بررسی اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه و کمپوست زباله شهری بر تغییرات آنزیمی در برگ درخت توت

عیسی ابراهیمی*[۱]، رضا صورتی زنجانی[۲]، حسن حسنی کومله[۳]، محمد حسین رضادوست[۴]، اسماعیل کامران[۵]، یوسف خیرخواه رحیم آباد[۶]، شهلا نعمت الهیان[۷]

(تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۲)

چکیده

توت یک درخت تک پایه بوده و می‌تواند در شرایط آب و هوایی مختلف رشد کند. برگ درخت توت به عنوان غذای اصلی کرم ابریشم، و نقش اساسی در صنعت ابریشم دارد. مصرف کودهای شیمیایی در چند دهه اخیر سبب بروز مشکلات زیست‌محیطی فراوانی شده است، از این‌رو در چند سال اخیر مصرف کودهای آلی و مایه تلقیح باکتریایی افزایش چشمگیری داشته است. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه و پسماند زباله شهری بر تغییرات آنزیمی برگ توت و فعالیت آنزیم فسفاتاز خاک می‌باشد. برای انجام این پژوهش تعداد ۲۷ نهال توت از موسسه تحقیقات کرم ابریشم کشور تهیه شد. این پژوهش به صورت طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه گیلان به اجرا در آمد. تیمارهای مورد استفاده شامل دو سطح از پسماند زباله شهری (دو و چهار درصد)، دو سطح باکتری *سودوموناس* (۱۰۶ و ۱۰۶×۵ سلول در گرم خاک) و شاهد است. آنزیم‌های کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز، کلروفیل a و b در برگ توت و آنزیم فسفاتاز در خاک اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که استفاده مایه تلقیح باکتریایی میزان آنزیم فسفاتاز را در خاک افزایش داده است. همچنین نتایج حاکی از آن است که مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از ۷۷/۲ در تیمار شاهد به ۲۷۶ میکرومول بر گرم بافت تازه برگ در تیمار سطح دوم کمپوست و باکتری رسیده است. بیشترین مقدار این آنزیم در سطح دوم مایه تلقیح باکتریایی (۱۰۶×۵) به همراه سطح دوم کود آلی (چهار درصد) معادل ۰/۱۶ (میکرومول بر دقیقه برگرم وزن تر) به دست آمده است. به طور کلی، نتایج به دست آمده نشان داد که می‌توان از ترکیب کودهای آلی و مایه تلقیح باکتریایی جهت تامین عناصر مورد نیاز گیاه توت استفاده کرد.

واژه های کلیدی: تغذیه، سودوموناس، مواد آلی، پلی‌فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز

ابراهیمی ع.، صورتی زنجانی ر.، حسنی کومله ح.، رضادوست م.ح.، کامران ا.، خیره خواه رحیم آبادی ی.، نعمت الهیان ش. ۱۴۰۲. بررسی اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه و کمپوست زباله شهری بر تغییرات آنزیمی در برگ درخت توت درخت توت سیاه. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۱۱، شماره ۱. صفحه:۷۳-۸۶.

۱-دانشجوی دکتری فیزیک و حفاظت خاک، مرکز نخبگان و استعدادهای برتر نیروهای مسلح، مرکز تحقیقات ابریشم کشور، گیلان، رشت مرکز تحقیقات ابریشم کشور، گیلان، رشت

۲-استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۳-استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۴-مرکز تحقیقات ابریشم کشور، گیلان، رشت

۵-مرکز تحقیقات ابریشم کشور، گیلان، رشت

۶-مرکز تحقیقات ابریشم کشور، گیلان، رشت

*پست الکترونیک: Ebrahimi.soilphysic@yahoo.com

مقدمه

توت از خانواده Moraceae و جنس *Morus* است که شامل ۲۴ گونه، یک زیر گونه و حداقل ۱۰۰ واریته شناخته شده می‌باشد (Duke, 1983; Krawczyk & Lochynska, 2020). درخت توت گیاهی یک پایه است. بسته به شرایط اقلیمی در اواسط اردیبهشت به گل نشسته، رسیدگی و برداشت محصول از اواسط خرداد شروع و تا مرداد ماه ادامه دارد (Shahrestani, 1998). درخت توت مقاوم به سرما (تحمل تا ۲۵- درجه سانتی‌گراد) بوده و کم توقع است و در اکثر مناطق و شرایط آب و هوایی رشد می‌کند (Basiri, 2017). در ایران ۳ گونه آن به نام توت سفید (*Morus alba*)، توت سیاه (*Morus nigra*) و توت سرخ (*Morus rubra*) با واریته‌های متعدد وجود دارد (Duke, 1983). گیاه توت به عنوان تنها منبع غذایی منحصر به فرد جهت تغذیه لاروهای کرم ابریشم می‌باشد (Aslani & Ahmadi, 1996). لذا تغذیه مناسب لاروهای ابریشم تجاری متکی به برگ‌های توتی است که در طول هضم و جذب قادر به تأمین مواد غذایی مورد نیاز جهت رشد و نمو طبیعی آنها باشد (Zheng *et al*., 1988; Chundanga *et al*., 2020).

یکی از روش‌های مدیریتی برای حفظ و ارتقا کیفیت خاک در کشاورزی پایدار استفاده از کودهای آلی و زیستی است (Chocano *et al*., 2016). ریزجانداران مورد استفاده در کودهای زیستی یا آزادزی هستند و یا دارای روابط همزیستی با گیاهان می‌باشند (Karami Chame *et al*., 2016). این ریزجانداران به طور مستقیم و غیرمستقیم در تغذیه گیاه شرکت می‌کنند (A Khalid *et al*., 2006; bhilash *et al*., 2016; Oleńska *et al*., 2020; Sarikhani & Amini, 2020). در میان باکتری ها، جنس‌های متعلق به *سودوموناس*، باسیلوس و *ریزوبیوم* و در میان قارچ‌ها *پنی‌سیلیوم* و *آسپرژیلوس* توانمندترین سویه‌های حل کننده فسفات‌های نامحلول معدنی هستند (Naseri *et al*., 2017). به گروهی از باکتری‌های مفید ریزوسفری خاک که سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند باکتری‌های محرک رشد گیاه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) گفته می‌شود. این باکتری‌ها می‌توانند با استفاده از روش‌های مختلف شامل انحلال ترکیب‌های کم‌محلول و نامحلول عناصر غذایی و در نتیجه افزایش فراهمی آن‌ها، رقابت برای جذب عناصر غذایی، تولید سیدروفور، افزایش تحمل گیاه به تنش‌های شوری، خشکی و سمیت عناصر و تولید هورمون‌های گیاهی مانند ایندول استیک اسید سبب افزایش رشد گیاه شوند (Glick, 2014; Pereira *et al*., 2020). امروزه استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه در کشاورزی به عنوان روشی جایگزین برای کودهای شیمیایی، آفت‌کش‌ها و مکمل‌ها در راستای جلوگیری از آلودگی محیط زیست در حال افزایش می‌باشد (Ashrafuzzaman *et al*., 2009).

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه از جمله منابع زیستی می‌باشند که از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم سبب افزایش قابلیت و دسترسی عناصر غذایی و در نهایت افزایش رشد گیاه می‌شوند (Khalid *et al*., 2006; Oleńska *et al*., 2020). باکتری‌های محرک رشد گیاه با اکسیداسیون ناقص قندها و مواد پلی‌ساکاریدی ترشح شده توسط ریشه گیاه، اسیدهای آلی مانند اسید گلوکونیک، اسید اگزآلیک و اسید سیتریک تولید می‌نمایند. نوع و مقدار اسیدهای آلی تولید شده در هر محیط به نوع ریزجانداران تولید کننده آن اسید مربوط می‌شود (Reyes *et al*., 1999; Kochian *et al*., 2015). توانایی ریزجانداران خاک‌زی در آزادسازی عناصر مغذی گیاهان مانند فسفر و پتاسیم، تجزیه ترکیب‌های آلی پیچیده در خاک و کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی، امروزه به نحو مطلوبی در جهت کشاورزی پایدار مورد استفاده کشورهای پیشرو در این امر است (Marhual *et al*., 2011). مطالعات زیادی نشان داده است که استفاده از باکتری‌های محرک رشد به عنوان مایه تلقیح برای رشد گیاهان بسیار مفید است و باعث افزایش علمکرد شده است. برخی از مطالعات تأثیر این باکتری‌ها را بر روی گیاهان گندم (Kumar *et al*., 2014)، برنج (Lavakush *et al*., 2014)، سویا (Masciarelli *et al*., 2014)، سیب (Aslantas *et al*., 2007)، انگور (Kose *et al*., 2005)، تمشک (Orhan *et al*., 2006) و ذرت (Pereira *et al*., 2020) و ... می‌باشند. پسماندهای آلی، مواد طبیعی با ویژگی‌های بیوشیمیایی هستند که توسط ریزجانداران تجزیه می‌شوند. معمول‌ترین پسماندهای آلی شامل ترکیباتی هستند که به خوبی در شرایط هوازی و بی‌هوازی تجزیه شوند

(Ayilara *et al*., 2020; Sayara *et al*., 2020). پسماند-های آلی عمدتا از زباله شهری، ضایعات کشاورزی و صنعتی تشکیل شده‌اند (Kumar & Bharti, 2012). امروزه تولید انبوه پسماندهای آلی ناشی از فعالیت‌های صنعتی و زندگی شهری، پیامدهای مشکل‌ساز کوتاه مدت و بلند مدت را برای سلامت محیط زیست ایجاد کرده است (Cheng *et al*., 2007). این ترکیب‌ها، علاوه بر مواد آلی معمولاً سرشار از عناصر غذایی مورد نیاز گیاه به ویژه نیتروژن و فسفر می‌باشند و سبب بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک از قبیل تخلخل، پایداری خاکدانه‌ها، جرم مخصوص ظاهری، حاصلخیزی خاک، حرکت و نگهداشت آب در خاک می‌شوند (de Melo *et al*., 2007).

با افزایش جمعیت، میزان تولید زباله شهری به شدت افزایش پیدا کرده است و یکی از مهم‌ترین معضلات کنونی دفن و یا سوزاندن زباله‌ها می‌باشد (Soobhany, 2019; Chen *et al*., 2016). همچنین کودهای شیمیایی به خصوص کودهای فسفاته حاوی ناخالصی فلزهای سنگین هستند. فلزهای سنگین عامل آلودگی خاک محسوب شده و سبب کاهش فعالیت‌های میکروبی می‌شوند و علاوه بر آن ممکن است توسط گیاه جذب و از آن طریق وارد زنجیره غذایی انسان و حیوان شوند. خطر وجود فلزهای سنگین مانند کروم، نیکل، روی، کادمیوم و مس در جیره‌ی غذایی انسان مشخص شده است (Rahimi *et al*., 2021; Wang *et al*., 2005). کشاورزی پایدار با هدف کاهش مصرف کودهای شیمیایی یک راه حل مطلوب جهت غلبه بر این مشکلات است. کودها دارای منشاء باکتریایی و آلی نیز بسیار مفید هستند، زیرا نه فقط نیازهای گیاه را تامین می‌کنند، بلکه از آن جهت که به محیط زیست هم آسیب نمی‌رسانند، حائز اهمیت می‌باشند و در کشاورزی پایدار بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در دهه‌های اخیر تولید کمپوست از این زباله‌ها سبب شده است که بخشی از آن مجدداً به صورت کود در دسترس گیاه قرار گیرد که نتایج بسیار مفیدی بر روی رشد گیاهان داشته است. بنابراین با توجه به مشکلات زیست محیطی مصرف کودهای شیمیایی، قیمت پایین کمپوست زباله شهری و در دسترس بودن آن، استفاده از کمپوست زباله شهری و باکتری‌های محرک رشد به منظور تأمین نیاز تغذیه‌ای گیاهان از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد. تاکنون مطالعه جامعی در خصوص تغییرات آنزیمی برگ درختان توت ناشی از مصرف کودهای آلی و زیستی انجام نشده است. با توجه به اهمیت موضوع درختان توت در صنعت ابریشم و آلودگی ناشی از مصرف کودهای شیمیایی، این مطالعه بررسی اثر مصرف کودهای آلی کمپوست زباله شهری و مایه تلقیح باکتریایی حاوی باکتری *سودوموناس* بر تغییرات آنزیمی برگ توت و آنزیم فسفاتاز در خاک انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

برای انجام این پژوهش از نهال توت رقم کن موچی (*Kenmochi*) استفاده شد. این نهال‌ها از مرکز تحقیقات ابریشم کشور واقع در استان گیلان تهیه شد. طرح آماری پژوهش مورد مطالعه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار می‌باشد. تیمارهای مورد مطالعه شامل تیمار شاهد، تیمار باکتری *سودوموناس* (*Pseudomonas* sp.) در دو سطح (10^6 و 5×10^6 سلول در گرم خاک) و دو سطح کمپوست زباله شهری (دو و چهار درصد وزنی) می‌باشند. این باکتری از کلکسیون میکروبی دانشگاه تهران تهیه شد. کمپوست زباله شهری از کارخانه کمپوست‌سازی شهر رشت تهیه شد. برای آماده‌سازی گلدان‌ها ابتدا تیمارهای مورد مطالعه به خاک گلدان‌ها اضافه شده و سپس یک دوره دو ماه انکوباسیون برای آنها در نظر گرفته شد. بعد از دو ماه در مهر ماه سال ۱۳۹۸ نهال‌ها در گلدان کاشت شده و بعد از برگ‌دهی نهال‌ها در اوایل خرداد ماه برگ‌های مربوط به هر تیمار جمع‌آوری شدند.

ویژگی‌های خاک

ویژگی‌های خاک قبل از کشت و اضافه شدن تیمارها اندازه‌گیری شد. بافت خاک به روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1936)، EC و pH خاک به روش اسپارکس (Sparks *et al*., 1996)، کربنات کلسیم معادل خاک به روش خنثی سازی با اسید کلریدریک (Sparks *et al*., 1996)، کربن آلی به روش والکلی و بلاک (Walkley & Black, 1934)، پتاسیم به روش نشر شعله‌ای (فلیم

فتومتری) (Page *et al*., 1982)، فسفر به روش آمونیوم مولیبدات وانادات و همچنین نیتروژن به روش هضم تر با دستگاه کجلدال اندازه‌گیری شدند (Cottenie, 1980). کشت جامد King B (شامل ۲۰ گرم در لیتر پپتون، ۱/۵ گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۱/۵ گرم در لیتر HPO_4 K_2، ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول و ۱۶ گرم در لیتر آگار) کشت داده شد. کلونی‌های رشد یافته بر روی این محیط پس از چند بار بازگشت بر روی این محیط خالص‌سازی شدند (King *et al*., 1954).

فعالیت آنزیم فسفاتاز خاک

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی، ابتدا مقدار یک گرم خاک توزین شد و سپس ۰/۲۵ میلی‌لیتر تولوئن و ۴ میلی‌لیتر بافر فسفات با (pH=11) و یک میلی‌لیتر از محلول سوبسترای پارانیترو فنل فسفات به آن افزوده و نمونه‌ها برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس در انکوباسیون قرار گرفتند. ۴ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار و یک میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۵ مولار برای اتمام یافتن فعالیت آنزیمی به آن افزوده شد و نمونه‌ها کاملا تکان داده شدند سپس محلول به وسیله‌ی کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شد. نمونه‌ها به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش Giannopolities & Rise (1977) اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز برگ

برای تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به ۱/۵ میلی‌لیتر محلول واکنش (۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۷)، ۰/۱۵ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میکرومولار، ۵۴۹/۸۵ میکرولیتر آب مقطر) ۳۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۲۰ میلی‌مولار اضافه شد و جذب بلافاصله در طول موج ۲۴۰ نانومتر در دو مرحله با فاصله زمانی یک دقیقه‌ای قرائت شد (Beers & Sizer, 1952).

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز برگ

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز به این صورت انجام شد که دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره نمونه که دارای ۴۰ میکروگرم پروتئین باشد، ۲۰ میکرولیتر محلول پرولین و مقدار کافی بافر سیترات - فسفات ۲۵ میلی‌مولار بود که بعد مخلوط شدن به مدت دو دقیقه ورتکس شد. سپس ۴۰ میکرولیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی‌مولار به مخلوط فوق اضافه کرده و بلافاصله مخلوط همگن شد و تغییرات جذب نور با فواصل ۱۰ ثانیه و به مدت یک دقیقه در طول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت گردید (Mohammadi & Kazemi, 2002).

کلروفیل

مقدار نیم گرم از ماده تر گیاهی را در هاون چینی ریخته، سپس با استفاده از نیتروژن مایع آن کوبیده شد. ۲۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد به نمونه اضافه، سپس در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده می‌شود. عصاره جدا شده فوقانی حاصل از سانتریفیوژ را به بالن شیشه‌ای منتقل می‌شود. مقداری از نمونه داخل بالن را در کووت اسپکتروفتومتر ریخته و سپس به طور جداگانه در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b توسط اسپکتروفتومتر مقدار جذب را قرائت شد. در نهایت با استفاده از فرمول‌های ۱ و ۲ میزان کلروفیل a، b برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه به دست می‌آید (Arnon, 1967).

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 * A663 - 0.86 * A645) V/100W \quad (۱)$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 * A645 - 3.6 * A663) V/100W \quad (۲)$$

V= حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)

A= جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر

W= وزن تر نمونه برحسب گرم

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و نمودارها در محیط Excel ترسیم شدند. آزمون مقایسه میانگین هر یک از ویژگی‌های یاد شده در تیمارهای بکار رفته نیز توسط آزمون توکی در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های خاک و کمپوست مورد استفاده

در جدول ۱ نتایج آنالیز خاک مورد مطالعه قبل از کاشت نهال‌ها نمایش داده شده است. بافت خاک مورد مطالعه رسی است و میزان ماده آلی این خاک در سطح مناسبی (۲/۲۶ درصد) قرار دارد. همچنین مقدار فسفر، پتاسیم و نیتروژن این خاک نیز به ترتیب ۶۰، ۱۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و ۰/۰۸ درصد است. در جدول ۲ مشخصات کمپوست زباله شهری مورد استفاده ارایه شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود درصد کربن آلی در این کود بالا است.

جدول ۱- مشخصات شیمیایی و فیزیکی خاک مورد مطالعه

Table 1. Chemical and physical characteristics of the studied soil

Parameter	Texture	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	pH	EC ($dS\ m^{-1}$)
Value	Clay	45	38.4	16.6	6.26	0.4
Parameter	P ($mg\ kg^{-1}$)	K ($mg\ kg^{-1}$)	N (%)	OM (%)	$CaCO_3$ (%)	
Value	60	135	0.08	2.26	4.88	

جدول ۲- مشخصات شیمیایی کمپوست مورد مطالعه

Table 2. Chemical characteristics of the studied compost

Parameter	P	K	N	OC	EC	pH
			(%)		($dS\ m^{-1}$)	
Value	0.4	0.7	0.9	14.7	0.5	6.9

آنالیز واریانس آنزیم‌های مورد مطالعه و کلروفیل

در جدول ۳ نتایج آنالیز واریانس آنزیم‌های خاک و موجود در برگ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشخص است هر سه آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، پلی‌فنل اکسیداز و کاتالاز در برگ تحت تأثیر معنی‌دار استفاده توام از کودهای آلی و مایه تلقیح باکتریایی قرار گرفته‌اند. در مورد آنزیم فسفاتاز موجود در خاک نیز مشاهده می‌شود که اثرات ساده دو نوع کود آلی و مایه تلقیح باکتریایی نیز و اثر متقابل آنها بر میزان آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و فسفاتاز خاک معنی‌داری است. مشاهده می‌شود که بیشترین مقدار ضریب تغییرات (CV) در آنزیم پلی‌فنل اکسیداز برابر با ۵/۴۱ درصد به دست آمده است. تغییرات کلروفیل‌ها نیز تابعی از اثر متقابل دو نوع کود بوده و به صورت تکی یا ساده تغییرات این پارامتر معنی‌دار نبوده است. حشمتی و همکاران (Heshmati *et al*., 2016) نیز در مطالعه‌ای به بررسی اثر کودهای مایه تلقیح باکتریایی بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه گلرنگ پرداختند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پلی‌فنل اکسیداز و کاتالاز در گیاه تحت تاثیر کود مایه تلقیح باکتریایی هستند. نتایج حشمتی و همکاران (Heshmati *et al*., 2016) با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

جدول ۳- تجزیه واریانس ویژگی‌های بیوشیمیایی خاک و برگ

Table 3. Analysis of variance of soil and leaf biochemical properties

Source of Variation	Df	Superoxide dismutase	Polyphenol oxidase	Catalase	Phosphatase	Chlorophyll a	Chlorophyll b
Compost	2	35539^{**}	0.01^{ns}	67399^{ns}	48^{ns}	87^{**}	86^{**}
Bacteria	2	10404^{**}	0.001^{ns}	34804^{ns}	15^{ns}	20^{**}	18^{**}
Bacteria * Compost	4	1958^{**}	0.0001^{**}	18134^{**}	1.4^{**}	1.01^{ns}	1.6^{**}
Error	16	34	0.000	282	0.08	0.6	0.03
CV (%)	-	4.24	5.41	4.97	2.04	4.5	1.4

*، ** و ns به‌ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح یک درصد، پنج درصد و عدم معنی‌داری می‌باشند

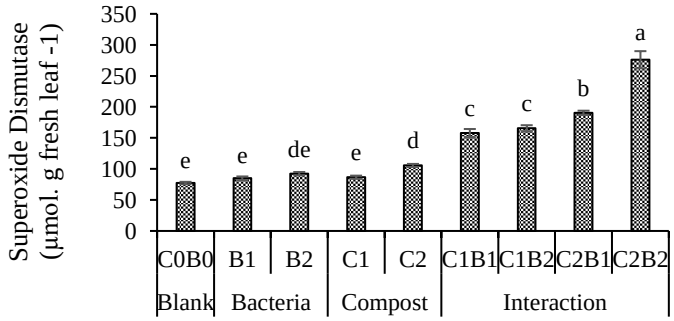
*, ** and ns: significant at %1, %5 probability level and non- significant, respectively

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

در شـــکل ۱ نتایج مقایســـه میانگین اثر دو نوع کود آلی کمپوست و مایه تلقیح باکتریایی حاوی سودوموناس در تیمارهای مختلف بر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که افزایش باکتری به خاک (اثر ساده) سبب افزایش معنی‌دار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شده است. این موضوع در مورد کمپوست نیز صحت دارد. در بخش اثرات متقابل نیز مشاهده می‌شود که در سطح اول کمپوست افزایش باکتری سبب افزایش مقدار این آنزیم شده است اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبوده اســت. اما در ســطح دوم کمپوســت با افزایش باکتری از ســطح اول به دوم ســبب افزایش معنی‌داری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شده است. سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار ترکیبی سطح دوم باکتری و کمپوست نسبت به تیمار شاهد به مقدار ۳/۵ برابر افزایش یافته است. تیپو و همکاران (Tiepo *et al*., 2020) نشـــان دادند که اســـتفاده از باکتری‌های محرک رشد ریشه در شرایط تنش باعث بهبود و ایجاد تغییرات معنی‌داری در سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌شود که با نتایج پژوهش حاضـــر مطابقت دارد. فوکامی و همکاران (Fukami *et al*., 2018) نیز نشـــان دادند که همزیستی باکتری‌های محرک رشد با گیاه ذرت مناسب بوده و ســـبب افزایش فعالیت آنزیم‌های ســـوپراکســـید دیســـموتاز و کاتالاز در برگ گیاه شـــده اســـت. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکســـیدان یکی از مکانیزم‌های مقابله با افزایش رادیکاهای فعال اکســـیژن در شـــرایط تنش می‌باشد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز اولین سد مقاومتی گیاهان می‌باشد که موجب تجزیه رادیکال‌های فعال به مواد کم خطر می‌شود (تبدیل آن‌ها به هیدروژن پراکســـید). در ادامه هیدروژن پراکســـیدهای تولیدی توســـط بقیه آنزیم‌های آنتی‌اکســـیدان به مواد بی‌خطر تبدیل می‌شـود (Tuna *et al*., 2008; Jiang & Huang, 2001).

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

در شکل ۲ نتایج مقایسه میانگین تغییرات آنزیم پلی‌فنل اکســـیداز تحت تأثیر تیمارهای مختلف کود آلی و مایه تلقیح باکتریایی نشـــان داده شـــده اســـت. همان‌گونه که مشـخص اسـت بیشـترین مقدار این آنزیم در سـطح دوم کود مایه تلقیح باکتریایی به همراه ســـطح دوم کود آلی معـادل ۰/۱۶ (میکرومول بر دقیقـه برگرم وزن تر) بـه دسـت آمده اسـت. کمترین مقدار این آنزیم نیز در تیمار شـاهد به دسـت آمده اسـت. در مورد اسـتفاده توام از کود آلی و مایه تلقیح باکتریایی نشـان داده شـده اسـت که با افزایش هر کـدام تغییرات معنی‌داری در ســـطح آنزیم پلی‌فنل اکسـیداز در برگ رخ داده است. سطح آنزیم پلی فنل اکســـیداز از تیمار شـــاهد به تیمار اســـتفاده توام از ســـطح دوم باکتری و کمپوســـت به مقدار نزدیک به ســـه برابر شده است. یکی از وظایف آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در گیاه ریشه‌زایی است.



شکل ۱- تغییرات آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برگ

Figure 1. Changes in leaf superoxide dismutase enzyme

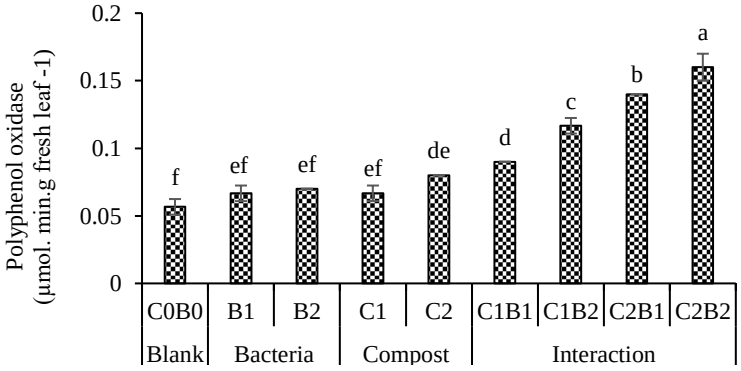
B0: بدون باکتری؛ B1: سطح اول باکتری؛ B2: سطح دوم باکتری؛ C0: بدون کمپوست؛ C1: سطح اول کمپوست؛ C2: سطح دوم کمپوست

B0: no bacteria; B1: first level of bacteria; B2: second level of bacteria; C0: no compost; C1: First level of compost; C2: Second level of compost

میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون توکی ندارند.

The same letters above each column based on to Tukey, test means there was no significant difference at 5%

با افزایش ریشه‌زایی میزان جذب آب و مواد غذایی توسط گیاه افزایش می‌یابد. محمودی میمند و همکاران (Mahmudi Mimand *et al*., 2016) نشان دادند که تلقیح گیاه پسته با باکتری‌های محرک رشد سبب افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز شده است که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. سایر پژوهشگران نیز وجود تغییرات بسیار زیاد فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در تشکیل ریشه ارقام سهل ریشه‌زا خرما، گونه‌های انگور و گردو را نشان دادند (Cheniany *et al*., 2010; Satish *et al*., 2008; Qaddoury & Amssa, 2003). پلی‌فنل اکسیدازها گروه‌ی از آنزیم‌ها هستند که در اکسیداسیون فنل‌ها به کینون‌ها و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی نقش مهمی دارند. در ارتباط با امکان مؤثر بودن فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز در واکنش‌های دفاعی گیاه، تحقیقات نشان داده است که این آنزیم‌ها در فعالیت دفاعی و واکنش فوق حساسیت در مقابل ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها دخالت دارند (Mohammadi & Kazemi, 2002). همچنین این آنزیم اکسیداسیون دی‌فنول‌ها را به کوئینون‌ها که در پلیمریزاسیون رنگدانه‌ها نقش دارند کاتالیز می‌کند که از این طریق گیاه می‌تولند از تخریب رنگدانه‌ها طی تنش جلوگیری نماید. بنابراین، افزایش فعالیت این آنزیم در اثر تنش می‌تواند جهت کاهش تخریب رنگدانه‌ها و سیستم‌های فتوسنتزی طی تنش باشد. تغییرات در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش‌های محیطی از جمله تنش کمبود آب گزارش شده است (Hirayama *et al*., 2006).



شکل ۲- تغییرات آنزیم پلی فنل اکسیداز برگ

Figure 2. Changes in polyphenol oxidase enzyme of leaf

B0: بدون باکتری؛ B1: سطح اول باکتری؛ B2: سطح دوم باکتری؛ C0: بدون کمپوست؛ C1: سطح اول کمپوست؛ C2: سطح دوم کمپوست

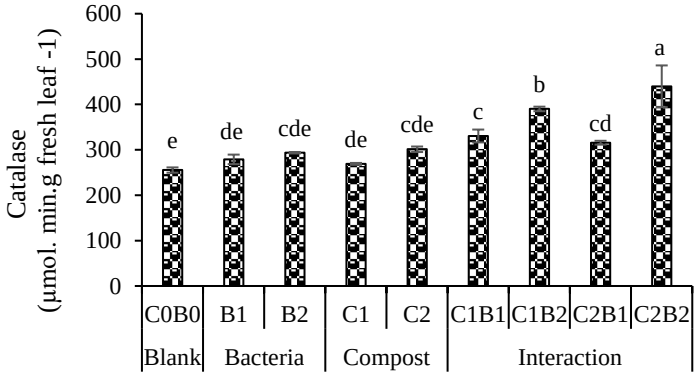
B0: no bacteria; B1: first level of bacteria; B2: second level of bacteria; C0: no compost; C1: First level of compost; C2: Second level of compost

میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون توکی ندارند.

The same letters above each column based on to Tukey, test means there was no significant difference at 5%

آنزیم کاتالاز

نتایج مقایسه میانگین تغییرات آنزیم کاتالاز ناشی از تغییر سطوح مقدار کمپوست و مایه تلقیح باکتریایی در شکل ۳ آمده است. در این شکل همانند دو شکل ۱ و ۲ بیشترین مقدار آنزیم در تیمار سطح دوم مایه تلقیح باکتری و کمپوست به دست آمده است. این مقدار معادل ۴۴۰/۱ (میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه) است که نسبت به تیمار شاهد افزایش ۱۷۲ درصدی داشته است. در مورد آنزیم کاتالاز نیز مشاهده می‌شود که کمترین سطح آن در تیمار شاهد بوده است. همچنین مشاهده می‌شود که افزایش‌های غیرمعنی‌داری در سطح آنزیم کاتالاز برگ ناشی از افزایش سطح یک و دو کمپوست و مایه تلقیح باکتریایی (اثرات ساده) رخ داده است. حیدی و گلپایگانی (Heidari & Golpayegani, 2012) همزیستی گیاه با باکتری‌های محرک رشد سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه می‌شود که با نتایج به دست آمده از این پژوهش مطابقت دارد.



شکل ۳- تغییرات آنزیم کاتالاز برگ

Figure 3. Changes in catalase enzyme of leaf

B0: بدون باکتری؛ B1: سطح اول باکتری؛ B2: سطح دوم باکتری؛ C0: بدون کمپوست؛ C1: سطح اول کمپوست؛ C2: سطح دوم کمپوست

B0: no bacteria; B1: first level of bacteria; B2: second level of bacteria; C0: no compost; C1: First level of compost; C2: Second level of compost

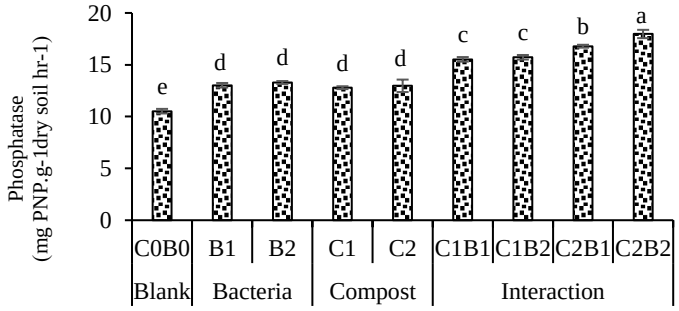
میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون توکی ندارند.

The same letters above each column based on to Tukey, test means there was no significant difference at 5%

آنزیم فسفاتاز

در شکل ۴ نتایج مقایسه میانگین تغییرات آنزیم فسفاتاز خاک تحت تاثیر تیمارهای کود آلی و مایه تلقیح باکتریایی آمده است. در جدول ۳ نشان داده شد که اثرات ساده تیمارهای کود آلی و مایه تلقیح باکتریایی بر مقدار فسفاتاز خاک معنی‌دار نبوده است. اما در تیمارهای ترکیبی این دو نوع کود نشان داده شده است که افزایش معنی‌داری در سطح آنزیم فسفاتاز خاک رخ داده است. بیشترین مقدار آنزیم فسفاتاز خاک در تیمار ترکیبی سطح دوم کمپوست و مایه تلقیح باکتری معادل ۰/۴ ($mg\ PNP.g^{-1}dry\ soil\ hr^{-1}$) به دست آمده است. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل دو نوع کود نشان داده است که در سطح اول کمپوست افزایش مایه تلقیح باکتری از سطح اول به سطح دوم دارای اختلاف معنی‌داری نیست. با افزایش کمپوست به خاک مقدار ترکیبات آلی در آن افزایش می‌یابد. به طور کلی، معدنی شدن ضایعات صنعتی- کشاورزی لیگنوسلولزی به وسیله فرایندهای میکروبی سبب حلالیت فسفات نامحلول آلی می‌شود که ماده آلی را تبدیل به یک اصلاح کننده غنی از ترکیب‌های پلی‌ساکاریدی و فسفر فراهم می‌کند. به علاوه، ماده آلی معدنی شده می‌تواند به عنوان منبع کربن و انرژی برای فعالیت ریزجلنداران خاک استفاده شود. این پیامد می‌تواند بیشتر گسترش یابد و برای فعالیت‌های آنزیمی خاک که به عنوان فاکتورهای اصلی در فعالیت میکروبی کل خاک و کیفیت خاک شرکت می‌کنند نیز اثرگذار باشد. افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند دهیدروژناز و فسفاتاز شاخص‌هایی از فعالیت میکروبی و معدنی شدن فسفر در خاک‌ها هستند که سبب افزایش در فراهمی مواد غذایی برای گیاهان و افزایش حاصلخیزی خاک می‌شود (Garcia *et al.*, 1997). به دلیل ورود سوبسترای آنزیمی، فعالیت آنزیم‌های خاک در طول دوره تجزیه پسماند جامد همواره در نوسان بود. به هر حال این پسماندها می‌توانند به عنوان منبع انرژی مورد استفاده جمعیت میکروب‌های هتروتروف خاک قرار گرفته و در نتیجه تنفس میکروبی خاک را به عنوان شاخص فعالیت میکروبی افزایش دهند. از این رو با توجه به آن‌که هر گونه عملیات مدیریتی که روی جمعیت‌های زیستی خاک اثر بگذارد، تغییراتی نیز در سطوح آنزیمی خاک ایجاد خواهد کرد، می‌توان بیان کرد که سیستم‌های خاک-آنزیم در ارتباط تنگاتنگ با مدیریت پسماندهای آلی هستند (Boyle & Paul, 1989). تولید اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتاز توسط ریزجانداران خاک از راه‌کارهای اصلی درگیر در انحلال و رهاسازی فسفر خاک می‌باشند (Malboobi *et al.*, 2009). آنزیم فسفاتاز که پیوندهای استری فسفات آلی را هیدرولیز می‌کند و سبب آزادسازی فسفات می‌شود، خود به دو گروه اسیدی و قلیایی تقسیم‌بندی می‌شود. تولید فسفاتازهای اسیدی و قلیایی به منظور افزایش انحلال و دسترسی فسفر و غلبه بر مشکل کمبود فسفر، راه‌کار زیستی میکروفلور خاک و گیاهان می‌باشد.

فسفاتاز اسیدی نقش اصلی را در معدنی‌سازی فسفر آلی در خاک بازی می‌کند. از آن‌جایی که گیاهان عالی فاقد فعالیت فسفاتاز قلیایی هستند، عمده فسفاتاز قلیایی خاک به ریزجانداران نسبت داده می‌شود (Hart *et al*., 1994). فسفاتازهای میکروبی ممکن است معدنی‌سازی بیشتر ترکیب‌های فسفر آلی را انجام دهد. تولید، فعالیت و انحلال آنزیمی فسفر آلی و معدنی شدن آن تحت تأثیر شرایط خاک از جمله pH، ماده آلی، بافت خاک، کربنات کلسیم، شوری و رطوبت است (Rodríguez & Fraga, 1999).



شکل ۴- تغییرات آنزیم فسفاتاز خاک

Figure 4. Changes in soil phosphatase enzyme

B0: بدون باکتری؛ B1: سطح اول باکتری؛ B2: سطح دوم باکتری؛ C0: بدون کمپوست؛ C1: سطح اول کمپوست؛ C2: سطح دوم کمپوست

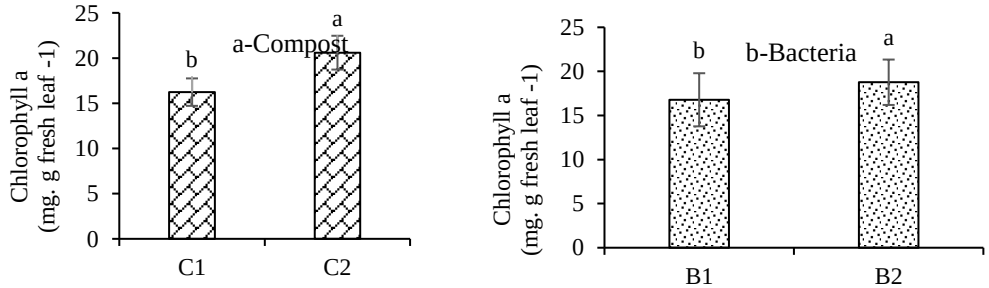
B0: no bacteria; B1: first level of bacteria; B2: second level of bacteria; C0: no compost; C1: First level of compost; C2: Second level of compost

میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون توکی ندارند.

The same letters above each column based on to Tukey, test means there was no significant difference at 5%

کلروفیل a

در شکل ۵ نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده کمپوست (شکل الف) و مایه تلقیح باکتریایی (شکل ب) بر مقدار کلروفیل a نمایش داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود افزایش کمپوست و مایه تلقیح باکتریایی از سطح یک به سطح دو سبب افزایش معنی‌داری کلروفیل a در برگ درختان توت شده است. این کودها سبب افزایش جذب آهن و منیزیم که از کاتیون‌های اصلی کلروفیل هستند می‌شود، بنابراین با افزایش جذب آهن و منیزیم به علت افزایش سطح کمپوست میزان کلروفیل a افزایش یافته است. علت افزایش میزان کلروفیل b در برگ درختان به علت بهبود وضعیت تغذیه گیاه و بهبود شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک است. فلاح و همکاران (Fallah *et al*., 2014) در طی مطالعه‌ای بیان کردند که استفاده از باکتری‌های محرک رشد سبب بهبود در جذب عناصر مانند آهن و پتاسیم می‌شوند. در مطالعات مختلف به اثر مثبت کودهای آلی و باکتری‌های محرک رشد بر میزان کلروفیل برگ اشاره شده است (Biswas *et al*., 2013; Alagawadi & Gaur, 2012: Mirzakhani *et al*., 2009).



شکل ۵- تغییرات کلروفیل a برگ در تیمارهای مختلف (الف) کمپوست و (ب) باکتری

Figure 5. Changes in leaf chlorophyll a in different treatments of (a) compost and (b) bacteria

B0: بدون باکتری؛ B1: سطح اول باکتری؛ B2: سطح دوم باکتری؛ C0: بدون کمپوست؛ C1: سطح اول کمپوست؛ C2: سطح دوم کمپوست

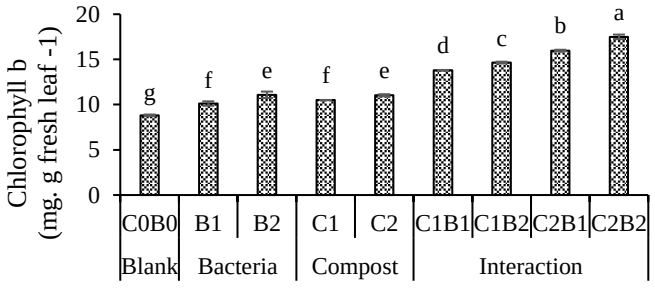
B0: no bacteria; B1: first level of bacteria; B2: second level of bacteria; C0: no compost; C1: First level of compost; C2: Second level of compost

میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون توکی ندارند.

The same letters above each column based on to Tukey, test means there was no significant difference at 5%

کلروفیل b

نتایج مقایسه میانگین اثر کمپوست و مایه تلقیح باکتریایی بر مقدار کلروفیل b در برگ درخت توت در شکل ۶ آمده است. همان‌گونه که مشخص است با افزایش سطح کمپوست و باکتری میزان کلروفیل b افزایش معنی‌داری یافته است. بیشترین مقدار کلروفیل b در تیمار سطح دو باکتری به همراه سطح دو کمپوست معادل ۱۷/۴۹ (میلی گرم بر گرم وزن تر برگ) به دست آمده است. همچنین کمترین مقدار این پارامتر نیز در تیمار شاهد که فاقد کود آلی و مایه تلقیح باکتریایی بوده برابر با ۸/۸۱ (میلی گرم بر گرم وزن تر برگ) اندازه‌گیری شده است.



شکل ۶- تغییرات کلروفیل b برگ

Figure 6. Changes of chlorophyll b of leaf

B0: بدون باکتری؛ B1: سطح اول باکتری؛ B2: سطح دوم باکتری؛ C0: بدون کمپوست؛ C1: سطح اول کمپوست؛ C2: سطح دوم کمپوست

B0: no bacteria; B1: first level of bacteria; B2: second level of bacteria; C0: no compost; C1: First level of compost; C2: Second level of compost

میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون توکی ندارند.

The same letters above each column based on to Tukey, test means there was no significant difference at 5%

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه به بررسی اثر کود آلی کمپوست زباله شهری و باکتری‌های محرک رشد *سودوموناس* بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی برگ توت پرداخته شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که افزودن کود آلی پسماند زباله شهری و مایه تلقیح باکتریایی باعث بهبود وضعیت آنزیمی گیاه شد. نتایج نشان داده است که میزان کلروفیل نیز با افزایش مصرف کودهای آلی و مایه تلقیح باکتریایی بهبود یافته است. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش کودهای آلی و به ویژه مایه تلقیح باکتریایی، سطح آنزیم فسفاتاز در خاک افزایش معنی‌داری داشته است. افزایش آنزیم فسفاتاز در خاک سبب آزاد شدن فسفر پیوند خورده با ذرات آلی و معدنی می‌شود و به عبارتی باعث افزایش فسفر در بخش محلول خاک می‌شود. با افزایش فسفر در بخش محلول گیاه به راحتی می‌تواند فسفر مورد نیاز خود را تامین کند. نتایج مربوط به استفاده از باکتری برای آزاد سازی فسفر این موضوع را به ما نشان می‌دهد که از این کودها می‌توان در جهت تامین نیاز گیاه استفاده کرد بدون آنکه به محیط زیست آسیبی وارد شود. چراکه مصرف بیش از حد و خارج از نیاز گیاه از کودهای نیتروژنی و فسفری باعث آلودگی آب‌های سطحی می‌شود. با توجه به اینکه در استان گیلان موضوع پدیده غنی‌شدن تالاب انزلی به عنوان یک معضل شناخته شده است، استفاده از مایه تلقیح باکتریایی می‌تواند به عنوان یک راهکار اساسی برای کاهش آلودگی تالاب نیز باشد. به طور کلی با توجه به مسایل اقتصادی مربوط به هزینه‌های کود شیمیایی و مسایل زیست محیطی کودهای شیمیایی می‌توان تیمار سطح دوم کمپوست به همراه سطح دوم باکتری را توصیه کرد. نتایج و مقایسات آماری نشان داد که این تیمار نسبت به سایر تیمارها دارای نتایج بهتری است.

References

Abhilash P.C., Dubey R.K., Tripathi V., Gupta V.K., and Singh H.B. 2016. Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends in Biotechnology*, 34 (11): 847-850.

Alagawadi A.R. and Gaur A.C. 2012. Inoculation of Azospirillum brasilense and phosphate solubilizing bacteria on yield of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in dry land. *Tropical Agriculture*, 69: 347-350.

Arnon A.N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23: 112-121.
Ashrafuzzaman M., Hossen F.A., Ismail M.R., Hoque M.A., and Islam M.Z. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancementof rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8: 1247-1252.
Aslani A. and Ahmadi, M. 1996. Silkworm and its diseases. *University Jahad Publications, University of Tehran*. 146 pages. (In Persian)
Aslantas R., Cakmakci R., and Sahin F. 2007. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apples trees growth and fruit yield under orchard conditions. *Scientia Horticulturae*, 111: 371–7.
Ayilara M.S., Olanrewaju O.S., Babalola O.O., and Odeyemi, O. 2020. Waste management through composting: Challenges and potentials. *Sustainability*, 12(11): 4456.
Basiri S.H. 2017. Determination of some of physico-chemical the properties and suitable storage time of concentrated mulberry in Khorasan region. *Food Science and Technology*, 66(14): 175-186. (In Persian)
Beers R.F., and Sizer I.W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1): 133– 140.
Biswas J.C., Ladha J.K., Dazzo F.B., Yanni Y.G. and Rolfe B.G. 2013. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy Journal*, 92: 880-886.
Bouyoucos G.J. 1936. Directions for making mechanical analysis of soils by the hydrometer method. *Soil Science*, 42(3): 225-230.
Boyle M., and Paul E. 1989. Carbon and nitrogen mineralization kinetics in soil previously amended with sewage sludge. *Soil Science Society of America Journal*, 53(1): 99-103.
Chen P., Xie Q., Addy M., Zhou W., Liu Y., Wang Y., Cheng Y., Yanling C., and Ruan R. 2016. Utilization of municipal solid and liquid wastes for bioenergy and bioproducts production. *Bioresource Technology*, 215: 63–172.
Cheng H., Xu W., Liu J., Zhao Q., He Y., and Chen, G. 2007. Application of composted sewage sludge (CSS) as a soil amendment for turfgrass growth. *Ecological Engineering*, 29(1): 96-104.
Cheniany M., Ebrahimzadeh H., Masoudi-Nejad A., Vahdati K., and Leslie C. 2010. Effect of endogenous phenols and some antioxidant enzyme activities on rooting of Persian walnut (*Juglans regia L.*). *African Journal of Plant Science*, 4: 479-487.
Chocano C., García C., González D., de Aguilar J.M., and Hernández T. 2016. Organic plum cultivation in the Mediterranean region: The medium-term effect of five different organic soil management practices on crop production and microbiological soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 221: 60-70.
Chundang P., Thongprajukaew K., Kovitvadhi U., Chotimanothum B., Kovitvadhi A., and Pakkong P. 2020. Improving the nutritive value of mulberry leaves, *Morus spp*. (Rosales: Moraceae) for silkworm larvae, Bombyx mor i (Lepidoptera: Bombycidae) using gamma irradiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 13(1): 629-641.
Cottenie A. 1980. Methods of plant analysis, In: Soil and plant testing: FAO Soils Bulletin 38/2, 120p.
de Melo W.J., de Stefani Aguiar P., de Melo G.M.P., and de Melo V.P. 2007. Nickel in a tropical soil treated with sewage sludge and cropped with maize in a long-term field study. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(6): 1341-1347.
Duke J.A. 1983. Handbook of Energy Crops, Center for New Crops & Plants Products, Purdue University. Gerasopoulos D. and Stavroulakis G. 1997. Quality characteristics of four mulberry (*Morus spp*.) cultivars in the area of Chania Greece. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73: 261–264.
Fallah A., Momeni S., and Shariati S. 2014. Effect of PGPR biofertilizers on the qualitative and quantitative yield parameters of wheat (*Triticum aestivum*). *Applied Soil Research*, 2(1): 103- 114.
Fukami J., Ollero F.J., and de la Osa C. 2018. Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with Azospirillum brasilense. *Archives of Microbiology*, 200: 1191–1203.
Garcia C., Hernandez T., and Costa F. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28(1-2): 123-134.
Giannopolitis C.N., and Ries S.K. 1977. Superoxide dismutases I. occurrence in higher plants. Pl. *Physiology*, 59: 309-314.

Glick B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169: 30-39.

Hart S., Stark J., Davidson E., Firestone M., Weaver R., Angle S., Bottomley P., Bezdiecek D., Smith S., and Tabatabai A. 1994. Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties. *Soil Science Society of America, Madison, Wis*, 985-1017.

Heidari M., and Golpayegani A. 2012. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum L.*). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11: 57–61.

Heshmati S., Amini Dehaghi M., and Fathi Amirkhiz K. 2016. Effect of Chemical and Biological Phosphorus on Antioxidant Enzymes Activity and Some Biochemical Traits of Spring Safflower (*Carthamus tinctorius L.*) under Water Deficit Stress Conditions. *Journal of Crop Production and Processing*, 6(19): 203-214. (In Persian)

Hirayama M., Wada Y., and Nemot H. 2006. Estimation of drought tolerance based on leaf temperature in upland rice breeding. *Breeding Science*, 56: 47-54.

Jiang Y., and Huang B. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turf grasses in relation to antioxidant metabolisms and lipid peroxidation. *Crop Science*, 41(2): 436-442.

Karami Chame S., Khalil Tahmasbi B., ShahMahmoodi P., Abdollahi A., Fathi A., Seyed Mousavi S.J., and Bahamin S. 2016. Effects of salinity stress, salicylic acid and pseudomonas on the physiological characteristics and yield of seed beans (*Phaseolus vulgaris*). *Scientia*, 14(2): 234-238.

Khalid A., Arshad M., and Zahir Z.A. 2006. Phytohormones: Microbial production and applications, P 207-220. In: Uphoff N., Ball A.S., Fernandes E., Herren H., Husson O., Laing M., Palm C., Pretty J., Sanchez P., Sanginga N., and Thies J. (Eds.), Biological Approaches to Sustainable Soil System, Florida, USA.

King E.O., Ward M.K., and Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Translational Research*, 44(2): 301-307.

Kochian L.V., Pineros M.A., Liu J., and Magalhaes J.V. 2015. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. Annual Review of Plant Biology, 66: 571–598.

Kose C., Guleryuz M.S. and Demirtas I. 2005. Effects of some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on graft union of grapevine. *Journal of Sustainable Agriculture*, 26: 139–47.

Krawczyk K., and Łochyńska M. 2020. Identification and characterization of Pseudomonas syringae pv. mori affecting white mulberry (*Morus alba*) in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 158(1): 281-291.

Kumar A., Maurya B.R., Raghuwanshi R. 2014. Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatalysis Agric Biotechnol*, 3: 121–8.

Lavakush Y.J., Verma J.P., and Jaiswal D.K. 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). *Ecological Engineering*, 62: 123–8.

Mahmudi Mimand B.M., Saberi-Riseh R., Moradi M., Alaei H., and Mohamadi A.H. 2016. Induction of plant defense response against Phytophthora crown and root rot in pistachio by Pseudomonas fluorescens strains. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, *47*(1): 93-105

Malboobi M.A., Owlia P., Behbahani M., Sarokhani E., Moradi S., Yakhchali B., Deljou A., and Heravi K.M. 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8): 1471-1477.

Marhual N.P., Pradhan N., Mohanta N.C., Sukla L.B., and Mishra B.K. 2011. Dephosphrization of LD slag by phosphorus solubilising bacteria. *International Bio deterioration & Bio degradation*, 65: 404-409.

Masciarelli O., Llanes A., and Luna V. 2014. A new PGPR co-inoculated with Bradyrhizobium japonicum enhances soybean nodulation. *Microbiological Research*, 169: 609–15.

Mirzakhani M., Ardakani M.R., Aeene Band A., Shirani A. H. and Rejali F. 2009. Dual inoculation of Azotobacter and Mycorrhiza with nitrogen and phosphorus fertilizer rates on grain yield and some of characteristics of spring safflower. Proceeding of international conference on energy and environment. March 19-21. pp: 729-733

Mohammadi M., and Kazemi H. 2002. Changes in peroxidase and Polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated whit Fusarim germinearum and induced resistance. *Plant Science*, 162(4): 491- 498.

Naseri R., Barari M., Zarea M., Khavazi K., and Tahmasebi Z. 2017. Effect of plant growth promoting bacteria and Mycorrhizal fungi on growth and yield of wheat under dryland conditions. *Journal of Soil Biology*, 5(1): 49-66. (In Persian)

Oleńska E., Małek W., Wójcik M., Swiecicka I., Thijs S., and Vangronsveld J. 2020. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Science of the Total Environment*, 140682.

Orhan E., Esitken A., Ercisli S., Turan M., and Sahin F. 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, 111(1): 38-43.

Page A.L., Miller R.H., and Keeney D.R. 1982. Methods of soil analyses. *American Soil Science Agronomy Monograph*, 1159p.

Pereira S.I.A., Abreu D., Moreira H., Vega A., and Castro, P.M.L. 2020. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and nutrient use efficiency in maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. *Heliyon*, 6(10): e05106.

Qaddoury A., and Amssa M. 2003. Endogenous phenolic contents: peroxidase and polyphenoloxidase activities in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) offshoots related to rooting ability. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25: 417-421.

Rahimi M., Rahimi G., Ebrahimi E., and Moradi S. 2021. Assessing the distribution of cadmium under different land-use types and its effect on human health in different gender and age groups. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.

Reyes I., Bernier L., Simard R.R., Tanguay P., and Antoun H. 1999. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical Penicillium rugulosum and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(3): 291-295.

Rodríguez H., and Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4): 319-339.

Satish J., Raveendran P., and Rokade N. 2008. Changes in polyphenol oxidase activity during rooting of hardwood cuttings in three grape rootstocks under Indian condition. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 29: 94-97.

Sayara T., Basheer-Salimia R., Hawamde F., and Sánchez A. 2020. Recycling of Organic Wastes through Composting: Process Performance and Compost Application in Agriculture. *Agronomy*, 10(11): 1838.

Shahrestani N. 1998. Berry fruits of IRAN. University of Guilan. 131-150. (In Persian)

Soobhany N. 2019. Insight into the recovery of nutrients from organic solid waste through biochemical conversion processes for fertilizer production: A review. *Journal of Cleaner Production*, 241: 118413.

Sparks D.L., Helmke P., and Page A. 1996. Methods of soil analysis: Chemical Methods. *Soil Science Society of America Journal.*

Tiepo A.N., Constantino L.V., Madeira T.B., Gonçalves L.S.A., Pimenta J.A., Bianchini E., de Oliveira A.L., Oliveira H.C., and Stolf-Moreira R. 2020. Plant growth-promoting bacteria improve leaf antioxidant metabolism of drought-stressed Neotropical trees. *Planta*, 251(4): 1-11.

Tuna A., Kaya C., Dikilitas M., and Higgas D. 2008. The combined effects of gibberellin acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 1-9.

Walkley A., and Black I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1): 29-38.

Wang X, Sato T, Xing B, Tao S. 2005. Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish. Sci Total Environ, 350: 28–37.

Zheng T.Z., Tan Y.F., Huang G.X., and Fan H.B. 1988. Mulberry cultivation. FAO Agricultural Services Bulletin, pp. 1-127.

Evaluation of the Effect of Plant Growth Promoting Bacteria and Municipal Waste Compost on Enzyme Changes in Mulberry Leaf

Eisa Ebrahimi[1*], Reza Sourati Zanjani[2], Hassan Hassani Kumleh[3], Mohammad Hossien Rezadoost[4], Esmaeil Kamran[5], Uosef Khirkhah Rahim Abadi[6], Shahla Nematollahian[7]

(Received: 2021 May Accepted: 2022 February)

Abstract

Mulberry is a single-stemmed tree, growing in a variety of climates. Mulberry leaves are the main source of food for silkworm, which plays a key role in silk industry. In recent decades, since the use of chemical fertilizers has caused many environmental problems, the application of organic and bio-fertilizers has increased significantly. The current study aimed to investigate the impact of growth promoting bacteria and municipal waste on enzyme changes in mulberry leaves as well as soil phosphatase enzyme. For this research, 27 mulberry seedlings were collected from Iran Silk Research Centre. This research was conducted as a completely randomized design with three replications in the research greenhouse of Guilan University. In this study, the treatments used included two levels of municipal waste (two and four percent), two levels of *Pseudomonas* sp. inocula (10^6 and 5×10^6 cells per liter) and control sample. Catalase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase, chlorophyll a and b in mulberry leaves were measured and also soil phosphatase was determined. The results indicated that the application of bacteria inocula led to the increment in the amount of soil phosphatase enzyme. The results also showed that the amount of superoxide dismutase enzyme were increased from 77.2 in the control treatment to 276 µmol/g of fresh leaf tissue in the higher level of compost and bacteria treatment (second level). Furthermore, the highest amount of this enzyme was equal to 0.16 ($\mu mol \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$ wet weight), which was observed in the higher level of *Pseudomonas* sp. inoculum (5×10^6) along with the higher level of organic fertilizer (4%). In general, the results demonstrated that a combination of organic fertilizer and beneficial bacteria inocula can be used instead of chemical fertilizers to provide the elements required by the mulberry plant.

Keywords: Nutrition, Pseudomonas, Organic matter, Polyphenol oxidase, Superoxide dismutase

Ebrahimi E., Sourati Zanjani R., Hassani Kumleh H, Rezadoost M R., Kamran E., Khirkhah Rahim Abadi U., Nematollahian Sh. 2023. Evaluation of the effect of plant growth promoting bacteria and municipal waste compost on enzyme changes in mulberry leaf. *Applied Soil Research*, 11(1):73-86.

1.Ph. D. Physics and conservation Soil, Center of Elites and Top Talents of the Armed Forces, Iran silkworm research center, Guilan, Rasht Iran silkworm research center, Guilan, Rasht
2.Assistant Professor Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht
3.Assistant Professor Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht
4.Iran silkworm research center, Guilan, Rasht
5.Iran silkworm research center, Guilan, Rasht
6.Iran silkworm research center, Guilan, Rasht
7. Iran silkworm research center, Guilan, Rasht
* Corresponding Author Email: Ebrahimi.soilphysic@yahoo.com