jan 15;208:111714. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111714. Epub 2020 Dec 1. PMID: 33396045.
- 47- Mohammadzadeh S, Kiani A, Amiri M. Lycopene modulates hepatic toxicity and testis injury induced by etoposide in male rats. *F S Sci.* 2022; Aug 5:S2666-335X(22)00049-0. doi: 10.1016/j.xfss.2022.07.005. Epub ahead of print. PMID: 35940575.
- 48- Ma, S., Li, R., Gong, X., Shi, W., & Zhong, X. Lycopene reduces in utero bisphenol A exposure-induced mortality, benefits hormones, and development of reproductive organs in offspring mice. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018; 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2395-2>
- 49- Boeira, S. P., Funck, V. R., Borges Filho, C., Del’Fabbro, L., Gomes, M. G. d., Donato, F., ... Furian, A. F. Lycopene protects against acute zearalenone-induced oxidative, endocrine, inflammatory and reproductive damages in male mice. *Chem.-Biol. Interact.* 2015; 230:50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.02.003>
- 50- Bose KS, Agrawal BK. Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in coronary heart disease. *Singapore Med J.* 2007;48:415–20.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Ali B. Jebur; Raghda A. El-Sayed; Fatma M. El-Demerdash .Lycopene modulates testicular injury, oxidative stress, and caspases upregulation induced by fenvalerate in male rats. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 76. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.76>

Publisher’s Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Some histological effects of Bisphenol-A on some reproductive organs in male adult rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)

Manar Al-Murshidi ¹, Walaa salih Hassan ², Wuhood Hamza Muttaleb ^{3,*}

¹ College of Science for Women/ University of Babylon. Iraq

² College of Science/ University of Babylon. Iraq

³ College of Science for Women/ University of Babylon Iraq.

*Correspondence: manarbio2@gmail.com

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.77>

ABSTRACT

Bisphenol-A (BPA) is a broadly used substance in our environment. The current study was established to investigate the potentially toxic effects of BPA in the histology of adult male albino rabbits' reproductive organs. 45 adult male rabbits were subdivided into three groups. Group 1 orally received standard saline solution daily (proposed as a negative control); Group 2 received (0.5 ml/day) of olive oil orally daily (offered as a positive control); and the third Group, 3 rabbits, were treated orally with a dose of 25mg/Kg BW of the BP-A which dissolved in olive oil for 30 days. Tissue specimens from epididymis, testis, seminal vesicles and prostate were collected for histological examination. Blood samples were collected for serum hormone level evaluation. Results showed that BPA caused a significant decrease in testosterone, Luteinizing hormone, Follicle stimulating hormone, and a significant increase in estradiol and prolactin, along with some histopathological alterations in the epithelial and connective tissues of all the organs of studied animals. In conclusion, BPA induced hormonal disturbances in some hormones of the reproductive pituitary axis and histologic and toxic effects on the histology of all reproductive organs.

Keywords: Bis-Phenol A; reproductive hormones; testis; epididymis; accessory sex glands; histology.

INTRODUCTION

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) could affect human and animal endocrine coordination, comprising their effects on the synthesis of hormones, secretion, and metabolism in the living bodies. One such chemical was Bisphenol -A (BP-A), which has more and more concerns in the scientific communities due to its widespread usage, daily exposure, and potentially harmful effects on human health ^{1,2}. BP-A is constituted of polycarbonate and epoxy resins, which may be used as the lacquer lining of food and beverage cans, drink containers, baby bottles, and some composites and dental sealants. Despite their lifestyles, many people were diagnosed as having BP-A metabolites in their urine ². Bisphenol A (BPA) is an estrogenic endocrine disrupter substance through its direct effects on binding to classic cell membrane estrogen receptors and activating it ³. It has been shown that bisphenol A induces different pathological problems such as cancers, neurological disorders, behavioral defects, abnormalities in liver enzymes, cardiovascular diseases, and type 2 diabetes. ⁴. Bisphenol A was associated with male reproductive abnormalities in sperm morphology and motility, sperm count reduction, and testicular lesions ⁵.

MATERIALS AND METHODS

Materials used in the present study were Bisphenol -A [CAS No. 80-05-7], prepared from Sigma–Aldrich Inc. German, in the form of crystalline white powder. hormones were assayed by (ELIZA kit); an enzyme-linked immune-sorbent assay kit [IB79174, IBL-America., Minneapolis, Minnesota., USA].

Experimental design

Forty percent healthy male adult rabbits with an average weight of 2500 ± 250 grams at eight months old. They were obtained from the laboratory of the animal house. Animals were kept in wide-ventilated stainless-steel animal cages under the prevalent environmental circumstances at room temperature of $(25 \pm 2^\circ\text{C})$ and an illumination period of 12 h-light 12 h-dark, with free pathogens conditions. Rabbits' balanced diet comprises carrots, vegetables, pellets, and water. Before the experiment, rabbits were acclimatized to the experimental conditions for at least one week. All rabbits were cared for according to the standard guides and ethics for the care and use of laboratory animals. Rabbits were equally divided into three groups, each containing fifteen animals. In the first Group, 1 rabbit received the usual food [without any additives] and received normal saline via intragastric tube daily (negative control); Group 2 orally received olive oil via intragastric tube daily (0.5 ml/day), it is proposed as positive control, while third Group, 3 rabbits were received bisphenol A in a dose of 25 mg/kg of the body weight for 30 days orally, that dissolved in olive oil via intragastric tube ⁵.

Biochemical study

Blood samples were obtained from the experimental animals and centrifuged for 15 minutes at 3000 rpm to estimate hormone levels in serum. Levels were assessed by [ELIZA enzyme-linked immunosorbent assay kit], [IB79174, IBL-America, Minneapolis, Minnesota, USA].

Histological study

Experimental rabbits were anesthetized by the use of diethyl ether through inhalation. Testis, seminal vesicles, prostate, and epididymis were excised, fixed in 10% formalin buffer for 6 hours, then processed at 5 μm paraffin stained with Hematoxylin and Eosin stain(H&E) ⁶.

Statistical analysis

Levels of serum testosterone hormone were assessed and statistically analyzed using (one-way analysis of variance test) ANOVA and LSD. The data were expressed as Mean \pm SD at a significant P value of < 0.05 .

Ethical approval

The experiment was carried out according to the guidelines laid down by the International Animal Ethics Committee or Institutional Ethics Committee and by local laws and regulations; approval was obtained on 17/8/2022 with number 332.

RESULTS

Biochemical results

Results exposed a non-significant difference ($P > 0.05$) in serum testosterone, LH, FSH, Prolactin and Estradiol levels of group 1 (negative control) as compared to group 2(positive control). The levels of serum testosterone, LH, and FSH of the experimental Group 3 animals that treated with BPA were showed a significant decrease ($P < 0.001$) when compared with the first treated Group 1 and Group 2, as elucidated in [Table1]. Levels of prolactin and estradiol were inversely increased due to Bis-PA administration.

Group	Group1	Group2	Group3	P value
Mean ± SD.				
Testosterone	5.67± 0.7	5.12 ±0.24	3.77 ±0.5	0.04
Luteinizing hormone	2.05± 0.4	1.73 ±0.03	1.08±0.3	0.1
Follicle Stimulating Hormone	1.98± 0.3	1.70 ±0.16	1.19± 0.4	0.1
Estradiol	53.73±3.1	51.11±2.7	119.22±15.4	0.02

Table 1. Serum hormone levels of the experimental and control groups.

Histological results

The histological examination of the animals of groups 1 and 2 indicated the similar histological structures of all the examined reproductive organs studied: the prostate, epididymis, testis, and seminal vesicles. Testis of the control groups (1 & 2) of the adult male rabbits showed an intact, well-developed interstitium between the regularly arranged seminiferous tubules, with sperm-filled lumens. The lumens were lined by stratified epithelial tissue that was built from sperm line cells, beginning with spermatogonial cells that appeared as round small cells that had round nuclei. Primary spermatocytes were looked at as large, round nuclei organized as single or double layers. Spermatids were rounded, small, and had pale nuclei. Then, mature sperms were located inside the tubule's lumens. Sertoli cells were found with their triangular nuclei attached to the basement membranes of the testicular tubules. The testis of the rabbits treated with Bisphenol- A [group 3] was explained by a widening in the tissue of the interstitium along with a germinal epithelium sloughing, causing a loss in the typical arrangement of seminiferous tubules. Blood vessels of the interstitial spaces were congested and dilated, invaded with inflammatory monocellular cells. The seminiferous tubule lumens appeared with tiny debris of spermatids and degenerated Sertoli cells containing pyknotic nuclei. The germinal epithelium was degenerated, spaced, and separated from the basement membrane. The cauda of the epididymis of both control groups (1 and 2) were circular tubules -lined with pseudostratified epithelium of three cell types; basal, principle, and clear cells - separated from each other by the interstitial tissues with some cells of connective tissue and smooth muscles fibers along with a large number of sperms in their lumen [Fig. 3B].

The histological observations of the caudal portion of the epididymis of the BP-A- A treated rabbits [group 3] showed flared interstitial spaces with thickness in smooth muscle layers and connective tissue, almost with congestion of the blood vessels altogether with inflammatory cells. Histological results also showed a loss of the tubule's circular shape and irregularity, with altered epithelium from columnar to flat hypertrophic cells toward the lumen; with vacuolated light cytoplasm, principal cells showed degeneration of their stereocilia.

The prostate of control groups (1 & 2) of the adult male rabbits were formed by acini filled with prostatic secretions and embedded in the fibromuscular stroma that contains blood capillaries. The prostatic acini were an arrangement of simple columnar epithelial cells, the height of the lining epithelium was varied, inconsistent with the prostate functional state. The histological examination of BPA-treated animal prostates (group 3) showed hyperplasia in the prostatic stroma and acini lining epithelium. The prostatic acini also showed infiltration with small dark blue inflammatory mononuclear cells inside the lumen and around the acini, and there were papillary folds. Blood vessels of the capsule of the prostate were congested and hemorrhaged.

Seminal vesicles of the rabbits of control groups (1 & 2) showed branched acini with pseudostratified columnar epithelium and smooth muscles between the branches. Meanwhile, animals of group 3 exhibited a thickening in the acinar epithelium and hyperplastic nodules. The blood vessels of the tissue between the branches were congested with edema and inflammatory cells.

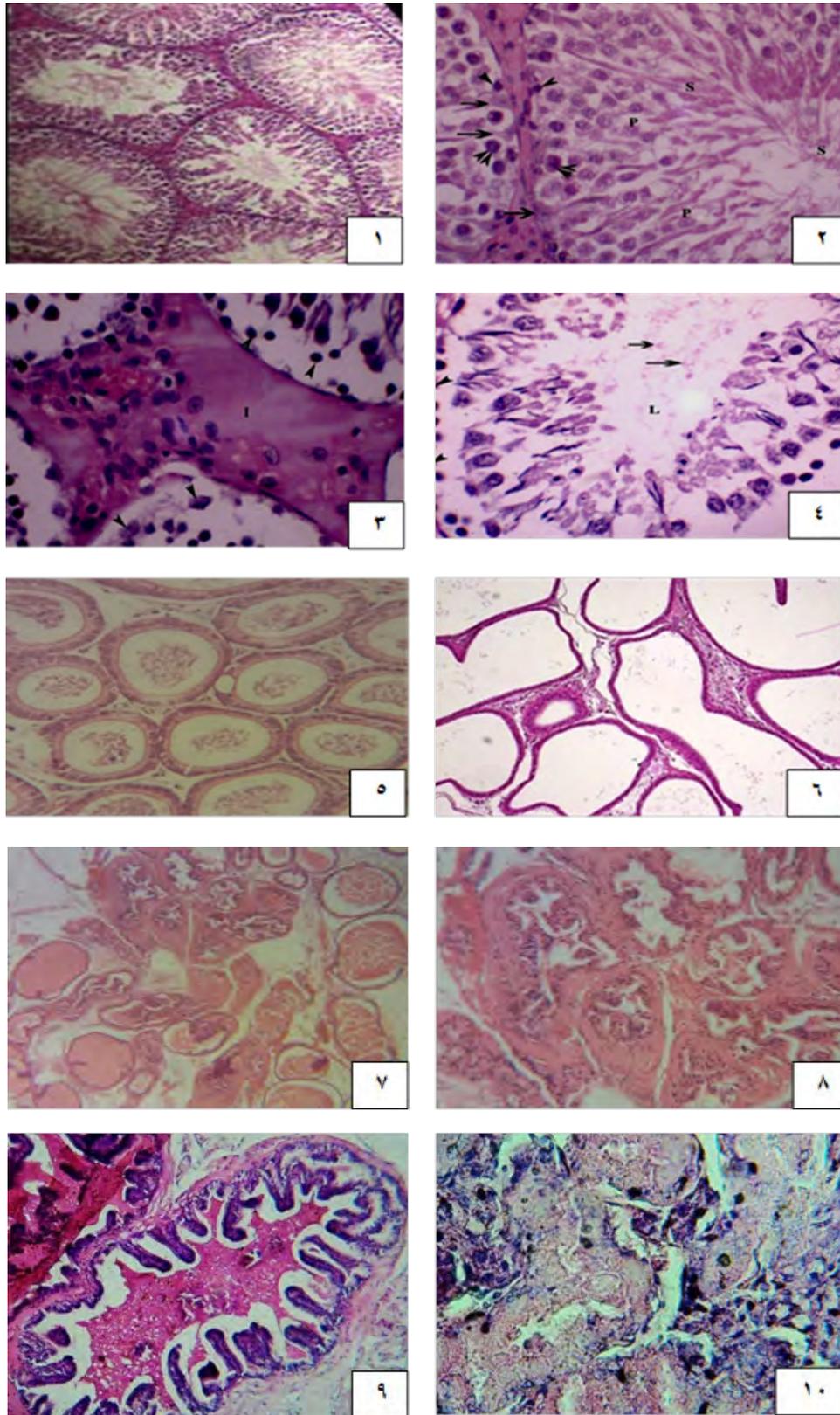


Figure 1. A cross-section of the control rabbit testis shows intact seminiferous tubule architecture with intact spermatogenesis. (2): Cross section of control rabbit testis showing the seminiferous tubules lumen, with spermatogonia resting on the basal membrane, appeared as round small cells (arrowheads), primary spermatocyte (two arrowheads), spermatids (P), Sertoli cells and spermatozoa (s). (3): Cross section of BP-A treated rabbit testis showing the expansion of the interstitium (I) between the testicular tubules and sloughing of the germinal epithelium (arrowheads). Congested blood vessels (star) and

inflammatory cells (arrow). (4): Cross section of Bisphenol-A treated rabbit testis showing few remains of spermatids (arrows) in the lumen with disintegrated Sertoli cells exhibiting pyknotic nucleus, (arrowheads (5): Cross section of control rabbit epididymis showing the intact tubules separated by interstitium. with lumen filled with sperms. Figure (6): Cross section of Bisphenol-A treated rabbit testis showing irregularity in the shape of the tubules with widening of the interstitial spaces and thickening of epithelium and smooth muscle tissue with increased fibrotic tissues, interstitial spaces with infiltration of connective tissues and inflammatory cells with low epithelium. (7): Cross section of control rabbit prostate with a regular size acinus, with secretions in lumen (8): Cross section of BP -A treated rabbits showing hyperplasia. There is a thick stroma surrounding the acini with fibrosis and hypertrophy, monocellular inflammatory cells infiltration, and disassembled stroma (9): Cross section of the seminal vesicle from control rabbits displaying the branched acini with secretion in the lumen. (10): Cross section of the seminal vesicle from BP-A treated rabbit exhibiting coiled hyperplastic nodules with congested blood vessels and some inflammatory cells.

DISCUSSION

Several factors, such as endocrine disrupters and toxic elements, can affect spermatogenesis⁷. The decreased testosterone levels might be caused by the reducing effect of Bis-PA on Leydig cells; actually, their count is 8,9, where the appropriate cause is the effect of Bis-PA on the enzyme α -reductase which converted testosterone into BHT. The current results show that the rabbits treated with Bisphenol A significantly decreased testosterone hormone levels. These findings were confirmed by^{15,16}. However, this diverges with the findings of 17, who explained that serum testosterone levels do not alter, although BP-A could affect fertility. The decrease in LH levels might be caused by the reduced sensitivity of pituitary gonadotropine cells¹⁰, or low levels of testosterone may cause it via the antiandrogenic action of Bis-PA⁸. The decreased FSH level could be caused by 17 B-estradiol that inhibits the secretion of gonadotropins from the pituitary due to the estrogen mimic action, as documented by¹¹. Going ahead with estradiol Bis-PA could cause hyperprolactinemia through its binding with estrogen receptors in both the anterior and posterior pituitary. It could also cause an increase in Prolactine gene expression and release,^{12,13}.

The recent study exhibited the disorganization of seminiferous tubules of BP- Treated rabbits with germinal epithelium sloughing; those outcomes were granted with¹⁴ findings attributed to the increasing smooth muscle movement because of the inflammation that affects the epithelial tissue responses and then causing disproportionate stretch of the epithelial lining, through the release of chemotactic substances⁸. In the current study, results explained a dis-organization of the epididymal tubules with cellular hypertrophy of the BP-A- A treated rabbits, the shape of the epithelial layer was conformed from columnar to flat; the results were in contract with¹⁸ results, who related the cause to the defense mechanisms toward the exposure to the BP- A forging substance. Similarly,¹⁹ were referred to the phagocytosis activity of the epididymal principal cells against the rubbish of any forging substance. The halo cells were presumed to be lymphocytes that acted as an immunological function of the male reproductive system²⁰. Clear cells were responsible for hunting the damaged immature sperms and absorbing droplets of sperm cytoplasm²¹.

Histological examination of the prostate sections of BPA treated Group (3) revealed a presence of hyperplasia with hemorrhage in the capsule of the prostate, which was elucidated by^{22,24,25}, who stated that the prostate was sensitivity to the synthetic and natural estrogen hormones and altered the prostate development and differentiation. Seminal vesicles of the Group (3) that were treated with BPA showed thickness in the acini epithelium with congested blood vessels as elucidated by⁸, who stated that any injury of the male reproductive system can cause differentiation of cells by mitosis, and then growth of the new hyperplastic epithelium. These findings agreed with²³, who stated that the oxidative stress in tissues also could be seen because of the exposure to BP- A through its changing the iNOS expression, which downregulated the expression of testicular androgens receptors.

CONCLUSIONS

The study investigated the effects of bisphenol A (BPA) on the reproductive system of male rabbits. The results showed that BPA exposure significantly reduced testosterone levels, sperm count, and sperm motility. It also caused disorganization of the seminiferous tubules, epididymal tubules, and prostate and increased the size of the seminal vesicles. These findings suggest that BPA is a potential endocrine disruptor that can adversely affect male reproductive health. Overall, the study provides strong evidence that BPA exposure can have a significant impact on male reproductive health.

Further research is needed to fully understand the mechanisms by which BPA affects male reproductive health. Public awareness campaigns should be undertaken to educate people about the potential dangers of BPA exposure. Regulations should be implemented to reduce the use of BPA in products that come into contact with food and beverages.

Author Contributions: methodology, Manar Al-Murshidi, Walaa salih Hassan; Conceptualization, 2, Wurood mutual;

Funding: This research received no external funding

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the University of Babylon.

Acknowledgments: The authors thanked the College of Sciences for Women for the materials used for experiments).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of the College of Sciences for Women

REFERENCES

1. Calafat A.M., Ye X., Wong L.-Y., Reidy J.A., Needham L.L. Exposure of the us population to Bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ. Health Perspect.* **2008**, 116:39-44.
2. Li D.k, Zhou Z, Miao M, He Y, Wang J, Ferber J, Herrinton LJ, Gao E, Yuan W .Urine bi-sphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil steril.* **2011**, 95: 625-630
3. Quesada I, Fuentes E, Visoleon MC, Ripoll C, Nadal A . Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17 β -estradiol rapidly activate the transcription factor CREB. *FASEB J*, **2002**, 16: 1671-1673.
4. Richter C.A, Birnbaum LS, Farabollini F, New-Bold R.R, Rubin B.S, Talness C.E, Vandenberg J.G, Walserkuntz, Vom Saal F.S . In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*, **2007** ,24: 199-224.
5. Wisniewski P, Romano R.M, Kizys M.M, Oliviera K.C, Kasamatsu T, Giannocco G, Chiamolera M.I, Diasdasilva M.R, Romano MA. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Toxicol*, **2015** , 2 : 1-9.
6. Shawkat, S. S.; Mohammed, A. I.; Rashid, S. A. .; Abdulateef, S. M. Effect Of Some Unfavorable Behavioral Traits On The Behavior Of Broiler Chicks. *JLSAR* 2023, 4, 1-8.

7. Vandenberg L.N, Chahoud I, Heindel J.J, Padmanabhan V, Paumgarten F.R, Schoen-Felder G .Urinary, circulating, and tissue bio-monitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*, **2010** ,118: 1055-1070.
8. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>.
9. Chitra, K.C.; Latchoumycandane, C. and Mathur, P. P. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicol.*, **2003**, 185 ;: 119-127.
10. Benson ,B ; Deborah S., Mark R. S., Alfred M. C., Alvaro T. F., Patrick J. F., Monika K. K., Jean M., Pamela M.A., Eric V. C., Melissa B., Manya C., Daniel G. H.. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol.* **2004**, 15: 3408-19.
11. Catherine A.R. , Linda S.B., Retha R.N., Beverly S.R.,Chris E, John C.V. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*, **2007**, 24:199–224
12. Brotons J.A, Olea-Serrano M.F., Villalobos M, Pedraza V, Olea N . Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* , **1995**,103:608–612.
13. Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect.*, **1996**, 104:298–305
14. Zhang Hang C, Wang A, Sun X, Li X, Zhao X, Li S, MA A .Protective effects of lycium barbarum polysaccharides on testis spermatogenic injury induced by bisphenol a in mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2013**
15. Kurmar S.G., Narayana K., Bairy KL, . Docabazine induces gene toxic and cyto toxic germ cell damage with concomitant decrease in testosterone and increase in lactate dehydrogenase concentration in the testis . *Mutant Res.* **2006** ,607: 240- 52
16. Zang Z, Suyun J.I, Tingting Xia, Huang S . Effects of bisphenol A on testosterone levels and sexual behaviors of male mice. *Adv Sexual Medicine*, **2016** , 6: 41-49.
17. Kim H.S., Han S.Y., Kwack S.J., Lee R.D., Kim I.Y., Seok J.H., Lee B.M., Yoo S.D., Park K.L . Androgenic/antiandrogenic effects of bisphenol-A in Hershberger assay using immature castrated rats. *Toxicol Lett*,**2002** ,135 : 111-123.
18. EL Ghazzawy I.F., Meleis A.E., Farghaly E.F., Solaiman A . Histological study of the possible protective effect of pomegranate juice on bisphenol-A induced changes of the caput epididymal epithelium and sperms of adult albino rats. *Alex J Med*, **2011** ,47: 125-137.
19. Ahmed M, Sabry S, Zaki S, EL-Sadik A . Histological, immunohistochemical and ultrastructural study of the epididymis in the adult albino rat. *Aust J Basic Appl Sci*, **2009** ,3: 2278-2289.
20. Palacios J, Regardera J, Paniagua R, Gamallo C, Nistal M .Immunohistochemistry of the human ductus epididymis. *Anat Rec*, **1993** ,235: 560-566.
21. Sh. H. Fayyad, L., A. Sh. Al Shaheen, M. Effect Of Root Treatment With Mycorrhiza And Foliar Application With Moringa Leaf Extract On Npk Elements In Citrullus Colocynthis Leaves. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 124-132. doi: 10.32649/ajas.2023.179722.
22. Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins G.S . Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *J Androl*, **2004** ,25: 330-337.
23. Chouhan S, Yadav S.K., Prakash J, Westfall S, Ghosh A, Agarwal N.K., Singh S .Increase in the expression of inducible nitric oxide synthase on exposure to bisphenol A: a possible cause for decline in steroidogenesis in male mice. *Environ Toxicol Pharmacol*, **2015**,39: 405-416.
24. Ramos J.G., Varayoud J, Sonnenschein C, Soto A.M., Munoz D.E., Toro M, Luque E.H.. Prenatal exposure to low doses of bisphenol A alters the periductal stroma and glandular cell function in the rat ventral prostate. *Biol Reprod*, **2001**. 65: 1271-1277.
25. Manar Mohammad Hasan AL-Murshidi. Histological study of testis tissue of male golden hamster (*Mesocricetus auratus*) in different time points of Diabetes. *Annals of Tropical Medicine & Public Health*, **2019**, 22:50-56

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Al-Murshidi, M.; Salih Hassan, W.; Hamza muttaleb, W. Some histological effects of Bisphenol-A on some reproductive organs in male adult rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 77. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.77>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Influence of adding sage leaves on growth performance, nutrient digestibility, and rumen fermentation in Awassi lambs

Murtadha Al-Bakhati¹, Anmar Al-Wazeer^{2,*}

¹ Department of Animal Production/ Faculty of Agriculture/ University of Kufa/ Najaf/ Iraq; pooldee38@gmail.com.

² Department of Animal Production/ Faculty of Agriculture/ University of Kufa/ Najaf/ Iraq;

* Correspondence: anmar.alwazeer@uokufa.edu.iq

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.78>

ABSTRACT

This study was conducted to determine the effect of adding different levels of sage leaf powder (SLP) to the diet of local Awassi lambs on growth performance, feed intake, digestibility and rumen fermentation. Sixteen Awassi male lambs 4-5 months of age were randomly distributed into four treatment groups: no feed additive (SLP0), 5g (SLP5), 10g (SLP10) and 15 g (SLP15) of sage leaves powder/kg of dry matter (DM) were added to the diet. Results revealed that adding SLP did not affect feed intake. However, growth performance, dry matter and organic matter digestion were recorded higher significances ($P \leq 0.05$) in lambs fed SLP5 and SLP10 than in lambs fed SLP15 and SLP0. Total volatile fatty acids concentrations were significantly increased ($P \leq 0.05$) in lambs fed SLP5 than other lambs. In conclusion, the addition of SLP at 5g/kg DM in the diet of Awassi lambs improved growth performance and nutrient digestibility with a positive effect on ruminal fermentation.

Keywords: *Salvia officinalis*; Awassi lambs; Growth performance; Nutrient digestibility; Rumen fermentation

INTRODUCTION

Limiting antibiotics as feed additives is one of the main objectives of the ruminant industry nowadays. There is a critical demand for feed additives acceptable to milk or meat consumers and can manipulate rumen fermentation to enhance digestibility and reduce environmental pollution with nitrogen and methane^{1,2,3}. The aromatic medicinal plants and their extracts with high concentrations of secondary metabolism compounds such as terpenes, tannins, phenols, flavonoids, and essential oils are good candidates for these requirements^{1,4,5}. They are safe and natural plant additives that do not hurt human and animal health while improving the health and performance of animals^{6,7,8}.

Sage (*Salvia officinalis* L.) is a fragrant perennial, evergreen subshrub of the *Lamiaceae* family that is indigenous to the Mediterranean and Middle East but has naturalized in other regions of the world^{8,9}. Sage was cultivated worldwide for its culinary, medicinal, and flavor properties. Secondary metabolites in sage leaves include essential oils (monoterpenoids) like α -Thujone, β -Thujone, 1,8-Cineole, α -Pinene, β -Pinene, Camphor, Camphene, sabinene and borneol^{10,11,12} as well as polyphenolics like rosmarinic acids and carnosol^{1,13}. Some of these compounds possess antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antifungal, anticancer and antibacterial properties^{8,10,14}. Numerous studies have evaluated sage leaves and their essential oil as a feed additive, focusing on feed digestibility and methane production using *in vitro* ruminal fermentation^{15,16,17}.

Therefore, the current study investigated the effect of different levels of sage leaf powder on growth performance, nutrient digestibility, and rumen fermentation in local Awassi lambs.

MATERIALS AND METHODS

This experiment was conducted at a private field in Al-Dujaili/Al-Kut District, Wasit Governorate, Iraq. Awassi lambs were purchased from the local market in Al-Kut and transferred by car to the location of the study. The animals were treated with internal and external parasites before starting the experiment. The sage (*Salvia officinalis* L.) leaves were also purchased from the local market in Al-Kut, finely ground and kept in airtight bags.

A sample of 20 g of dried sage leaves powder was soaked in water for 24 h, and 20 mL of hexane was added to separate oil from the water using a Clevenger-type system for 3 h at 4 °C. Shimadzu 2010 (Japan) gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) with a flame ionization detector and a DM-5Ms capillary column with lengths (30m × 0.25 um × 0.25 mm), where injection area and detector temperature were 280 °C and 340 °C, respectively. The temperature of the separation column was gradually increased, starting from 100 – 300°C. Inert nitrogen gas was used as a carrier gas at a rate of 100 KPa to identify components in sage essential oil according to the method¹⁸. In a completely randomized design, a feeding trial was conducted using sixteen local Awassi male lambs with an average initial body weight of 22.38 ±0.57 kg and ages 4-5 months. The lamb was housed in a semi-shad barn with an individual pen (2×1.5 m) equipped with feeding and drinking facilities. The concentrate mixture contained (per kg DM) 450g barley grain, 180g yellow corn, 240g wheat bran, 100g soybean meal, 10g limestone, 10g common salt and 10g premix. All lambs received a concentrated mixture of 3% of their live body weight twice daily, while wheat straw was offered *ad libitum* as roughage for 63 d, preceded by a 14-d adaptation period. Lambs were randomly divided into four equal treatment groups (4 lambs each) and fed a concentrated mixture without additive (control, SLP0), concentrate + 5g/kg DM (SLP5), concentrate + 10g/kg DM (SLP10), and concentrate+ 15g/kg DM (SLP15). The SLP was supplied into one dose mixed with 0.25 kg of concentrate before morning feeding to ensure the whole dose was received¹⁹. Fresh and clean water was available *ad libitum* to all lambs during the experimental period. Feed intake was recorded daily, and lambs were weighed weekly. The average daily gain and feed conversion ratio were calculated. The digestibility trial was conducted on the ^{ninth} week of the experiment. Daily feces samples of each lamb were collected before morning feeding for 5 d using collection bags. Feces samples were dried at 60° C for 48 h in a hot air oven and kept for further analysis. Representative samples of concentrate mixture, wheat straw, sage leaves powder, and dried feces were finely ground to pass through a 1mm screen sieve, and analyses for dry matter (DM), ash, crude protein (CP), ether extract, (EE) and crude fiber (CF) contents were performed according to AOAC². The organic matter (OM) content was calculated by subtraction of 100-ash. The nitrogen-free extract was calculated: NFE (g/kg DM) = OM-(CP+CF+EE). The metabolizable energy was calculated as ME (MJ/kg DM) = 0.012CP + 0.031EE + 0.005CF + 0.014 NFE²¹. Ingredients and chemical composition of concentrate mixture, wheat straw and sage leaves powder are shown in Table 1.

Ingredients (g/kg DM)	Concentrate mixture	Wheat straw	Sage leaves powder
Barley grain	450	-	-
Yellow corn	180	-	-
Wheat bran	240	-	-
Soybean meal	100	-	-
Limestone	10	-	-
Common salt	10	-	-
Premix	10	-	-
Chemical composition (g/kg DM)			
Dry matter (DM) (g/kg wet)	935.7	913.3	898.1

Organic matter (OM)	936.1	927.6	903.1
Crude protein (CP)	141.5	21.0	83.5
Ether extract (EE)	35.9	14.1	92.8
Crude fiber (CF)	68.4	395.7	143.9
Nitrogen-free extract (NFE)^a	690.3	496.8	582.9
Metabolizable energy (ME) (MJ/kg DM)^b	12.82	9.62	12.76

^a calculated NFE (g/kg DM) = OM-(CP+CF+EE)

^b calculated ME (MJ/ kg DM) = 0.012CP + 0.031EE+0.005CF +0.014NFE ²¹

Table 1. Ingredients and chemical composition of the concentrate mixture, wheat straw and sage leaves powder used in the experiment.

For rumen fermentation variables, rumen fluid samples were collected at 3 h after morning feeding using a flexible esophageal tube on the last day of the digestibility trial. After discarding the first 50 mL of rumen fluid to minimize saliva contamination and then collecting about 50 mL of rumen fluid, the pH was determined immediately using a portable electronic pH meter (HANNA). The collected rumen fluid was filtrated through 4 layers of cheesecloth, and a few drops of HCl and H₃PO₄ were added to stop the microbial activity. It was then centrifuged at 3000 rpm for 15 min. Then, the samples were kept frozen at -20°C for subsequent analysis of ammonia nitrogen concentration (NH₃-N) according to AOAC²⁰, and total volatile fatty acids (TVFA's) concentration was determined using Markham distillation apparatus following the distillation method²².

Data from feed intake, growth performance, nutrient digestibility and rumen fermentation variables were statistically analyzed using a completely randomized design with one-way ANOVA in SAS software²³. The post-hoc Duncan multiple comparison test was used to compare among the means ²⁴.

RESULTS

Essential oils in Sage leaves

Table 2 shows the chemical compounds found in sage leaves extracted essential oils. The GC/MS analysis of the oil revealed the presence of 21 constituents, which account for 97.4% of the oil. As seen in the same table, the major constituents (up 8 %) of the oil were 1,8-Cineole (12.3%), Camphor (11.2%), α -Pinene (9.8%) and α -Thujone (8.5%).

Compounds	Concentration (%)
1,8-Cineole	12.3
Camphor	11.2
α-Pinene	9.8
α-Thujone	8.5
α-Terpinene	6.3
β-Thujone	5.9
Myrcene	5.1
Camphene	5.1
β-Pinene	4.5
Borneol	4.3
α-Terpinene	4.1
Gama-Terpinene	3.9
α-Terpinol	3.7
α-Humulene	3.2
α- Terpinolene	3.2
Linalool	2.6
Sabinene	2.2
Limonene	0.8

Trance-caryophyllene	0.4
Borneol-acetate	0.2
Thymol	0.1
Total	97.4

Table 2. The GC-MS analysis of essential oils in sage leaves.

Feed intake and growth performance

The addition of different levels of SLP did not affect ($P \geq 0.05$) dry matter intake of roughage (361.35 ± 5.07 g/d), concentrate (723.04 ± 15.03 g/d) and total (1084.39 ± 14.85 g/d) in lambs. The final weights were similar in all groups and ranged from 30.83 to 33.00 kg, but total weight gain was higher ($P \leq 0.05$) for lambs fed SLP5 and SLP10 (10.33 and 9.33 kg) compared to the lambs fed SLP0 (8.50 kg) and SLP15 (8.75 kg). A similar trend happened with average daily gain (147.62 and 133.33 vs. 121.43 and 125 g/d, respectively) (Table 3). The feed conversion ratio improved significantly ($P \leq 0.05$) when lambs were fed SLP5 (7.57) and SLP10 (8.23) during the fattening period compared to those fed SLP15 (8.56) and SLP0 (8.77).

Item	SLP0	SLP5	SLP10	SLP15	SEM	P-value
Feed intake						
Roughage intake (g/d)	352.14	363.80	376.80	352.67	5.07	NS
Concentrate DM intake (g/d)	709.75	751.86	714.05	714.50	15.03	NS
Total DM intake (g/d)	1061.89	1115.66	1090.85	1069.16	14.85	NS
Growth performance						
Initial weight(kg)	22.33	22.67	22.17	22.33	0.57	NS
Final weight (kg)	30.83	33.00	31.50	31.08	0.70	NS
Total weight gain (kg)	8.50 ^b	10.33 ^a	9.33 ^{ab}	8.75 ^b	0.26	$P \leq 0.05$
Average daily gain(g/d)	121.43 ^b	147.62 ^a	133.33 ^{ab}	125.00 ^b	3.77	$P \leq 0.05$
Feed conversion ratio	8.77 ^a	7.57 ^b	8.23 ^{ab}	8.56 ^a	0.21	$P \leq 0.05$

^{a,b} within a row with different superscripts different significantly ($P \leq 0.05$); SEM= Standard error of the means; NS= not significant; SLP0=Lambs fed without additive; SLP5=Lambs fed 5 g sage leaves powder /kg DM; SLP10=Lambs fed 10 g sage leaves powder /kg DM; SLP15=Lambs fed 15 g sage leaves powder /kg DM.

Table 3. Feed intake and growth performance in Awassi lambs fed different sage leaf powder levels.

Nutrient digestibility

The apparent digestibility of dry matter and organic matter of the diet in lambs fed SLP5 and SLP 10 were improved significantly ($P \leq 0.05$) compared with those fed SLP0 and SLP15. However, increasing levels of sage leaf powder did not affect other nutrient digestibility of crude protein, ether extract, crude fiber, and nitrogen-free extract (Table 4). However, there is a numerical increase of 10g/kg DM.

Nutrient digestibility (%)	SLP0	SLP5	SLP10	SLP15	SEM	P-value
Dry matter digestibility	60.49 ^c	67.83 ^a	66.40 ^{ab}	62.78 ^{bc}	1.02	$P \leq 0.05$
Organic matter digestibility	68.12 ^c	74.58 ^a	72.54 ^{ab}	69.19 ^{bc}	0.89	$P \leq 0.05$
Crude protein digestibility	66.10	69.99	69.61	66.40	1.10	NS
Ether extract digestibility	79.16	82.03	80.22	79.28	1.09	NS
Crude fiber digestibility	67.10	73.24	68.47	67.75	1.50	NS
Nitrogen-free extract digestibility	83.86	87.00	86.74	83.69	0.71	NS

^{a,b} within a row with different superscripts different significantly ($P \leq 0.05$); SEM= Standard error of the means; NS= not significant; SLP0=Lambs fed without additive; SLP5=Lambs fed 5 g sage leaves powder /kg DM; SLP10=Lambs fed 10 g sage leaves powder /kg DM; SLP15=Lambs fed 15 g sage leaves powder /kg DM.

Table 4. Nutrient digestibility of the diet in Awassi lambs fed different levels of sage leaves powder.**Rumen fermentation variables**

There were no significant differences in ruminal pH values or ammonia nitrogen concentrations as the levels of addition with sage leaves powder were increased. However, the concentration of total volatile fatty acids (TVFA's) showed superiority ($P \leq 0.05$) in lambs fed SLP5 and SLP10 compared to those fed SLP0 and SLP15.

Rumen fermentation variables	SLP0	SLP5	SLP10	SLP15	SEM	P-value
Ruminal pH	6.71	6.44	6.53	6.67	0.72	NS
Ammonia-N (mg/dL)	23.21	22.97	22.69	23.11	0.37	NS
TVFA's (mmol/L)	81.84 ^b	89.77 ^a	84.25 ^{ab}	81.49 ^b	1.71	$P \leq 0.05$

^{a,b} within a row with different superscripts different significantly ($P \leq 0.05$); SEM= Standard error of the means; NS= not significant; TVFA's= Total volatile fatty acids; SLP0=Lambs fed without additive; SLP5=Lambs fed 5 g sage leaves powder /kg DM; SLP10=Lambs fed 10 g sage leaves powder /kg DM; SLP15=Lambs fed 15 g sage leaves powder /kg DM.

Table 5. Rumen fermentation variables in Awassi lambs fed different sage leaf powder levels.**DISCUSSION**

Sage leaves used in the current study were rich in essential oils, and the major compounds were 1,8-Cineole, Camphor, α -Pinene and α -Thujone. It is within the range reported by ^{10,25}. Previous research has revealed that the significant constituents of sage essential oil are α -Thujone, 1,8-Cineole, α -Pinene, β -Thujone, Camphor, and Borneol^{11,12}. The amounts of active compounds of sage vary by region due to environmental factors (climate, water availability, agronomical treatments), processing, drying method and extraction methods^{8,9,14,25}. Literature on the effect of sage leaves and their extracts, such as essential oils, on ruminants' feed intake and growth performance is very scarce. To our knowledge, this study is the first study to utilize *Salvia officinalis* leaves but not essential oils as a source of Phyto factors in ruminant nutrition. Regarding feed intake in the current study, the dry matter intakes of roughage (wheat straw), concentrate, and total intake were not affected by feeding Awassi lambs' different levels of SLP. This could be that feeding sage leaves did not affect the animals' appetites, and the lambs did not experience any adverse post-ingestive effects. These findings are consistent with those reported in lambs^{26,27,28} and goats²⁹, with no difference in feed intake when rosemary leaves were included in the diet. Furthermore, ³⁰ reported that roughage and concentrate feed intake were not alerted when Holstein calves fed on a mixture of leaves, including sage leaves³¹ obtained similar results with no change in feed intake when fed sage essential oil to lambs.

Regarding growth performance, the positive effect on the total weight gain and average daily gain of lambs in the current study may be due to sage leaves' containing flavonoids and phenolic compounds which scavenge free radicals^{13,32} or maybe the essential oil in sage leaves act as an anti-intestinal worm and improve the health status of the lambs³³. Furthermore, sage leaves are rich in vitamins A, B1, B2, and C and minerals ³⁴. They may work together with antioxidants and essential oils ³⁵ to improve the rumen environment and the weight gain of lambs. Lambs fed SLP5 gained about 26 g/d than lambs fed SLP15 and SLP0, and lambs fed SLP10 gained 12 g/day more. This supports the idea that some medicinal herb enhances weight gain and decrease feed efficiency. These results are in harmony with results reported by ²⁷ when 0.2 g of rosemary leaves /kg live body weight/ day were added to the diet of Barki lambs. ²⁸ also obtained similar results when rosemary and laurel leaves were added to the diet of Rahmani lambs at 0.5, 1%. The feed conversion ratio in the current study has the lowest value, and this indicates the efficiency of benefiting from the additive because it is one of the critical economic characteristics. Sage leaves modify rumen fermentation and increase the production of volatile fatty acids, which benefits the host animal (ruminant) by providing it with more significant quantities of microbial protein and increasing the efficiency of feed utilization ²⁶, which coincides with a reduction in methane production in the rumen measured *in vitro* ³. However, growth performance was not affected when sage essential oil was added to the diet of lambs ^{31,36}. The discrepancies in fattening performance in different

studies might be due to the differences in concentrations of essential oils extracted, method of adding herbs, diet, animal and experimental condition^{s26,37,29,30}.

Data needs to be more effective of SLP on nutrient digestibility *in vivo*. The superior increase in the diet digestibility of dry matter and organic matter in lambs fed SLP5 and SLP10 compared with those fed SLP15 and SLP0 may be due to improved rumen fermentation. Herbs can stimulate the function of proteases, amylases, and lipases in the pancreas by increasing the activity of digestive enzymes in ruminant^{s7}. Furthermore, some active ingredients with lower antimicrobial activity, like monoterpenoids with alcohol and hydrocarbon structures, may be degraded in the rumen and used as a carbon source by microorganisms in rumen^{s3,38}. Similar results were reported in lambs^{s27,28} and^{s29} when fed animals on rosemary leaves (*Lamiaceae* family).

Regarding rumen fermentation variables, with no significant changes in ruminal pH with feeding sage leaves, the values were within the reference range for optimum microbial function^{s39}. Several *in vitro* studies reported^{s2,16} that increasing levels of sage essential oils do not affect ruminal pH. A similar observation was reported by^{s27}, where no significant differences were observed in rumen pH when 0.2 g rosemary leaves /kg live body weight/ day were added to the diet of Barki lambs. Similar findings were reported by^{s28}, who found that feeding 0.5%, 1% of rosemary and laurel leaves to crossbred Rahmani lambs did not affect ruminal pH values. However,^{s17} reported increased rumen pH with sage leaves in an *in vitro* study. The effects of rumen pH may differ due to the main chemical constituent's dependent on the concentrations of the essential oils or compounds used in the diets^{s5,40}. In the current study, there was no significant occurrence in the concentration of ammonia nitrogen (NH₃-N) in the rumen fluid. However, a numerical decrease occurred with the increase in the level of addition to a limit of SLP10. This may be attributed to the regulatory action of sage leaves, which regulates the uptake and release of NH₃-N in the rumen. These results agreed with the results of^{s26,27}. Antibacterial activity has been demonstrated in different environments^{s10}.

Furthermore, there is a difference between *in vitro* and *in vivo* rumen systems that have greater buffering capacity against environmental stresses and are more likely to adapt and recover from intense inhibitors such as compounds found in essential oils^{s37,40}. The primary nitrogen source in the rumen is NH₃-N, and its decrease from the standard range leads to a decrease in microbial protein production within the normal range^{s19,29}. Similar results reported that NH₃-N concentrations were not affected by increasing levels of sage essential oils^{s15,16}. Contrary to our results,^{s3} reported a quadratic increase in NH₃-N concentrations with increasing levels of sage oil in an *in vitro* study using rumen fluid from rams, regarding significant increases in TVFA concentrations in lambs fed low-level (SLP5) and medium-level (SLP10). This may be due to the significant improvement in the current study's dry matter and organic matter digestion treatments in those lambs. This result agreed with those reported by^{s2,17} when using sage leaves or sage essential oil in a laboratory experiment but disagreed with those reported by^{s3,15}. This is attributed to the effect of phenolic compounds in sage on gram-positive bacteria.

On the other hand, the effect of flavonoids in sage will stimulate the fermentation activity in the rumen^{s16}. The results of the current study were similar to those of studies conducted on animals fed on medicinal plants of the family or their participation in the same active compounds. It agreed with the results in lambs^{s27,28} and goats^{s29} with an increase in TVFA's concentrations when incorporating rosemary leaves in the diet of lambs.

CONCLUSIONS

The results of this study suggest that feeding sage leaves to Awassi lambs can improve feed intake, growth performance, nutrient digestibility, and rumen fermentation. The positive effects of sage leaves on rumen fermentation were likely due to the phenolic compounds and flavonoids in sage. These compounds can stimulate the activity of bacteria in the rumen and increase the production of TVFAs. The positive effects of sage leaves on growth performance were likely due to sage's antioxidants and essential oils. These compounds can scavenge free radicals and improve the health status of the lambs. The results of this study suggest that sage leaves could be used as a feed additive to enhance the performance of ruminants. Sage leaves are a good source of antioxidants, essential oils, and phenolic compounds, which can benefit rumen fermentation and growth performance. Further research is needed to investigate the long-term effects of feeding sage leaves to

ruminants. More research is also necessary to determine the optimal dosage of sage leaves for different types of ruminants.

Author Contributions: Conceptualization, AA; methodology, MA and AA; validation, MA and ZZ; formal analysis, MA; investigation, MA; resources, MA and AA; data curation, MA and AA; writing-original draft preparation, MA; writing-review and editing, MA and AA; visualization, MA; supervision, AA; project administration, AA All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the UNIVERSITY OF KUFA (protocol code 20670 on 25-11-2021).

Acknowledgments: The authors would like to thank the Faculty of Agriculture at the University of Kufa and the Department of Environment and Water at the Ministry of Science and Technology for enabling us to perform this research in their laboratories.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Broudiscou, L.P.; Papon, Y.; Broudiscou, A.F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2000**; *87*(3-4):263-277.
2. Gunal, M.; Ishlak, A.; Abughazaleh, A. Evaluating the effects of six essential oils on fermentation and biohydrogenation in *in vitro* rumen batch cultures. *Czech J. Anim. Sci.*, **2013**; *58* (6):243–252. <https://doi.org/10.17221/6822-cjas>
3. Kahvand, M.; Malecky, M. Dose-response effects of sage (*Salvia officinalis*) and yarrow (*Achillea millefolium*) essential oils on rumen fermentation *in vitro*. *Ann. Anim. Sci.* **2018**; *18*(1): 125–142. <https://doi.org/10.1515/aoas-2017-0024>
4. Broudiscou, L.; Papon Y.; Broudiscou, A.F. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2002**; *101*(1-4):183-189. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00221-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00221-3)
5. Kholif, A.E.; Olafadehan, O.A. Essential oils and phytogetic feed additives in ruminant diet: chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Phytochem. Rev.* **2021**; *20*(6):1087-1108.
6. Jouany, J.P.; Morgavi, D.P. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*, **2007**; *1*: 1443-1466.
7. Frankič, T.; Voljč, M.; Salobir, J.; Rezar, V. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agric Slov.* **2009**; *94*(2):95-102.
8. Ghorbani, A.; Esmailizadeh, M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J. Tradit. Complement. Med.* **2017**; *7*(4):433-440. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2016.12.014>
9. Sharma, Y.; Fagan, J.; Schaefer, J. Ethnobotany, phytochemistry, cultivation and medicinal properties of Garden sage (*Salvia officinalis* L.). *J Pharmacogn Phytochem.*, **2019**; *8* (3):3139-3148.
10. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Inter. J. Food Microbial.* **2004**; *94*(3):223-253.
11. Torrance, L.; Cowan, G. H.; McLean, K.; MacFarlane, S.; Al-Abedy, A. N.; Armstrong, M.; Lim, T.Y.; Hein, I.; Bryan, G.J. Natural resistance to Potato virus Y in Solanum tuberosum Group Phureja. *Theor. Appl. Genet.* **2020**. *133*: 967-980.
12. Damyanova, S.; Mollova, S.; Stoyanova, A.; Gubenia, O. Chemical composition of *Salvia officinalis* L. essential oil from Bulgaria. *Ukr. Food J.* **2016**; *5*(4):695-700.

13. Boutebouhart, H.; Didaoui, L.; Tata, S.; Sabaou, N. Effect of extraction and drying method on chemical composition, and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from *Salvia officinalis* L. *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, **2019**; 22(3):717-727.
14. Jakovljević, M.; Jokić, S.; Molnar, M.; Jašić, M.; Babić, J., Jukić, H.; Banjari, I., Bioactive profile of various *Salvia officinalis* L. preparations. *Plants*, **2019**, 8(3): p.55. <http://dx.doi.org/10.3390/plants8030055>
15. Castillejos, L.; Calsamiglia, S.; Martín-Tereso, J.; Ter Wijlen, H. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2008**; 145(1-4):259-270. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.037>
16. Sh. Al-Obaidy, G., F. Abdulrahman, M., Sh. J. Alobaidy, B. Future Trends For Green Environmental Applications Of Nanotechnology: A Review. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 133-147. doi: 10.32649/ajas.2023.179725.
17. Zmora, P.; Cieślak, A.; Pers-Kamczyc, E.; Szyszka, P.; Szumacher-Strabel, M. An *in vitro* study on the effect of sage, *Salvia officinalis* L., on rumen fermentation. *J. Anim. Feed Sci.* **2012**; 21(4):613-623. <https://doi.org/10.22358/jafs/66135/2012>
18. Hcini, K.; Sotomayor, J.A.; Jordan, M.J.; Bouzid, S. Chemical composition of the essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) of Tunisian origin. *Asian J. Chem.* **2013**; 25:2601-2603.
19. Fahad, TO; Al-Wazeer, A.A.M. Growth performance and nutrient digestibility in Awassi lambs fed on different levels of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) leaf powder. *Indian J. Ecol.*, **2021**; 48 (15): 196-199.
20. AOAC, (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis*. 18th ed. AOAC International. Gaithersburg, USA, **2005**.
21. MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). *Energy Allowance and Feeding System for Ruminants*, Tech. Bull. No.33.London, UK, **1975**, 79 pp.
22. Warner, A.C. Production of volatile fatty acids in the rumen: methods of measurement. *Nutr. Abstr. Rev.***1964**; 34 :339–352.
23. SAS, SAS/STAR® software: changes and enhancements, release 9.4. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, **2018**
24. Duncan, D. B. Multiple ranges and multiple "F" test. *Biometrics*,**1955**; 11: 1-12.
25. Mühlbauer, W.; Müller, J., Sage (*Salvia officinalis* L.). In *Drying Atlas, Drying Kinetics and Quality of Agricultural Products*, 1st ed.; Mühlbauer, W.; Müller, J., Eds.; Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier: Kidlington, OX5 1 GB, UK, **2020**; pp. 401-407.
26. Hassan, S.A.; Hassan, K.M. Effects of medicinal plants and probiotic supplementation on some nutrients and blood parameters of Karadi lambs. *Euphrates J. Agric. Sci.* **2009**; 1(3): 1-13.
27. Allam, S.; El-Elaime, R.R. Impact of garlic, lemongrass, peppermint and rosemary as feed additives on performance of growing Barki lambs. *Egyptian J. Nutr. Feeds*, **2020**; 23(3):359-367.
28. Khayyal, A.A.; El-Badawy, M.M.; Ashmawy, T.A.M., Effect of rosemary or laurel leaves as feed additives on performance of growing lambs. *Egyptian J. Nutri. Feeds*, **2021**; 24(3):343-356.
29. Kholif, A.E.; Matloup, O.H.; Morsy, T.A.; Abdo, M.M.; Elella, A.A.; Anele, UY; Swanson, K.C. Rosemary and lemongrass herbs as phytogenic feed additives to improve efficient feed utilization, manipulate rumen fermentation and elevate milk production of Damascus goats. *Livest. Sci.*, **2017**; 204:39-46. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.08.001>
30. Lien, T.F.; Liao, C.M.; Lin, K.J. Effects of supplemental Chinese traditional herbal medicine complex on the growth performance, carcass characteristics, and meat quality of male Holstein calves. *J. Appl. Anim. Res.* **2014**; 42(2):222-227.
31. Özdoğan, M.; Önenç, S.S.; Önenç, A. Fattening performance, blood parameters and slaughter traits of Karya lambs consuming blend of essential oil compounds. *Afr. J. Biotechnol.***2011**; 10(34):6663-6669.
32. Said-Al Ahl, H.; Hussein, M.S.; Gendy, A.S.H.; Tkachenko, K.G. Quality of Sage (*Salvia officinalis* L.) Essential Oil Grown in Egypt. *Int. J. Plant Sci. Ecol.*,**2015**; 1(4):119-123.
33. Jordán, M.J.; Martínez-Conesa, C.; Bañón, S.; Otal, J.; Quílez, M.; García-Aledo I.; Romero-Espinar, P.; Sánchez-Gómez, P. The combined effect of Mediterranean shrubland pasture and the dietary

- administration of sage by-products on the antioxidant status of Segureña ewes and lambs. *Antioxidants* **2020**; *9*(10), p.938. <https://doi.org/10.3390/antiox9100938>
34. Maysaloon W. Ibraheem, Abdulkhaliq A. Farhan, Sataa M. Salih, Th.T. Mohammed. Carcass characteristics of Awassi lambs supplemented with Selenium and Vitamin D3. *Iranian Journal of Ichthyology*.2022, Vol 9, No. 1, pp: 355-359
 35. Tatar , A.; Kasaeizadeh, . R. .; Shobeirinia, B. .; Abdali, . L. .; Baelashaki, R. . The Effect Of Using Different Levels Of Vitamin E On The Productive Traits Of Broiler Chickens. *JLSAR* 2023, *4*, 30-36.
 36. Adhab, A.A.; Aldoori, Z.T.; Ahmed, B.A. Using of different kinds of aromatic oils with feeding on some productive traits in Awassi lambs. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.***2021**; *910*(1):012046. Doi:10.1088/1755-1315/910/1/012046
 37. Benchaar, C.; Hristov, A.N.; Greathead, H. Essential oils as feed additives in animal nutrition. In *Phyto-genics in Animal Nutrition*. T. Steiner, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK,**2009**; pp. 111–146.
 38. Malecky, M.; Albarello H.; Broudiscou, L.P. Degradation of terpenes and terpenoids from Mediterranean rangelands by mixed rumen bacteria *in vitro*. *Animal*, **2012**; *6*(4):612-616.
 39. Torrance L, Cowan GH, McLean K, MacFarlane S, Al-Abedy AN, Armstrong M, Lim TY, Hein I, Bryan GJ. Natural resistance to Potato virus Y in Solanum tuberosum Group Phureja. *Theoretical and Applied Genetics*. 2020 Mar; *133*:967-80.
 40. Benchaar, C.; Calsamiglia, S.; Chaves, A.V.; Fraser, G.R.; Colombatto, D.; McAllister, T.A.; Beauchemin, K.A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Technol.***2008**; *145*(1-4):209-228.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Al-Bakhati, M.; Al-Wazeer, A. Influence of adding sage leaves on growth performance, nutrient digestibility, and rumen fermentation in Awassi lambs. *Revis Bionatura* 2023;*8* (4) 78. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.78>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Growth performance of broiler chickens of turmeric (*Curcuma longa*) turmeric aqueous extract

Baqer, H. ^{1*}, Salah Gatea ², Salam Altaie ³, Thamer ALjanabi ⁴

¹ Department of Animal Production, Agriculture College/ Kerbala University/ Iraq;

² Department of Animal Production/ Agriculture College/ Kerbala University/ Iraq; Email: salah.katia@uokerbala.edu.iq.

³ Department of Animal Production/ Agriculture College/ Kerbala University/ Iraq; Email: salam.abood@uokerbala.edu.iq.

⁴ Department of Animal Production/ Agriculture College/ Kerbala University/ Iraq; Email: dr.thamer.kudir@uokerbala.edu.iq.

* Correspondence: haider.q@uokerbala.edu.iq

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.79>

ABSTRACT

The effects of Turmeric Powder extract (TPE) on the growth performance of broiler chicken were evaluated in the 5-week study. On 240-day-old chicks weighing 40.9g, levels were supplemented with turmeric powder extracts (TPE) in the water of broiler chicken. In conclusion, there was increased final live weight and weight gain, a better feed conversion ratio (FRC), and body and feed intake with the highest TPE on water. The serum metabolites were not affected by the level of TP in the diets. It was concluded that levels supplemented with turmeric powder Extracts (TPE) in the water of broiler chicken appear to act as a growth promoter with no adverse effect on health status.

Keywords: turmeric; broiler; growth performance.

INTRODUCTION

In poultry production, herbs have become a potential antibiotic substitute in poultry nutrition¹. Alternatives to replace antibiotics are called phytogetic feed additives, including probiotics, prebiotics, enzymes, and essential oils. Phytogetic growth promoters mainly enhanced gut health for optimum functioning². Turmeric supplementation stimulates the bird's digestive system by promoting intestinal lipase, maltase, and sucrose activities and the secretions of pancreatic amylase, lipase, chymotrypsin, and trypsin activities³. The findings showed improved body weight gain and FCR turmeric supplementation⁴. The supplementation of curcumin increased the villus height and width and increased epithelial cells in all segments (duodenum, jejunum, and ileum) of the small intestine of the digestive system.

This study aimed to evaluate the potential use of different levels of turmeric powder extract additive in water on broiler chickens' growth performance and production during the study.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in. Karbala, College of Agriculture, Department. Animal. Production was from 15/3/2021 to 20/4/2021. Two hundred forty-one-day-old chicks were used, and the average body was. Weight was 40.9 g. of Ross 308 breed. The duration of the study was 5 weeks. Chickens were distributed randomly

for four treatments and three replications of each treatment. Each treatment contained 60 chicks. The temperature is fixed at about 34- 35 °C in the first week and then decreases gradually to 2.3 °C per week until it reaches 21 - 23 °C. The illumination regime was a 12-hour light-dark cycle.

Preparation of the aqueous extract and method of use:

Turmeric was obtained from local markets, and the aqueous extract was made according to the modified Hernandez method by mixing an amount of powder with a volume of distilled water in a ratio of 1 g/ 2 ml of water and mixing them with a mixer. The solution then was presented in a water bath to a temperature of 60 degrees. C- For an hour, the solution is left, and then the solution is left overnight at room temperature. Then, the clear solution is filtered. by sterile gauze before using determined ingredients by analysis and using NRC⁹

RESULTS

The results in Table 1 show the influence of fortification aqueous extract of turmeric powder on broiler chickens' average body life weight During the trial period of 1 - 35 days. The results differed significantly at $P < 0.05$ in the mean of the weight of the body of the added treatments. The extraction of turmeric for chicken water compared to a comparison. Treatment. The significant increase in body weight continued during the breeding period. However, a significant increase was found in the fourth treatment, outperforming the rest of the additional treatments. This result agreed with researcher 10, who found a significant improvement in the productive properties of chicks added with different turmeric levels compared to control chickens.

Transaction	first week	second week	third week	fourth week	fifth week
T1	185.00±4.92	460.80 ± 1.31 C	980.96 ± 1.37 C	1493.33±49.16 B	2069.67 ± 17.47 C
K1	185.50 ± 3.60	467.96 ± 0.55 B	992.00 ± 3.60 B	1508.67±10.06 B	2116.67 ± 20.81 BC
K2	186.50 ± 2.00	468.16 ± 0.76 B	987.46 ± 0.80 B	1540.33 ± 4.50 B	2150.00 ± 50.00 B
K3	187.16 ± 0.28	480.33 ± 0.76 A	1006.30 ± 3.62 A	1621.33 ± 7.63 A	2263.67 ± 12.89 A
LSD		1.6814	5.0458	47,979	54.934
Morale level	NS	0.01	0.01	0.01	0.01

¹T. T1: control treatment without addition. K2: The second treatment is adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 10 ml/liter of water. 3: A third treatment by adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 20 ml/liter of water. K4: The fourth treatment. Averages ± Standard Error.

Table 1. This is a table. Tables should be placed in the main text near the first time they are cited.

Transaction	first week	second week	third week	fourth week	fifth week	Total
T1	129.00± 5.55 B	395.60 ± 8.60	649.00 ± 5.02 AB	931.27 ± 21.01	1107.93 ± 44.23	3212.8± 9.44 AB
K1	127.26 ± 6.20 B	386.46 ± 10.50	660.53 ± 5.83 A	953.00 ± 26.96	1142.67 ± 17.38	3269.92± 15.47 A
K2	132.66 ± 4.34 B	390.13 ± 5.00	636.66 ± 15.51 B	926.07 ± 32.83	1113.67 ± 16.60	3199.19± 44.15 B

K3	148.46 ± 8.32 A	396.66 ± 6.50	656.40 ± 2.00 A	940.77 ± 24.37	1155.33 ± 10.50	3270.62± 29.03 A
LSD	11,818		16,419			
Morale level	P<0.01	NS	P<0.05	NS	NS	NS

²T. T1 control treatment without addition. K2: The second treatment is adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 10 ml/liter of water. 3: A third treatment by adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 20 ml/liter of water. K4: The fourth treatment. Averages ± Standard Error.

Table 2. Shows the effect of adding an aqueous turmeric powder extract on the total forage consumption rate during the experiment.

Table 3 shows the effect of adding the aqueous extract to turmeric powder on the food conversion factor during the experiment. There was a significant improvement in the feed conversion factor for the fourth treatment compared with the control treatment. At the same time, however, we did not find a significant difference between the experimental and control treatments.

Transaction	first week	Second week	third week	fourth week	fifth week	Total
T1	0.88±0.01 B	1.43 ± 0.05	1.24 ± 0.008	1.82 ± 0.14 A	1.94 ± 0.30	1.91±0.33
K1	0.86 ±0.06 B	1.36 ± 0.03	1.26 ± 0.01	1.84 ± 0.08 A	1.88 ± 0.09	1.81±0.05
K2	0.90 ±0.01 B	1.38 ± 0.01	1.22 ± 0.02	1.67 ± 0.07 AB	1.83 ± 0.18	1.80±0.11
K3	1.00 ±0.04 A	1.35 ± 0.02	1.24 ± 0.008	1.52 ± 0.03 B	1.79 ± 0.01	1.73±0.04
LSD	0.077			0.1787		
Morale level	P<0.01	NS	NS	P<0.05	NS	NS

³T. T1: control treatment without addition. K2: The second treatment is adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 10 ml/liter of water. 3: A third treatment by adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 20 ml/liter of water. K4: The fourth treatment.

. Averages ± Standard Error.

Table 3. Effect of adding turmeric extract on the food conversion factor.

Table 4. Effect of adding the aqueous extraction to turmeric powder on the rate of weight gain during the experiment period, where we did not find significant differences in the weekly weight gain rate of the extracted treatments compared to the control treatment, while in the second week, there were significant differences among the experimental treatments and control. There were significant differences among experimental treatments in the third and fourth weeks.

Transaction	first week	second week	third week	fourth week	fifth week	Total
T1	146.00± 3.96	275.80 ± 4.59 C	520.16 ± 0.28 B	512.37 ± 48.64 B	576.33 ± 62.42	2031.32± 4.05 B
K1	147.16 ± 4.16	282.46 ± 4.13 B	524.03 ± 3.83 AB	516.67 ± 11.93 B	608.00 ± 24.24	2078.32± 4.80 B

K2	147.16 ± 2.88	281.66 ± 1.89 BC	519.30 ± 1.47 B	552.87 ± 5.20 B	609.67 ± 52.63	2110.66± 5.66 B
K3	148.16 ± 1.25	293.66 ± 0.57 A	525.96 ± 3.40 A	615.77 ± 9.64 A	642.00 ± 5.29	2225.55± 7.44 A
LSD		6.1076	5.0223	48.266		90.460
Morale level	NS	P<0.01	P<0.05	P<0.01	NS	P<0.01

⁴T. T1: control treatment without addition. K2: The second treatment is adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 10 ml/liter of water. 3: A third treatment by adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 20 ml/liter of water. K4: The fourth treatment. Averages ± Standard Error.

Table 4. The effect of adding turmeric extract on weight gain

Table 5: The effect of using the aqueous extract of turmeric powder on the relative growth rate during the experiment period, where there was an improvement in the relative growth rate of the treatments added to the turmeric extract to chicken water compared to the control. In the fourth week, there was a significant improvement in the control treatment.

Transaction	first week	second week	third week	fourth week	fifth week	Total
T1	130.35± 0.40	85.42 ± 2.09	72.15 ± 0.13 A	41.37 ± 3.06 B	32.02 ± 3.79	27.26±2.45
K1	131.47 ± 1.95	86.45 ± 1.67	71.78 ± 0.36 AB	41.32 ± 0.83 B	33.53 ± 1.24	27.91±1.86
K2	130.33 ± 2.49	86.05 ± 0.89	71.53 ± 0.20 B	43.74 ± 0.34 B	33.02 ± 2.43	27.93±3.56
K3	131.02 ± 1.54	87.84 ± 0.08	70.75 ± 0.29 C	46.83 ± 0.64 A	33.04 ± 0.10	27.89±0.58
LSD			0.4932	3.0733		
Morale level	NS	NS	P<0.05	P<0.01	NS	NS

⁵T. T1: control treatment without addition. K2: The second treatment is adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 10 ml/liter of water. 3: A third treatment by adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 20 ml/liter of water. K4: The fourth treatment. Averages ± Standard Error.

Table 5. The effect of adding turmeric extract on the relative growth of chicks

Table 6 shows the effect of using the aqueous extraction of turmeric powder on the water consumption rate during the experiment period, as there were significant differences in the water consumption rate of the extract treatments compared with the control.

Transaction	first week	second week	third week	fourth week	fifth week	Total
T1	370.00± 9.84	921.60 ± 2.62 C	1961.93 ± 2.75 C	2986.67 ± 98.33 B	4139.33 ± 34.94 C	10379.53±88. 95 C
K1	371.00 ± 7.21	935.93 ± 1.10 B	1984.00 ± 7.21 B	3017.33 ± 20.13 B	4233.33 ± 41.63 BC	10541.52±50. 67 B
K2	373.00 ± 4.00	936.33 ± 1.52	1974.93 ± 1.61	3080.67 ± 9.01	4300.00 ± 100.00	11116.92±90. 84

		B	B	B	B	A
K3	374.33 ± 0.57	960.66 ± 1.52 A	2012.60 ± 7.25 A	3243.33 ± 15.27 A	4527.33 ± 25.79 A	11118.25±28. 67 A
LSD		3.3629	10.092	95.957	109.87	150.58
Morale level	NS	P<0.05	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01

⁶T. T1: control treatment without addition. K2: The second treatment is adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 10 ml/liter of water. 3: A third treatment by adding an aqueous turmeric powder extract at a concentration of 20 ml/liter of water. K4: The fourth treatment. Averages ± Standard Error.

Table 6. The effect of adding turmeric extract on the water consumption rate.

DISCUSSION

The improvement in the productive traits of chickens for broilers to which the aqueous turmeric extract was added to water during the experimental period may be attributed to the presence of active compounds in the extract. At high levels, especially Hydrolysable phenolic acids, flavonoids, and tannins, which help improve the digestion of nutrients by stimulating the secretion of digestive enzymes, which enhances the digestion of the food intake, and this, in turn, helps improve the overall growth of broilers. This result agrees with researcher ¹¹, who found significant differences $P \leq 0.05$ in the final average body weight and the mean weight gain of turmeric-supplemented treatments during the rearing period. This also agrees with researcher ¹², who found significant improvements of $P < 0.05$ in the weight gain rate of the treatment supplemented with turmeric compared to the control during the Breeding period. The active substances present in turmeric also act as antioxidants and anti-inflammatories, which improve the functioning of the alimentary canal in the absorption of nutrients ¹³ and consequently lead to an increase in feed consumption for birds, and this is consistent with the findings of the researcher ¹⁰, which found a significant improvement, $P < 0.05$, in the rate of feed consumption for the treatment supplemented with turmeric water extract compared with the control treatment during the rearing period. As well as to the role of turmeric in the moral increase of the physiological structure of the small intestine in terms of the height of the villi and its surface area, and the villi rose to the depth of the Rajput crypts) ¹⁴. (Turmeric works to improve the growth and reproduction of beneficial bacteria that are initially inside the small intestine of birds, which is positively reflected in improving the rate of food consumption and the health status of birds ¹⁵, improving the food conversion factor, which agrees with the researcher ¹⁶, which found a significant improvement of $P < 0.05$ in the feed conversion factor of the turmeric-supplemented treatment. Compared with the control during the rearing period, we conclude the role of turmeric extract in improving the environment of the alimentary canal in food digestion and increasing the absorption of nutrients, which leads to significant productivity improvement traits of chickens.

CONCLUSIONS

The study investigated the effects of feeding aqueous turmeric extract to broiler chickens. The results showed that the extract significantly positively affected the chickens' growth rate, feed intake, and food conversion ratio. These effects were likely due to active compounds in the extract, such as hydrolyzable phenolic acids, flavonoids, and tannins. These compounds have antioxidant and anti-inflammatory properties, and they can improve the functioning of the alimentary canal to improve nutrient absorption and digestion. The extract also positively affected the growth of beneficial bacteria in the small intestine of the chickens, which further enhanced their nutrient absorption and overall health.

Based on the results of this study, it is concluded that feeding aqueous turmeric extract to broiler chickens can significantly impact their growth and overall health. The extract should be considered as a potential feed additive for broiler chickens.

Author Contributions: "Conceptualization. Salam Altaie; methodology, Salam Altaie. And Salah Gate; validation, Thamer ALjanabi; formal analysis, Salam Altaie.; investigation, Baqer, H.; resources, Salah Gate.; data curation, Salam Altaie.; writing—original draft. Preparation, Salah Gate.; Writing—a review. And editing, Salah Gate.; visualization. Sura Khafaji and Baqer, H.; supervision, Salam Altaie.; project administration, Baqer, H.

Funding: This research. Received no external funding.

Institutional Review Board Statement. "The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (Agriculture College, Kerbala University, Iraq)

REFERENCES

1. Lillehoj H, Liu Y, Calsamiglia S, Fernandez- Miyakawa M E, Chi F, Cravens R L, Oh S and Gay C G 2018. Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance lost health. *Veterinary Research* 49 (76):1-18.
2. Yitbarek M B 2015. Phytogenics as feed additives in poultry production: a review. *International Journal of Extensive Research* 3: 49-60
3. Plate K and Srinivasan K 2000. Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. *Food/ Nahrung* 44 (1): 42-46.
4. Daramola. O T.2020.Growth performance and serum metabolites of broiler chickens fed turmeric (*Curcuma longa*) powder-supplemented diets. Received 22 June 2020; Accepted 5 October 2020; Published 1 December 2020.
5. Mustafa,M.M;Karadas ,F;and Taayed,L.T.2021. Adding a different level of turmeric powder and curcumin to the diet on broiler performance, carcass traits, immunity, and gut morphology of broiler chicken under normal and heat stress conditions. *Iraq journal of agricultural sciences* - 2021:52(2):512-526.
6. SAS. 2012. Statistical Analysis system. User's Guide. Statistical version. 9th.ed. Inst-Inc Cary, NC.The USA.
7. Duncan, B. D. 1955. Multiple Range Test and Multiple F-Test. *Biometrics*. 11: 1- 42.
8. Hernandez, M., R. Lopez , R.M. Abanas, V. Paris and A. Arias. 1994. Antimicrobial activity of *Visneamocanera* Leaf extracts. *J. Ethnopharmacology*. 41; 115-119.
9. AL-Ameri. SMK and ALjashami, S.M.2017.study the effect of adding two levels of *Curcuma longa* and *caryophyllus Eugenia* to the broiler chicken on the production performance. 9(2). 801-789
10. Saed, Z. J. M., Mohammed, Th. T. & Farhan, S. M. Effect of ginger and celery seeds as feed additives on reproductive performance of broiler breeder males. *Plant Archives*.2018,18(2): 1823-1829.
11. Daramola. O T.2020.Growth performance and serum metabolites of broiler chickens fed turmeric (*Curcuma longa*) powder-supplemented diets. Received 22 June 2020; Accepted 5 October 2020; Published 1 December 2020.
12. Mahmood, N. A. & Abdulateef, S. M. Determining Some Undesirable Behavioral Traits and Their Impact on the Behavioral Performance of Broiler Chicks. in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* .2021,vol. 904.
13. Godara ,K.V and Singh,A .2019 . Effect of feed restriction and turmeric powder supplementation on broiler performance.*Haryana Vet.* (Dec. 2019)58(2),254-256.

14. Rajput, N., N. Muhammad, R. Yan, X. Zhong and T. Wang .2013. Effect of dietary supplementation of curcumin on growth performance, intestinal morphology and nutrients utilization of broiler chicks. *J. Poult. Sci.* 50:44-52
15. R. Aziz, S., A. Rashid, S. Impact Of Using Sunflower Seed Meal In Broiler Male Diets On Performance Traits And Carcass Characteristics. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 148-157. doi: 10.32649/ajas.2023.179726.
16. Mondal, M.A., Yeasmin, T., Karm, R., Nurealam Siddiqui, M., Raihanun-Nabi, S.M. Sayed, M.A. and Siddiky, M.N.A. 2015. Effect of dietary supplementation of turmeric powder on the growth performance and carcass traits of broiler chickens. *SEARCH. Agri.* 13(1); 188-199.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Baqer, H.; Gatea, S.; Altaie, S.; ALjanabi, T.; Growth performance of broiler chickens of turmeric (*Curcuma longa*) turmeric aqueous extract. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 79.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.79>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Production and characterization of flavored goat milk gels using zinc and calcium salts Producing functional foods

Qausar ALKaisy^{ID} 1,2*, Ali Alrikabi^{ID} 1, Jasim Al-Saadi^{ID} 2

¹ Department of Food Science/ College of Agriculture/ University of Basrah/ Iraq; ORCID.

² Department of Dairy Science and Technology/ College of Food Science/ AL-Qasim Green University/ Iraq. ORCID 0000-0002-0344-3566.

*Correspondence: qayssarhamad@fosci.uoqasim.edu.iq; Tel.: 009647715967596.

Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.80>

ABSTRACT

Goat milk gels were prepared using calcium and zinc salts. The viscosity of gel prepared by adding zinc chloride and flavored with banana and orange was higher than that of gel prepared using calcium chloride. WHC of gels prepared using zinc chloride and calcium chloride was high on the first day and then gradually decreased during storage time at 7 °C. The hardness of the sweetened, flavored goat milk gel prepared with calcium chloride was lower than that of the gel prepared with zinc chloride. The Sensory evaluation study showed that, in general, flavoring gels prepared from goat milk using zinc and calcium salts had a high degree of acceptability.

Keywords: flavored gel; Zinc chloride; Goat milk; Rheological properties

INTRODUCTION

Goat's milk is similar to cow's milk in its elemental composition 1. Goat milk contains 12.2% total solids, consisting of 3.8% fat, 3.5% protein, 4.1% lactose, and 0.8% ash. It has more fat, protein, ash, and less lactose than cow's milk 2. Goat milk contains less total casein but higher non-protein nitrogen than cow's milk 3. Goat milk has less α S-CN fraction and more κ -CN and β -CN fractions than cow milk 4. Milk protein gel formation is an essential and fundamental process in the dairy industry. This phenomenon occurs when protein-protein interactions form a three-dimensional network capable of trapping water molecules. Several types of protein gels are produced from milk and its components. The formation of acid gels is the most important because of its role in the formation of yogurt and similar products 5. Whey proteins form a gel substance due to exposure to a temperature higher than 70°C 6. While gels containing both whey proteins and casein can form during high-temperature storage of UHT milk 7. Heating milk after adding calcium chloride at concentrations ranging from 7 to 20 mM results in a gel similar to yogurt's but with a pH close to natural milk's pH of 8. Despite extensive studies on the effect of added calcium salts on casein particles, pure caseins, or pure whey protein systems, information about the effect of heat treatments on the interactions of added calcium with casein and whey proteins present in milk is limited. The effects of calcium ion activity, pH, temperature, and ionic strength on the physicochemical and rheological properties of the gel produced by adding calcium to skim milk were previously reported 9,10,11. The rheological properties of this type of gel

were also indicated by some researchers 11. This study aimed to prepare flavor gels from goat milk using calcium and zinc salts and identify their textural and sensory properties.

MATERIALS AND METHODS

Milk samples

Samples of mixed local goat milk were collected from several farms in Al-Hilla-Babil - Iraq, and fat was separated from milk using a milk separator to obtain skim milk.

Preparation of goat milk gels using calcium and zinc salts

Several preliminary experiments were established to determine the best conditions to form goat milk protein gel. Skimmed goat milk samples (100 ml) were heated at 85 °C for 20 minutes, sugar (7.5%) and flavoring materials (banana, orange, and cocoa flavors used according to manufacturing companies (made in China) were added to milk samples, mixed, and cooled to 22 °C. Calcium chloride and zinc chloride (13.5 mM) were added separately within the normal pH of milk. After that, the milk samples were heated to 85°C for 20 minutes and left without stirring to produce a gel. Gels were stored at 7 °C for 28 days.

Gel hardness

Textural properties were evaluated using a texture analyzer (CT3(4500), Brookfield engineering lab). The hardness of the samples was measured. The operation conditions were an artificial plastic cylinder (20 mm in diameter) inserted into each product to a depth of 20 mm with a 10.0 g trigger and speed of 1 mm/s ¹².

Water Holding Capacity (WHC)

Water-holding capacity (WHC) of sweetened flavored gel samples was determined as described by ¹³. Briefly, 10 g of gel sample was centrifuged at 5000xg for 10 min at 5°C. The resulting supernatant was carefully weighted to determine the amount of excluded water, $WHC \% = [1 - (w_2 / w_1)] \times 100$

$$WHC\% = [1 - (w_2 / w_1)] \times 100$$

whereas:

W1: Weight of the gel used

W2: Whole weight after centrifugation

Spontaneous Whey separation (SWS)

Spontaneous whey separation was determined according to the procedure described by ¹⁴. A cup of flavored gel was removed from the refrigerator and placed at a 45° angle. A needle connected to a syringe was used to withdraw the liquid whey from the sample's surface, and the whey's volume was measured. The process lasted for less than 10s to avoid further leakage of whey from the gel. The spontaneous whey separation was expressed as the percentage volume of whey over the initial weight of the gel sample.

Viscosity

The gel was broken by stirring with a glass rod (10 times clockwise; 10 times anticlockwise). Rotational viscosity measurements were done utilizing a Brookfield viscometer (model DV- E; Brookfield Engineering

laboratories) utilizing spindle No 3. Separately, measurement was caused at room temperature at 50 rpm for 1 minute, as described by ¹⁵.

Sensory evaluation

Eight panelists did a sensory evaluation among the College of Food Science/ Al-Qasim Green University staff for flavored goat milk gels to estimate the acceptability of gel samples. Gel specimens were assessed for flavor, body, texture, bitterness, and appearance/color on a 100-point scale according to the ensuing: flavor 40, body 15, texture 15, bitterness 20, and appearance/color 10. Mid scores from the eight panelists were documented¹⁶.

RESULTS

Viscosity of flavored goat milk gels

Figure (1) shows the storage effect on the viscosity of flavored goat milk protein gel. The viscosity of gel prepared by adding zinc chloride and flavored with banana, orange, and cocoa were 2110, 1395, and 1154 cp, respectively, while the viscosity for gel prepared using calcium chloride were 303, 296, and 301 cp, respectively, at day 1 of storage. The viscosity values gradually changed after 28 days of storage at 7 °C, and they were 1630, 1882, and 786 cp for gel prepared with zinc chloride and 223, 190, and 200 cp for gel prepared with calcium chloride, respectively.

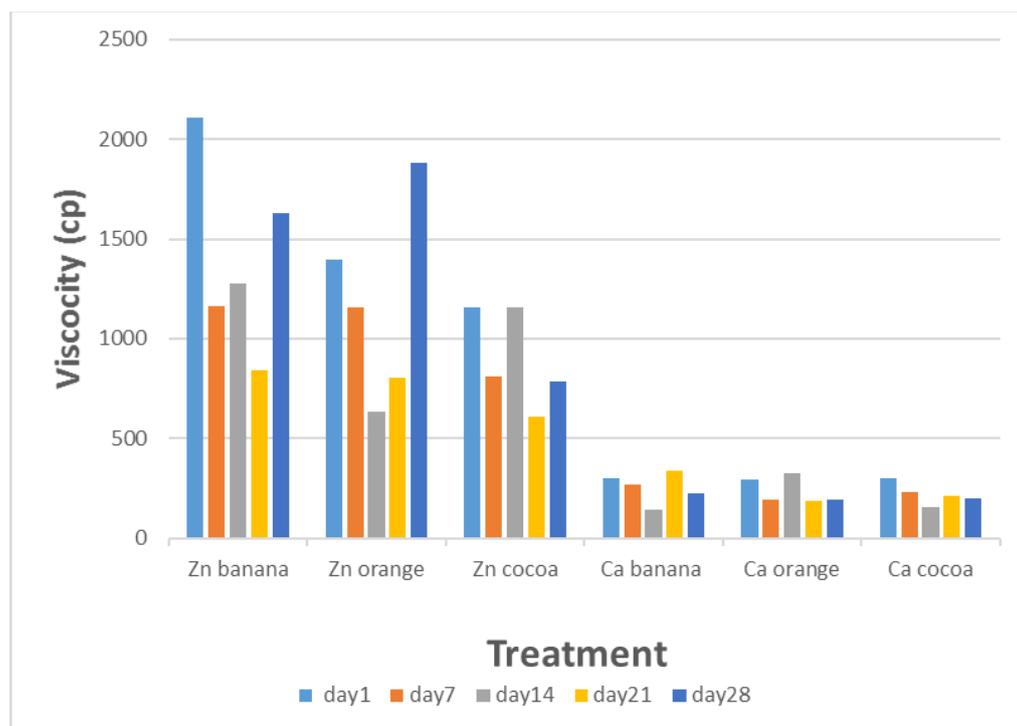


Figure 1. Changes in viscosity of flavored goat milk gel prepared using 13.5 mM of zinc and calcium chloride during storage at 7 °C for 28 days.

Water holding capacity of flavored goat milk gels

Water holding capacity is the ability of the gel to hold water within its structure. Figure (2) shows that the WHC of gels prepared using zinc chloride and calcium chloride was high on the first day and then gradually decreased during the progress of storage time at 7 °C. WHC on the first day for goat milk gels prepared using zinc chloride and flavored with banana, orange, and cocoa flavors were 31, 29, and 28%, respectively, while WHC for gels prepared with calcium chloride was 25, 28, and 29 % respectively. These values gradually decreased to 16, 19.5, 21.4%, 21.4, 22.1, and 24.6%, respectively, after 28 days of storage at 7 °C.

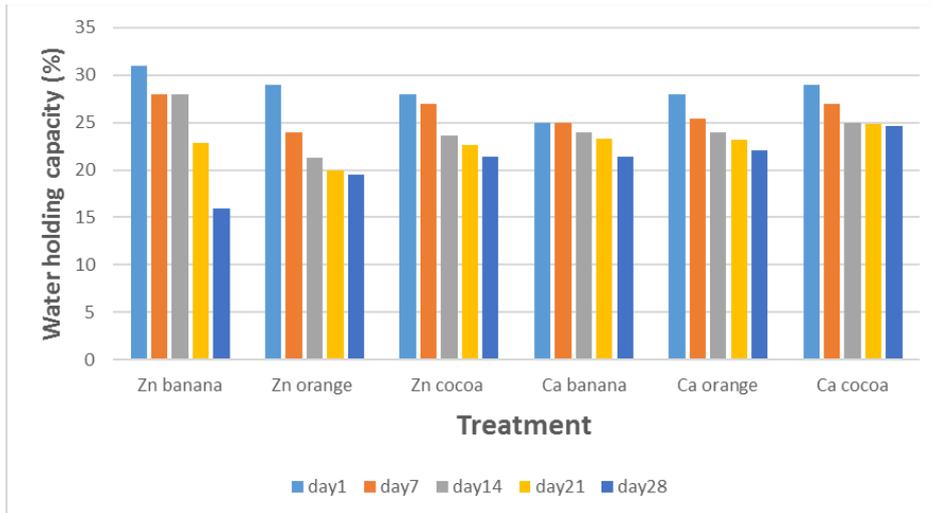


Figure 2: Changes in water holding capacity of flavored goat milk gel prepared using 13.5 mM of zinc and calcium chloride during storage at 7 °C for 28 days.

Spontaneous whey separation of flavored goat milk gels.

Spontaneous whey separation means liquid exudation at the top of the gel, which is one of the common defects of yogurt and sweetened gel. Figure (3) showed that SWS in goat milk gels prepared with zinc chloride and flavored with banana, orange, and cocoa were 0.9, 1, and 1.1 % in the first-day storage, while these values in the gel prepared with calcium chloride were 0.5, 0.2, and 0 %, respectively. These values changed after 28 days of storage to reach 1.4, 1.2, and 0.2 % for the gel prepared with zinc chloride and 1.5, 1, and 1.2 % for the gel prepared with calcium chloride, respectively.

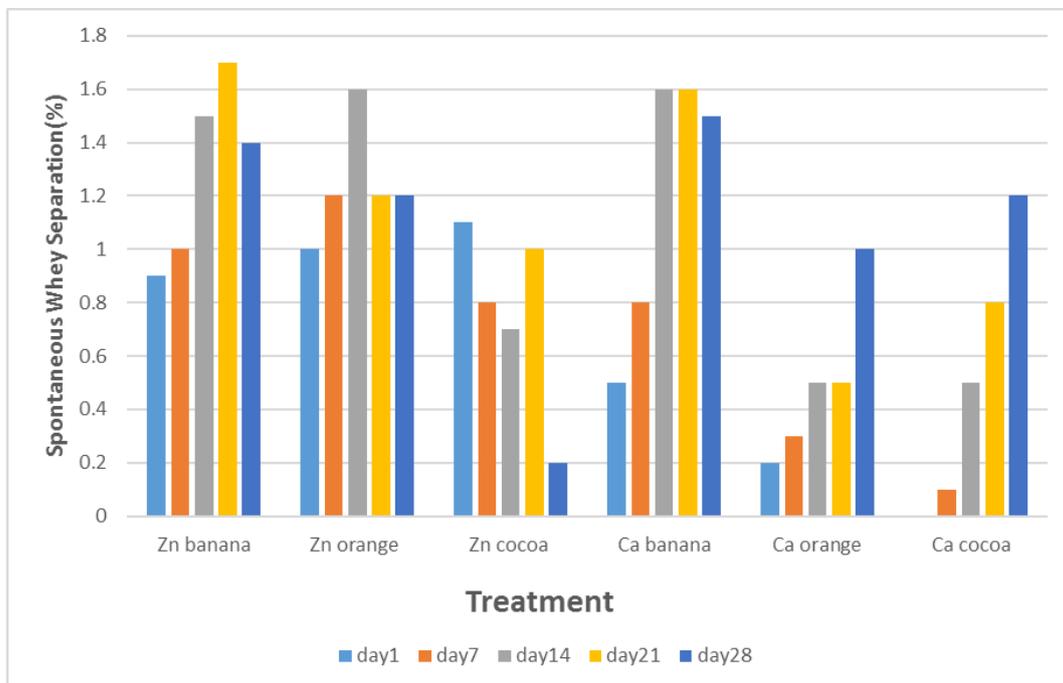


Figure 3. Changes in spontaneous whey separation of flavored goat milk gel prepared using 13.5 mM of zinc and calcium chloride during storage at 7 °C for 28 days.

Hardness of flavored goat milk gels

Hardness is the force needed to induce deformation in a gel, and it is a standard measure to indicate the strength of the gel network being analyzed. Figure No. (4) showed that the hardness of the sweetened flavored goat milk gel prepared with calcium chloride was lower than the hardness of the gel prepared with zinc chloride, where the hardness values for calcium gels flavored with banana, orange, and cocoa were 64.3, 57.9, 47.6 g, while the hardness in zinc gels were 207.3, 178.6, 158.4 g, respectively in the 1 day of storage, and these worth's altered after warehouse for 28 days at 7 ° C to 63.7, 54.4, 30 g for calcium gel and 237.2, 209.4, 147.3 g for zinc gels, respectively. The difference in the hardness of the gel prepared using different ions is due to the different ability of these minerals to interfere with milk proteins and the difference in their binding sites with proteins, which causes a difference in the three-dimensional structure of the gel network 17.

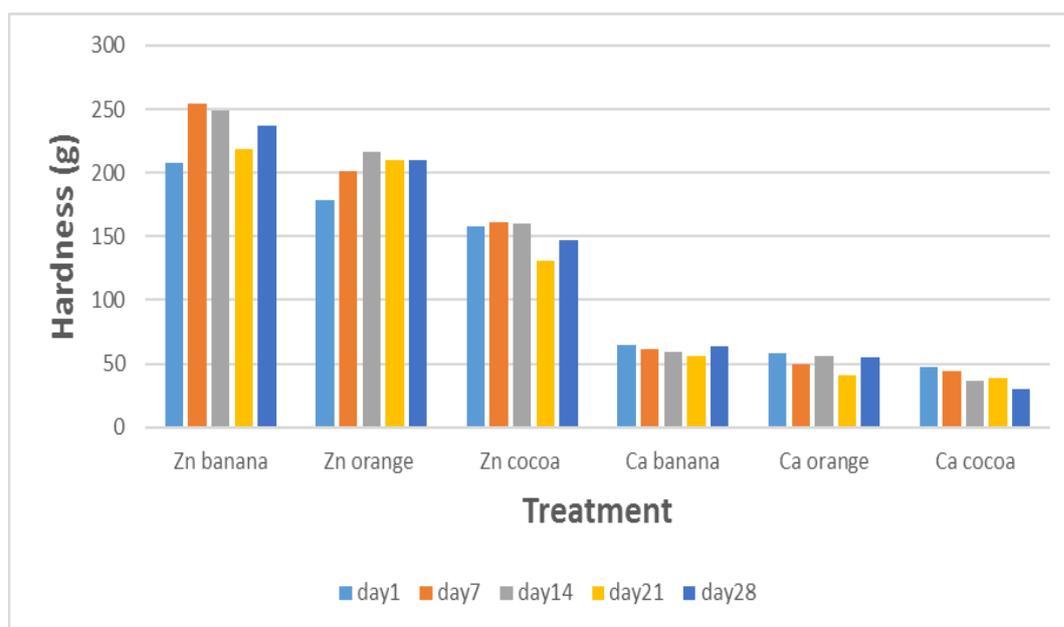


Figure 4. Changes in flavored goat milk gel hardness were prepared using 13.5 mM of zinc and calcium chloride during storage at 7 °C for 28 days.

Sensory evaluation of flavored goat milk gels

In general, flavoring gels prepared from goat milk using zinc and calcium salts were highly accepted (Figure 5). The total sensory evaluation scores for the goat milk proteins gel prepared with zinc chloride and flavored with banana, orange and cocoa on the first day were 90.6, 88.1, and 92.75, while the scores for gel prepared with calcium chloride were 86, 85.75, 89.25, respectively. These values changed during storage to reach after 28 days to 94.25, 89.5, and 94.75 for gel prepared with zinc chloride and 94.25, 90.25, and 90 for gel prepared with calcium chloride. The gels produced in this study were distinguished by their delicate texture and acceptable hardness.

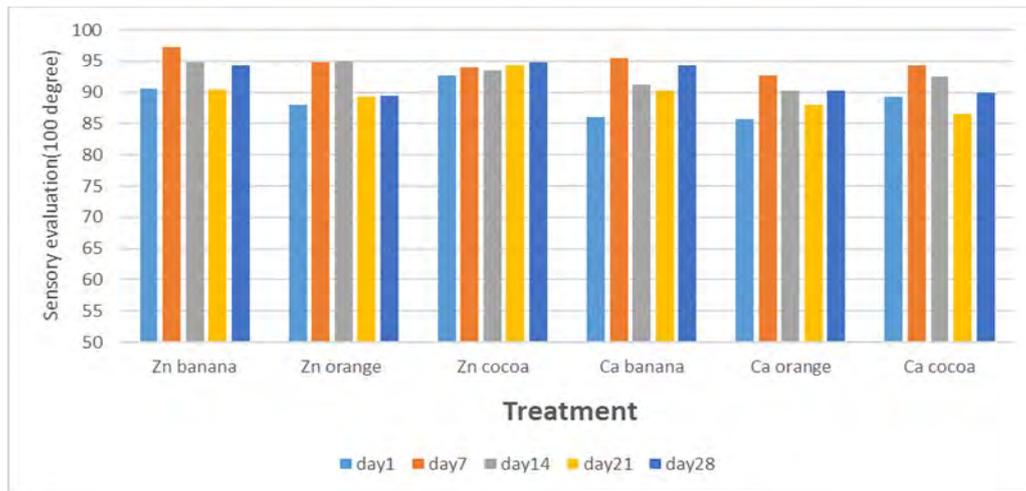


Figure 5. Sensory evaluation score of flavored goat milk gel crafted utilizing 13.5 mM of zinc and calcium chloride during storage at 7 °C for 28 days.

DISCUSSION

In general, the viscosity values for the sweetened flavored gel prepared with zinc chloride were higher than the gel prepared with calcium chloride, and this was due to the extensive loss of water from the gel prepared by adding zinc chloride. Besides, the change in viscosity values is due to the change in the properties of the sweetened gel during storage resulting from increasing interactions between milk proteins and salts. These results are consistent with what was indicated by ^{17,18}, who indicated that the hardness of the cow milk gel increased during the storage period, accompanied by an increase in viscosity. Concerning WHC values gradually decreased respectively after 28 days of storage at 7°C, and this is due to the increase in the interaction between salts, caseins, and whey proteins, which causes caseins to lose their net charges and increase their hydrophobicity, which leads to a decrease the ability of the gel to hold water. These results are consistent with the results found by ^{5,18}, and overall, we notice an increase in SWS during the storage period. It has an inverse relationship with the water retention capacity of the protein network²¹, and this can be due to the increase in the bonds between proteins and minerals in the gel network, which increases its hydrophobicity and allows the exudation of whey ¹⁸. as well as the difference in the hardness of the gel prepared using different ions is due to the different ability of these minerals to interfere with milk proteins, as well as the difference in their binding sites with proteins, which causes a difference in the three-dimensional structure of the gel network ¹⁸. The differences between the hardness of milk protein gel produced with different flavors during the storage period are related to the reactions between these flavors and milk proteins and ionic salts that affect the interaction between milk proteins, which affects the hardness⁶. This may be due to the addition of sugar during the preparation of the gel, which causes a reduction in the interactions between milk proteins ¹⁹. Panelists did not notice any undesirable taste in the resulting gels, and although the gels were crafted from skim goat milk, multiple panelists related them to be creamy. Hence, it may be achievable to utilize this technique to make quiet-fat dairy outputs with identical textures to those with more increased fat content.

CONCLUSIONS

the study investigated the effects of different salts on the properties of sweetened goat milk gels. The results showed that the viscosity of the gels was higher when zinc chloride was used instead of calcium chloride. This was due to the more extensive water loss from the gels prepared with zinc chloride. The WHC of the gels gradually decreased over time, and the SWS increased. This was due to the increase in the interactions between the salts, caseins, and whey proteins, which caused the caseins to lose their net charges and increase hydrophobicity. The panelists did not notice any undesirable taste in the resulting gels and found them creamy. Therefore, this technique could produce low-fat dairy products with the same texture as those with higher fat content.

Goat milk protein gels were constructed from skim milk utilizing heat therapy and 13.5 mM calcium chloride and zinc chloride. Flavoring gels prepared from goat milk using zinc and calcium salts were highly accepted.

Author Contributions: Qausar ALKaisy and Jasim Al-Saadi: Methodology, Resources, Writing-Original Draft. Ali Alrikabi: Conceptualization Writing-Review & Editing. Jasim Al-Saadi: Writing-Review & Editing. All authors have reviewed the final manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We highly thank her (Ashwaq Kadhim-Rahia) for their valuable help and support through this work. In addition, the financial support for the in vitro part of this work by Dr. Qaisar Hamad Ghayeb is highly acknowledged.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Rai, D. C., Rathaur, A., Yadav, A. K. (2022). Nutritional and nutraceutical properties of goat milk for human health: A review. *Indian Journal of Dairy Science*, 75(1). <https://epubs.icar.org.in/index.php/IJDS/article/view/121647>
2. Park, Y. W. (2010). Goat milk products: quality, composition, processing, and marketing. Encyclopedia of animal science. 2nd edition. Taylor and Francis. CRC Press. Boca Raton, FL. e DOI: 10.1081/E-EAS-120045703
3. Delger, M. (2021). Effect of seasonality and processing on physicochemical characteristics of goat and sheep milk: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Food Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand. Massey University. <http://hdl.handle.net/10179/16989>
4. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>
5. Lucey, J., Singh, H. (1998). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food research international*, 30(7), 529-542. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5)
6. Zain, H.; Tatar , A.; Alabi, O. M. .; Samiei Zafarghandi, M. . The Effect Of Using Different Levels Of Vitamin E On The Antioxidants Status Of Broiler Chickens. *JLSAR* 2023, 4, 37-44.
7. Torrance L, Cowan GH, McLean K, MacFarlane S, Al-Abedy AN, Armstrong M, Lim TY, Hein I, Bryan GJ. Natural resistance to Potato virus Y in Solanum tuberosum Group Phureja. *Theoretical and Applied Genetics*. 2020 Mar;133:967-80. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03521-y>
8. Datta, N., Deeth, H. (2001). Age gelation of UHT milk—a review. *Food and Bioproducts Processing*, 79(4), 197-210. <https://doi.org/10.1205/096030801753252261>
9. Sievanen, K., Huppertz, T., Kelly, A. L., Fox, P. F. (2008). Influence of added calcium chloride on the heat stability of unconcentrated and concentrated bovine milk. *International journal of dairy technology*, 61(2), 151-155. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00391.x>
10. Koutina, G., Christensen, M., Bakman, M., Andersen, U., Skibsted, L. H. (2016). Calcium induced skim-milk gelation during heating as affected by pH. *Dairy Science & Technology*, 96(1), 79-93.
11. Lin, L., Wong, M., Deeth, H., Oh, H. (2018). Calcium-induced skim milk gels using different calcium salts. *Food chemistry*, 245, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.081>
12. Ramasubramanian, L., D'Arcy, B. R., Deeth, H. C., Oh, H. E. (2014). The rheological properties of calcium-induced milk gels. *Journal of Food Engineering*, 130, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.01.020>
13. Ibraheem M W, Muhaimed A R, Mohammed Th. T. Leg cuts from Awaasi lambs fed a diet with varying levels of *Rhus coriaria* L., Physical dissection and chemical composition. *Revis Bionatura* 2022;7(4) 4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.4>

14. Harte, F., Luedecke, L., Swanson, B., Barbosa-Canovas, G. (2003). Low-fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1074-1082. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73690-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73690-X)
15. Amatayakul, T., Sherkat, F., Shah, N. P. (2006). Syneresis in set yogurt is affected by EPS starter cultures and levels of solids. *International journal of dairy technology*, 59(3), 216-221. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00264.x>
16. Donkor, O. N., Nilmini, S., Stolic, P., Vasiljevic, T., Shah, N. (2007). Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17(6), 657-665.
17. Bodyfelt, F. W., Tobias, J., Trout, G. M. (1988). The sensory evaluation of dairy products. Van Nostrand Reinhold.
18. N. Khorshed, A., S. Ahmed, A. Cultivation Of Reishi Mushroom (*Ganoderma Lucidum*) On Different Local Substates In Kurdistan Region, Iraq. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 158-173. doi: 10.32649/ajas.2023.179727
19. Ali, Z. K., Al-Saadi, J. M. (2019). Textural and sensory properties of milk proteins gels made by ferrous salts. *Euphrates Journal of Agriculture Science*, 11(4).
20. Belyakova, L. E., Antipova, A. S., Semenova, M. G., Dickinson, E., Merino, L. M., Tsapkina, E. N. (2003). Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31(1-4), 31-46. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00041-9)
21. Niamah, A. K., Al-Sahlany, S. T. G., Al-Manhel, A. J. (2016). Gum Arabic uses as prebiotic in yogurt production and study effects on physical, chemical properties and survivability of probiotic bacteria during cold storage. *World applied sciences journal*, 34(9), 1190-1196. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2016.34.9.184

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Qausar, A.; Ali A.; Jasim A. Production and characterization of flavored goat milk gels using zinc and calcium salts Producing functional foods. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 80. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.80>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Isolation and Identification of Fungal Species from the Insect Pest *Callosobruchus maculatus* (F.)Noor Akmoosh^{1*}, Ekhlash Al-Shareefi², Kawther Mohammed Ali³¹ University of Babylon, Babylon, Iraq; noorn6042@gmail.com; +9647818198773.² University of Babylon, Babylon/ Iraq³ University of Babylon/ Babylon/ Iraq; kawtherali1972@yahoo.com;

+9647800351337

* Correspondence: wsci.ikhlass.m@uobabylon.edu.iq; Tel.: (+9647822114389)

Available from: Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.81>**ABSTRACT**

Cowpea seed beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) is one of the most common and economically important pests of stored cereal products worldwide. Furthermore, these beetles can act as vectors for several fungal post-harvest diseases. The current research aimed to isolate the fungi associated with adults of *C. maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae); the present study aimed to isolate and identify fungi associated with adult insects and evaluate their potential as biocontrol agents against the cowpea beetle, *C. maculatus*. In this study, we collected *C. maculatus* adults from the Babylon local market and five regions (Hilah, Mahaweel, Al-Mashrou', Al-Haswa and Al-Musayyab) with no history of insecticide exposure. A potato dextrose agar medium was used to isolate the fungi attached to the surfaces of adult beetles. By Morphological and microscopic examination, Molecular identification and Sequencing analysis, Twenty-seven genera of fungi were isolated and identified from adult *C. maculatus*, including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida spp*, *white mycelium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Stachybotrys*, *Rhizopus*, *Drechslera*, *Scopulariopsis*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Geotrichum candidum*, *Streptomyces*, *Sarocladium*, *Beauveria bassiana*, *Talaromyces varians*, *Sporothrix flocculasa*, *Pseudozyma flocculasa*, and *Isaria fumosorosea*. The molecular weights of the PCR products for the fungi isolates ranged from 650-700 bp, and the amplified ITS1-5.8S-ITS4 rDNA region of indigenous entomopathogenic fungal isolates showed a high sequence similarity (99-100%) with *B. bassiana* and *M. anisopliae* deposited in the NCBI Genebank. The phylogenetic tree analysis of the ITS region sequences showed a high degree of similarity between the isolates under study, ranging from 96.5-100. However, there were differences in the sequences among clades, indicating genetic variation possibly due to mating or mutations in different environments. Our study suggests that the storage pest, *C. maculatus*, would be essential in spreading fungal contaminants and consequently increasing mycotoxin contamination in stored cowpeas.

Keywords: *Callosobruchus maculatus*, Isolation, Fungi.**INTRODUCTION**

Controlling pests in stored grains is as economically important as increasing the crop yield because, unlike crop damage during the growing season, post-harvest damage of stored grains is not financially compensated. Fungi and animal pests are the primary culprits for damage to stored grains, globally estimated to be responsible for 20% of food losses and up to 40-50% in some developing countries²³. Cowpea seed beetle *C. maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) is one of the most destructive pests on cowpea and other legumes growing

in tropical and sub-tropical countries, both in fresh green crusts in fields and in stored seeds²¹. The adults are not harmful. But, the larvae of this pest feed on cowpea *V. unguiculata* (L.), chickpea, *Cicer arietinum* L., lentil, *Lens culinaris* (Medik.), soybean, *Glycine max* (Mer.), and haricot beans, *Phaseolus vulgaris* (L.)¹⁷. The female adults of *C. maculatus* lay their eggs in the fresh cowpeas before reaping in the field. The larvae, hatched from these eggs, bore into the cowpea seeds, developed by feeding the embryo of the seeds, and matured in storage conditions in just about a month⁸. Therefore, the larvae can lead to both quantitative, due to grain weight loss caused by larvae feeding, and qualitative, due to product alterations such as loss of nutritious and aesthetic values, which increases the loss level in the cowpea grain mass^{1, 19}. Therefore, this pest requires great care due to the potential for severe damage.

Various researchers have isolated fungal species from insects—Burnside⁶ isolated *A. flavus*, *A. niger* and *P. corylophilum* from bees. Gillian and Prest¹⁰ and Gillian et al.¹¹ also isolated various fungi from bees, identifying the species *A. niger*, *A. flavus*, *P. corylophilum*, *C. cladosporoides* and *Alternaria* sp.

Recently, Rehner & Buckley²⁰ used two DNA regions, rDNA ITS-5.8s and elongation factor EF1- α , and compared 86 isolates of *Beauveria* from around the world and from several hosts. In addition to the original isolate from Scottish soil, they found a Swiss isolate labeled *B. bassiana* (ARSEF 1567) from a scolytid beetle grouped in *B. Caledonia*. Similarly, an isolate classified as *B. amorpha* (ARSEF 2251), also grouped in *B. caledonica*, was originally from a coleopteran insect in Brazil. This suggests that *B. caledonica* has the potential to be an insect pathogen¹².

MATERIALS AND METHODS

Samples Locations

Cowpea samples infested with cowpea seed beetle *C. maculatus* (F.) were collected from the local market in Babylon and for five regions (Hilah, Mahaweel, Al-Mashrou', Al-Haswa and Al-Musayyab), with no history of exposure to insecticides.

Ready-made dextrose potato medium

According to the manufacturer's instruction, this medium is prepared by suspending 39 gm of the medium in 1000 ml of distilled water with added 250 mg of chloramphenicol that prevents the growth of bacteria and sterilized by autoclave at 121°C and 15 lbs pressure. Soak for 20 minutes; after the end of the sterilization period, leave the beaker until it cools down to 50 °C, then pour the nutrient media into Petri dishes with a diameter of 9 cm and put them in the refrigerator until they are used for isolation, cultivation and reproduction of the fungi used in study²⁴.

Isolation of fungi from adult insects

To isolate pathogenic fungi from the insects, the insects are sterilized with ethyl alcohol (70%) in order to get rid of the fungus on the external surface for one minute, and then they are washed with distilled water and then sterilized with a solution of sodium hypochlorite NaOCl (1%) for 30 seconds, then washed with distilled water and placed on filter papers and then transferred by sterile forceps to the PDA medium at the rate of three replications, where five insects were placed in each repetition. The dishes were incubated at a temperature of 27 ± 2 for a period of 5-7 days; after that, the fungal isolates were purified on a new nutrient medium by taking a 0.3 cm diameter disc from the edge of the fungal colonies and transferred this disc by a sterilized needle to

the center of a plastic petri dish containing 20 mm of PDA medium, and the dishes were incubated at a temperature of 27 ± 2 for 5-7 days. After incubation and identification, the percentages of frequency and appearance of isolated fungi were calculated according to the following equation: -

Percentages of frequency = Number of isolates per species/ Total Number of isolates of all species * 100

Percentages of appearance = Number of appearance in each species of all samples/ Total Number of samples * 100

Morphological and microscopic examination

After appearance growth, colonies of fungi concerning color, shape and texture (Powdery, Granular, Cottony) as recorded pigments are examined on the colony surface and appearance on the foundation. Fungi isolates are examined microscopically, and the fingerprint of the fungi in the colony is taken by adhesive tape. Transparent adhesive tape touches the surface of the fungal colonies, and then the tape is on a glass slide containing a drop of lactophenol cotton blue. Slides were examined under magnification 10X, 40X, and 100X as described ³⁰.

Molecular identification

Fungal genomic DNA was extracted from mycelia by using a Favorgen kit. The internal transcribed spacer with 5.8 s rDNA was amplified using ITS5/ITS4 universal primer for fungal isolates. The PCR mixture was prepared according to Table (1) and augmented on the current cyclor PCR system (Labnet, USA) by conditions in Table (2).0; (Pitt and Hocking, 2013; Rai, 2016). The PCR products were run on 1.5% agarose gel, and electrophoresis was made at 70 V for 30 min. The gel was pre-stained with 0.05% ethidium bromide. The PCR bands were noticed by using an ultraviolet transilluminator.

No.	Chemical materials	Volumes (μ l)
1.	Master Mix	12 μ l
2.	Forward Primer	1 μ l
3.	Reveres Primer	1 μ l
4.	DNA	1-2 μ l
5.	Deionizer D. W	Adjusted the volume to 25 μ l
	Total mix	25 μ l

Table 1. PCR mixture.

No.	Steps	Temp.	Time	cycles	Cool stage
1.	Primary denaturation	95 C	Min. 5		
2.	Denaturized	95 C	30 sec	30	
	Annealing	56 C	1.5 Min		
	Extension	72 C	1 Min		
3.	Final extension	72 C	10		4C

Table 2. PCR conditions

Sequencing analysis

Ten isolates of fungal species from this study PCR products are subjected to sequencing analysis. Direct sequencing analysis was performed on the 20 µl PCR product of AFU5S primer, sent to the Macrogen Laboratory in Korea. Afterward, the DNA sequencing data for different fungi isolates were compared with the gene bank using the NCBI Blast nucleotide database.

Phylogenetic tree

The phylogenetic tree is analyzed by using Mega version 6 software program with an unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) tree type based on sequences data of fungal species amplified by ITS5/ITS4 primer for 10 isolates.

RESULTS

Isolation of fungi from adult insects

The results indicate (table 3) that the highest occurrence of isolated fungi from *C. maculatus* was observed in the fungus *A. niger*, with a rate of 46.05%, followed by *Penicillium* sp. and *A. flavus*, which had occurrence rates of 12.91% and 12.33%, respectively. On the other hand, *Aspergillus nidulans* and *Pseudozyma flocculata* had the lowest occurrence rates, at 0.15% and 0.16%, respectively, among the other isolated fungi. The remaining fungi showed varying occurrence rates ranging from 0.22% to 5.16%.

The results also showed that the highest percentage of occurrence was found in the fungi isolated from *C. maculatus* males, specifically those isolated from the Al-Musayyib region (3.72%), followed by the Al-Hilla and Al-Mahawil regions, where the fungal presence was recorded at 3.70% in each. At the same time, the fungi isolated from *C. maculatus* female showed an occurrence rate of 3.69% among all insect samples collected from the study locations (Al-Musayyib, Al-Hassoah, Al-Mishrak, Al-Mahawil, and Al-Hilla). Among the fungi isolated from *C. maculatus* in this study, two fungi, namely *B. bassiana* and *I. fumosorosea*, were selected as biological agents for conducting further experiments.

NO	The location	Al-Hilla		Al-Mahaw eel	Al-Mashrou'			Al-Haswa		Al-Musayyab		Mean
		The percentage of occurrence of fungal species in Males & Females										
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female		
1	<i>Aspergillus niger</i>	40	26.3	28	34.9	50	41.4	87.1	60.3	46.9	45.6	46.05
2	<i>Aspergillus terreus</i>	0	1.7	8	0	0	0	2.5	11.1	8.1	0	3.14
3	<i>Aspergillus flavus</i>	15	22.8	4	15.8	20.4	9.7	0	6.3	9.8	19.5	12.33
4	<i>Aspergillus chevalieri</i>	0	3.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0.35
5	<i>Aspergillus candidus</i>	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
6	<i>Aspergillus nidulans</i>	0	0	0	1.5	0	0	0	0	0	0	0.15
7	<i>Aspergillus tamarii</i>	0	0	0	0	6.8	0	0	0	0	0	0.68
8	<i>Penicillium</i>	10	19.2	16	7.9	9	26.8	2.5	9.5	19.6	8.6	12.91
9	<i>Candida spp</i>	0	1.7	4	0	0	0	5.1	3.1	0	6.5	2.04
10	White mycelium	7.5	0	4	0	0	2.4	0	3.1	0	0	1.7
11	<i>Curvularia</i>	5	0	0	1.5	0	0	0	0	0	0	0.65
12	<i>Cladosporium</i>	7.5	8.7	4	3.17	0	12.1	0	0	3.2	0	3.867
13	<i>Chaetomium</i>	0	7	0	14.2	0	0	0	0	0	0	2.12
14	<i>Stachybotrys</i>	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.75
15	<i>Rhizopus</i>	0	0	12	4.7	11.3	7.3	2.5	6.3	3.2	4.3	5.16
16	<i>Drechslera</i>	0	0	8	6.3	0	0	0	0	0	0	1.43
17	<i>Scopulariopsis</i>	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4.3	0.83
18	<i>Paecilomyces</i>	0	0	0	3.1	0	0	0	0	0	0	0.31
19	<i>Mucor</i>	0	0	0	0	2.2	0	0	0	0	0	0.22
20	<i>Geotrichum candidum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.5	0.65

21	<i>Streptomyces</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	8.1	0	0.81
22	<i>Sarocladium</i>	2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25
23	<i>Beauveria bassiana</i>	5	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0.67
24	<i>Talaromyces varians</i>	0	0	0	4.7	0	0	0	0	0	0	0.47
25	<i>Sporothrix flocculasa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.3	0.43
26	<i>Pseudozyma flocculasa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1.6	0	0.16
27	<i>Isaria fumosorosea</i>	0	0	8	1.5	0	0	0	0	0	0	0.95
	The total	40	57	25	63	44	41	39	63	61	46	
	Mean	3.70	3.69	3.70	3.68	3.69	3.69	3.69	3.69	3.72	3.69	

Table 3. Percentages for the emergence of fungal species in males and females of *C. maculatus* adults.

Molecular diagnosis of Fungi

DNA extraction and PCR assay

Ten isolates of fungi species in this study were subjected to DNA extraction. The ITS5 and ITS4 are universal primer pairs that targeted the sequences place of the ITS1-5.8S-ITS2 gene of the fungi isolates, which was used to discriminate fungi to the species level. The molecular weights of the PCR products for the fungi isolates under study ranged from 650-700 bp., as there were clear differences in the molecular weight of fungi species when ITS5 and ITS4 primers were used. The figure shows agarose gel electrophoresis of PCR products for fungi species.

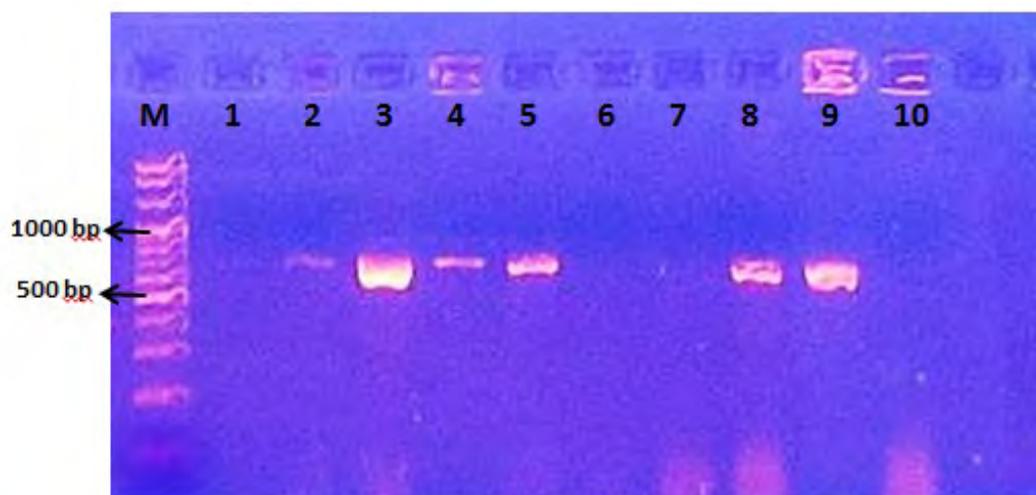


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products for ITS1-5.8S-ITS2 gene of fungi species. Lane M= molecular marker 1500 bp.

Sequencing analysis

PCR was done for ten fungi isolates for the ITS region; direct sequencing analysis was performed on the 20 μ l PCR product of the ITS region and was sent to the Macrogen Laboratory in Korea. After obtaining the sequence of the nitrogenous bases of the sent isolates, they are matched with the sequence of reference samples in the gene bank using the NCBI Blast Nucleotide Database to confirm the highest proportion of the genus and species name for each isolate.

Table (4) shows the results of molecular diagnosis for fungi isolates under study comparison with reference strains in NCBT by Telomorpe name, and the Anamorpe name offsets it. The Table showed that the molecular diagnosis using the nitrogenous bases sequence of some samples was identical to the phenotypic diagnosis using traditional laboratory methods except for several isolates, some of which have not been diagnosed with traditional methods to species level, which are diagnosed by molecular methods.

No.	Molecular diagnosis		Reference strains	Final Diagnosis (Anamorphic)
	NCBT strain (Telomorpe)	Identities		
1.	<i>Sarocladium</i> sp.	100%	MG279089.1	<i>Acremonium</i> sp.
2.	<i>Sarocladium subulatum</i>	100%	MG589575.1	<i>Acremonium</i> sp.
3.	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	99%	OQ612703.1	<i>Sporothrix flocculosa</i>
4.	<i>Aspergillus flavus</i>	99%	MH237625.1	<i>Aspergillus flavus</i>
5.	<i>Talaromyces varians</i>	99%	MH856408.1	<i>Penicillium varians</i>
6.	<i>Talaromyces varians</i>	99%	KC962109.1	<i>Penicillium varians</i>
7.	<i>Beauveria bassiana</i>	98%	KX376473.1	<i>Beauveria bassiana</i>
8.	<i>Beauveria bassiana</i>	99%	MT528790.1	<i>Beauveria bassiana</i>
9.	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	100%	OW984012.1	<i>Sporothrix flocculosa</i>

Table 4. Results of molecular diagnosis for fungi isolates under study comparison with reference strains in NCBT.

Phylogenetic tree

The phylogenetic tree was analyzed using Mega 6 software program with an unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) tree type based on sequences data of ITS region amplified by ITS5/ITS4 primers pair for 9 isolates. The results of phylogenetic tree analysis for entomopathogenic fungi were observed in five groups. *T. varians*, *B. bassiana*, *P. flocculosa*, *A. flavus* and *Sarocladium* sp. (Figure 2).

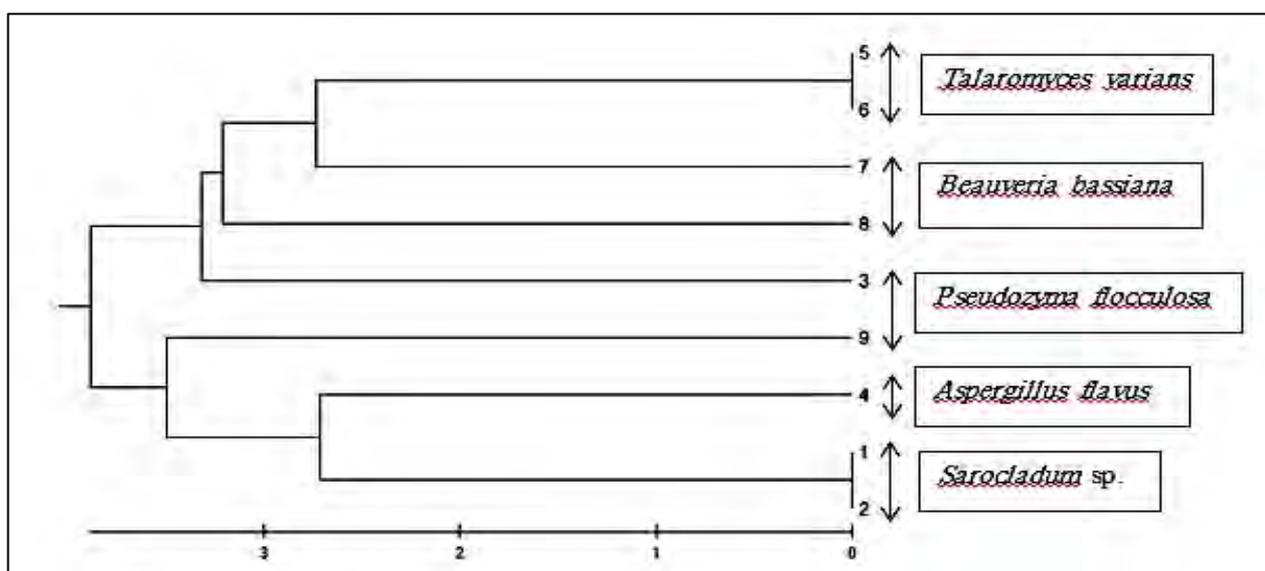


Figure 2. Phylogenetic tree based on ITS region sequences for Fungi isolates understudies.

Drawing the phylogenetic tree of the ITS region sequences for the isolates under study shows a high degree of similarity between species, ranging from 96.5-100 %. The difference in sequence among any clades shows approximately 0.0-3.5 %. The weighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) tree type was a common type of phylogenetic tree to determine the diversity of pathogenic fungi. Therefore, many studies have used this type of tree.

DISCUSSION**Isolation of fungi from adult insects**

Twenty-seven genera of fungi were isolated and identified from adult *C. maculatus*, including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* spp, white mycelium, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Stachybotrys*, *Rhizopus*, *Drechslera*, *Scopulariopsis*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Geotrichum candidum*, *Streptomyces*, *Sarocladium*, *Beauveria bassiana*, *Talaromyces* variants, *Sporothrix flocculasa*, *Pseudozyma flocculasa*, and *Isaria fumosorosea*. Most of them belonged to *Aspergillus*, from which seven species were isolated. The reason for this is that *Aspergillus* possesses small reproductive units in large numbers, allowing for long-distance dispersal and the ability to form specific structures to resist unfavorable environmental conditions for its growth²⁵. These findings are consistent with²⁶, who isolated several fungal genera from the mosquito *Gx. quinquefasciatus*, including *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Trichoderma*. These results also agreed with²³, who isolated several fungal genera from the *Tribolium castaneum*, including *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Hyphopichia burtonii*, *Penicillium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Cephalophora* spp., *Alternaria alternate*, *Monascus* sp., *Fusarium*, *Nigrospora*, *Beauveria*, *Chaetomium*, *Coprinellus*, *Irpex*, *Lichtheimia*, *Trichoderma*, *Byssoschlamys*, *Cochliobolus*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Polyporales*, *Rhizomucor* and *Talaromyces*.

Among the fungi isolated from *C. maculatus* insects, two fungi, *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea*, were found. These fungi were utilized as biological agents in this study for insect control, as they have been used to combat various insects.

The selection of *B. bassiana* in the current study agreed with Ozdemir et al.²⁷, who used *B. bassiana* in combating the insect *C. maculatus*. Additionally, *I. fumosorosea* was chosen to control the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), which is consistent with the findings of the current study on biological control.

Molecular diagnosis of Fungi

The molecular weights of the PCR products for the fungi isolates under study ranged from 650-700 bp. As there are clear differences in the molecular weight of fungi species by ITS5 and ITS4 primer were used, this agrees with most references that used ITS1-5.8S-ITS2 region of fungal rDNA by ITS5 and ITS4 primer²².

While there are several references were used for ITS1 and ITS4 primer for ITS1-5.8S-ITS2 region of fungal rDNA to the identification of entomopathogenic fungi [5,18,4] were isolated twenty-one entomopathogenic fungi, the resulting from the electrophoresis of the PCR product using the universal primer for the amplification of ITS rRNA gene of bands with a size of 650 bp. Also, Gebremariam et al.⁹ used ITS1 and ITS4 primers

to identify *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with a band size of 545 bp. for two species. Another study¹⁵, for the first time, used the primer binding site (PBS) marker system to discriminate among the entomopathogenic fungi species successfully.

The PCR sequencing of the ITS region of rRNA is currently regarded as the standard method for phylogenetic analyses and identification of fungal species. It provides an excellent tool for identifying fungi species that do not present typical morphological characteristics^{28,14}.

Some studies used sequence analysis of ITS region by using ITS1 and ITS4 primers or ITS5 and ITS4 primers for identification of entomopathogenic fungi such as Imoulan *et al.*,¹³ were isolated and identified several species of *Beauveria*. Species identification using only ITS region of rDNA as a DNA barcode reached its resolution limit within *Beauveria*. While Lu *et al.*,¹⁶ four entomopathogenic fungi strains were isolated and identified as *Lecanicillium attenuatum*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium longisporum*, and *Akanthomyces lecanii* based on rDNA-ITS sequence analysis. Also, Yang *et al.*,²² isolated four genes of entomopathogenic fungi from soil samples collected from different localities of southern China as *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea*, *Aspergillus nomius* and *Akanthomyces attenuatus*.

Results of the phylogenetic tree coincided with several recent studies that show a high degree of similarity and homogeneity in the ITS region among entomopathogenic fungi. Al-Shindah *et al.*,²⁹ isolated twenty-one different fungal isolates from samples of infected insects from different areas in Salah El-Din Governorate in Iraq and showed the percentage of similarity between the isolates of entomopathogenic fungi and their conformity with the globally registered fungal species in NCBI. The similarity ratio reached 97.51 - 99.80% with the globally registered strains, confirming the diagnosis's accuracy. While Gebremariam *et al.*,⁹ used sequences of ITS1-5.8S-ITS4 rDNA region of all indigenous entomopathogenic fungal isolates showed 99–100% sequence similarity with *B. bassiana* and *M. anisopliae* deposited in NCBI/Genbank.

Although there is a high similarity to the fungi isolates in this study in matching the nucleotide sequences, they are genetically different isolates because the match was not 100%. This may be due to matings or mutations that occur in fungi due to their presence in different environments^{2,3}.

CONCLUSIONS

Twenty-seven genera of fungi were isolated and identified from adult *C. maculatus*, including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida spp*, *white mycelium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Stachybotrys*, *Rhizopus*, *Drechslera*, *Scopulariopsis*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Geotrichum candidum*, *Streptomyces*, *Sarocladium*, *Beauveria bassiana*, *Talaromyces variants*, *Sporothrix flocculate*, *Pseudozyma flocculate*, and *Isaria fumosorosea*

The molecular weights of the PCR products for the fungi isolates ranged from 650-700 bp, and the amplified ITS1-5.8S-ITS4 rDNA region of indigenous entomopathogenic fungal isolates showed a high sequence similarity (99-100%) with *B. bassiana* and *M. anisopliae* deposited in the NCBI/Genbank. The phylogenetic tree analysis of the ITS region sequences showed a high degree of similarity between the isolates under study, ranging from 96.5-100. However, there were differences in the sequences among clades, indicating genetic variation possibly due to matings or mutations in different environments

Two fungi, *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea*, were selected as biological agents based on their occurrence rates in male and female *Callosobruchus maculatus* adults.

Funding: This research received no external funding

Data Availability Statement: Data Availability Statements in the “Bionatura Research Data Policies” section at <https://www.revistabionatura.com/policies.html>.

Acknowledgments: The authors would like to thank all the Advanced Mycology Laboratory at the College of Science for Women / University of Babylon for their collaboration.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Al Sharefi, E., & Cotter, S. C. (2019). The nutritional ecology of maturation in a carnivorous insect. *Behavioral Ecology*, 30(1), 256-266.
2. Al-Abedy A.N.; Abu Dakka A.B.; Al-Ghazali N.A. and Ali U.A. (2018). Molecular diagnosis of isolates belonging to the fungi *Rhizoctonia*, *Fusarium* *Pencillium tardochrysogenum*, *Fusarium solani* and *Verticilliodes* isolated from the roots of some tomato plants lycopersicum solanum. *Karbala Journal of Agricultural Sciences*). 5(2).
3. Al-Jawer Z.W.; Ahmed K.D. and Al-Shukurji M.A. (2018). Molecular identification of local isolates of the fungus *Aureobasidium pullulans*. *The Journal of Mesopotamian Sciences*, 27 (4) / Issue of the Third Conference on Life Sciences from 126-115.
4. Al-Shindah1R.S.D.; Hassan A.A. and Mansour M.S. (2022). Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungi from Green Peach Aphid *Myzus Persicae* and Evaluation of Their Activity for Insect Control. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*.
5. Bich G.A.; Castrillo M.L.; Kramer F.L.; Villalba L.L. and Zapata P.D. (2021). Morphological and Molecular Identification of Entomopathogenic Fungi from Agricultural and Forestry Crops. *Floresta e Ambiente*; 28(2): 1-11.
6. Al-Abedy A.N.; Kadhim J.H; Abdalmoohsin R.G; Al-Taey DK. Genetic diversity of *Tomato yellow leaf curl virus* isolates and the effect of the virus on the hormone content of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Research on Crops*. 2021;22(2):347-55.
8. Fox, C. W., & Tatar, M. (1994). Oviposition substrate affects adult mortality, independent of reproduction, in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Ecological Entomology*, 19(2), 108-110.
9. Gebremariam A.; Chekol Y., and Assefa F. (2021). Phenotypic, molecular, and virulence characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide. *Heliyon*, 7.
10. Gilliam, M., & Prest, D. B. (1972). Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 20(1), 101-103.
11. Gilliam, M., Prest, D. B., & Morton, H. L. (1974). Fungi were isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2, 4-D and antibiotics. *Journal of invertebrate pathology*, 24(2), 213-217.
12. Glare, T. R., Reay, S. D., Nelson, T. L., & Moore, R. (2008). *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. *Mycological Research*, 112(3), 352-360.

13. Imoulan A.; Hussain M.; Kirk P.M.; El Meziane A. and Yao Y. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20 (4): 1204-1212.
14. Kawasaki M (2011). Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses. *Medical Mycology* 52:291–295.
15. Kushiyevev R.; Tunçer C.; Özdemir I.O.; Erper I.; Kalendar R.; Alkan M. and Özer GT. (2022). Molecular Characterization of Native Entomopathogenic Fungi from Ambrosia Beetles in Hazelnut Orchards of Turkey and Evaluation of Them in Vitro Efficacy. *Insects* 13:1-17.
16. Lu Q.; Wang P.; Ali A. and Zang L.S. (2022). Molecular Identification and Virulence of Four Strains of Entomopathogenic Fungi Against the Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 115, (3): 731–738.
17. Mahfuz, I., & Khalequzzaman, M. (2007). Contact and fumigant toxicity of essential oils against *Callosobruchus maculatus*. *University Journal of Zoology, Rajshahi University*, 26, 63-66.
18. Mohammed A.A.; Ahmed F.A.; Younus A.S.; Kareem A.A. and Salman A.M. (2022). Molecular identification of two entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* strains and their efficacy against two aphid species in Iraq. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20 (67): 1-8.
19. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>
20. Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84-98.
21. Singh, S. R., & Emden, H. V. (1979). Insect pests of grain legumes. *Annual Review of Entomology*, 24(1), 255-278.
22. Suwaid, A. H. .; Rashid, M. A. .; Taha, M. M. . Genetic Analysis For Combining Ability And Estimation Of Some Genetic Parameters Of Yield And Its Components In Maize Using Half Diallel Cross. *Journal of Life Science and Applied Research*. 2020, 1, 60-64.
23. Yun, T. S., Park, S. Y., Yu, J., Hwang, Y., & Hong, K. J. (2018). Isolation and identification of fungal species from the insect pest *Tribolium castaneum* in rice processing complexes in Korea. *The plant pathology journal*, 34(5), 356.
24. Griffith, G. W., Easton, G. L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., Worgan, H. J., ... & Perkins, W. T. (2007). Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS microbiology letters*, 276(2), 165-171.
25. Samson, R. A., Evans, H. C., & Latge, J. P. (1988). *Atlas of entomopathogenic fungi* Springer. Verlag., Berlin, Heidelberg, New York, 1-187.
26. Govindarajan, M., Jebanesan, A., & Reetha, D. (2005). Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Tropical biomedicine*, 22(1), 1-3.
27. Ozdemir, I. O., Tuncer, C., Erper, I., & Kushiyevev, R. (2020). Efficacy of the entomopathogenic fungi; *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-5.

28. Cafarchia, C., Iatta, R., Latrofa, M. S., Gräser, Y., & Otranto, D. (2013). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infection, Genetics and Evolution*, 20, 336-351.
29. Al-Shindah, R. S., Hassan, A. A., & Mansour, M. S. (2022, July). Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungi from of Green Peach Aphid *Myzus Persicae* and Evaluation of Their Activity for Insect Control. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1060, No. 1, p. 012093). IOP Publishing.
30. Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A., & Pitt, J. I. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in food mycology*, 3-31.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Akmoosh N., Al-Shareefi E., Kawther Mohammed Ali. Isolation and Identification of Fungal Species from the Insect Pest *Callosobruchus maculatus* (F.). *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 81. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.81>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Study protective role *Camellia sinensis* L. (black tea) and silver, Zn oxide nanoparticles on antioxidant-oxidant enzymes and biochemical level against paracetamol overdose in adult male rats

Doaa Adil Rabee^{1*}, Ghufran Hasan Oleiwi², Baha Abdel Hussein Musa³, Nibras Al-Ibrahemi⁴, Mohammed Oleiwi Abdulridha⁵

¹ University of Karbala/ Karbala/ Iraq; doaa.a@uokerabala.edu.iq

² University of Karbala / Karbala / Iraq; ghufran.h@uokerabala.edu.iq

³ University of Karbala / Karbala / Iraq; bahaa.a@uokerabala.edu.iq

⁴ University of Karbala / Karbala / Iraq; nibras.a@uokerabala.edu.iq

⁵ University of Karbala / Karbala / Iraq; mohammed.alubodi.92

* Correspondence: doaa.a@uokerabala.edu.iq; Tel.: (+9647719491064)

Available from: Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.82>

ABSTRACT

This study aims to measure the preventive effect of the silver, Zn oxide nanoparticles, and *Camellia sinensis* L. (black tea) on liver toxicity caused by the paracetamol drug. The Nanomaterials, with a practical size range of 33–40nm, black tea was extracted by Soxhlet apparatus using methanol alcohol at a concentration (80%); design in this study, 60 adult male rats weighing between 195 and 330 g and aged 11 to 14 weeks were used. They were kept in a relatively regulated setting with a temperature of 25C° at the University of Karbala's animal facility. They received food. There were eight rat group divisions. G1: just received saline solution (0,85%) as the control. G2: 250 milligrams of black tea and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body weight. G3: 400 milligrams of *C. sinensis* L. and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body weight. G4: injection of 0.3 milligrams of zinc nanoparticles and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body weight. G5: injection of 0.5 milligrams of zinc nanoparticles and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body weight. G6: injection of 0.3 milligrams of silver nanoparticles and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body G7: injection of 0.5 milligrams of silver nanoparticles and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body, G8: 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body administered intravenously, the blood bled for 30 days after receiving all dosages orally once daily for 21 days. When rats were given injections of 0.5 mg of nanoparticles and when injections of 250 mg of a black tee., it was discovered that the concentration of Malondialdehyde MDA, Lipid Peroxidation LPO, Triacylglycerid, cholesterol levels, and glucose decreased significantly. In contrast, Glutathione peroxidase GPX and protein levels are increased considerably. This was due to the injections' preventive and antioxidant action against the oxidative stress brought on by the paracetamol height dose.

Keywords: silver nanoparticles, Zn oxide nanoparticles, *Camellia sinensis* L., paracetamol.

INTRODUCTION

Metallic nanoparticles are used in a wide range of nanoscience and nanotechnology fields. These nanoparticles may take the place of regularly used drugs in certain applications¹. Emerging materials called gold nanoparticles have different optical and electrical properties from traditional materials and have a promising future in the medical industry². Silver particles attracted people because of their unique properties compared to silver of a smaller size, the large (Bulk). Due to its wide applications, the scientific and industrial community has paid specific attention to the topic of these minutes. As silver nanoparticles represent more than 23% of

the nano products available in the current market³, silver nanocomposites impact fungi, bacteria, and viruses. Due to their small size (less than 5 nanometers), silver particles tend to migrate to the surface. This migration is facilitated by the nanoparticles' increased surface area and increased synthesis of reactive oxygen, resulting in free radicals forming⁴ zinc oxide nanoparticles. One of the most crucial microelements requires vital activities. It enters the body through food and water, is primarily absorbed in the small intestine, and then travels to the blood plasma⁵, which significantly impacts apoptosis. Zinc overload results in necrosis or apoptosis, which is cell death⁶; ZnO nanoparticles are among the most common nanoparticles used in ointments, lotions, and other products that protect skin from UV burns and cancer⁷; ZnO nanoparticles impartment role in Dermatology, endocrinology, radioisotope diagnostics, and the treatment of immune deficiency diseases, ZnO nanoparticles are essential for biological processes such cell growth and division, immunological response, teratogenesis, and osteogenesis. According to the percentage of tea sold overseas globally, there are three main types: 78% black, 20% green, and 2% oolong. Theaflavin, 3-gallate a flavin, 3-gallate flavin, and 3-gallate a flavin are the primary flavins in black tea. Black tea's astringent flavor and copper color result from the orange-red flavins component⁸.

In addition to their antioxidant characteristics, tea polyphenols are recognized for their antibacterial action⁹. Reactive oxygen species (ROS), which include a range of chemicals produced from molecular oxygen, such as O₂⁻, H₂O₂, and OH⁻, can harm cells and tissues. Antioxidants can lessen or prevent this damage. Antioxidants are divided into many types. Super Enzymatic Antioxidants are made up of enzyme oxidation as well as other enzymes that cause CAT, catalase, and SOD, oxide dismutase, to transform into non-interacting molecules¹⁰. Non-enzymatic antioxidants A, C, E, and Menia are the second type. Vitamins Antioxidants Non-enzymatic albumin, glutathione, zinc, copper, and other antigens are crucial in preventing the harm caused by free radicals in the body. The study attempts to pinpoint the significant alterations in the non-enzymatic antioxidant levels in the serum of infected women. Compared to women with toxic diseases, breast cancer¹¹ Paracetamol, which has a vital role in treating oxidative damage in the body, is used to treat moderate fever and pain. Aspirin and ibuprofen's gastrointestinal adverse effects are absent when taken in large dosages, making it a suitable overdose medication¹². However, acute overdoses of paracetamol, whether accidental or planned, are relatively common and can be exceedingly dangerous. Adults may suffer severe hepatocellular necrosis if they consume 10–15 grams of paracetamol, and 20–25 grams are lethal¹³.

MATERIALS AND METHODS

- 1- Practicable size (33–40nm) silver and Zinc oxide nanoparticles were acquired from Nanomaterials.
- 2- After being cleaned and foreign things removed, the black tea leaf was purchased at a nearby market in Karbala. Three times with tap water and once with (DW) distilled water were used to wash the leaves. Electrical grinding was performed on each dry component. The powdered components were kept in polypropylene tubes and the refrigerator at 40C0 until use¹⁴⁻¹⁵.
- 3- Soxhlet apparatus (100g of powdered (black tea) *Camellia sinensis* L. leaf, 100ml of methanol alcohol solvent (80%) in a 500ml flask for extraction through 24 hours and then separation alcohol from the extract by using rotary evaporation^{16,17, 18, 19, 20}.

Experiment Design

Design In this study, 60 adult male rats weighing between 195 and 330 g and aged 11 to 14 weeks were used.

They were kept in a relatively regulated setting with a temperature of 25C° at the University of Karbala's animal facility. They received food. There were eight rat group divisions. G1: just received saline solution (0,85%) as the control. G2: 250 milligrams of black tea and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body weight. G3: 400 milligrams of *C. sinensis* L. and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body weight. G4: injection of 0.3 milligrams of zinc nanoparticles and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body weight. G5: injection of 0.5 milligrams of zinc nanoparticles and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body weight. G6: injection of 0.3 milligrams of silver nanoparticles and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body weight. G7: injection of 0.5 milligrams of silver nanoparticles and 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body weight, G8: 250 milligrams of paracetamol per kilogram of body administered intravenously, The blood bled for 30 days after receiving all dosages orally once daily for 21 days.

Biochemical analysis

The cardiac puncture method was used to take blood, which was then spun for 10 minutes at 3000 rpm to separate the blood serum. Blood was drawn after 30 days, and the serum was kept at 40 °C for enzyme assays. Serum total protein concentration²¹ Utilizing an analysis kit from the Biomaghreb company, triacylglycerides, total cholesterol, and glucose²² were also determined²³.

Oxidative and antioxidant assay

Malondialdehyde (MDA), Glutathione peroxidase (GPX), and Lipid Peroxidation (LPO) analysis by using a kit from chin Bioassay Technology Laboratory (BT LAB)

Statistical Analysis

Mean was used to express the data. A one-way analysis of variances was used to assess the statistical significance of differences between the control group and the other groups (ANOVA). The SPSS for Windows version was used for statistical analysis, and P values of 0.05 or less were considered significant (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

RESULTS

The extract of *C. sinensis* L. consists of several active components produced naturally and accumulated in plants. The secondary metabolic screen study was carried out to identify the active components of *C. sinensis* L. Table (1) in the current study, protean level in group G8 significantly decreased to 2.99 mg/dl Compared to the control group (6.45 mg/dl), G2, G3, G4, G5, and G7 all demonstrated a significant increase (5.34, 5.44, 5.87, 5.99, 6.27, and 6.56 mg/dl, respectively) Compared to G8 (2.99 mg/dl). While glucose level group G8 showed a significant increase (0.294 mg/dl) compared to the control group's of 0.175 mg/dl, G2, G3, G4, G5, G6, and G7, all displayed a significant decrease (0.167, 0.156, 0.148, 0.125, 0.111, and 0.104 mg/dl) respectively compared with G8 (0.294 mg/dl). Total cholesterol level in group G8 (164.22 mg/dl) showed a significant increase Compared to the control group (145.34 mg/dl). While the G2, G3, G4, G5, and G6 all exhibited a significant decrease (142.34, 122.59, 111.54, 94.43, 89.74, and 78.28 mg/dl, respectively

Compared to G8 (164.22 mg/dl), Triacylglycerid levels in group G8 (101.53 mg/dl) were significantly higher than those in the control group 72.39 mg/dl. While G2, G3, G4, G5, G6, and G7 all exhibited a significant decrease from G8 101.53 mg/dl mg/dl to 88.64, 79.64, 73.38, 67.80, 59.56, and 55.34 mg/dl, respectively. In table (2). When compared to the control, the MDA level of group G8 rats exhibited a significant rise (0.756 mol/L) and displayed a substantial increase; G2, G3, G4, G5, and G6 all showed a significant decline (0.667, 0.653, 0.637, 0.629, 0.601, and 0.586 mol/L, respectively)., Compared to the control level of 6.56 mol, the LPO level of group G8 exhibited a considerable rise (7.99 mol/L). G2, G3, G4, G5, and G6 significantly declined (6.98, 6.85, 6.65, 6.56, 6.43, and 6.32 mol/ L, respectively). Compared to the control group's GPX level of 66.35 mol/L, group G8's level was significantly lower (30.56 mol/L). G2, G3, G4, G5, and G7 significantly rose (58.91, 56.81, 53.72, 52.86, 50.64, and 49.84 mol/ L, respectively). Compared with G8, 30.56 mol/ L.

Groups	Protean	Glucose	Total cholesterol	Triacylglycerid
G 1	6.45	0.175	145.34	72.39
G2	5.34	0.167	142.34	88.64
G3	5.44	0.156	122.59	79.83
G4	5.87	0.148	111.54	73.38
G 5	5.99	0.125	94.43	67.80
G6	6.27	0.111	89.74	59.56
G7	6.56	0.104	78.28	55.34
G8	2.99	0.294	164.22	101.53
LSD	0.37	0.96	0.47	0.94

Table 1. Effect of silver and zinc nanoparticles on glucose, protein, Total cholesterol, and Triacylglycerid Concentration mol/L.

Groups	MDA	LPO	GPX
G 1	0.605	6.56	66.35
G2	0.667	6.98	58.91
G3	0.653	6.85	56.81
G4	0.637	6.65	53.72
G 5	0.629	6.56	52.86

G6	0.601	6.43	50.64
G7	0.586	6.32	49.84
G8	0.756	7.99	30.56
L.S.D	0.86	0.36	0.65

Table 2. Shows the effect of silver and zinc nanoparticles on MDA, LPO, and GPX Concentrations mol/L, in male Rats.

DISCUSSION

The current study aimed to examine silver and zinc nanoparticles' antioxidant and defense mechanisms on liver enzymes against methotrexate-induced toxicity and ROS. A table with the results is shown (1,2), which shows that the G8 group (250 milligrams of paracetamol per kilogram of body administered intravenously) had significantly increased glucose, total cholesterol, triacylglyceride, MDA, and LPO concentrations than the G1 control group. As a result, taking paracetamol with drinking water causes oxidative stress and an increase in ROS by raising MDA and LPO levels in the liver tissue and lowering GPX and protein levels. These outcomes were in line with prior research. Because ROS can harm cells by oxidizing the lipids in cell membranes, deactivating the protein sulfhydryl enzyme²⁴, and disrupting DNA synthesis²⁵ Due to the conjugation of glutathione with NAPQI to produce mercapturic acid, paracetamol causes hepatic glutathione depletion and eventually liver damage from overdoses²⁶. Paracetamol significantly increased serum GPT and total protein when compared to the results²⁷. The resulting ROS may cause cellular damage through the peroxidation of membrane lipids, inactivation of the sulfhydryl enzyme, protein cross-linking, and DNA synthesis²⁸. As a result of GSH conjugating with NAPQI to produce mercapturic acid, high doses of paracetamol deplete the liver's GSH, which in turn raises lipid peroxidation by absorbing hydrogen from a polyunsaturated fatty acid and finally damages the liver²⁹. The enzyme serum glutamic pyruvic transaminase (sGPT) is produced when the liver or heart is damaged. It is released into the bloodstream and is frequently found in heart and liver cells. Therefore, the blood levels of sGPT increase when the heart or liver is damaged. Some medications, including paracetamol and aspirin sodium diclofenac, can also raise sGPT levels. Paracetamol lowers levels of uric acid and total protein.

In contrast, it is pointed out that increasing levels of the GPT, GOT enzyme, and glucose³⁰ increase the risk of paracetamol poisoning. It is well known that the toxicity of paracetamol causes levels of the GPT, GOT enzyme, and glucose to rise and that taking a paracetamol dose lowers uric acid and total protein. Poisons like paracetamol also cause levels of the GPT, GOT enzyme, and glucose to rise³¹.

The experiment's results demonstrated that 250 milligrams of black tea increased the activity of antioxidant enzymes and effectively scavenged free radicals because of their ability to scavenge ROS electrons. An antioxidant effect at intracellular or extracellular levels inhibits the xanthine oxidase enzyme activity, changing the product xanthine oxidase to xanthine dehydrogenase³². The reasons for the significant rise in GSH levels in response to active compounds may include increased resistance or activation of the enzyme glutamyl cysteine synthesis³³. This substance or glutathione synthesis might cause glutamyl transpeptidase to become active³⁴. When this extract and a mutagen overlap, the phenol from *C. sinensis* leaves inhibits the enzymatic effectiveness of the harmful action of methotrexate³⁵. The processes by which phenolic compounds exert their antioxidant action include neutralizing lipid free radicals and inhibiting hydrogen peroxide's decomposition into free

radicals³⁶. Due to tea's unique capacity for auto-oxidation and the consequent rise in reactive oxygen species, catechins in tea have both pro-oxidant and antioxidant properties³⁷ and work as a hydrogen donor³⁸. The apparent chemical and structural similarity of tea catechins to some traditional anti-folic drugs, such as trimethoprim and methotrexate, further supports this observation³⁹. Earlier studies have found various antioxidants, including parsley extract⁴⁰.

Injection of 0.5 milligrams of zinc oxide and silver nanoparticles increased the activity of antioxidant enzymes and effectively scavenged free radicals, increasing antioxidant enzyme levels and protecting cell membranes from oxidative stress damage, according to the investigation—a decrease in MDA, LPO, protean, and GPX amounts. Nanoparticles can boost antioxidant activity and reduce ROS levels⁴¹. These outcomes were in line with prior research that showed the stability, antioxidant properties, non-toxicity, and approval of gold nanoparticles for additional in-vitro and in-vivo studies⁴². In line with the study, In male rats, liver damage and the quantity of serum proteins are reduced by nanoparticles⁴³, whereas the male reproductive systems of mice are preserved⁴⁴. The outcomes Cell membranes can be shielded from oxidative stress damage by ZnO nanoparticles, which can also boost levels of antioxidant enzymes and lower MDA levels. ZnO nanoparticles can increase antioxidant activity while lowering ROS levels^{45,46}.

CONCLUSIONS

The study investigated the effects of paracetamol, black tea, zinc oxide and silver nanoparticles on liver enzymes against methotrexate-induced toxicity and ROS. The results showed that paracetamol caused oxidative stress and increased ROS by raising MDA and LPO levels in the liver tissue and lowering GPX and protein levels. Black tea increased the activity of antioxidant enzymes and effectively scavenged free radicals. Zinc oxide and silver nanoparticles increased the activity of antioxidant enzymes and protected cell membranes from oxidative stress damage.

Based on the results of this study, it is concluded that paracetamol, black tea, zinc oxide and silver nanoparticles can all be used to protect the liver from oxidative stress and methotrexate-induced toxicity.

REFERENCES

1. Rao, Y., Inwati, G. K., and Singh, M. (2017). Green synthesis of capped gold nanoparticles and their effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Future Science OA* 3(4), FSO239.
2. Tao, C. (2018). Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles: Research progress, challenges, and prospects. *Letters in Applied Microbiology* 67, 537- 543.
3. Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H.,... & Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4), 527-534.

4. Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Ahmad, M. K., Mahdi, A. A., Pal, R., & Cameotra, S. S. (2014). Interaction of silver nanoparticles with *Escherichia coli* and their cell envelope biomolecules. *Journal of Basic Microbiology*, 54(9), 905-915.
5. Skalniy, A.V. and Rudakov, I.A. (2004) Bioelements in Medicine. M.: Onix Vol.21:272 pp. (in Russian)
6. Akhtar, M.J.; Ahamed, M.; Kumar S.; Khan, M.M.; Ahmad, J. and Alrokayan, S.A. (2012) Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal Nanomedicine*. Vol.(7): 8459857pp.
7. Shalyapina, A.Y.; Solovyova, A.Y.; Zaporozhets, M.A.; Khokhlov, E.M.; Plotnichenko, V.G.; Buslae, V.A. E.Y.; Rustamova, E.G., Gubin, SP (2012) Composite materials based on graphene and zinc oxide nanoparticles *Bulletin of MITXT*. Vol.7(5):80984pp. (in Russian).
8. Bogutska, K.I. ; Sklyarov, Y.P. and Prylutsky, Y.I. (2013) Zinc and zinc nanoparticles biological role and application In biomedicine. *Ukrainca Bioorganica Acta* Vol. 1: 9-16pp.
9. Chan, E. W., Soh, E. Y., Tie, P. P. and Y. P., Law (2011). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Res.*, 3, 266.
10. Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol* .552: 335-344
11. Omar Khaled Attallah, Thafer Thabit Mohammed and Nasr Nuri Al-Anbari. Effect of Adding Grape Pomace and Resveratrol on Some Physiological Traits and Gene Expression to Prevent Hemorrhagic Fatty Liver Syndrome in Laying Hens . *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*.2022, 1060 (1), 012076. doi:10.1088/1755-1315/1060/1/0120
12. Wong LT, Whitehouse LW, Solemonraj G, Paul CJ. 1981. Pathways of acetaminophen conjugate in the mouse. *Toxicity Lett*; 9: 145 151.
13. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>.
14. AL-Ibrahemi. N; Hasan. RM (2019). Identification of Artemisinin compound in *Artemisia herba alba* belongs to the Asteraceae by HPLC and GC/MS. *Al-Kufa University Journal for Biology*. VOL.11 / NO.2. 8854-2073.
15. AL-Ibrahemi .N; Hasan.R.M; Alslman.K.(2020). Effect of Zinc oxide nanoparticles on the oxidant stress (Malonaldehde MDA, lipid peroxidation level LPO) and antioxidant GSH glutathione) *Medico-Legal Update* 20(1), 882-888.
16. Al-Ibrahemi. N; AL-Yassiry, A.; AL-Laith. Z.N & Al-Musawi, B.H. (2022).Chemical Analysis Of Phytochemical For the *Anethum graveolens L*. Fresh And Commercial Dry By Gas Chromatography-Mass- Spectrometer. *IOP.Conference series: Earth and Environmental Science*.
17. Naser, N.K.; ALMasoody, I.H. & Al-Ibrahemi, N. (2022).Antibiotic and chemical study for the *Petroselinum sativum L*. that belongs to the Umbellifera family.*International Journal of Health Sciences*, (6) (S6),6066-6073.
18. Hamza, N.M.; Yasir, S.M. and Hussain, A.M. (2021) Biological Effects of Aqueous Extract of *Laurus Nobilis L*. Leaves on Some Histological and Immunological Parameters in Male Rat Liver Affected by Aluminum Chloride. *Archives of Razi Institute*, Vol. 76, No. 6:1657-1665.
19. AL-Ibrahemi. N; AL-Laith. Z.N; AL-Yassiry,A.and AL-Masaoodi N.H. (2022). Phytochemical study of Volatile Oil for the *Ocimum basilica L*. and *Mentha spicata* By Gas Chromatography Technique. *IOP.Conference series: Earth and Environmental Science*.(1755-1315) Vo.2031.

20. Abd, A.S. and Saqban, L.H. (2023). Study of the effect of cytotoxicity of extracts from *Origanum Majorana* leaves on human breast cancer cell line (AMJ13) in vitro. AIP Conf.Proc. 2414. 020027. P:2-6. [21] Lewis,S.M.;Bain,B.J.and Bates,I.(2006).Dacie and Lewis practical hematology,10th ed., Elsevier, Germany: 709.
21. Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. and Bruns, D.E.(2012). Tietz textbook of clinical chemistry and Molecular Diagnostics. By Saunders, an imprint of Elsevier Inc. USA.
22. Al-Jowari, S.A.K and Alhussainy, I.A.A. (2020). Effect of orange peel powder (*Citrus sinensis* L.) on lipid profile in normal and experimentally–induced oxidative stress in albino mice. *Faculty of Basic Education journal*. (19) 79.
23. H. Esaa, F. .; Kassim, J. K. . Identification And Distribution Of Minerals In Soils From Al-Ahrar Area, Waist Province, Iraq. JLSAR 2021, 2, 14-20.
24. ALobaidy, B. .; Al-Falahi, M. N. .; Almarie, A. A. . Effect Of 6-Bap Growth Regulator On Seed Priming Of Several Bread Wheat Varieties Under Water Irrigation Salinity Stress. JLSAR 2021, 2, 21-26.
25. Kushwah, D.S.; Salman, M.T.; Singh, P.; Verma, V.K. and Ahmad, A.(2013). Protective effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* seed in paracetamol induced acute hepatotoxicity in vivo. *Pakistan J. Biology Sciences*; 10:3923.
26. Stones, S.J; Bagchi, D.; Hassoun, E. and Bagchi M. (2001) Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol.Toxicol. Oncol.*, 19: 201-213
27. Schmidt LE, Dalhoff K. (2002). Serum phosphate is an early predictor of outcome in severe acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology*. Sep;36(3):659-65.
28. Itadt, PD, krauss A, etal. (2000) Pancreatic exocrine function in patients with type I & II DM. *Acta diabetes*.; 37:105-110.
29. Kadhim, Sh.H., Mosa, A.U, Ouda, M.H. (2013). Hepatoprotective effect of green tea (*Camellia sinensis*) on female rats drenched with paracetamol. *Kerbala Journal of Pharmaceutical Sciences* Number 6.
30. Kushwah, D.S.; Salman, M.T.; Singh, P.; Verma, V.K. and Ahmad, A.(2013). Protective effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* seed in paracetamol induced acute hepatotoxicity in vivo. *Pakistan J. Biology Sciences*; 10:3923.
31. Hassan, A.U.; Abeed, S.A. and Obeid, A.K. (2020). Histophysiological Considerations Deals with the Damaging to Rat Kidneys by Examined Doses of Heroin. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, October-December 2020, Vol. 14, No. 4. 2357-2360.
32. Deaton, CM. and Marlin, D. (2003) Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. Vol. 189:278–291pp.
33. Li, Y.; Dankher, O. P.; Carreira, L.; Smith, A. P. and Meagher, R. B. (2006) The shoot-specific expression of γ -glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. *Plant Physiology*. 141:288–298pp.
34. Amina S. Jalal and Rafih A. Mahmood . (2013) Enzymatic effect of flavonoids extracted from the leaves of *Camellia sinensis* on liver enzymes in mice. *Al- Mustansiriyah J. Sci*. Vol. 24, No 4.
35. Azez, S.G. and Hamza, N.M. (2020). Study of the preventive role of cranberry extract on some physiological parameters in male rate induced by sodium fluoride. *Journal of Annals of Tropical Medicine & Public Health*, Vol. 23, NO. (I).

36. Elbling, L.; Weiss, R. M.; Teufelhofer, O.; Uhl, M.; Knasmueller, S.; ShulteHermann, R.; Berger, W and Micksche ,M. (2005) Green tea extract and (-)- epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J.* Vol. 19 (7). Pp: 807–809.
37. Mandel, S.; Weinreb, O.; Amit, T. and Youdim, M.B. (2004) Cell Signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative. *Diseases. J. Neurochem.* Vol. 88 (6).Pp: 1555–1569
38. Kareem, M.A. and Obeid, A.K. (2020). Evaluation of The Effect of Aqueous Extract of *Lepidium Sativum* Seed on The Adverse Effects of Rat Liver Injury Induced by Sodium Nitrite. *International Journal of Pharmaceutical Research.* Oct-Dec 2020. Vol 12; Issue 4. P:4212-4216.
39. Mohammed, Ruqaya Kareem, Al-Ibrahemi, Nibras. (2022). Phytochemical and Protective Study for The *Petroselinum Sativum* L. (Parsley) on The Oxidative Stress and Antioxidant in Rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine.* Vol. 89 (2), Page 8039- 8042.
40. Usman, I.; Aziz, A.A.; Abu, N.O. (2019) Application of green synthesis of gold nanoparticles: A review. *J. Teknol.*, 81, 171–182.
41. Khan, S.; Bakht, J.; Syed, F. (2018) Green synthesis of gold nanoparticles using acer pentatomic leaves extract its characterization, antibacterial, antifungal and antioxidant bioassay. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.*, 13, 579–58.
42. Xue, M.; Jiang, Z.Z. Wu, T. Li, J.; Zhang, L. . (2012) Anti-inflammatory effects and hepatotoxicity of Tripterygium-loaded solid lipid nanoparticles on adjuvant-induced arthritis in rats. *Phytomedicine*; 19 (11): 998-1006.
43. Badkoobeh, P.; Parivar, K. ;Kalantar ,S. M; Hosseini, S. D. and Salabat, A. (2013) Effect of nano-zinc oxide on doxorubicin-induced oxidative stress and sperm disorders in adult male Wistar rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine.* Vol. 11(5):355– 364pp.
44. Kawther Neamah Najm , Yasemin Khudiar Alghanimi. (2022). Cytotoxicity of Iraqi Propolis Nanoparticles on Human Colon Cancer Cell Line (SW480). *Jundishapur Journal of Microbiology.* Vol. 15, No.1.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: D. A. Rabee, G. H. Oleiwi, B. A. H. Musa, N. Al-Ibrahemi, and M. O. Abdulridha, “Study protective role *Camellia sinensis* L. (black tea) and silver, Zn oxide nanoparticles on antitoxin- dant - oxidant enzymes and biochemical level against paracetamol overdose in adult male rats,”. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.82>

Publisher’s Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

The Antioxidant Status of Kidney Failure Patients

Ashwaq Audah

Department of Community Health, Techniques, Al-Furat Al-Awsat Technical University, Technical Institute, Samawa, Iraq

*Correspondence: Email: Ashwaqaudah109@gmail.com

Available from: Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.83>

ABSTRACT

Foundation: Kidney disappointment is an ailment in which the kidneys no longer function. (1) It is isolated into intense kidney disappointment (cases that proliferate) and persistent kidney disappointment (those that are long haul). Indications might incorporate leg expansion, feeling tired, heaving, loss of craving, or disarray. Complexities of intense infection might incorporate uremia, high blood potassium, or volume over-burden. Difficulties of ongoing illness might incorporate coronary illness, hypertension, or sickliness. Creatinine is a breakdown result of creatine phosphate in muscle and is generally delivered at a genuinely consistent rate by the body (contingent upon bulk). Point: This study expects to research the connection between catalase compound, creatinine, and urea level with the advancement of kidney disappointment. Techniques: Plasma of Catalase, creatinine, and Urea were not entirely settled in 46 patients with kidney disappointment and 21 solid subjects as control bunch utilizing the colorimetric technique. All outcomes were genuinely examined. Results: A profoundly huge increment was found in the serum level of creatinine and urea in patients with Kidney disappointment contrasted with control ($P < 0.05$). Compared with the control, serum levels of catalase compound were diminished in the patient gathering ($P < 0.05$). End: The consequences of the current review give proof that the family background of kidney infection, diabetes mellitus, hypertension, coronary illness, and long-haul uncontrolled hypertension has an unmistakable connection with kidney disappointment hazard. Undeniable degrees of creatinine and urea were introduced in patients with Kidney disappointment.

Keywords: Catalase enzyme, Creatinine, Urea, Kidney failure Diseases.

INTRODUCTION

Kidney dissatisfaction, called end-stage kidney sickness, is an affliction wherein the kidneys work under 15% of run-of-the-mill levels¹. Kidney frustration is named either extraordinary kidney dissatisfaction, which develops rapidly and may resolve, and constant kidney disillusionment, which develops progressively and can frequently be irreversible². Appearances could consolidate leg amplification, tiredness, regurgitation, loss of craving, and confusion³. Complexities of extreme and continuous disillusionment join uremia, high blood potassium, and volume overload⁴. Complexities of continuous frustration similarly fuse coronary sickness, hypertension, and anemia⁵. A creatinine test is the extent of how well kidneys are playing out their control of filtering waste from your blood, and creatinine is an engineered compound left over from energy-conveying processes in muscles. Vital kidneys channel creatinine out of the blood. Creatinine exits the body as a side-effect of pee. An assessment of creatinine in your blood or pee offers hints to help experts conclude how well the kidneys are working⁶.

Creatinine is an engineered side-effect of creatine, an amino destructive made by the liver and set aside in the liver. Creatinine is the eventual outcome of common muscle metabolism⁷. The substance enters your dissemination framework after it is isolated. Kidneys dispose of it from blood. The creatinine then leaves the body through pee. Run-of-the-mill levels vary, as demonstrated by your body size and muscle mass⁸. For example,

a standard reach for men is between 0.6 and 1.2 mg/dl, and a regular reach for women is 0.5 and 1.1 mg/dl. Uremia means kidney disillusionment. Whenever the kidneys cannot channel waste to form, it can enter the bloodstream⁹

A considerable number of individuals with uremia will require dialysis. Dialysis uses a machine to go comparably a "fake kidney" that channels the blood¹⁰. Some may require a kidney move, which could thwart further kidney issues by overriding a sickly kidney with a strong one. People routinely need to hold on for various years for a kidney and may require dialysis while they stop. Many indications are called uremic neuropathy or nerve pain on account of kidney disillusionment. Neuropathy can cause shuddering, deadness, or electrical sensations in the body, particularly the hands and feet. These signs will regularly fall apart over an extended period and do not vanish with rest or further sustenance: nausea, regurgitating, and loss of hankering. Certain people could get in shape by these issues—changes in blood tests. The critical sign of uremia frequently is the presence of urea in the blood during routine blood testing¹².

Catalase is a tetrameric peroxidase protein that changes H₂O₂ to water and nuclear oxygen. Essentially, using H⁺ advocates, catalase works with diminishing normal hydroperoxide (ROOH+AH₂→H₂O+ROH+A). H₂O₂ oversees the quality enunciation of catalase. In animals, H₂O₂ is detoxified by catalase and GPX. Catalase shields the cells from H₂O₂, and ¹⁴ plays a critical role in the disease anticipation specialist monitoring structure and change to oxidant stress¹⁵. In vertebrates, catalase is considered to be pervasively in the liver. A couple of factors affect the rate at which a substance works. In this review, we estimated that degrees of level creatinine, urea and catalase chemicals are markers of Kidney disappointment expansion in Kidney disappointment patients. To test our theory, we looked at pattern creatinine, urea and catalase catalyst levels in kidney and non-kidney disappointment patients.

MATERIALS AND METHODS

Serum creatinine, urea and catalase compound levels were estimated in ²¹ solid people—also 46 patients with Kidney disappointment. The mean time of control (47.93±3.05) and the patient gathering (46.73±3.54) were arbitrarily chosen from patients with Kidney disappointment from walk to October 2021. Data regarding the clinical history of each Subject was obtained, including age, infections endured, and term of disease with their day-by-day diet and occupation.

Techniques

All gatherings were exposed to exhaustive clinical history, assessment and explicit Kidney disappointment examination. Venous blood tests (5 ml) were gathered from the patient and control gatherings. The serum was isolated by centrifugation (Gallen Germany) at 3000 RPM for 10 min and put away in covered plastic cylinders at -20 °C until examination. The serum's creatinine, urea and catalase catalyst levels were estimated using the Spectrophotometric strategy at at 532 nm 548 nm by utilizing Shimadzu U.V-Noticeable recorder spectrophotometer model U.V-160. The last focus was communicated in pg/ml.

Factual investigation

Information is communicated as mean ± SEM. A statistical investigation was done utilizing a plan, measurable bundle for sociology (SPSS), and the stark contrasts between the control and the patients were not entirely settled by utilizing an understudy's t-test. The likelihood of (P<0.05) is considered critical all through.

RESULTS

Clinical characteristics about patients' age and so forth were summarized in (Table 1).

General Characters

C. Kidney failure	B. Healthy Control	
F. 46	E. 21	D. Total No.of Subject
I. 46.73 ± 3.54	H. 47.93 ± 3.05	G. Age

Table 1. General Characteristics of Healthy Controls and Kidney Failure Patients (Cases).

Serum Creatinine and urea levels were found to be significantly higher in Kidney failure patients compared to control ($p < 0.05$, Fig.1 and Fig.2). Catalase enzyme was significantly decreased in the serum of Kidney failure patients compared to control ($P < 0.05$, Fig.3).

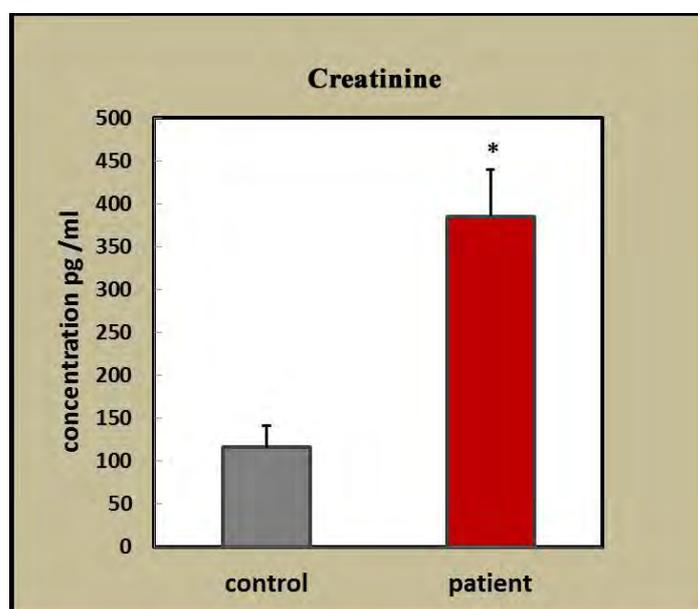


Figure 1. Creatinine levels in healthy patients at ($p < 0.05$).

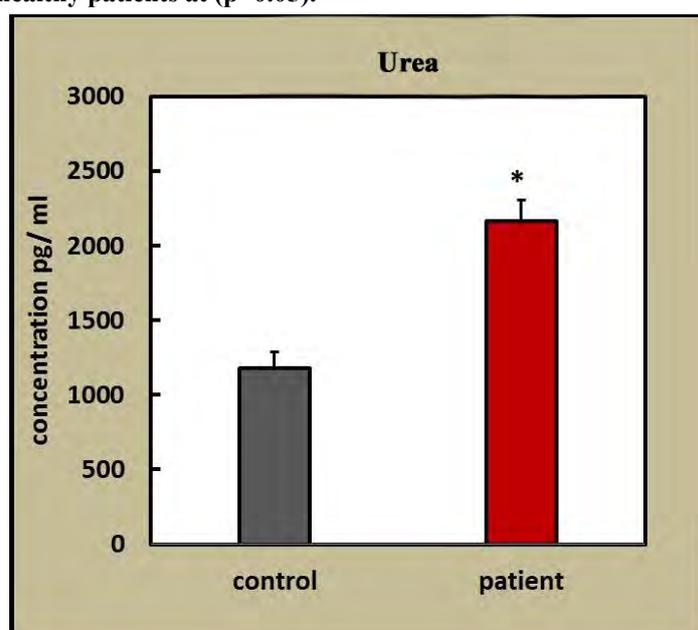
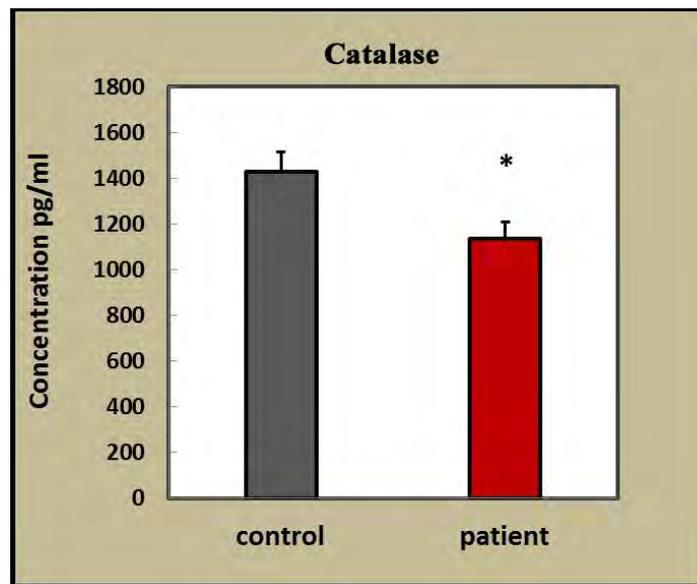


Figure 2. Urea levels in healthy and patient ($p<0.05$).**Figure 3. Catalase enzyme levels in healthy patients ($p<0.05$).**

DISCUSSION

Kidney disappointment is a non-kidding, long-term condition that influences the kidneys and causes an expanding and progressive loss of kidney work and renal disappointment in the last stage²¹. In persistent renal disappointment, kidney work drops to under 25% of the ordinary level. In this jumble over the years, the kidneys progressively lose their capacity to channel squanders from the blood and dispose of them in the pee. Therefore, the gathering of liquids in the body and poisons, for example, Urea and Creatinine in the blood, happens because of the powerlessness of the kidneys to channel the blood going through them, so its worth expansions in This is the thing seen in the exploration, which prompts not many indications from the get-go. Nosigns might only show up once most kidney work has been lost. Constant renal disappointment (CRF) is related to oxidative pressure that adds to the advancement of various short- and long-haul complexities, including hypertension, frailty, arteriosclerotic cardiovascular sickness, neurological issues, hemostatic anomalies, and disabled resistance. The presence of oxidative pressure in CRF is proven by an excess of side-effects of collaboration of responsive oxygen species (ROS) with and decline Catalase compound levels have been accounted for in Kidney disappointment⁵. Our outcomes showed a decline in Catalase chemical level in Kidney disappointment when contrasted with controls, concurring with past studies²².

While the presence of oxidative pressure in CRF is grounded, its hidden systems have, as of late, been unfurled. Oxidative pressure can happen either because of expanded ROS age, discouraged cell reinforcement framework or both. The standard cell reinforcement framework comprises a progression of cancer prevention agent catalysts and various endogenous and dietary cancer prevention agents that respond with and inactivate ROS. The essential ROS created in the high-impact life forms is superoxide, an exceptionally responsive and cytotoxic specialist¹⁴. The most proficient catalyst is catalase, as every chemical can perform roughly 800,000 synergist occasions each second. The primary capacity of catalase is to safeguard cells from hydrogen peroxide (H₂O₂) particles by changing them to oxygen and water. In this review, we showed that serum levels of creatinine urea are fundamentally expanded in Kidney disappointment when contrasted with solid subjects. In the current review, creatinine urea level has been reliably exhibited to be raised in patients with Kidney disappointment. Declining: Declining the viability of catalase chemicals in kidney disappointment prompts oxidative and tissue harm because of the increment in free extremists and the absence of cell reinforcements.

CONCLUSIONS

In conclusion, kidney failure is a serious condition that leads to a progressive loss of kidney function and the accumulation of toxins in the body. Oxidative stress plays a role in the development of complications associated with kidney failure, and the effectiveness of catalase enzymes is reduced, leading to tissue damage.

REFERENCES

1. Paul, N.K. Man, N. Moatti, D. Raichvarg. Membrane phospholipid peroxidation in renal insufficiency and chronic hemodialysis, *Nephrology*, 1991; 12 , pp. 4-7.
2. T. Miyata, K. Kurokawa, C. Van Ypersele De Strihou. Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000, 11 pp. 1744-1752.
3. N.D. Vaziri, Z. Ni, F. Oveisi, K. Liang. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in chronic renal insufficiency. *Hypertension*, 2002 39 (2002), pp. 135-141.
4. J. Himmelfarb, E. McMonagle. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int.* 2001, 60 , pp. 358-363.
5. N.D. Vaziri, F. Oveisi, Y. Ding (1998). Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int.*, 1998, 53 ; pp. 1748-1754.
6. H. Muhammed, S., Y. Mohamed, R. Investigation And Molecular Identification Of Cucumber Damping-Off Fungi Under Greenhouse Condition. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 19-31. doi: 10.32649/ajas.2023.179712.
7. R.K. Sindhu, J.R. Koo, C.K. Roberts, N.D. Vaziri. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin. Exp. Hypertens.* 2004, 26 , pp. 43-53.
8. N.D. Vaziri, Z. Ni, F. Oveisi, K. Liang, R. Pandian. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension*, 2002; 136 , pp. 135-141.
9. Al-Atijawi, S. H. ; Almusawy, R. S. . The Effect Of Adding Different Rates Of Mushroom Powder To The Wheat Flour On The Nutritional Value Of Proteins, Sensory And Physical Properties Of Local Bread. *JLSAR* 2021, 2, 46–53.
10. O. Sommerburg, T. Grune, J.H. Ehrich, W.G. Siems. Adaptation of glutathione peroxidase activity to oxidative stress occurs in children but not in adult patients with end-stage renal failure undergoing hemodialysis. *Clin. Nephrol.*, 2002 58 (Suppl. 1) , pp. S31-S36.
11. J. Mimic-Oka, T. Simic, L. Djukanovic, Z. Reljic, Z. Davicevic (1999). Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin. Nephrol.*, 1999. 51 , pp. 233-241.
12. G. Sener, K. Paskaloglu, H. Toklu, C. Kapucu, G. Ayanoglu-Dulger, A. Kacmaz, A. Sakarcan. Melatonin ameliorates chronic renal failure-induced oxidative organ damage in rats *J. Pineal Res.* 2004, 36 , pp. 232-241.
13. C. Van den Branden, B. Ceysens, D. De Craemer, P. De Bleser, K. Hellemans, A. Geerts, D. Verbeelen. Antioxidant enzyme gene expression in rats with remnant kidney induced chronic renal failure. *Exp. Nephrol.* 2000, 8 , pp. 91-96.
14. T. Zima, S. Stipek, J. Crkovska, K. Nemecek, J. Platenik, V. Bartova, V. Tesar. Antioxidant enzymes—superoxide dismutase and glutathione peroxidase—in haemodialyzed patients. *Blood Purif.* 1996, 14, pp. 257-261.
15. N.D. Vaziri, X.Q. Wang, F. Oveisi, B. Rad. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension*, 2000; 36 , pp. 142-146.
16. C. Van den Branden, B. Ceysens, D. De Craemer, M. Pauwels, K. Vanden Houte, P. De Bleser, K. Hellemans, A. Geerts, D. Verbeelen. Renal antioxidant enzymes and fibrosis-related markers in the rat adriamycin model. *Nephron*, 2000; 86 , pp. 167-175.
17. J.S. Koenig, M. Fischer, E. Bulant, B. Tiran, I. Elmadfa, W. Druml. Antioxidant status in patients on chronic hemodialysis therapy: impact of parenteral selenium supplementation. *Wien. Klin. Wochenschr.* 1997, 109 , pp. 13-19.
18. C.K. Roberts, N.D. Vaziri, R.K. Sindhu, R.J. Barnard. A high-fat, refined-carbohydrate diet affects renal NO synthase protein expression and salt sensitivity. *J. Appl. Physiol.* 2003, 94 , pp. 941-946.

19. Ibraheem M W, Muhaimed A R, Mohammed Th. T. Leg cuts from Awaasi lambs fed a diet with varying levels of *Rhus coriaria* L., Physical dissection and chemical composition. *Revis Bionatura* 2022;7(4) 4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.4>.
20. R.A. Beswick, A.M. Dorrance, R. Leite, R.C. Webb. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*, 2001; 38 , pp. 1107-1111.
21. K. Trznadel, L. Pawlicki, J. Kedziora, M. Luciak, J. Blaszczyk, A. Buczynski. Superoxide anion generation, erythrocytes superoxide dismutase activity, and lipid peroxidation during hemoperfusion and hemodialysis in chronic uremic patients. *Free Radic. Biol. Med.* 1989, 6 , pp. 393-397.
22. M. Inal, G. Kanbak, S. Sen, F. Akyuz, E. Sunal. Antioxidant status and lipid peroxidation in hemodialysis patients undergoing erythropoietin and erythropoietin-vitamin E combined therapy. *Free Radic. Res.* 1999, 31 , pp. 211-216.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Audah, A. The antioxidant status of Kidney failure patients. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 83. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.83>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Association of serum level and gene expression of IL-25 in a sample of Iraqi asthmatic patients

Basima Q. Hasan ALSaadi^{1,*}; Mayada Hussain Ali²

1 Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for postgraduate studies /
University of Baghdad, Iraq

2 Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for postgraduate studies /
University of Baghdad, Iraq

* Correspondence: Email: basima22000@yahoo.co.uk Available from:
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.84>

ABSTRACT

Asthma is an increasingly common disease characterized by allergic airway inflammation, hyperresponsiveness, mucus overproduction, and peribronchial fibrosis. The epithelial cytokines IL25 have been implicated in asthma pathogenesis because they promote Th2-type cytokine synthesis. The current study aimed to assess IL-25 expression and measure the serum level of this cytokine in asthmatic Iraqi patients. The study was conducted on sixty (60) asthmatic patients (32 female and 28 male) and thirty as apparently healthy subjects (control) (16 female and 14 male) with ages ranging from 15-60 years recruited Alzahra'a Center for Asthma and Allergy in Baghdad during the period between November /2021 to March /2022. Written informed consent was obtained from all patients and a healthy control group.

Moreover, the study design was approved by the Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies/ University of Baghdad. All patients were diagnosed according to clinical examination by a chest physician and selected according to the global initiative of asthma criteria. The healthy control group are non-smoking subjects with no history of obstructive lung disease or atopy. The RNA was extracted from the whole blood of asthma patients and healthy control without Trizol subjects using the protocol in Easy Pure t® blood RNA Kit (ER-401). The acceptable purity of asthmatic patients and control healthy group RNA ranges between 1.84 and 1.99. IL-25 gene expression showed the Ct of asthma patient group (25.179) and control group (27.393), and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of asthma patient group (288.81) and control group (58.48) and the fold of gene expression was statistically significantly ($P \leq 0.01$) the calculation of the gene expression it was significant in the patient group than control group 4.938 times with ratio (4.938:1). ELISA estimated IL-25 concentration, the results were statistically significant ($P \leq 0.001$), the level of IL-25 in asthma patient group (29.30 ± 5.107317 pg/ml) while the level of IL-23 in Control group (15.16 ± 0.085248 pg/ml).

Keywords: IL-25, gene expression, Elisa, Asthma

INTRODUCTION

Asthma is a non-communicable chronic disease in adults characterized by recurrent coughing, wheezing, shortness of breath and chest tightness. Severe and chronic inflammation of the airway and recurrent symptoms limitation may occur a few times a day or a few times per week¹. Asthma symptoms may worsen at night or with exercise and result from complex gene-environment interactions, with heterogeneity in clinical presentation and intensity of airway inflammation and remodeling. Asthma affected approximately 262 million people and caused about 461,000 deaths in 2019². Moreover, death mainly occurs in the developing world.

Around 300 million people have asthma worldwide, and a further 100 million may likely be affected by 2025^{3, 4}

Interleukin-25 (IL-25) is a pro-inflammatory cytokine belonging to the Interleukin-17 family, also known as Interleukin-17E (IL-17E). It has a molecular weight of 16.7 kDa and 161 amino acid residues. IL-25 is predominantly responsible for propagating Th2 cytokine-driven allergic responses and the pathophysiology of eosinophilic asthma⁵. It is produced mainly by epithelial cells responding to allergen proteases, pollutants, and viral respiratory infections, such as rhinovirus and respiratory syncytial virus. It is also produced by Th2 cells, the earliest recognized source of IL-25, and also from innate Lymphoid Cells Group 2 (ILC2), Eosinophils, Basophiles, and mast cells. It is essential in activating eosinophils by activating adhesion molecule ICAM-1. It promotes recruitment of Th2 cells, ILC2, B cells, eosinophils and mast cells to the site of allergic inflammation in the lung⁶. This produces Immunoglobulin E (IgE) production by B cells, airway eosinophilia, airway hyperresponsiveness, and remodeling⁷. Furthermore, IL-25 stimulates several immune cells, such as Th2 cells, ILC2, eosinophils, mast cells, and structural cells, including endothelial cells, epithelial cells, and fibroblasts to produce and secrete pro-inflammatory cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, and IL-13), and chemokines, namely CXCL8, and macrophage inflammatory protein-1⁸.⁶ Found that the elevated IL-25 mRNA expression and protein concentration was associated with a lower eosinophil and higher neutrophil percentage in asthmatic airways and a lower IL-25 mRNA expression in sputum cells was observed in severe asthma compared to controls, another study by⁹. revealed that Epithelial expression of IL-25 was increased in subject with asthma However, the pathophysiological mechanisms of the “alarmin” cytokines IL-25 in the pathogenesis of different phenotypes of asthma are incompletely understood.

To our knowledge, this is the first study about the genetic aspect of asthma to determine the gene expression of IL-25 in Iraqi patients by using quantitative real-time PCR and to determine serum levels of IL-25 by the ELISA technique.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and sampling

Sixty patients (32 female and 28 male) and thirty apparently healthy subjects (control) (16 female and 14 male) with ages ranging from 15-60 years were enrolled in the current study, and questionnaire form information including age, season, gender, family history, sensitivity, incidence intensity, onset of disease, other diseases were also included, the samples were admitted Alzahra'a Center for Asthma and Allergy in Baghdad during the period between November /2021 to March /2022. Written informed consent was obtained from all patients and a healthy control group. Moreover, the study design was approved by the Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies/ University of Baghdad. All patients were diagnosed according to clinical examination by a chest physician and selected according to the global initiative for asthma criteria. The healthy control group are non-smoking subjects with no history of obstructive lung disease or atopy.

Extraction of genomic RNA and determination of serum level of IL-25

Five ml of peripheral blood samples were collected from the asthma and healthy control group patients. Two ml of blood were kept in EDTA anticoagulant tubes, conserved in 0.25 ml of EDTA blood Eppendorf tubes, and stored at -20 °C for later RNA extraction. The RNA was extracted from the whole blood of asthma patients and healthy control without Trizol subjects using the protocol in **Easy Pure** t® blood RNA Kit (ER-401). Nanodrop measured RNA concentration and purity. The acceptable purity of asthmatic patients and control healthy group RNA ranges between 1.84-1.99. The serum level of IL-25 was determined in asthma patients, and an IL-25 ELISA kit from SunLong company (China) was used in this study.

Real-time –PCR for IL-25 gene

One-step gDNA removal and cDNA Synthesis

The cDNA synthesis was subjected by using the Easy Script® protocol, a two-step gDNA removal and cDNA synthesis Super Mix(Li,2017). According to the manufacturer's instructions, the procedure was performed in a reaction volume of 20 µl. The total RNA volume was (20µl)

Primer sequence for IL-25

Primers used in the study were designed according to their reference sequence in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database and shown in Table (1).

Primer /prop quence (5'→3' direction)	IL-25	Se-
forward 3'		5'-TG-GTCCCTTTTTGGGAAACC-
Revers CAGGCTTT-3' (153bp)		5'-TGTGCAGAAGTG-
		<i>GAPDH housekeeping gene</i>
Forward CATCTTCCAGG		5' GAAATCCCATCAC-
Reverse		5 'GAGCCCAGCCTTCTCCATG

Table 1. Show the primer sequence used in this study.

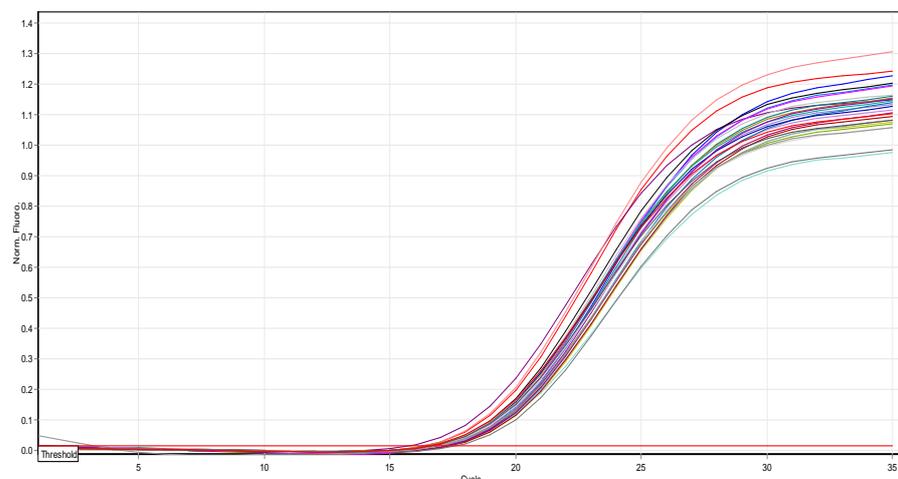


Figure 1. GAPDH amplification plots by qPCR Samples included all study groups. Cycle threshold values ranged from 17 to 20. The photograph was taken directly from the Qiagen rotor Gene qPCR system.

Quantitative Real-Time PCR run

The reaction components and volume of qRT-PCR

Component	Volume
Total RNA/mRNA	4
Anchored Oligo(dT) Primer(0.5 µg/µl)	1 µl
Random Primer((0.1 µg/µl)	1 µl
GSP	1pmol

2xEXreaction Mix	10 μ l
Easy Script® RT/R1 Enzyme Mix	1 μ l
gDNA remover	1 μ l
RNase-free Water	To 20 μ l

Table 2. The reaction components and volume needed

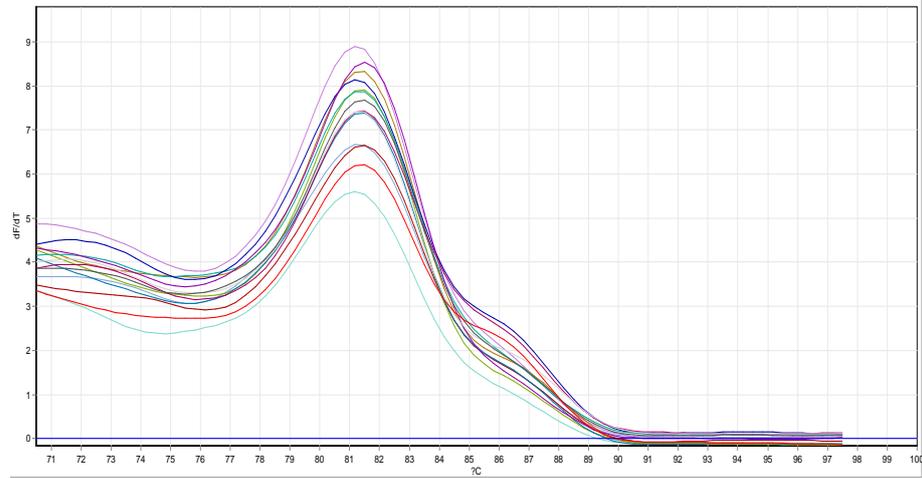


Figure 2. GAPDH dissociation curves by qPCR. Samples included all the study groups. The photograph was taken directly from the Qiagen Rotor-Gene qPCR system.

The time and temperature needed are shown in table (3)

	Step 1	Step2	Step3
Temperature	25c°	42 c°	85c°
Time	10 min.	15min.	5 seconds
	Random Primer(N9)	Anchored Oligo(dT)18	Inactivate reverse transcriptase enzyme

Table 3. Thermal Cycler steps.

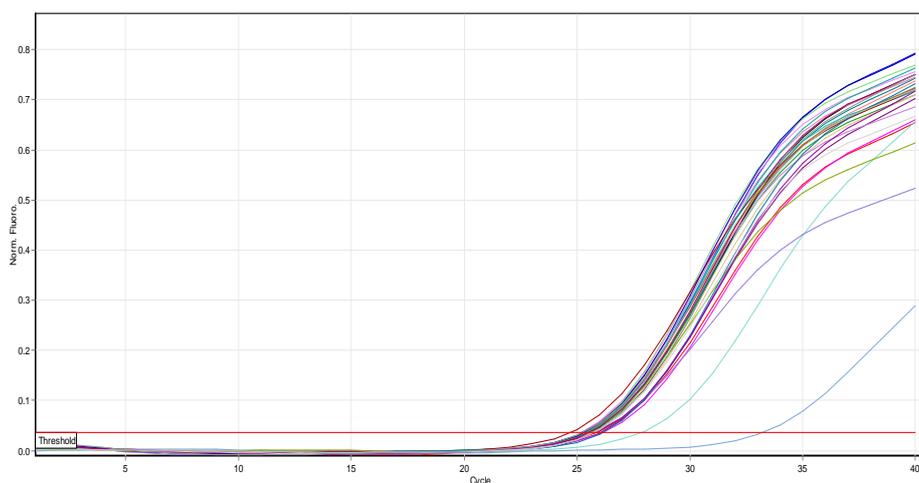


Figure 3. IL-25 amplification plots by qPCR. Samples included those taken from the healthy study group. Cycle threshold values ranged from 21.97 to 23.75. The photograph was taken directly from the Qiagen Rotor-Gene qPCR system.

Trans Start® Probe q PCR Super Mix for RT-PCR

This procedure was carried out in a reaction volume of 25 μ l according to the manufacturers' instruction: the master Mix Syper Green was allowed to thaw at room temperature 25 $^{\circ}$ C then the volume of components needed to prepare the required number of reaction were calculated according to the Table (4) then all the tubes were briefly centrifuged to spin down the contents and to eliminate any air bubbles, the tube was set inside the qRT-PCR well, and the program was run. The optimal annealing temperature of the qPCR reaction was found after several tries to 64 $^{\circ}$ C. The reaction components are described in table (5).

The qRT-PCR program conditions were designed as shown in Table (4)

Components	Volume
Master mix Syper Green	12.5 μ l
Forward primer	1 μ l
Reverse primer	1 μ l
cDNA	3 μ l
Nuclease-free water(NFW.)	7.5 μ l
Total volume	25μl

Table 4. Reaction Components and volume for gene expression.

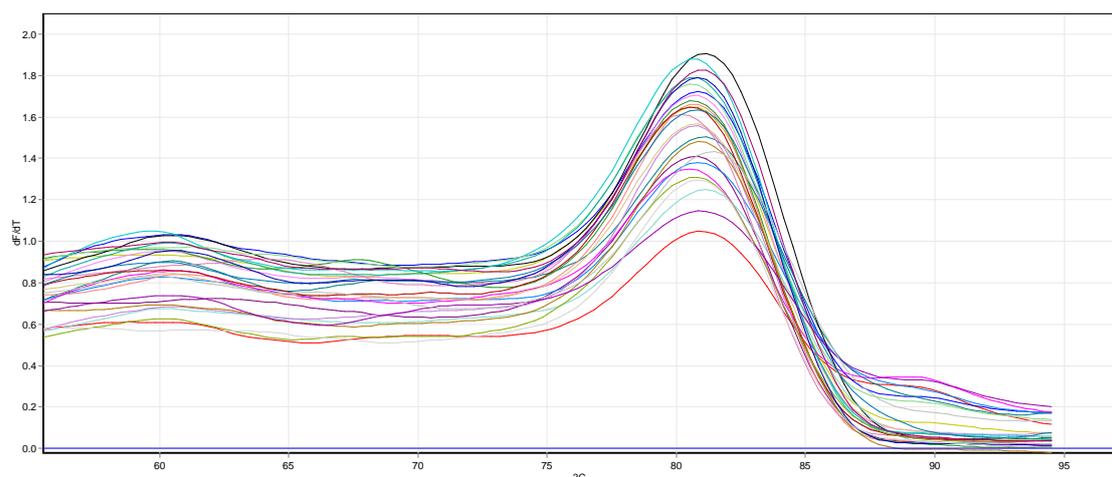


Figure 4. IL-25 dissociation curves by qPCR Samples included a healthy study group. Melting temperature ranged from 85.0 $^{\circ}$ C to 88.0 $^{\circ}$ C. The photograph was taken directly from the Qiagen Rotor gene qPCR machine.

		Temperature	Time	Cycle
Stage 1	Denaturation	95 $^{\circ}$ C	30	1
Stage 2	Denaturation	95 $^{\circ}$ C	5s	
	Annealing	56 $^{\circ}$ C	40s	40
	Extension	72 $^{\circ}$ C	20s	
Stage3	Dissociation	55-95 $^{\circ}$ C	1min.	1

Table 5. Stages and temperature of qRT-PCR

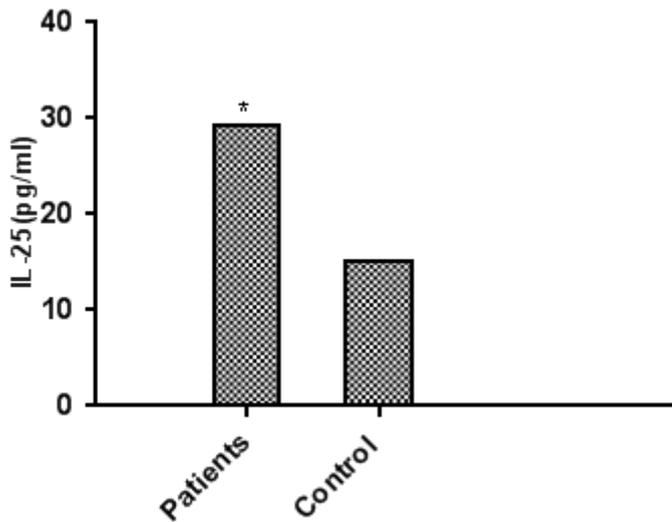


Figure 5. Represent serum level of IL-25 in asthmatic patients and control groups

RT-PCR analysis of IL25 gene expression

Δ CT: The expression ratio was calculated according to the following equation: Δ CT (test) = CT gene of interest (target, test) – CT internal control (housekeeping gene). Finally, the expression ratio was calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Normalized expression ratio¹⁰.

$\Delta\Delta$ CT: To compare the transcript levels between different samples, the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used¹⁰.

The CT of the gene of interest was normalized to that of the internal control gene. The difference in the cycle threshold (Ct) values of the GAPDH gene (interest gene) was calculated using the following formula.

Δ CT (test) = CT gene of interest (target) – CT internal control
 Δ CT (calibrator) = CT gene of interest (target, calibrator) – CT internal control. The Δ CT of the test samples was normalized to the Δ CT of the calibrator: $\Delta\Delta$ CT was calculated according to the following equation: $\Delta\Delta$ CT = Δ CT (test) - Δ CT (calibrator). Finally, the expression ratio was calculated according to the formula. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Normalized expression ratio¹⁰

Detection of IL-25 by ELISA

Determination of serum level of IL-25 using EnzymeLinked Immunosorbent Assay kit (Sunlong Biotech. / China) Using manual instructions. The kits were based on the principles of sandwich-ELISA

Statistical Analysis:

The Statistical Analysis System- SAS (2012) program was used to detect the effect of different factors on study parameters. A T-test was used to compare the means in this study significantly.

RESULTS

Quantitative Real-time PCR of IL-25 Expression

The mean Ct value of IL-25cDNA amplification was (25.179) in the patient's group. On the other hand, the mean Ct value in the Healthy group was (27.393), Table (6). There was a significant difference in the mean Ct values between the two study groups ($P \leq 0.01$).

Groups	Means Ct of <i>IL25</i>	Means Ct of <i>GAPDH</i>	Δ Ct (Means Ct of <i>IL25</i> - Means Ct of <i>GAPDH</i>)	$2^{-\Delta$ Ct}	experimental group/ Control group	Fold of gene expression
Patients	25.179	17.133	8.046	0.0038	0.0038/0.0008	4.938
Control	27.393	17.043	10.350	0.0008	0.0008/0.0008	1.000
T-test	--	--	--	--	--	1.073 **
P- value	--	--	--	--	--	0.0001

** ($P \leq 0.01$).

Table 6. Fold of IL25 expression Depending on $2^{-\Delta$ Ct} Method.

Table (6) shows the calibration that was used, and it was one of the control samples with high expression of IL-25. Data in Table (7) represent mean values of $2^{-\Delta\Delta$ Ct of the patient group with asthma (288.81), while the mean value for the control nonasthmatic group was (58.48). There was a significant difference between the two groups regarding the mean $2^{-\Delta\Delta$ Ct, ($p \leq 0.01$)

Groups	Means Ct of <i>IL25</i>	Means Ct of <i>GAPDH</i>	Δ Ct (Means Ct of <i>IL25</i> - Means Ct of <i>GAPDH</i>)	Mean Δ Ct Calibrator (ctIL25-ct <i>GAPDH</i>)	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	experimental group/ Control group	Fold of gene expression
Patients	25.179	17.133	8.046	16.22	-8.174	288.81	288.81/58.48	4.938
Control	27.393	17.043	10.35	16.22	-5.87	58.48	58.48/58.48	1
T-Test	--	--	--	--	--	--	--	1.073 **
P-Value	--	--	--	--	--	--	--	0.0001

** ($P \leq 0.01$).

Table 7. Fold of IL25 expression Depending on the $2^{-\Delta\Delta$ Ct} method.

As shown in Table (7), the calculation of the gene expression was more significant in the patient group than in the control group 4.938 times. The mean Ct values in the healthy nonasthmatic group were higher than those of the asthmatic patient group. This is important in reflecting the original mRNAs present in the samples. It is evident from these results that the patient group is associated with the highest copy number of mRNAs, reflecting its higher expression. In this study, the mRNA expression of IL-25 was analyzed using qRT-PCR assay, and the results were compared between the healthy controls and asthmatic patients group. The relative expression of the IL-25 gene in all study groups was calculated using the $2^{-\Delta\Delta$ Ct method. The mean of $2^{-\Delta\Delta$ Ct values of the healthy group was 58.48, while in asthma patients, it was 288.81, as shown in Table (7). There was a significant difference between these two groups ($P=0.0001$).

The quantification PCR reaction was run in triplicate for each sample. Samples from the healthy and asthma groups were used in each run. Plots of each run (i.e., amplification plots and dissociation curves) were also

recorded. Figures 1, 2, 3, and 4 present the amplification plots and dissociation curves for GAPDH and IL-25, respectively

Measurement of serum level of IL-25

Table (8) and Figure (5) show Concentrations of IL-25 in the blood serum of asthmatic patients and control group. That represents the significance between asthmatic patients and the control group ($P \leq 0.01$). The Mean \pm SE of asthma Patients (29.30 ± 5.107317 pg./ml) and mean \pm SE of the control group (15.16 ± 0.085248 pg./ml). IL-25 plays an essential role in bronchial asthma because the release of this interleukin is increased in the damaged bronchial epithelium.

Groups	No.	Mean \pm SE of IL-25
Patients	60	29.30 ± 5.107317
Control	30	15.16 ± 0.085248
T-test	--	1.953
P-Value	--	0.0016**

** ($P \leq 0.01$).

Table 8. Comparison between patients and control groups in IL-25 level.

DISCUSSION

The current study aimed to evaluate the potential effect of IL-25 expression on asthma risk. These results are consistent with those reported in previously published studies ¹¹.

The results agreed with ^{9, 11}, as IL-25 levels were higher in severe asthmatics than in the control group. Thus, it is used as a suitable marker of allergic asthma. However, This result is incompatible with the study of ¹², who found in their studies on assays of IL25 in the serum of asthmatic patients that IL-25 in patients with severe asthma is no higher than that of nonasthmatic individuals and claims that any significant role for IL-25 in severe asthma is likely to be localized to the lungs and bronchial tissues ¹². at the same time, ¹³ on their study on pediatric asthma shows that the serum level of IL-25 has a highly significant ($P = 0.000$) association with susceptibility to asthma. The epithelial cytokines IL-25 have been implicated in asthma pathogenesis because they promote Th2-type cytokine synthesis. This study shows the role of interleukin 25 in the airway inflammation. Also, Our study agrees with a study conducted by ⁶, who reported the association between high serum concentration of IL-25 and asthmatic patients.

CONCLUSIONS

The study revealed the association between increased IL-25 mRNA expressions and serum IL-25 concentrations in patients with severe asthma compared to the healthy control group. However, the current study concluded that IL-25 is upregulated in severe asthma patients with increased concentration in blood serum.

REFERENCES

1. Syabbalo, N. The Role of Alarmin Cytokines in the Pathogenesis and Treatment of Severe Uncontrolled Asthma. *Ann .Clin. Med .Res.* **2021**; *2(1)*: 1022
2. Global strategy for Asthma management and prevention, (2020) WHO

3. Stern, J.; Pier, J. and Litonjua, AA editors. Asthma epidemiology and risk factors. Seminars in immunopathology; **2020**: Springer
4. Du, L.; Xu, C.; Zeng, Z.; Chen, F.; Tang, K.; Liang, Y.; and Guo, Y. Exploration of induced sputum BIRC3 levels and clinical implications in asthma. *BMC Pulmonary Medicine*, 22:86. **2022**.
5. Reynauld, J.C. New insight into the role of cytokines in asthma. *J. Clin. Pathol.* **2001**; 54(8):577-89
6. Thabit S S, Awad M M, Abdulateef S M. Effects of In-Ovo Injection of sialic acid on Chick's embryonic development and physiological traits. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 49. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.49>
7. Noaman A I, Khalaf R M, Emad GH, Al-Abbasy, Mohammed Th. T. Effect of flaxseed oil dosing on fertility, growth characteristics and some physical, biochemical, and hormonal blood parameters during the early pregnancy of Awassi ewes. *Revis Bionatura*. 2022;7(4) 5. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.5>.
8. Kouzaki, H., Tojima, I.; Kita, H.; and Shimizu, T. Transcription of interleukin-25 and extracellular release of the protein is regulated by allergen proteases in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, 49(5):741-50.
9. Cheng, D.; Xue, Z.; Yi, L.; Shi, H.; Zhang, K.; Huo, Z.; Bonser R.A.; Zhao, J.; Xu, Y.; Erle, D.J. and Zhen, G. Epithelial Interleukin-25 Is a Key Mediator in Th2-High, Corticosteroid-Responsive Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **2014**, Vol 190 (6) : pp 639–648,
10. Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **2008**; 3(6):1101-8
11. YAO, X.; SUN, Y.; WANG, W.; AND SUN, Y. Interleukin (IL)-25: Pleiotropic roles in asthma, Review. *Respirology*. **2016**. 21, 638–647
12. Khairi, I. R.; Salman, M. A. Effect Of Plant Growth Regulators On In Vitro And Ex Vitro Conditions On Propagation Of *Dianthus Caryophyllus* L. *JLSAR* 2021, 2, 54–60.
13. AL-Hasnawi, A.T.N. and AL-Hasnawi, S.M.J. Role of interleukin 25 and interleukin 33 as immunological markers in pediatric asthma. *Eurasia J. Biosci.* **2020**; 14, 4625-4630
14. Cary N. Statistical analysis system, User's guide. Statistical. Version 9. SAS Inst Inc USA. **2012**.
15. Li, P.; Du, J.; Goodier, J.L.; Hou, J.; Kang, J.; Kazazian, H.H., et al. Aicardi–Goutières syndrome protein TREX1 suppresses L1 and maintains genome integrity through exonuclease-independent ORF1p depletion. *Nucleic Acids Res.* **2017**; 45(8):4619-31

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: ALSaadi, B.Q.H.; Ali, M.H. Association of serum level and gene expression of IL-25 in a sample of Iraqi asthmatic patients. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 84. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.84>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

The Effect of Partial Replacement of Yellow Corn by Iraqi Rice Bran Treated with multi-enzymes on the Broiler Performance

Tariq S. Almrsoomi*, Ali J. Hammod, Ammar H. Areaaer

1 Department of Animal Production, Faculty of Agriculture,

2 Department of Animal Production, Faculty of Agriculture,

*Correspondence: tareq.almusawi@uokufa.edu.iq

Available from: Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.85>

ABSTRACT

Until recently, the central objective of poultry feed formulation was to supply common feedstuff such as corn. Today, the search for sustainable alternatives to traditional feed elements is a primary goal to reduce feed costs. This study was carried out to explore the production performance of the Rice bran in the feeding of broiler Ross 308 chicken. One hundred eighty chicks were fed with Rice bran diets treated with multi-enzyme as a partial replacement (10%) of Yellow Corn. Chicks were distributed into four treatment groups as follows: (L0) control (45% yellow corn), L1, L2 and L3 (10% Rice bran and 35% yellow corn). Rice bran was treated with different amounts of multi-enzymes: 500, 750, and 1000mg of Labazyme/kg diet, respectively. The results showed a significant ($P \leq 0.05$) decrease in the marketing live body weight and total weight gain for broilers fed with 10% Rice bran and 35% yellow corn. The accumulative feed consumption and conversion ratio were unaffected (no significant difference at $P \leq 0.05$) when the Rice bran was treated with 1000 mg of Labazyme/kg diet. This present study concludes that a diet with 10% Rice bran and 35% yellow corn hurts the growth performance of broiler chicken. However, the breeding cost of broiler Ross 308 chicken was reduced when the Rice bran was treated with 1000 mg/kg multi-enzymes (L3 group). There were no effects on the mortality rate of all experimental groups.

Keyword: Broiler, Labazyme, Performance, Rice bran, Ross 308.

INTRODUCTION

The raw materials used in human feeding in poultry production systems should be reduced. Corn is the primary cereal used in poultry production systems. Thus, using alternative by-products, such as rice bran, according to their nutritional value and availability, will increase the ability of feed formulation and decrease the use of expensive feedstuff. Thus, yellow corn can be partially substituted by Rice bran as its nutritional features are similar to those of corn¹. The Rice bran contains more lysine (4.8%), cysteine (5.4%) and threonine (4.2%) than corn. It also contains higher levels of total crude protein, around 13%, and lipids, 13%, than corn². It has a low portion of starch in comparison with corn, which reduces the risk of infection by Mycotoxin³. Rice bran is a great nutrition compound as it is rich in oryzanols, tocopherols, tocotrienols, phytosterols, and vitamin E, which are micronutrients and antioxidant. Consequently, the Rice bran may be used as a low-cost source of energy in chickens Diet. The partial replacement of yellow corn by 12.5, 25% raw Rice bran has reduced the broilers' diet digestibility and growth rate. The high fiber content of raw rice bran causes this reduction.⁴ Few studies have demonstrated that the enzymatic treatment of rice bran can digest the fibers and make the nutrients more accessible. The enzymatic treatment of Rice bran before using it in the feed of laying hens as a partial replacement for yellow corn has enhanced egg production and egg quality.^{5,6} found that the partial replacement of yellow corn (up to 7.5%) by Raw Rice bran did not affect broilers' meat quality and production

performance. At the same time, the entire replacement of yellow corn with Rice bran reduced the production performance during the same feeding period ⁷. Feed intake was reduced when a higher percentage of Rice bran was used ⁸. Adding carbohydrase enzyme individually or in combination with Phytase to feed that contains raw Rice bran has increased the availability of nutrients and improved body weight gain ⁹. No research has been conducted to investigate the effect of Iraqi Rice bran treatment with variable levels of Labazyme as a multi-enzyme on broilers' performance. This experiment aimed to assess the nutritional value of Iraqi rice bran after treatment with different amounts of multi-enzymes. This experiment is the first to investigate the improvement effect of ribozyme treatment on the nutritional value of Iraqi rice bran as an energy source in a broiler diet. It is also one of the few experiments that assess the usefulness of partial replacement of yellow corn by 10% of enzymatically treated Iraqi Rice bran on broiler performance.

MATERIALS AND METHODS

Diets and management

The experiment was conducted in Fowl Farm, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, University of Kufa, from February 1 to March 7, 2022, for 5 weeks. Rice bran was collected from Iraqi Anbar rice and treated with Labazyme in concentrations of 500, 750, and 1000 mg/kg of diet. The Labazyme is a multi-enzyme manufactured by New Pharm (a Korean company) consisting of Protease (2.750 CSU), Amylase (5.500 SLU) and Cellulase (27.5 FPUi). The experiment was carried out by a completely randomized design (CRD). One hundred eighty broiler Ross 308 chicks at 1 day old, 42g initial weight was used, Provided by (Al-Anwar Hatchery- Babylon). The chicks were randomly distributed to 4 treatment groups (45 chicks/treatment) with 3 replicates (15 each) as follows: L0 was a control (45% corn + 0% rice bran), and L1, L2 and L3 were added 500, 750, and 1000 mg of Labazyme per 1 kg diet, respectively. The yellow corn was partially replaced with 10% of differently treated Rice bran (35% corn + 10% Rice bran), as shown in Table 1. All chicks were fed diets which

Ingredient %	Starter diets (1-21d)		Finisher diets (22-35d)	
	L0	L1,L2,L3	L0	L1,L2,L3
Yellow Corn	45	35	45	35
Rice bran	0	10	0	10
Wheat	16.6	17.1	23.1	23.8
Soybean meal (48%)	32.7	31.7	24.7	23.7
^a premix	2.5	2.5	2.5	2.5
Limestone	0.5	0.5	0.5	0.5
Salt	0.2	0.2	0.2	0.2
dicalcium Phosphate	1.5	1.5	1.5	1.5
Vegetable oil	1	1.5	2.5	2.8
Crude protein %	23	23	20	20
Energy (Kcal ME/kg)	3007	3003	3165	2149
Calcium %	0.12	0.12	0.10	0.10
Available phosphorus %	0.45	0.45	0.41	0.40
Cysteine +Methionine %	0.66	0.67	0.60	0.60
Crude Fiber %	3.89	4.31	3.57	4

L1, L2 and L3 were added 500, 750, and 1000 mg of Labazyme per 1 kg diet.

^a. One kilogram of premix contained: 2200 Kcal/kg Met.En., Protein45%, Fiber 3%, Fat 8%, Phosphorus (av) 0.12%, calcium 6%, Cys.+ meth. 2.5%, Lys.3%, meth. 2%. A 30.000 IU, D3 30.000 IU, E 500 mg, K 40 mg, B1 30 mg, B2 75mg, B6 60 mg, Pantothenic acid 120 mg, Folic acid 15 mg, Niacin 400 mg, biotin1500 mg, choline 1.7%, Na 1.5 %, Fe 450 mg, Cu 70%, Zn 600 mg, potassium iodine 5 mg, cob 1 mg and Sel 1 mg.

Table 1. The content of the experimental diets %.

L1, L2 and L3 were added 500, 750, and 1000 mg of Labazyme per 1 kg diet.

a. One kilogram of premix contained: 2200 Kcal/kg Met.En., Protein45%, Fiber 3%, Fat 8%, Phosphorus (av) 0.12%, calcium 6%, Cys.+ meth. 2.5%, Lys.3%, meth. 2%. A 30.000 IU, D3 30.000 IU, E 500 mg, K 40 mg, B1 30 mg, B2 75mg, B6 60 mg, Pantothenic acid 120 mg, Folic acid 15 mg, Niacin 400 mg, biotin1500 mg, choline 1.7%, Na 1.5 %, Fe 450 mg, Cu 70%, Zn 600 mg, potassium iodine 5 mg, cob 1 mg and Se1 mg. Presented in mash form during the first three weeks of age (1 - 21 days) by starter diet (23% protein and 3000 Kcal ME/kg), while during (22 - 35 days) with finisher diet (20% crude protein and 3150 Kcal ME/kg) which formulated according to NRC (1994). The chicks were distributed to 15 Pens (200 × 150 cm per pen) in floor cages, which were provided with artificial lighting (23 hours/day) for 5 weeks of the experimental period. A mixture of minerals and vitamins was added to the feed to cover the nutritional requirements of chicken diets by the management guide of broiler Ross 308(2018). Broilers had ad libitum access to water and feed. Live body weights and feed consumption were recorded at 7, 14, 21, 28, and 35 days of age, while mortality was recorded daily. There was no chicken mortality during the experiments, but body weight gain and feed conversion ratio were calculated weekly.

Statistical analysis

Data obtained from this study was tested for significance by one-way ANOVA using GLM procedures of¹⁰. Duncan's multiple collection test (1955) checked the differences between treatment means.

RESULTS

No significant differences in the live body weight (LBW) of chicks during the experimental period (shown in Table) during 7 days of age were found in comparison with the control group (L0). During 14 days of age, a significant ($P \leq 0.05$) increase in the body weight of the L0 and L3 groups was recorded, and groups L1 and L2 recorded the lowest body weight. Significant ($P \leq 0.05$) decreases in body weight were found between experimental treatments and control L0, which recorded the maximum LBW during 21, 28, and 35 days of age, while the L3 group was the second one, and L1, L2 was the lowest during the same periods. In the statistical analysis of the influence of partial replacement of 10% Rice bran (treated with Labazyme) for yellow corn on body weight gain (BWG), in Table (3), the results indicated that a significance ($P \leq 0.05$) decrease in body weight gain during the first week of age was found between experimental treatments and control, but during (15-21), (22- 28) and (29- 35) days of age, no difference was found between L0 and L3 while L2 and L3 have recorded a significant ($P \leq 0.05$) depression during the same periods, also during the total period 1-35 day of age.

Treatments	Body weight(g) in days of age				
	7	14	21	28	35
L0	±3.51 132	309±2.60a	653±3.33a	1062±7.85a	1546±10.03a
L1	±0.33 131	282±0.57c	542±1.45c	903±6.92d	1326±3.75c
L2	132±0.57	299±1.45b	562±11.25c	946±10.10c	1316±13.56c
L3	±0.57 136	306±0.33a	613±18.47b	1014±2.6b	1445±25.98b
Level of sig.*	NS	*	*	*	*

* $P \leq 0.05$ means that the letters in the same column are significantly different; L1, L2 and L3 were added 500, 750, and 1000 mg of Labazyme per 1 kg diet, respectively.

Table 2: The live body weight response of Broiler Ross 308 Fed 10 % of Rice Bran as a Partial replacement for the Yellow Corn was treated with Labazyme (Mean ± standard error).

Feed consumption has significantly ($P \leq 0.05$) decreased in all experimental groups in comparison with the control group L0 at (15-21), (22-28) and (29-35) days of age and also during the total period (1-35 days of age). L1 and L2 recorded the lowest feed consumption. At the same time, L0 (control) and L3 recorded a higher feed intake than L1 and L2.

Treatments	Body weight Gain(g) in days of age				
	8-14	15-21	22-28	29-35	1-35
L0	2.08a±178	±5.78a343	±4.93a409	±16.17a484	±6.56a1414
L1	150±0.33c	±2.02b260	±8.08b361	±10.68bc423	1195±4.33c
L2	167±0.88b	±12.7b263	±1.45ab384	±3.46c370	1185±13.85c
L3	170±0.88b	±18.76a306	±15.87a401	±28.570ab430	1309±26.55b
Level of sig.*	*	*	*	*	*

* $P \leq 0.05$ means that the letters in the same column are significantly different; L1, L2 and L3 were added 500, 750, and 1000mg of Labazyme per 1 kg diet, respectively.

Table 3. Body weight Gain response of Broiler Ross 308 Fed 10 % of Rice Bran as a Partial replacement for the Yellow Corn and treated with Labazyme (Mean ± standard error).

Feed conversion ratio was significantly ($P \leq 0.05$) decreased for L1, L2 and L3 in comparison with the L0 control at (15-21) days of age. The feed conversion ratio of L0 and L3 during the total period (1-35 days of age) was significantly ($P \leq 0.05$) better in comparison with L1 and L2, which recorded 1.63 and 1.66, respectively.

DISCUSSION

All the experimental birds showed significant ($P \leq 0.05$) differences for all productive characters during the total period (1-35) days of age. There were no significant differences in LBW in all test groups and control at the first week of age, but the depression started and continued after the first week. However, the highest enzyme concentration used to treat Rice bran (L3) gave an LBW close to the control group. The body weight gain also decreased with lower enzyme concentration treatment, similar to LBW; the BWG of group L3 (treated with 1000mg/kg) was close to that of the control group. The enzymatic treatment needs further optimization using a higher enzyme concentration (more than 1000mg/kg) to perform better. Higher enzyme concentrations will digest all the fibrous contents of rice bran, including all nutrients, and make them available for birds. On the other hand, there was no significant ($P \leq 0.05$) difference in the feed conversion ratio between the control group and L3, which means that the production cost can be reduced using enzymatically treated Rice bran.

Treatments	Feed consumption(g) in days of age				
	8-14	15-21	22-28	29-35	1-35
L0	242±5.856a	414±6.22	647±26.87a	860±27.62ab	2164±54.7a
L1	131±18.18b	506±52.25	553±2.02ab	775±30.02b	1966±38.39b
L2	130±17.32b	489±15.87	583±8.37ab	772±14.43b	1975±4.61b
L3	165±8.66b	518±25.98	532±57.15b	855±31.75a	2100±53.7ab
Level of sig.*	*	NS	*	*	*

* P≤0.05 means that the letters in the same column are significantly different; L1, L2 and L3 were added 500, 750, and 1000 mg of Labazyme per 1 kg of diet, respectively.

Table 4. Feed consumption (g/bird/week) response of Broiler Ross 308 Fed 10 % of Rice Bran as a Partial replacement for the Yellow Corn and treated with Labazyme (Mean ± standard error).

Treatments	Feed conversion ratio in days of age.				
	7-14	15-21	22-28	29-35	1-35
L0	1.33±0.03a	±0.01b <i>20.1</i>	±0.05a <i>1.60</i>	1.80±0.10b	0.03b <i>1.53±</i>
L1	0.90±0.11b	1.93±0.20a	1.53±0.03a	1.83±0.0b	1.63±0.03a
L2	0.80±0.11b	±0.14a <i>86.1</i>	±0.03a <i>1.53</i>	2.10±0.05a	0.03a <i>1.66±</i>
L3	1.00±0.05b	±0.01a <i>70.1</i>	±0.08b <i>1.33</i>	2.10±0.05a	0.01ab <i>1.60±</i>
Level of sig.*	*	*	*	*	*

* P≤0.05 means that the letters in the same column are significantly different; L1, L2 and L3 were added 500, 750, and 1000 mg of Labazyme per 1 kg diet, respectively.

Table 5. Feed conversion ratio response of Broiler Ross 308 Fed 10% of Rice Bran as a Partial replacement for the Yellow Corn and treated with Labazyme (Mean ± standard error).

The growth rate was significantly dropped in the test groups (L1 and L2) due to the presence of high fiber content due to low enzyme concentration treatment (500 and 750mg/kg). Fibers can trap the nutrients and reduce performance because of the bulkiness effect. This agrees with the finding of ^{4,11,12}, who showed that non-starch polysaccharides (NSP) present in the diet lead to low broiler growth performance, and the use of enzymes improves the nutritional value of rice bran. The negative effect of fiber is more significant on body weight and feed conversion ratio when rice bran is used in broiler diets ⁸. Using Rice bran in the finisher diet has also reduced the broiler performance ¹³. In general comparison, the improved performance of broiler chicken growth represented by feed conversion ratio confirms that using enzymes reduces the fiber content in a treated diet and proposes the rice bran as a candidate replacement for yellow corn in feed formulation.

CONCLUSIONS

The Iraqi Rice bran treated with a high concentration of multi-enzymes is helpful as a readily available and inexpensive dietary component for feed formulation. Optimizing the enzyme concentration for Rice bran treatment (higher than 1000mg/Kg) will enhance broiler growth performance. The Iraqi Rice bran is safe to be used as a feedstuff as it has no adverse effects on the mortality rate. Further research is required to determine the optimum amount of Labazyme to treat Iraqi Rice bran and the impact of this optimum concentration on broiler health and growth performance.

REFERENCES

1. Alyaseen, A.A. and Abdul abass, M.H. Poultry feeding. first edition, College of Agriculture - University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
2. Steel, RC and Torrie, J.H.1980. Principle and procedures of Statistics. 2nd edition. New York, United States of America: McGraw-Hill Book Co. **2010**.
3. Mohammadigheisar, T., Shouldice, V. L., Torrey, S., Widowski, Tina M., Ward, Nelson E., and Kiarie Elijah G. Growth performance, organ attributes, nutrient and caloric utilization in broiler chickens differing in growth rates when fed a corn-soybean meal diet with multi enzyme supplement containing phytase, protease and fiber degrading enzymes. *Poultry Science*,100,1-11. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101362>. **2021**.
4. Alshukri, A.Y., Almrsoomi, T. S., Areaaer, A. H. and Alfartosi, K. A. Effect of Partial Substitution of Rice bran for the Yellow Corn (Maize) on Broiler Performance. *International Science Research*, **2016**; 5, 2003-2006. <https://www.researchgate.net/publication/312595327>
5. S. F. Al-jughaihy, A., Sh. J. Alobaidy, B. Effect Of Osmo-Hardening Seed On K And Na Concentration And Some Growth Properties Of Wheat Under Salt Stress. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 32-43. doi: 10.32649/ajas.2023.179713 .
6. Al-Tayyar,I.S.and Almrsoomi,T.S. The Growth Parameters Response of Broiler Chicks Fed Partial replacement of Rice Bran for the Yellow Corn. *Al-Qadisiyah Journal For Agriculture Science*, **2022**;12, 93-97.
7. Alkhateeb, A. R. ; Ibrahim, W. ; Taha, A. A. . Correlation Between Udder Conformation With Daily Milk Yield Of Buffaloes. *JLSAR* 2021, 2, 61–65.
8. Priabudiman, Y. and Sukaryana, Y. The influence of Palm Kernel Cake and Rice Bran Fermentation product mixture to the Broiler Carcass Quality. *International Journal Science and Engineering*, **2012**;2, 1-3. Doi: 10.12777/ijse.2.1.1-3.
9. Sanchez, J., Thanabalan, A., Khanal, T., Patterson, R., Slominski, B. and Kiarie. E. Growth performance, gastrointestinal weight, microbial metabolites and apparent retention of components in broiler chickens fed up to 11% Rice bran in a corn-soybean meal diet without or with a multi-enzyme supplement. *Animal Nutrition*, **2019**;5, 41-48. Doi: 10.1016/j.aninu.2018.12.001
10. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82> .
11. SAS. SAS/Statistics Users Guide: Statistics Cary. North Carolina, United States of America: SAS Institute Inc. **2012**.
12. Sharma, R., Srivastava, T. and Saxena, D.C. Studies on Rice bran and its benefits- A Review. *International Journal Engineering Research Application*, **2015**;5,107-112. http://www.ijera.com/papers/Vol5_issue5/Part%20-%20202/Q50502107112.pdf
13. Chen, X., Yang, H. and Wang, Z. The Effect of Different Dietary Levels of Defatted Rice bran on . **2019**.

14. Fan, L., Huang, R., Wu, C., Cao, Y., Du, T., Pu, G., Wang, H., Zhou, W., Li, P., Kim, S. W. Defatted Rice bran Supplementation in Diets of Finishing Pigs: Effects on Physiological, Intestinal Barrier, and Oxidative Stress Parameters. *Animal Journal*, **2020**;499,1-12.Doi: 10.3390/ani10030449

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Almrsomi, T.S.; Hammod, A.J.; Areaer, A.H. The Effect of Partial Replacement of yellow corn by Iraqi Rice Bran Treated with multi-enzymes on the Broiler performance. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 85. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.85>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

The performance of moringa leaf extract application and bagging the bunches to improve fruits quality of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Al-Khadrawi and Al-Buraim

MohammedAbdulrahman¹, ManarAlwan², KadumAbdullah^{2*}, MariamChaffat³

1 Horticulture and Landscape Department/ College of Agriculture/ University of Kerbala/ Karbala, Iraq; mohammed.s@s.uokerbala.edu.iq.
<https://orcid.org/0000-0001-6675-8189> 2

2 Department Horticulture and Landscape/ College of Agriculture Al-Qasim Green University; manar.a@agre.uoqasim.edu.iq.

2 Horticulture and Landscape Department/ College of Agriculture/ University of Kerbala, Karbala/ Iraq; <https://orcid.org/0000-0002-9619-5900>

3 Plant Protection Department, College of Agriculture, University of Kerbala, Karbala, Iraq.

* Correspondence: kadum.m@uokerbala.edu.iq.; Tel.: 0771 723 8168
Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.86>

ABSTRACT

The study was conducted at the Fadak farm of the Husseiniya shrine/ Karbala governorate during the growth season 2021 to test the role of application with Moringa leaf extract and the paper bagging of the bunches in improving some qualitative characteristics of the fruits of two palm cultivars, Al-Khadrawi and Al-Buraim. The bunches were sprayed with three concentrations of moringa leaf extract (0, 100, 200 ml. L⁻¹) three times after 7, 10, and 13 weeks of pollination and then bagging the bunches after each application process according to the schedule and plan of the experiment. The results indicated that application with moringa extract and bagging increased the proportion of total dissolved solids (T.S.S.), total sugars and reducing sugars, and decreased the total acidity neutralizing, sucrose, and tannins. Al-Khadrawi cultivar was superior in most of the studied traits.

The study's findings suggest that natural plant extracts (such as Moringa leaf extract) can be utilized as organic amendments or fertilizer additives in conjunction with particular farming practices to enhance the quality of the fruits of some varieties of date palms.

Keywords: T.S.S.; natural extract; *Phoenix dactylifera*; Arecaceae; *Moringaoleifera*.

INTRODUCTION

The palm tree species *Phoenix dactylifera* L. is a member of the Arecaceae family of palms. The number of their species worldwide is estimated at 1500 species¹. About 600 of them are registered in Iraq², which is one of the oldest palm plantations in the world. Therefore, it is believed that Iraq and the Arab Gulf region are its original home. The fruit of the date palm has much potential. Its fruits, seeds, pits, and byproducts all contain the potential for both nourishment and medicine because fruits and seeds are packed in nutrients such phenolics, dietary fibers, vitamins, minerals, and amino acids which makes them have many functions such as antibacterial, antioxidant, anticancer, and antidiabetic properties and the presence of phytochemicals such as carotenoids, phenolic acid, flavonoids, tocopherol, phytosterols, etc. boosts these bioactivities³.

The al-Khadrawi variety is one of the commercial varieties characterized by slight greenness in its fruits. Its cultivation spreads in the central and southern regions of Iraq. It has several names, including Khadrawi Basra

and Khadrawi Mandali. Its fruits are consumed in the wet stage and have a distinctive flavour⁴. Al-Buraim is one of the most important dates in Basra. Its cultivation spreads throughout Iraq, and its ripe fruits are of excellent quality and eaten in the Khalaal and Rutab stages. It is eaten as cooked Khalaal and is not left most of the time until the Tamar stage⁵.

In recent years, global interest in the quality of food consumed has increased, so many practices have emerged that improve the quality of fruits without leaving adverse effects on human health and the environment. One of these practices is using plant extracts that can serve the same purpose as industrial materials but without any danger to humans and the environment⁶. Due to their abundant quantity of different active ingredients, plants serve as the primary source of raw substances for the synthesis of essential and practical bio-products (such as food, cosmetics, medications, bio-stimulants, bio-pesticides, and feed) such that many plant components, including seeds, fruits, flowers, stems, leaves, and roots, have been utilized in their production⁷. The stimulating properties of botanical extracts are attributed to organic compounds, including polyphenols, amino acids, plant hormones, and vitamins, as well as both micro- and macro-elements; however, their impact on enhancing the quantity and quality of crops depends on the crop species, cultivar, stage of growth, environmental conditions, as well as dose, timing, and application method^{8,9}. Among these extracts is *Moringa oleifera* leaf extract as a natural alternative because it contains many growth hormones, especially zeatin, which is derived from the plant cytokinin group, antioxidants, nutrients and vitamins¹⁰ and thus its effect is similar for the effect of synthetic growth regulators¹¹. In a study conducted in Egypt by¹² application the bunches of the palm cultivar Al-Khadrawi with *Moringa* leaf extract at a concentration of 3% three times between one spray and another month, where the first spray was three hours before pollination, it was found that the application treatment significantly outperformed the proportion of total soluble solids accumulated in the fruit and total sugars as well as reducing sugars. In contrast, application with the extract reduced the non-reducing sugars. As for the neutralizing total acidity, there are no significant differences between the spray and comparison treatment and the case for total tannins in the fruit.

The process of muzzling, i.e., bagging the bunches with different covers, is an essential physical process, especially in hot and dry areas, as it improves the quality of the fruits and protects them from some insect pests, mechanical damage and unsuitable climatic factors that negatively affect the quality and productivity of the palm fruits¹³. Al-Issawi¹⁴ found that when bagging the Khastawi cultivar with different types of covers (transparent polyethylene, black polyethylene, unique sleeve bags, mesh cloth, and paper bags), all covers increased the quality of the fruits.

In order to improve the quality of the fruits and highlight the importance of using natural extracts and specific agricultural techniques to produce high-quality horticultural crops, the study evaluated the effectiveness of applying *Moringa* leaf extract on bunches and bagging them with paper. It also examined how these two practices interacted with various cultivars of palm trees (Al-Khadrawi Basra and Al-Buraim).

MATERIALS AND METHODS

The field experiment was launched at the Fadak farm of the Husseinia shrine during the season 2021. Thirty-six palm trees were selected, with eighteen palm trees for each cultivar at the age of five years, homogeneous in size and growth strength as much as possible. Manual pollination and thinning were carried out by leaving 6 bunches. Palm⁻¹. Three elements were examined in the study. The first element was three different concentrations of moringa leaf extract (200, 100.0 ml. L⁻¹) applied on the bunches with three sprays. The first spray was after 7 weeks of pollination (the end of the Hababuk stage and the beginning of the Jamri stage), and between one spray and another was 21 days. The second factor was using bagging with closed-end perforated paper bags, where the bagging process was done immediately after the first spray and the bags were lifted at the third spray. The third factor included two cultivars: Al-Khadrawi Basra and Al-Buraim. The experiment was designed in a Randomized Complete Block design, R.C.B.D., with three replications, and the averages were compared according to Duncan's polynomial test at a probability level of 0.05¹⁵. The qualitative characteristics of the fruits were measured, where the proportion of dry mass and water content (%), the proportion of total soluble solids (T.S.S.) (%), which were measured using Hand Refractometer according to¹⁶, total and reducing sugars and sucrose (%) which were estimated using The Lane and Eynon method mentioned by¹⁷, the total neutralizable acidity (%) determined as in¹⁸ and the proportion of tannins (%) calculated by the method of¹⁹.

Chemical components	Leaf Powder	Chemical components	Leaf Powder	Chemical components	Leaf Powder
Moisture (%)	7.5	Iron (mg)	28.2	Histidine (g/16 g N)	0.61
Protein (g)	27.1	Sulfur(mg)	870	Lysine (g/16 g N)	1.32
Fat (g)	2.3	Vitamin A (β -carotene) (mg)	16.3	Tryptophan (g/16 g N)	0.43
Carbohydrate (g)	38.2	Vitamin B1 (thiamine) (mg)	2.6	Phenylalanine (g/16 g N)	1.39
Fiber (g)	19.2	Vitamin B2 (riboflavin) (mg)	20.5	Methionine (g/16 g N)	2
Calcium (mg)	2.003	Vitamin B3 (nicotinic acid) (mg)	8.2	Threonine (g/16 g N)	1.19
Magnesium (mg)	368	Vitamin C (ascorbic acid) (mg)	17.3	Leucine (g/16 g N)	1.95
Phosphorus (mg)	204	Vitamin E (tocopherol acetate) (mg)	113	Isoleucine (g/16 g N)	0.83
Potassium (mg)	1.324	Arginine (g/16 g N)	1.33	Valine (g/16 g N)	1.06
Copper (mg)	0.6				

Table 1. Chemical analytical assessment of 100 g of powdered *Moringa oleifera* leaves.

RESULTS

Water content of fruits (%)

It is noticed from Table 2 that application with moringa leaf extract reduced the water content of the fruits, as the most significant proportion was observed with the comparative treatment of 29.36 %, while the lowest proportion was detected at a concentration of 200 ml. L⁻¹ of 25.69%, while the bagging increased the water content of the fruits, as the bagging treatment reached 28.57%, while treatment without bagging gave 26.23%. The two cultivars also differed in the water content in their fruits, where the fruits of the Al-Khadrawi cultivar recorded the most significant proportion of 31.33%. At the same time, the proportion in Al-Khadrawi variety was 23.56%. Regarding the relationship between extract application and bagging, the application treatment at a concentration of 0 ml. L⁻¹ with bagging recorded the most significant proportion, 30.71%, while the concentration was 200 ml. L⁻¹ recorded the lowest proportion, which was 24.40% without paper cover.

On the other hand, the comparison treatment of moringa extract on the Al-Khadrawi cultivar outperformed by giving the most significant proportion, reaching 34.21%, while the application dose of 200 ml. L⁻¹ on the Al-Buraim cultivar recorded the lowest water content proportion, 22.98%. Regarding the interaction between bagging and cultivar, Al-Khadrawi's bagging treatment outperformed Al-Buraim's non-bagging treatment by recording a proportion of fruit water content that reached 32.12%. In contrast, Al-Buraim's non-bagging treatment recorded the lowest proportion, 22.11%.

The interaction of the three examined variables significantly impacted the water content of the fruits, as it was noted that the spray application was at a concentration of 0 ml. L⁻¹ with bagging on Al-Khadrawi cultivar gave the most significant proportion of 35.20%, while application with a concentration of 200 ml. L⁻¹ without bagging on the Al-Buraim cultivar recorded the lowest proportion of 21.43% Table 2.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	33.23 b*	31.03 c	27.36 e	30.54 a	31.33 a
	With bagging	35.20 a	31.73 c	29.43 d	32.12 a	
Buraim	Without bagging	22.80 h	22.10 hi	21.43 i	22.11 c	23.56 b
	With bagging	26.23 f	24.30 g	24.53 g	25.02 b	
Extract averages		29.36 a	27.29 b	25.69 c		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	34.21 a	31.38 b	28.40 c	Bagging averages	
	Buraim	24.51 d	23.20 d	22.98 d		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	28.01 ab	26.56 ab	24.40 b	26.23 b	
	With bagging	30.71 a	28.01 ab	26.98 ab	28.57 a	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 2. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on the water content of the (%) of two palm cultivars.

Fruit dry matter proportion (%)

The data in Table 3 indicated that the proportion of dry matter of the fruits gradually increased with the increase in the concentration of moringa leaf extract, where the spray application was at a concentration of 200 ml. L⁻¹ had the most significant proportion of 74.30%. The comparison sprays recorded a proportion of 70.63%, while bagging reduced the dry matter in the fruits, reaching 73.76% in the treatment without bagging. In comparison, it amounted to 71.42% in the bagging treatment. As for the cultivars, it is noticeable that there are significant differences between them, as the Al-Buraim cultivar has a significant score of 76.43%, superior to the Al-Khadrawi cultivar, which has a rate of 68.66%—the spray application with 200 ml. L⁻¹ and without bagging was superior to 75.60%, while the 0 ml. L⁻¹ treatment with bagging was the lowest, which amounted to 69.28%—also, the application treatment with a concentration of 200 ml. L⁻¹ was superior to the Al-Buraim cultivar, with the most significant proportion of 77.01%.

The comparison treatment for the Al-Khadrawi cultivar recorded a smaller proportion of 65.78%. In comparison, the non-bagging treatment of the Al-Buraim cultivar outperformed because it gave the most significant proportion of 77.88%, while the lowest proportion was in the bagging treatment for the fruits of the Al-Khadrawi cultivar, which amounted to 67.87%. The data of the triple interaction indicated that the application treatment with 200 ml. L⁻¹ without bagging the Al-Buraim cultivar recorded the most significant proportion of dry matter in the fruits, amounting to 78.56%, during the application with 0 ml. L⁻¹ with bagging on the fruits of the Al-Khadrawi variety recorded the lowest rate of 64.80% Table 3.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	66.76 h*	68.96 g	72.63 e	69.45 c	68.66 b
	With bagging	64.80 i	68.26 g	70.56 f	67.87 c	
Buraim	Without bagging	77.20 b	77.90 ab	78.56 a	77.88 a	76.43 a
	With bagging	73.76 d	75.70 c	75.46 c	74.97 b	
Extract averages		70.63 c	72.70 b	74.30 a		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	65.78 d	68.61 c	71.60 b	Bagging averages	
	Buraim	75.48 a	76.80 a	77.01 a		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	71.98 ab	73.43 ab	75.60 a	73.76 a	
	With bagging	69.28 b	71.98 ab	73.01 ab	71.42 b	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 3. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on fruit dry matter proportion (%) of two palm cultivars.

Total Soluble Solids (%) (T.S.S.)

Table 4 shows that the proportion of total soluble substances increased with an increase in the application of moringa leaf extract, where the application of 200 ml. L⁻¹ gave the most significant proportion of 57.23%, while the comparison treatment revealed the lowest proportion of 51.80%. Also, the proportion of total soluble solids increased with the bagging of the bunches was 55.55%, with a significant difference from the treatment without packaging, which amounted to 53.77%. Al-Khadrawi cultivar significantly outperformed the Al-Buraim cultivar, as their proportions reached 55.86 and 53.46%, respectively.

There was a remarkable effect of the dual interaction between the extract and the bagging, where the application was 200 ml. L⁻¹ with the bagging was superior to all treatments, which was 57.46%. In contrast, the comparison treatment recorded the lowest proportions, amounting to 51.00%, and the treatment of application of Al-Khadrawi cultivar with Moringa leaf extract with a concentration of 51.00%. 200 ml. L⁻¹ with a ratio of 58.58%, while the comparison application for Al-Buraim gave less proportion, which was 50.88% Table 4. The process of bagging the fruits of the cultivars had a considerable effect on T.S.S. The bagging of the Al-Khadrawi cultivar excelled by producing the most significant proportion, which was 56.73%.

The cultivar Al-Buraim gave the lowest rate of 52.55% without bagging. As for the effect of the triple interactions of the study factors, it was significantly superior to the spray of 200 ml. L⁻¹ with bagging for the Al-Khadrawi variety reached 59.83%, while the lowest proportion was in the comparison treatment for the Al-Buraim variety, which was 50.00% (Table 4).

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	52.00 gh*	55.66 c	57.33 b	55.00 a	55.86 a
	With bagging	53.43 ef	56.93 b	59.83 a	56.73 a	
Buraim	Without bagging	50.00 i	53.00 fg	54.66 cd	52.55 b	53.46 b
	With bagging	51.76 h	54.23 de	57.10 b	54.36 ab	
Extract averages		51.80 c	54.95 b	57.23 a		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	52.71 c	56.30 b	58.58 a	Bagging averages	
	Buraim	50.88 d	53.61 c	55.88 b		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	51.00 d	54.33 bc	56.00 b	53.77 b	
	With bagging	52.60 cd	55.58 b	57.46 a	55.55 a	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 4. Impact of moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on two palm cultivars' total soluble solids (%) (T.S.S.).

Total sugars (%)

The data of Table 5 indicates that application with moringa leaf extract increased the proportion of total sugars in fruits, whereas the application with 200 ml. L⁻¹ was significantly superior by giving it the most significant proportion of 51.76%, but the comparative application gave a lower proportion of 46.27%. The bagging practice also increased the proportion of total sugars in the dates. Hence, the proportion in the bagging treatment was 50.65%, with a significant difference from the treatment without bagging, which recorded the lowest rate of 47.75%. The fruits of the two cultivars also varied in terms of the proportion of total sugars, with the Al-Khadrawi cultivar yielding the greatest sugars ratio of 50.74 percent, significantly outperforming the Al-Buraim cultivar, which provided just 47.66 percent.

The same table also demonstrates that the application of the moringa extract and bagging interacted significantly, showing the extract treatment's superiority at a concentration of 200 ml. L⁻¹ with bagging, where the ratio reached 52.74%, while the comparative dose gave a rate of 44.63%. When applied to the Al-Khadrawi cultivar, the two treatments were at 200- and 100 ml concentrations. L⁻¹ resulted in

Respective proportions of 53.18% and 51.21%, whereas the comparative treatment for the Al-Buraim cultivar yielded the lowest proportion of 44.70%. While the comparative treatment for the Al-Buraim cultivar recorded the lowest proportion, 46.21%, the packing treatment for the Al-Khadrawi cultivar recorded the most significant total sugar content, 52.19%.

Regarding the triple interaction, Table 4's findings show the two application treatments with 200- and 100 ml concentrations. L⁻¹ with the packaging of Al-Khadrawi fruits was superior. These treatments had the most excellent rates, reaching 53.94 and 52.73%, respectively, while the comparative treatment for the Al-Buraim variety had the lowest rate, 43.49% Table 5.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	45.78 d*	49.70 c	52.42 b	49.30 b	50.74 a
	With bagging	49.91 c	52.73 ab	53.94 a	52.19 a	
Buraim	Without bagging	43.49 e	46.00 d	49.14 c	46.21 c	47.66 b
	With bagging	45.92 d	49.89 c	51.53 b	49.11 b	
Extract averages		46.27 c	49.58 b	51.76 a		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	47.84 c	51.21 ab	53.18 a	Bagging averages	
	Buraim	44.70 d	47.94 c	50.33 b		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	44.63 c	47.85 b	50.78 a	47.75 b	
	With bagging	47.91 b	51.31 a	52.74 a	50.65 a	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 5. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on Total sugars (%) of two palm cultivars.

Reducing sugars (%)

Table 6. shows that the reduced sugar fraction was dramatically improved by application with moringa leaf extract—the application that involved 200 ml. L⁻¹ had the most significant proportion of reducing sugars, which came to 44.07%, while the comparison treatment had the lowest proportion, 37.44%. When compared to the treatment without bagging, which came to 38.56%, the packaging treatment obtained a proportion of 43.65%, a considerable improvement in the proportion of reducing sugars. Regarding the cultivar component, Al-Khadrawi surpassed the Al-Buraim cultivar with a considerable difference since their respective reducing sugar proportions were 43.54 and 38.67%.

The outcomes of the binary overlapping between extract application and bagging showed that the combination of 200 ml. L⁻¹ concentration and packaging produced the most significant proportion of reducing sugars, 46.57%, while the comparison treatment produced the lowest proportion, 34.75%—the two application treatments with concentrations of 200- and 100 ml. L⁻¹ was superior to the Al-Khadrawi cultivar, where the reducing sugars in them reached 45.55% and 44.80%, respectively, but the comparison treatment on the Al-Buraim cultivar recorded the lowest proportion, 34.60%. The combination of the cultivar and bagging also contributed to the excellence of the packing treatment of the Al-Khadrawi variety, which came in at 46.67%. In contrast, the Al-Buraim variety's treatment without bagging came in at the lowest proportion, at 36.70% (Table 6). In aspects of the triple interaction, the application of 200 ml. L⁻¹ combined with the bagging of bunches of the Al-Khadrawi variety yielded the most significant proportion of reducing sugars, amounting to 48.58%, significantly outperformed the comparison treatments for the fruits of Al-Buraim variety, which delivered the lowest proportion, 32.93%—table 6.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	36.57 f*	42.15 CDE	42.53 CDE	41.41 b	43.54 a
	With bagging	44.02 cd	47.41 ab	48.58 a	46.67 a	
Buraim	Without bagging	32.93 g	36.56 f	42.53 CDE	36.70 c	38.67 b
	With bagging	36.26 fg	41.08 de	44.56 bc	40.63 b	
Extract averages		37.44 b	41.80 a	44.07 a		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	40.29 b	44.78 a	45.55 a	Bagging averages	
	Buraim	34.60 c	38.82 b	42.58 ab		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	34.75 d	39.36 c	41.57 bc	38.56 b	
	With bagging	40.14 c	44.25 ab	46.57 a	43.65 a	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 6. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on Reducing sugars (%) of two palm cultivars.

Sucrose proportion (%)

Table 7 revealed that the sucrose rate decreased as the application concentration with leaf extract increased. The control treatment (0 ml. L⁻¹) recorded the most significant proportion (8.87%), while the spray treatment with a concentration of 200 ml. L⁻¹ recorded the lowest proportion (6.77%). Fruit packaging also reduced sucrose, as the proportion of sucrose in coated fruits reached 6.97%, while the proportion in unwrapped fruits reached 8.65%. As for the cultivar factor, the two cultivars differed significantly between them, where the fruits of the Al-Buraim cultivar gave the most significant proportion of 8.98%, while the Al-Khadrawi cultivar had a decrease in the proportion of sucrose, which amounted to 6.64%. The binary interaction between the study factors is shown in Table 7, which indicates that application with moringa leaf extract at 0 ml. L⁻¹ without bagging produced the most significant proportion of sucrose, 9.97%, while the lowest proportion was 6.07% when treating fruits with a concentration of 200 ml. L⁻¹ with packaging. The comparison treatment of the Al-Buraim cultivar was superior in the bilateral interaction between application with the extract and the cultivar, with a proportion of 10.11%, which did not differ significantly from the application treatment with a concentration of 100 ml. L⁻¹ on the same variety amounted to 9.14%, while the lowest proportion of sucrose was recorded when applied with 200 ml. L⁻¹ for Al-Khadrawi cultivar, which amounted to 5.85%. Regarding the interaction between the packaging and the cultivar, the Al-Buraim cultivar benefited most from the treatment without bagging, where the proportion of sucrose reached 9.48%, comparable to the 8.48% obtained through packaging the same cultivar. Al-Khadrawi cultivar, however, got the lowest proportion, 5.45%, from its bagging treatment Table 7. The triple interaction between the three factors was clear, where it was noted the superiority of the extract spray treatment (0 ml. L⁻¹) + without bagging for the fruits of the Al-Buraim cultivar, which gave a sucrose proportion of 10.55%, while the lowest proportion recorded by the spray application with 200 ml. L⁻¹ with the bagging of Al-Khadrawi variety, which amounted to 5.15% Table 7.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	9.38 bc*	7.54 e	6.55 fg	7.83 b	6.64 b
	With bagging	5.88 gh	5.32 hi	5.15 i	5.45 c	
Buraim	Without bagging	10.55 a	9.49 bc	8.40 d	9.48 a	8.98 a
	With bagging	9.67 b	8.79 cd	6.99 ef	8.48 ab	
Extract averages		8.87 a	7.78 b	6.77 c		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	7.63 b	6.43 bc	5.85 c	Bagging averages	
	Buraim	10.11 a	9.14 a	7.70 b		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	9.97 a	8.52 ab	7.48 bc	8.65 a	
	With bagging	7.78 b	7.05 bc	6.07 c	6.97 b	

*Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 7. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on sucrose proportion (%) of two palm cultivars.

Total Neutral Acidity (%)

The findings of Table 8 show that the overall acidity was negatively correlated with the rise in Moringa leaf extract concentration, with the control treatment recording the most significant proportion of 0.95% and the 200 ml. L⁻¹ spray treatment recorded the lowest proportion of 0.70%. The paper packaging treatment reported 0.75% compared to the control treatment's 0.86%, indicating a reduction in acidity. The cultivars under study did not differ significantly from one another. The interactive outcomes between application extract with bagging showed that the control treatment was preferable; it recorded the most significant proportion (1.02%) during the application with 200 ml. L⁻¹ with bagging recorded the lowest proportion, 0.67%—the application treatment with a concentration of 200 ml. L⁻¹ on the Al-Khadrawi cultivar recorded the lowest proportion, 0.69%.

In contrast, the comparative treatment for the cultivar Al-Buraim was significantly better than the other treatments due to the interaction between the application of extract and the cultivar, where a proportion of 1.02% was recorded. The interaction treatment between bagging and cultivar did not show significant differences for the Al-Buraim cultivar, while the bagging treatment impacted significantly on the Al-Khadrawi cultivar, where the unwrapped bunches gave this cultivar the most significant acidity proportion of 0.85%. In contrast, the bagging reduced the acidity of the same variety, which amounted to 0.73% Table 8.

Findings from the triple impact in Table 8 revealed that the control application of the Al-Buraim cultivar was significantly superior in recording the most excellent acidity of 1.10%, while the application of 200 ml. L⁻¹ with bagging on Al-Khadrawi cultivar recorded the lowest proportion of 0.67% Table 7.

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	0.95 b*	0.85 c	0.75 e	0.85 a	0.79 a
	With bagging	0.80 d	0.73 ef	0.67 h	0.73 b	
Buraim	Without bagging	1.10 a	0.80 d	0.70 gh	0.86 a	0.82 a
	With bagging	0.95 b	0.71 fg	0.68 h	0.78 ab	
Extract averages		0.95 a	0.77 b	0.70 c		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	0.87 b	0.79 c	0.69 d	Bagging averages	
	Buraim	1.02 a	0.75 cd	0.71 d		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	1.02 a	0.82 b	0.72 c	0.86 a	
	With bagging	0.87 b	0.72 c	0.67 c	0.75 b	

*Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level.

Table 8. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on total neutral acidity (%) of two palm cultivars.

The proportion of tannins in the fruits (%)

The data in Table 9 indicate that application with Moringa leaf extract and bagging significantly reduced the proportion of tannins in the dates. The application is 200 ml. L⁻¹ recorded the lowest proportion of 0.35 compared with the most significant rate of 0.46% with the control treatment, while the treatment of fruit packaging recorded 0.35 % compared with the unwrapped fruits, which recorded 0.46%. As for the cultivar factor, the two cultivars differed in the proportion of tannins. The most significant proportion was in the Al-Khadrawi cultivar. Its fruits contained 0.43%, while the Al-Buraim fruits contained 0.39% g.

The dual interactions in the same table indicate the superiority of the treatment of 200 ml. L⁻¹ with the packaging recorded the lowest proportion of 0.33, while the most significant proportion recorded by the comparison treatment was 0.53%, and the application with 200 ml. L⁻¹ for Al-Buraim variety showed a significant decrease in the proportion of tannins that amounted to 0.35, While it increased in the comparison treatment for the Al-Khadrawi variety to 0.48%. As for the interaction between the bagging and the cultivar, the unbagged bunches of the Al-Khadrawi cultivar boosted the proportion of tannins in its fruits, which gave 0.48%, while the practice of the Al-Buraim cultivar recorded the lowest proportion, which amounted to 0.34% (Table 9).

Concerning the triple interactions between the experimental factors, the comparison treatments for the Al-Khadrawi cultivar recorded the most significant proportion of tannins, which amounted to 0.54%. In contrast, the application treatment had a concentration of 200 ml. L⁻¹, coupled with the packaging on the Al-Buraim cultivar, recorded the lowest proportion, which amounted to 0.33% (Table 9).

Cultivar	Bagging	Extract (ml. L ⁻¹)			Interaction between bagging and cultivar	Cultivar averages
		0	100	200		
Khadrawi	Without bagging	0.54 a	0.50 b	0.40 d	0.48 a	0.43 a
	With bagging	0.43 c	0.37 e	0.33 g	0.37 b	
Buraim	Without bagging	0.53 a	0.44 c	0.37 e	0.44 a	0.39 b
	With bagging	0.35 f	0.34 fg	0.33 g	0.34 b	
Extract averages		0.46 a	0.41 a	0.35 b		
Interaction between extract and cultivar	Khadrawi	0.48 a	0.43 ab	0.36 bc	Bagging averages	
	Buraim	0.44 ab	0.39 bc	0.35 c		
Interaction between extract and bagging	Without bagging	0.53 a	0.47 b	0.38 c	0.46 a	
	With bagging	0.39 c	0.35 d	0.33 d	0.35 b	

* Means that share the same letters do not differ significantly among themselves according to Duncan's polynomial test at the 0.05 probability level

Table 9. Impact of applying moringa leaf extract, bagging the bunches, and their interactions on the proportion of tannins in the fruits (%) of two palm cultivars.

DISCUSSION

The outcomes of the previous tables demonstrate that the use of moringa leaf extract significantly enhances data quality (boosting T.S.S., total and reducing sugars, decreasing sucrose, and tannins), perhaps because the extract contains several hormones, especially auxins, which play a role in luring compounds produced by photosynthesis to be stored in fruits and enhance their quality²⁰ or maybe that the total sugars increased in the dates as a result of the early ripening of the fruits, which led to an enhancement in sugar and thus the proportion of soluble solids in the fruits increased. Additionally, it stimulates several cytoplasmic enzymes that convert organic acids into sugars, reducing the acidity of fruits and boosting their sugar content. The calcium and potassium in the extract, which play a crucial and necessary function in development by regulating and activating enzymes²², may also cause an increase in sweetness and softness of the fruits. These findings concur with²³, who found that application of salami palm bunches with a concentration of 6% Moringa leaf extract resulted in the most significant proportion of total soluble solids, the greatest proportion of total and reducing sugars, and the lowest acidity when compared to the control treatment. This is also in line with 24, which discovered that applying the extract on seedless grapes boosted the total soluble solids and sugar proportion while lowering the neutralizing acidity. The outcomes also demonstrated that the fruit bagging procedure enhanced the quality of the fruits by creating an environment favorable for fruit development by increasing the humidity around the fruits, which resulted in the creation of an environment favorable for enzyme activity or by playing a role in the prevention of photo-oxidation of internal hormones²⁵. These findings are in line with those made by¹³, who found that the brown paper bagging process on the Halawi and Sayer cultivars affected the majority of the fruit's constituent parts as the proportion of total soluble solids, total and reducing sugars, and the fruit's moisture content increased. Additionally, the findings of this study concur with those

of¹⁴ who found that the chemical characteristics of the fruits of the Khastawi cultivar were enhanced by bagging them in various cover materials. Naturally, the difference between the two cultivars in the studied characteristics is due to the genotype controlling the phenotypic characteristics of the fruits.

CONCLUSIONS

The results of this study indicate that it is possible to rely on natural extracts, such as those from Moringa leaves, to enhance the quality characteristics of the fruits because their use increases the proportion of total and reducing sugars as well as total soluble solids while decreasing the proportion of sucrose and neutral acidity. Paper bagging can also be advised as an agricultural approach to improve some of the qualities of fruits and create an appropriate environment for their development and ripening. In addition to the research elements' substantial impacts, utilizing these treatments in combination is desirable since their interactions produced fruits of excellent quality. This research also suggests investigating the effects of other components of this miraculous tree, including its fruits, seeds, and roots, on the development and quality of other horticultural crops, either on their own or in combination with other agricultural techniques.

Author Contributions: Mohammed Abdulrahman; Field application of treatments, Data collection, resources, writing and drafting. Manar Alwan: Supervision, guidance and follow-up, review, and editing. Kadum Abdullah: Supervision, guidance and follow-up, review, and editing.

Funding: External support money was not used for this study.

Data Availability Statement: All data is available by the first author.

Acknowledgments: I extend my thanks and gratitude to the management of Fadak farm the Department of Horticulture and Landscaping, and all those who helped in the completion of this research

Data Availability Statement: All data is available by the first author

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Jassim, N. S.; Saleh, A. D. Efficiency of using *Bacillus subtilis* as a growth regulator and its effect on the phenotypic and physiological characteristics of date palm offshoots *Phoenix dactylifera* L. under salt stress conditions. *Journal of Kerbala for Agricultural Sciences*,**2018**. Volume 5, Issue 4, pp. 1-5.
2. Al-Hamdani, K. A. S.; Muhammad, M. H.; Hussein, M. N. *Date Palm*, first edition. Tikrit University Press, Iraq, **2022**. pp340.
3. Idowu, A. T.; Igiehon, O. O.; Adekoya, A. E. ; Idowu, S. Dates palm fruits: A review of their nutritional components, bioactivities and functional food applications. *AIMS Agriculture and Food*,**2020**. 5(4), 734-755.
4. Al-Aqidi H. K. *The date palm is the lady of the trees and the fruit of the fruit*. first edition. the Hashemite Kingdom of Jordan,**2010**. p 396.
5. Hussein, P. A. Description of some varieties of Iraqi date palms. The National Committee for the Registration and Approval of Agricultural Varieties. The national program for the propagation, improvement and cultivation of date palms. Ministry Of Agriculture. The Republic of Iraq ,**2002**.
6. Ali, A. A.; Falih, S. A.; Idan, R. O.; Aziz, H. M. Response of seedlings of olive cultivar Khudairi to treatment with licorice and yeast extracts., *Journal of Kerbala for Agricultural Sciences*,**2017**. Volume 4, Issue 4, pp. 56-68.
7. Godlewska, K.; Ronga, D.; Michalak, Izabela. Plant extracts-importance in sustainable agriculture. *Italian Journal of Agronomy*, **2021**, 16.2.

8. Ertani A.;PizzeghelloD. ;Francioso O;Tinti A. ;Nardi S. Biological activity of vegetal extracts containing phenols on plant metabolism. *Molecules*,**2016**,21:1-14.
9. A.L.- Shamy, W. A. .; Alkhateb, B. A. A. H. .; Abdel, E. T. . Role Of Perlite Quantity And Intervals Of Irrigation On Potatoes (*Solanum Tuberosum* L.) Grown In Gypsiferous Soil. *Journal of Life Science and Applied Research*. 2020, 1, 31-39.
10. Abdalla, M. M. The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) plants. *Int. J. Plant Physiol. Biochem*,**2013**,Volume 5(3): 42-49
11. Mahmood, N. A. & Abdulateef, S. M. Determining Some Undesirable Behavioral Traits and Their Impact on the Behavioral Performance of Broiler Chicks. in I.O.P. Conference Series: Earth and Environmental Science .2021,vol. 904.
12. Mustafa, A.; Abdel-Hamid, N.; Abd El-Hamid, A.; El-Sonbaty, M.; Abd El-Naby, S. Improving Fruit Set, Yield and Fruit Quality of Khadrawi Date Palm Cultivar. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*,**2018**. Volume 26(4), 1461–1470.
13. Sharif, H. J. Effect of bagging and licorice extract on early ripening and improvement of fruit characteristics of date palm Phoenix dactylifera L. Al-Sayer and Al-Hallawi cultivars, Master Thesis, University of Basra, College of Agriculture, Horticulture and Palm Department. Iraqi-date palms.net.**2008**.
14. Al-Issawi, M. Evaluation of the efficiency of the date and type of taste mastication in the qualitative characteristics and degree of maturity of date palm fruits of the Khastawy cultivar. Master's thesis, College of Agriculture, University of Anbar, Iraq.**2020**.
15. Al-Rawi, K. M.; Muhammad, K. A. Design and analysis of agricultural experiments, second edition. University of Mosul, Ministry of Higher Education and Scientific Research. Republic of Iraq.**2020**.
16. Noaman A I, Khalaf R M, Emad GH, Al-Abbasy, Mohammed Th. T. Effect of flaxseed oil dosing on fertility, growth characteristics and some physical, biochemical, and hormonal blood parameters during the early pregnancy of Awassi ewes. *Revis Bionatura*. 2022;7(4) 5. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.5>.
17. A.O.A.C. Official Method of Analysis. Association of Official Method of Analytical Chemists Washington. D.C.,**1970**. p 910.
18. Howrtiz , W. Official methods of analysis association of official analytical chemists Washington, D.C. **1975** . 221p.
19. Ali, H.H., AL-Rawi, K., Khalaf, Y., Alaaraji, S., Aldahham, B., Awad, M., Al-ani, O., Al-ani, F., Ali, A.T.Serum Caveolin-1 Level is Inversely Associated with Serum Vaspin, Visfatin, and HbA1c in Newly Diagnosed Men with Type-2 Diabetes.Reports of Biochemistry and Molecular Biology,2022, 11 (2), pp. 299-309.
20. H. Muhammed, S., Y. Mohamed, R. Investigation And Molecular Identification Of Cucumber Damping-Off Fungi Under Greenhouse Condition. *Anbar Journal Of Agricultural Sciences*, 2023; 21(1): 19-31. doi: 10.32649/ajas.2023.179712.
21. Al-Hamoud, F. Some of the physical, chemical and physiological characteristics of the fruits of the fruit. (2019). Master Thesis, College of Agriculture, University of Basra, Iraq.
22. Hasegawa, P.M.;Bressan, R. A.; Zhu, J. K.;Bohnert, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity.*Annu Rev Plant Physiol*,**2000**.Volume51: 463-499.
23. Thabet, A. Y. I.; Abdel-Hak, R. E. S.; Ashour, N. N.; Hassan, H. S. Influence of foliar application with moringa (*Moringa oleifera* L.) aqueous leaf extract on fruit set, yield and fruit quality of Selmy date palms. *Egyptian Journal of Chemistry*,**2022**. Volume 65 (9), 1-2.
24. Aly, M. A.; Harhash, M.M.; Bassiony, S. S.; Felifal, M.M. S. Effect of Foliar Spray of Sitofex, Moringa Leaves Extract and Some Nutrients on Productivity and Fruit Quality of “Thompson seedless” Grapevine. *Journal of the Advances in Agricultural Researches*,**2020**. Volume 25(1):112-129.
25. Mohammad, A. A.; Al-Rayes, A. H. Plant physiology. The second part. Ministry of Higher Education and Scientific Research,. College of Agriculture, University of Baghdad, Iraq. **1995**.

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published:15 December 2023

Citation: Abdulrahman, M.; Alwan, M.; Abdullah, K. Chaffat, M. The performance of moringa leaf extract application and bagging the bunches to improve fruits quality of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Al-Khadrawi and Al-Buraim. Revis Bionatura 2023;8 (4) 86. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.86>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Effect of the source of the plant part and plant growth regulators on the establishment and multiplication of vegetative branches of *Rosmarinus officinalis* L. *in vitro*Al-Hasan Nassrullah ^{1*}, Sarab Almkhtar ²

¹ College of Agriculture/Department of Horticulture and Landscape/ University of Kerbala/ Kabala/ Iraq; alhasan.a@s.uokerbala.edu.iq. ORCID 0000-0003-1996-7759

² College of Agriculture/Department of Horticulture and Landscape/ University of Kerbala/ Karbala, Iraq; sarab.a@uokerbala.edu.iq. ORCID 0000-0003-0470-7057

* Correspondence: alhasan.a@s.uokerbala.edu.iq; Tel.: 009647706054733
Available from. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.45>

ABSTRACT

This search was carried out in the plant tissue culture laboratory- College of Agriculture - University of Kerbala from 2021 to 2022. The study included the use of *in vitro* technology in the use of plant parts and different combinations in the emergence and multiplication of farms vegetative branches of rosemary, the study was carried out in two stages after performing the sterilization process: the first included the emergence of vegetative farms by planting the growing tops and side nodes on the MS nutrient medium with different concentrations (0, 1, 2, 3 mg.L⁻¹) BA, and the second stage was carried out by cultivating the growths resulting from the nodes grown in the previous stage on the (MS) media, that was prepared with various concentrations (0, 1, 2, 3 mg.L⁻¹) BA and (0, 0.1, 0.2, 0.4mg.L⁻¹) NAA, The results of the study showed the superiority of the apical, as it achieved a response rate of 57.5% compared to the lateral shoots, which recorded a response rate of 37.5%, and the con. of 1 mg.l⁻¹ BA was superior and achieved a response rate of 80% comparison with the neutral treat that achieve a response rate It reached 15%, and the results showed that the same concentration of benzyl adenine at a concentration of 2 mg.l⁻¹ achieved of higher average in the number and length of branches (4.74 branches.plantlet⁻¹, 4.12 cm), while the concentration achieved 3 mg .l⁻¹ of it had the higher rate of leaves number and the Fresh and Dry weight of the branches (15.24 leaves.plantlet⁻¹, 2986 mg and 1823 mg), respectively, comparison with the neutral treat that achieved the lower average, and the concentration 0.2 mg.L⁻¹ NAA exceeded in achieving The highest average number of branches, leaves, fresh & dry weight of branches was (4.16 branches.plantlet⁻¹ and 14.21 leaves.plantlet⁻¹, 2606 mg and 1594 mg) respectively, while the concentration exceeded 0.4 mg.L-1 NAA in achieving the highest rate The length of the branches reached 3.74 cm. All experiments were carried out using CRD (utterly randomized design).

Keywords: explants type ; plant growth regulators ; micro propagation ; rosemary ; tissue culture

INTRODUCTION

The Rosemary plant (*Salvia rosmarinus*), whose scientific name is *Rosmarinus officinalis*, is medically necessary. It is an aromatic perennial plant relearned to the Lamiaceae family. The original home of this plant is southern Europe and the Mediterranean, from which it spread to all parts of the world where it grows wild. Its cultivation spread in most countries, and France, Spain and Tunisia are among the most critical countries

producing the oil extracted from this plant¹. The plant propagates either in the field by seeds. However, it is limited in use during the growing season. It is undesirable, as it is slow because rosemary seeds have low germination levels of about 40%, and vegetatively using Cuttings, the most widely used method for its propagation. However, the ability to root is weak, so researchers tended to multiply it and increase the production of effective compounds by tissue culture². The plant has medicinal and non-medical uses as a food additive, flavoring and spice. It is also used to manufacture aromatherapy, aromatic soap and cosmetics³. Rosemary is one of the plants known for its high nutritional and medicinal value. It has been used since ancient times to enhance memory⁴. The leaves and oil of the plant are often used as spices and flavorings in the food industry because they contain volatile compounds responsible for giving a desirable flavor and as antimicrobials and antioxidants, as plant oil is used. Usually, in the cosmetics and pharmaceutical industries, an aromatic component is included in the manufacture of soap, creams, and moisturizers, and in the perfume industry⁵. The essential oils are found in the leaves and flower tops and are formed from the compounds borneol, camphene, campher and cenol, mainly oleoresin, which is widely used in the preparation of folk medicines and modern pharmaceutical industries, as well as in the manufacture of perfumes, flavors and aromatherapy³, the leaves also contain flavonoids, tannins, rosemarinic acid, diterpenes and rosemaricine⁴. The increasing use and the significant trend in recent years to the utilization of medicinal plants become threatening and a significant risk to plants and natural resources due to their removal and sabotage of the environment. Plants and this technology have significant benefits regarding type, quantity and controlled production without restricting natural factors, such as geographical location, seasonal changes, or environmental stresses. To shorten time and effort, researchers have recently devoted their efforts to using unique methods and technologies that shorten time in breeding and improvement programs and increase the production of secondary compounds by adding some catalysts, whether physical or chemical⁶. Plant growth regulators are organic chemical compounds manufactured naturally or artificially (non-nutrients). They are either stimulants or growth inhibitors that are added in the stages of plant growth and cause a change in its growth and development⁷, Williams⁸ Mention the mechanism of action of plant growth regulators when they are added to plant tissues, added at deficient concentrations and then absorbed from plant tissues by this move to sites to bind to receptors, then a secondary transmission system is activated to stimulate cell activity. PGRsupplemented in the media plays a significant efficacy in determining the desired goal of tissue culture, especially in vitro formation processes⁹. From the above and the importance of the plant from the medical point of view and the efficacy of PGR in the growth and development of the planted plant part, the study aimed to employ the technology of plant tissue culture in the propagation of rosemary plants and study the effect of plant growth regulators added to the nutritional medium with different combinations on the growth and development of the planted part and obtaining greater Sterile, pathogen-free tissue culture.

MATERIALS AND METHODS

Location

The experiment was executed in the plant tissue culture laboratory - Horticulture Department - Agriculture College- University of Karbala from 2021-2022.

2.2. The stage of sterilization of explants and the initiation of plants:-

The explants (shoot tip and buds) For two-year-old plants were laundered with running water several times for an hour, after that in Alcohol 70% for 2 minutes, then with distilled water, then the plant parts were immersed

in 2% NaOCl solution for 15 minutes to be superficially disinfected in sterile conditions. This was followed by washing them with sterile distilled water thrice. To remove the effects of the sterile material, it was prepared, washed in the laboratory and sterilized inside the autoclave. The sterile growing tops and lateral buds were planted on solid {MS (10)} nutrient medium, which was prepared with different concentrations of BA (0, 2, 1, 3 mg.L⁻¹) with 10 replications for each plant part. The cultures were placed in the growth room at controlled growth conditions. The response percentage (percentage of open buds) was taken after 30 days of planting and is calculated according to the following equation: -

Response ratio = (number of buds growing)/(planted to total number of buds)×100%.

Stage of preparation and sterilization of the medium

MS-prepared medium (Murashige, Skoog) containing macro and micronutrients and fortified with vitamins and glycine at a weight of 4.43 gr. L⁻¹ was used throughout the experiment. Sucrose was added—30 gr. L⁻¹, plant growth regulators were added after preparing the base solutions according to the type of experiment, then the pH (Potenz Hydrogen) was adjusted to 5.7 ± 1 using one standard HCL Hydrochloric acid or NaOH. The volume was completed to liter, and agar of the type (Agar-Agar) 7 g per liter was added to the medium for homogenization and dissolution of the agar. Heat the medium using a vibrating heating device until homogeneity and then distribute it in the cultivation tubes (values) up to 10 ml and cover it with the appropriate caps. After preparing the food media and distributing it in the cultivation containers designated for it, it was sterilized with an autoclave at a temperature of 121°C for 15 minutes and kept inside the stratified airflow table until use.

Multiplication stage

Based on the previous stage's results, the growing tops were selected as being the most responsive plant part. The plants were cut at a rate of 2 cm and grown on MS medium prepared with BA (0, 1, 2, 3 mg.L⁻¹) overlapping with NAA (0, 0.1, 0.2, 0.4mg.L⁻¹) at 10 replicates for each concentration. The cultures were kept under the same conditions mentioned above. The study indicators were taken after four weeks, which included the number and length of branches, leaves number, and the Soft and Dry weight of the branches.

Statistical analysis

All experiments were carried out using CRD (utterly randomized design) with factorial experiments with ¹⁰ replications for each treatment. The results were analyzed using the statistical program Genstat, and the averages were compared according to the least significant difference test LSD at the probability level of 0.05 ¹¹.

RESULTS

This class probably swears by subtitles. It should equip a concise and precise description of the results of experiments, their overlap, and the conclusions of experiments that can be carried out.

Effect of explants type and BA concentrations on the Initiation stage

The explants play a vital role in the in vitro cultivation of any plant species due to the determination of the possibility of succession and the rate of branch doubling, and then the physiological condition and sensitivity of plant species to various pollution causes. The results of Table 1. showed the response of the growing tops grown on MS medium in achieving the highest response rate of 57.50% compared to the lateral buds that

recorded a response rate of 37.50%. The con. of 1 mg.l⁻¹ was a significant average of the con., as it gave the highest response average of 80%. In contrast, high levels of BA caused a decrease in the growth rate, which happened at concentrations 2 and 3 mg.l⁻¹, which recorded a response average of 65 and 30% on the relay, while the neutral treat achieved a lower average of 15%. The results confirm that all bilateral interactions significantly affected the response rate. in the case of interaction between the cultivated plant part and BA concentrations, the highest response rate recorded by the growing top at the concentration 2 mg.L⁻¹BA was 90%, as shown in Figure 1, and the lowest response rate recorded by lateral buds in the comparison treatment, which reached 10%.



Figure 1: Response of Shoots tip to concentrations BA to initiation after four weeks of cultivation on MS media.

Explants type	BA Con(mg.l ⁻¹)				mean
	0.0	0.1	0.2	0.3	
Shoots tip	20	90	80	40	57.5
Buds	10	70	50	20	37.5
LSD (0.05)	16.19				8.10
mean	15	80	65	30	
LSD (0.05)	11.45				

Table 1. Effect of plant part type and BA concentrations and their interaction on the response of vegetative parts (%) to initiation after one month of cultivation on (MS) media.

Influence of BA and NAA concentrations and their overlap on the average number of shoots(branches. Plantlet⁻¹).

One of the traits studied is the effect of different BA and NAA concentrations and their interaction on the vegetative multiplication process, which was observed in Table 2. The superiority of BA significantly at the con. of 2 mg.l⁻¹ by giving it the highest average of branches number reached 4.74 branches. Plantlet⁻¹, which did not differ significantly from the con. to 3 mg.l⁻¹, achieved an average of 4.25 branches. plantlet⁻¹, the lowest rate was in the comparison treatment, which amounted to 1.99 branches. plantlet⁻¹. The same table also indicated that NAA was excellent at con. 0.2 mg.l⁻¹, the highest rate was recorded at 4.16 branches. Plantlet⁻¹, which did not differ significantly from the concentration 0.1 mg.l⁻¹, gave an average of 4.00 branches. Plantlet⁻¹, compared to the control treatment, which gave the lowest rate of 3.41 branches. Plant⁻¹. As for the

interaction effect between the concentrations of BA and NAA, their values differed significantly from each other, as the con. of 2 mg.l⁻¹ of BA and the overlap with concentrations 0.1 and 0.2 mg.L⁻¹ of NAA gave the highest average number of branches that reached 5.33 branches. Plantlet⁻¹, as we can see in the figure(2-b), while the medium without growth regulators achieved the lowest response to the number of branches, which reached 1.33 branches. part⁻¹ as we can see in the Figure 2-a. Recorded the highest rate

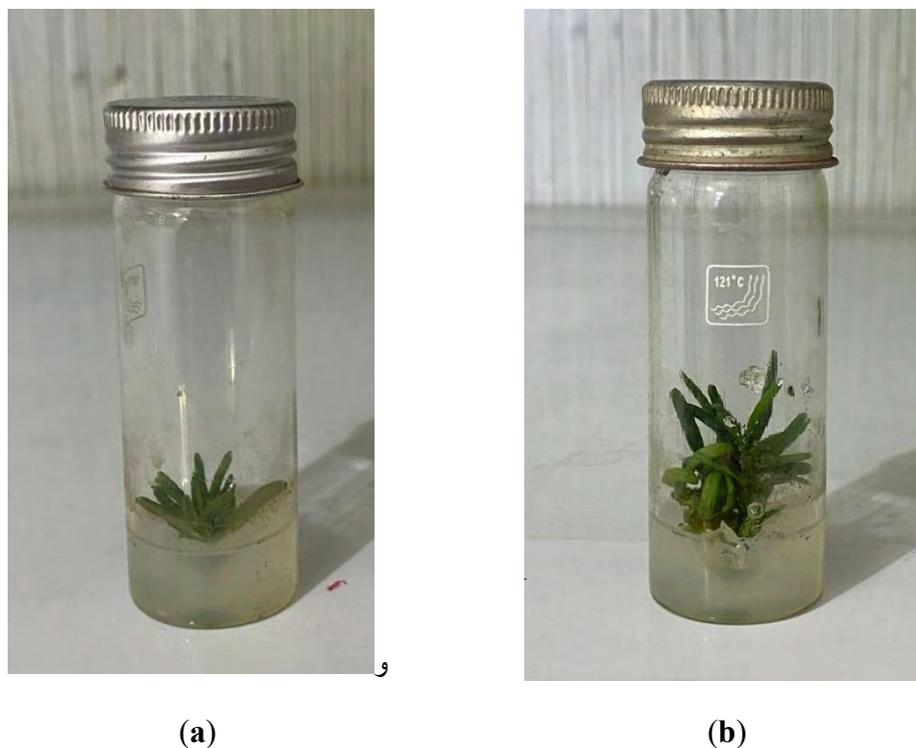


Figure 2: Vegetative branches of rosemary plant after four weeks of cultivation on MS media.: (a) control treatment (Free media without growth regulators), (b) Influence of BA and NAA concentrations and the overlap between them on vegetative branches of rosemary.

BA Con{mg.L ⁻¹ }	NAA Con(mg.l ⁻¹)				mean
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0	1.33	1.67	2.33	2.64	1.99
1	4.00	4.33	4.33	3.67	4.08
2	4.33	5.33	5.33	4.00	4.74
3	4.00	4.67	4.67	3.67	4.25
{L.S.D}{(0.05)}	1.12				0.56
mean	3.41	4.00	4.16	3.49	
L.S.D(0.05)	0.56				

Table 2: Influence of BA & NAA concentrations and the overlap between Them on a rate number of vegetative branches after one month of planting on (MS) media.

Influence of BA & NAA concentrations & the overlap between Them on length vegetative branches(cm)

The results of Table 3. show that there was excellence in the average length of rosemary branches when increasing BA concentrations from 1 to 2 mg.l⁻¹ was added to the nutrient medium, which gave a rate of 3.57 and 4.12 cm on the relay. The response decreased with an increase in BA concentration to 3 mg.L⁻¹, which gave the lowest rate of 2.45 cm, while the control treatment gave an average of 3.01 cm.

Regarding the effect of NAA concentrations, the con. 0.4 mg. L⁻¹ was excellent in an average branch length (3.74 cm), while the comparison treatment achieved the lowest rate of 2.42 cm. As for the interaction effect between the concentrations of BA and NAA, it is noted that the higher rate was achieved in the (MS) media, which contains a concentration of 2 mg.L⁻¹ of BA with 0.1 mg.L⁻¹ of NAA, which was 4.63 cm, which was significantly superior to that of NAA. The rest of the treatments, as for the lowest average length of branches, occurred at the empty nutrient medium, which amounted to 1.09 cm.

BA Con{mg.L ⁻¹ }	NAA Con(mg.l ⁻¹)				mean
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0	1.09	2.61	4.04	4.29	3.01
1	3.08	3.78	3.91	3.51	3.57
2	3.59	4.63	3.99	4.26	4.12
3	1.93	2.77	2.20	2.91	2.45
{L.S.D}{(0.05)}	0.30				0.15
mean	2.42	3.45	3.54	3.74	
L.S.D(0.05)	0.15				

Table 3: influence of BA & NAA and the overlap between Them on the length rate of vegetative branches (cm) of rosemary after four weeks of cultivation on MS media.

Influence of BA and NAA concentrations the overlap between Them on the leaves number rate (leaves. Plantlet⁻¹)

The results of Table 4. show that the concentration exceeds 3 mg. L⁻¹ significantly recorded the highest average number of leaves, which was 15.24 leaves. Plantlet⁻¹ did not differ significantly from the con. of 2 mg.L⁻¹, as it achieved an average of 15.03 leaves.plantlet⁻¹, while the lowest average number of leaves was in the neutral treatment, which was 9.84 leaves.plantlet⁻¹. Results also showed that the NAA superiority at 0.2 mg L⁻¹ was significant in achieving the highest rate of 14.21 leaves.plantlet⁻¹, compared with the control treatment that gave a rate number of leaves of 12.20 leaves.plantlet⁻¹. As for the overlap effect between the concentrations of BA and NAA, it is noted that the results of BA were excellent at the con. About 2mg. L⁻¹ and with the interaction of the NAA at a con.about 0.2 mg.L⁻¹ in giving, The highest rate of 17.50 leaves.plantlet⁻¹, with comparison treatment which, gave an average of about 8.67 leaves.plantlet⁻¹.

BA Con{mg.L ⁻¹ }	NAA Con(mg.l ⁻¹)				mean
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0	8.67	9.00	10.70	11.00	9.84
1	12.60	14.33	12.33	11.33	12.64
2	12.30	16.68	17.50	13.65	15.03
3	15.25	15.75	16.33	13.65	15.24
{L.S.D}{(0.05)}	1.40				0.70
mean	12.20	13.94	14.21	12.40	
L.S.D(0.05)	0.70				

Table 4: influence of BA and NAA and the overlap between them on the rate of leaves number (leaves.plant⁻¹) of rosemary plant after one month of cultivation on MS media.

Influence of BA and NAA concentrations and the overlap between them on the rate fresh weight of shoots (mg)

Regarding the effect of the concentrations of BA and NAA added to the food medium on the characteristic of the fresh weight of the whole vegetable, the statistical analysis data is recorded in Table 5 and indicated that the concentration exceeded 3 mg. L⁻¹ BA significantly recorded the highest fresh weight average of 2986 mg, which did not differ significantly from the con. of 2 mg. L⁻¹, as it gave an average of 2870 mg, whereas the lowest average of fresh weight in the control treatment was 1324 mg. The results also showed the superiority of NAA at a concentration of 0.1 mg.L⁻¹ significantly achieved the highest rate of 2606 mg, which did not differ significantly from the 0.2 mg con. L⁻¹, which achieved a rate of 2553 mg, compared with the control treatment, which achieved the lowest rate of 2037 mg. As for the interaction effect between the concentrations of BA and NAA, it is noted from the results of the table that BA was exceeded at the con. of 2 mg. L⁻¹ and with the interaction with NAA at the con. of 0.2 mg. L⁻¹ achieved the highest rate of 3621 mg, while the comparison treatment achieved less average, amounting to 946 mg.

BA Con{mg.L ⁻¹ }	NAA Con(mg.l ⁻¹)				mean
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0	946	1220	1395	1735	1324
1	2082	2884	2044	1952	2241
2	2035	3220	3621	2605	2870
3	3035	3100	3155	2605	2986
{L.S.D}{(0.05)}	294.1				147
mean	2037	2606	2553	2224	
L.S.D(0.05)	147				

Table 5: Influence BA & NAA and the overlap between Them on the rate fresh weight of the shoot (mg) of rosemary after four weeks of cultivation on MS media.

Influence BA & NAA concentrations and their overlap on the dry weight rate of shoots (mg)

The statistical analysis data in Table 6. indicated significant differences in the average Dry Weight characteristic of the vegetative group according to the different concentrations of BA and NAA added to the media, as the con. It exceeded 3 mg. L⁻¹ BA significantly recorded the highest rate of dry weight, about 1823 mg, which did not differ significantly from the con. of 2 mg. L⁻¹, as it achieved an average of 1698 mg, while the lowest dry weight rate when the control treatment was 641 mg. Results also showed the superiority of NAA at a con. of 0.2 mg in the same table. L⁻¹ significantly achieved the highest average of 1594 mg, which did not differ significantly from the 0.1 mg.L⁻¹ achieved an average of 1514 mg, compared to the control treatment, which gave the lowest average of 1112 mg. As for the interaction effect between the concentrations of BA and NAA, it is noted from the table results that BA exceeded the con. 2 mg. L⁻¹ and with the interaction with NAA at the concentration 0.2 mg. L⁻¹ achieved the highest average of 2540 mg, whereas the comparison treatment achieved an average amounting to 330 mg.

BA Con{mg.L ⁻¹ }	NAA Con(mg.l ⁻¹)				mean
	0.0	0.1	0.2	0.4	
0	330	654	750	833	641
1	1061	1240	1018	987	1076
2	1015	2110	2540	1128	1698
3	2040	2055	2070	1128	1823
{L.S.D} _(0.05)	274.2				137.1
mean	1112	1514	1594	1019	
L.S.D(0.05)	137.1				

Table 6: influence of BA & NAA and the overlap between Them on the Dry Weight rate of the shoot (mg) of rosemary after four weeks of cultivation on MS media.

DISCUSSION

From the preceding, as we can see in Table 1. as a result of the lack of response of the lateral buds to the evolution experiments compared to the developing peaks, the developing peaks were adopted in the evolution experiments and other stages. The reason for the superiority of the ends of the branches may be due to the presence of auxin in the shoot tip more than it is in the single nodes because the shoot tip is the main center for its manufacture in the plant and thus its effect on cell division and elongation is more significant in the ends of the branches ¹² Or, the reason may be attributed to the fact that the developing tops have a number of axillary buds, which have a greater chance of surviving and growing rapidly¹³. Alternatively, the reason is probably on account of physiological factors concerning the hormonal and nutritional content of tissues, which is a determinant of response, whereby nutrients and hormonal substances accumulate in the tissues of the growing apex compared to other parts, or the reason for the superiority of the developing apex may be attributed to the rapid division of its cells because they are unspecialized and undifferentiated cells and in the developmental stages Preliminary¹⁴. These results agree with the findings of several researchers ^{15,16,17} who recorded when using the tops of the branches in extracorporeal propagation. The neighborhood was a huge success. The catalytic action of BA concentrations is attributed to the catalytic action of cytokinin in urging the cultured branch cells to

divide and differentiate, and the differentiation of shoots results in vegetative branches. In addition, many researchers pointed to the role of cytokinein at appropriate concentrations in tissue culture¹⁸. This is consistent with the findings¹⁹ that cytokines have an essential role in the development of cultures and does not agree with the findings²⁰. Also, the decrease in growth rates at high concentrations of benzyl adenine may be due to a disturbance in the vital processes within the plant tissues, which led to an imbalance in the hormonal balance and then a decrease in the growth rates of plant parts²¹.

It was clear from the above-presented results of Tables. 2-6 Generally, the growth regulator BA was superior in the studied traits, which included the number and length of vegetative branches, the number of leaves, and the fresh and dry weight of the vegetative group compared to the comparison treatment. The reason may be attributed to the role played by the balance between the growth regulators used Cytokinines (*BA*) and Auxins (NAA) in determining the pattern of cellular differentiation and formation of organs outside the body, as the presence of high concentrations of Cytokinines and low Auxins in the food medium leads to the formation of vegetative buds that grow into vegetative branches. Studies indicate that auxin leads to the stimulation of genes that produce cytokines. By controlling their gene expression, gene expression products play an essential role in biological processes such as cell division, chloroplast development, and nutrient metabolism²². These effects (the studied traits) may be due to the catalytic action of cytokines in urging cells to divide and differentiate, resulting in the growth of buds into vegetative branches. Quickly and highly efficient in breaking the apical dominance as it works to reveal and widen the vessels carrying both wood and phloem, prevent the decomposition of chlorophyll, stimulate cell division and increase the production of nucleic acids. The reason may be due to the action of BA on the hormonal balance of the plant tissue in the meristematic areas rich in auxin to cause the required response, which causes a break in the apical dominance and the transfer of nutrients by pushing the plant part to stimulate the growth of vegetative branches in the armpits of the leaves^{23,24,25}, as for the higher levels of them, which cause a decrease in growth rates on account of the disturbance on the vital processes in the tissues as cause of Hormonal Imbalance in them, leading to a decrease in The growth rates of the plant parts. This decrease does not necessarily mean the death of cells, but it is usually the result of an impediment to growth²¹. This is consistent with what was found²⁶ when growing vegetative branches of *Digitalis lanata* by growing the tips of the branches of sterilized seedlings on MS medium prepared with different concentrations of growth regulators BA and TDZ. Results also correspond with the Findings²⁷ when treating the *Digitalis lanata* plant with gamma rays and adenine. The rate of the studied vegetative growth characteristics is also noted from the data of the same tables that BA exceeds the concentration of 2 mg. L⁻¹ in the number and length of multiple branches and the number of leaves. The reason may be attributed to the stimulatory action of cytokinein in urging cells to divide and differentiate, which results in the growth of buds into vegetative branches. Apical dominance and the creation of areas of attraction in the lateral buds stimulate the rapid transfer of nutrients to them, which results in stimulating the growth of buds and, thus, the number of branches. Several theories have been developed to explain this phenomenon, including that the added cytokinein moves from the bottom up through the axillary buds and thus cancels the effect of auxien formed In terminal and inferiorly motile buds, which may accumulate in high concentrations in axillary buds and hinder their growth by inhibiting differentiation in the lateral vascular tissues in these buds. Thus, the role of the cytokinein moving upward will be to affect the process of differentiation of the woody tissues and vascular bundles of the axillary buds to link with their counterparts in the stem and then facilitate the transfer of water and nutrients to these buds and thus stimulate them to grow, develop and form lateral branches²⁸, as for the higher levels of

them, which cause a decrease in growth rates on account of the disturbance on the vital processes in the tissues as a cause of Hormonal Imbalance in them, leading to a decrease in The growth rates of the plant parts. This decrease does not necessarily mean the death of cells, but it is usually the result of an impediment to growth ²¹.

It is also noted from the data of the previous tables that BA is superior to the concentration of 2 mg. Liter⁻¹ in the average fresh and dry weight may be attributed to the fact that this treatment had outperformed the average number and length of branches, which led to an increase in the live mass, which was reflected in the fresh and dry weight of this mass. These results are in agreement with the findings of ^{29,30}.

The highest average fresh and dry weight of the multiplied branches was (106.2 and 5.82) mg, respectively, obtained when the tips of *Digitalis purpurea* branches were grown on MS medium prepared with 2 mg. L⁻¹ BA with 0.2 mg. L⁻¹ IAA. The results also agreed with what was reached ³¹ when conducting the vegetative multiplication experiment of the hawthorn plant, when the concentration was 2 mg.L⁻¹ of BA had the highest rate of fresh and dry weight (345.0 and 102.5) mg, respectively. It also agreed with what was reached ³² in the characteristics of the fresh and dry weight of the vegetative growths of *Catharanthus roseus* planted on MS medium and prepared with 2 mg.L⁻¹ of BA with 0.2 mg.L⁻¹ of NAA gave the highest average the fresh & dry weight (793.0 & 432.3) mg, respectively.

CONCLUSIONS

The selection of a type part of the plant and the addition of plant Growth Regulators in different combinations and concentrations to the MS food medium had a practical and distinct role compared to the comparison treatment in the average of the studied vegetative growth characteristics, which included the number and length of branches, number of leaves, fresh and dry weight of the vegetative total in the farms of vegetative branches of rosemary plants—transplanted in vitro.

Author Contributions: “Conceptualization, Al-Hasan Nassrullah and Sarab Almkhtar; validation, Sarab Almkhtar; formal analysis, Al-Hasan Nassrullah; data curation, Al-Hasan Nassrullah; writing original draft preparation, Sarab Almkhtar; writing review and editing, Al-Hasan Nassrullah; supervision, Sarab Almkhtar; project administration, Al-Hasan Nassrullah; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: "This research received no external funding."

Acknowledgments: Special thanks and gratitude to everyone who contributed to overcoming the difficulties encountered by the experiment, writing the research and publishing it, especially the head of the Department of Horticulture and Landscaping, Dr. Kadum Mohammed Abdullah and Dr. Zaid Khalil, as well as Dr. Zeinab Alywe Mohammed Al-tememe.

Conflicts of Interest: “The authors declare no conflict of interest.”

REFERENCES

1. Peter, V. The secondary metabolism of plants Secondary Defenes compounds. Springer Verlage. New York. **2004**, p.1-10.
2. Leelavathi, D., & Kuppan, N. IN VITRO REGENERATION FROM APICAL BUD EXPLANT OF *ROSMARINUS OFFICINALIS* L. AN IMPORTANT MEDICINAL PLANT. *Banat's Journal of Biotechnology*. **2013**, 4(8), 14

3. Seveitia, M.R., K.M. Abu Amerb and Sena. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*. **1999**, 37 (February): 124-131.
4. Chevallier, A. Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersley. **2001**, 336 pp.
5. Maistor E.L.; S.F. Mota; E.B. L.Ima; B.M. Bernardes and F.C. Goulart. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential oil in mammalian cells in vivo. *Genet. Mol. Res.* **2010**, 9(4), 2113-2122.
6. Singh, A. ; P. K. Singh. Salicylic acid-induced biochemical changes in cucumber cotyledons. *Indian J. of Agricultural Bioch.* **2008**, 21(1and2), 35-38.
7. Paridaen, A. Investigating the use of plant growth regulators in New Zealand and Australia. Australian University, Crops Competition New Zealand Study Tour Project Report. **2009**.
8. Williams, M.E. Introduction to phytohormones. Doi/ 10. 1105 / tpc. 110. Tt 0310. **2011**
9. Puglisi, S. Use of plant growth regulators to enhance branching of Clematis spp. Master of Science, Department of Horticulture Science, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. **2002**
10. Skoog, F. and C.O. Miller. Chemical regulation of growth and organ formation on plant tissue cultivated in vitro : In Biological Action of growth substances . 11 th . symp . soc. Exp . Biol. U. k. **1957**, 11:118- 131.
11. Al-Sahoki, Medhat, Waheeb ; Karima Ahmed. Applications in the design and analysis of experiments. Ministry of Higher Education and Scientific Research - Iraq. **1990**.
12. S. F. Al-jughayfy, A., Sh. J. Alobaidy, B. Effect Of Osmo-Hardening Seed On K And Na Concentration And Some Growth Properties Of Wheat Under Salt Stress. Anbar Journal Of Agricultural Sciences, 2023; 21(1): 32-43. doi: 10.32649/ajas.2023.179713.
13. Rasool, R.; Ganai B. A.; Kamili ; A.N. Akbar; S, Masood A. *Artemisia amygdalina* (Asteraceae). *a critically endangered plant of Kashmir. pak. J. Bot* **2013**; 45(2):629-634.
14. Hammoud, Ali Khalaf ; Majid, Bayan Hamza. Effect of benzyl adenine and salicylic acid on the growth and production of total alkaloids of Ashwagandha (*Withania Somnifera* L.) ex vivo. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences* **2017**, 48(3):700-690.
15. Gantait, S.; N. Mandal; S. Bhattacharya ; P.K. Das. An elite Protocol for accelerated quality-cloning in *Gerbera jamesonii* Bolus cv. sciella . in vitro cellular and Developmental . *Biology-plant* **2010**, 46(6):537-548.
16. Saini , H.K. ; M.S. Gill ; M.I.S. Gill . Direct shoot organogenesis and plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.). *Ind. J. Biotech* **2010**, 9, 419:423.
17. Kumar, R.S; C. Joshi ; K.T. Nailwal. Callus induction and plant regeneration from leaf explant of apple (*pyrus malus* L.) cv. Golden Delicious. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **2016**, 5(2):502-510.
18. Taiz, L. and E. Zeiger . Plant physiology. 5th ed. Sin Auer Associates Inc. Publisher Sunderland, Massachus - AHS. U.S.A. **2010**,
19. Soni, M; M. Thak and M. Modgil. In vitro multiplication of Merton I.793- an apple rootstock suitable for replantation. *Indian Journal of Biotechnology* **2011**, 10(7):362-368.
20. Ohmayed, K. H. ; Sharqi, . M. M. ; Rashid, H. M. . Comparison Of The Physical And Chemical Changes In Local Organic Waste After Cultivation Of The Ganoderma Lucidum Mushroom And Composting By Common Methods. *Journal of Life Science and Applied Research*. 2020, 1, 1-9.

21. Abdulateef, S. M., Aldhanki, Z. T. M. & Rashid, S. A. The influence of different sounds on the feeding behavior of broiler chickens and their impact on blood physiology and conditioning place preference (CPP). *Plant Arch.* 2018.18
22. Schmülling, T. Cytokinins In *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Academic Press/Elsevier Science. **2004**
23. Abu Zaid, Al-Shahat Nasr. *Plant hormones and agricultural applications*. Second Edition . Arab House for Publishing and Distribution. Egypt. **2000**
24. Ali, H.H., AL-Rawi, K., Khalaf, Y., Alaaraji, S., Aldahham, B., Awad, M., Al-ani, O., Al-ani, F., Ali, A.T. Serum Caveolin-1 Level is Inversely Associated with Serum Vaspin, Visfatin, and HbA1c in Newly Diagnosed Men with Type-2 Diabetes (2022) *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 11 (2), pp. 299-309.
25. Schmülling, T. Cytokinins In *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Academic Press/Elsevier Science. **2004**
26. Khudai M Y, Abdulateef S M, Mouhammed T Th, Alamili H S. Use of modern geometric design of fish ponds to increase welfare and blood parameters. *Revis Bionatura* 2023;8 (2) 82. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.82>
27. Almukhtar, S. A., Alrubaye, M. A., Elkaaby, E. A., Kadhim, Z. K., : Alkilabi, C. K. Effect of irradiation by gamma rays and the use of benzyl adenine to increase the production of cardiac glycoside compounds from *Digitalis lanata* in vitro. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. **2019**, Vol. 388, No. 1, p. 012068. IOP Publishing.
28. Al-Khafaji, Makki Alwan. *Plant growth regulators - their horticultural applications and uses - Ministry of Higher Education and Scientific Research - College of Agriculture - University of Baghdad*. **2014**
29. F. T. Al-Rawi, Y. T. Abdul-Rahaman , Abdullah I.Noaman , Th. T. Mohammed, S. M Abdulateef, Nadia Jebiril and KI. Mahmud. Role of ascorbic acid and appetite stimulants on a few blood serum biochemical characteristics in pregnant Iraqi ewes under heat stress. Al-Rawi F T, Abdul-Rahaman Y T, Noaman *Revis Bionatura* 2022;7(4) 6. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.6>.
30. Kadhim, Z. K., Al-Shareefi, M. J., Lateef, S. M. Effect of growth regulators on in vitro micropropagation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Research on Crops* **2019**, 20(3).
31. Al-Obaidi, Hashem Kazem Mohammed : Ahmed, Maysa Hamed and Ibrahim, Kazem Mohammed. *CrategusjapanL hawthorn reproduction ex vivo*. *Journal of Al-Mustansiriya Science* **2009**, Volume 20 issue 5 pages1-8.
32. Al-Hujaimi, Ihsan Jali Azbeeb. Using tissue culture technology to produce vincristen and phenplacen in the callus of *Catharanthus roseus* tolerant to salt stress, Master's thesis, College of Agriculture, University of Kufa. **2010**

Received: 26 September 2023 / Accepted: 15 April 2023 / Published: 15 December 2023

Citation: Nassrullah, A.; Almukhtar, S.; The effect of explants type and plant growth regulators on the establishment and multiplication of vegetative branches of *Rosmarinus officinalis* L. *in vitro*. *Revis Bionatura* 2023;8 (4) 45. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.45>

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Biotechnología para la producción y la vida



Técnicas Agrícolas | Cultivo de Tejidos | Bioproductos
Fitopatología/Microbiología | Biología Molecular | Biorremediación



La Universidad Nacional Autónoma de Honduras



SE ENCUENTRA DENTRO
DEL RANKING SCIMAGO
Y RANKING QS



**“AGRADECEMOS
A LOS
INVESTIGADORES
QUE LO HAN
HECHO POSIBLE”**

FRANCISCO JOSÉ HERRERA ALVARADO
Rector UNAH



DICIHT
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA,
HUMANÍSTICA Y TECNOLÓGICA



UNAH
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE HONDURAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS 1847

Lucem Aspicio



LA UNAH CUENTA CON

162 Instancias de investigación:

72 Grupos de investigación científica

67 Unidades de gestión de la investigación

10 Institutos de investigación científica

7 Observatorios universitarios de investigación

6 Centros experimentales y/o de innovación



DICIHT
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA,
HUMANÍSTICA Y TECNOLÓGICA



UNAH
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE HONDURAS

Docencia, investigación,
extensión y proyección
social al servicio del territorio



Fortalezas institucionales

- > Biotecnología
- > Limnología
- > Derechos Humanos – Posconflicto
- > Internacionalización
- > Inclusión Social
 - SER – Servicio Educativo Rural
 - Educación de Alfabetización
- > MII S – Instituto de formación para el trabajo y el desarrollo humano
- > Formación humanística “Ruta Humanística en el currículo - Cátedra abierta Maestra de la Sabiduría”
- > Investigación y desarrollo tecnológico
- > Comprometida con la calidad
- > Centro de Estudios Territoriales
- > Biodiversidad
 - Herbario
 - Ictiología
 - Fitoteca

Áreas del conocimiento

- Ciencias Agropecuarias
 - Ciencias de la Educación
 - Ciencias de la Salud
 - Ciencias Económicas y Administrativas
 - Ciencias Sociales
 - Derecho
 - Ingenierías
 - Teología y Humanidades
- > 26 programas de pregrado
 - > 16 programas de posgrado
 - 1 doctorado
 - 8 maestrías
 - 7 especializaciones

www.uco.edu.co  Universidad Católica de Oriente  @uconio



“Servicio educativo con calidad en
Personas, procesos y servicios”

Contacto institucional Universidad Católica de Oriente
Sector 3, Cra. 46 No. 40B 50 - PBX: +(57)(4) 569 90 90. Ext. 604
Fax: +(57)(4) 501 09 72 - Email: uco@uco.edu.co

