



The reaction of *Eryngium campestre* plant to glycine, nitroxine and humic acid and investigating the effect of its extract on dealing with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria

Zeinab Nasrollahnejad¹, Khodayar Hemmati^{1*} , Mehrdad Babarabie²

¹ Department of Horticultural Science and Landscape Engineering, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: Kh_hemmati@gau.ac.ir

² Department of Agriculture, Minab Higher Education Center, University of Hormozgan, Bandarabbas, Iran.

Article type:

Research article

Abstract

Eryngium campestre is a biennial herbaceous plant native to northern Iran. Nowadays, the use of chemical fertilizers has increased significantly, which has irreparable effects on the environment and human health. The use of organic compounds and biofertilizers instead of chemical fertilizers has recently received much attention. Also, it is more important to study about natural substances that contain more antimicrobial properties and less side effects, such as plant extracts. For this purpose, an experiment was conducted. This experiment was conducted in Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources in 2019-2020 in a factorial format based on a completely randomized design with 3 replications. The treatments included: nitroxin (0, 1 and 2 ml/l), humic acid (0, 1 and 2 ml/l), glycine (0, 75 and 150 mg/l). The measured traits included total phenol, total flavonoid, antioxidant activity, total sugar, chlorophyll, carotenoid and activity of catalase and peroxidase enzymes. The effect of glycine on the measured traits was significant except flavonoids and catalase enzyme activity at 5 and 1% levels. Also, the effect of nitroxin on the measured traits was significant at the level of 1%. The effect of humic acid on the measured traits was significant except for the amount of antioxidant activity, chlorophyll and catalase enzyme activity at the level of 5 and 1%. Also, the interaction effect of all three treatments on the measured traits except catalase enzyme was significant at 1% level. In general, the results showed that the treatments used in this research, individually and in combination (interaction effect), increased most of the measured traits. Also, an experiment was conducted regarding the effect of *Eryngium campestre* extract on the population of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The results showed that *Eryngium campestre* extract did not inhibit the bacteria. In general, the results showed that the used compounds can be used to improve the biochemical characteristics of the *Eryngium campestre*.

Article history

Received: 06-7-2023

Revised: 26-8-2023

Accepted: 17-9-2023

Keywords

Biological fertilizers

Eryngium campestre

Nitroxin

Pseudomonas aeruginosa

Staphylococcus aureus

Cite this article as: Nasrollahnejad, Z., Hemmati, Kh., Babarabie, M. (2023). The reaction of *Eryngium campestre* plant to glycine, nitroxine and humic acid and investigating the effect of its extract on dealing with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants.*, 11(3):99-114.



©The author(s)

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

Doi: 10.30495/ejmp.2023.1990721.1737 Dor: 20.1001.1.23223235.1402.11.3.7.2



انجمن گیاهان دارویی ایران
ثابت ۱۸۹۶۳

اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی

شاپا چاپی: ۳۳۳۵-۲۳۲۲
شاپا الکترونیکی: ۴۶۹۷-۲۷۸۳



دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

بررسی واکنش گیاه دارویی زولنگ (*Eryngium campestre*) به گلايسين، نیتروکسین و اسید هیومیک و تاثیر ضد باکتریایی عصاره آن بر *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و

زينب نصراله‌نژاد قمی^۱، خدايار همتی^{۱*}، مهرداد باباربيع^۲

^۱ گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: Kh_hemmati@gau.ac.ir
^۲ گروه کشاورزی، مجتمع آموزش عالی میناب، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

| نوع مقاله: | چکیده |
|--|---|
| مقاله پژوهشی | زولنگ (<i>Eryngium campestre</i>) یک گیاه علفی دو یا چندساله بومی مناطق شمال ایران می‌باشد. امروزه مصرف کودهای شیمیایی به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است که اثرات جبران ناپذیری بر محیط زیست و سلامت بشر دارد. استفاده از ترکیبات آلی و کودهای زیستی به‌جای کودهای شیمیایی اخیراً بسیار مورد توجه گرفته است. همچنین مطالعه درباره مواد طبیعی که حاوی خاصیت ضد میکروبی بیشتر و عوارض کمتر هستند، مثل عصاره گیاهان اهمیت بیشتری دارد. بدین منظور آزمایشی انجام شد. این آزمایش در سال ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار صورت گرفت. تیمارها شامل: نیتروکسین (صفر، ۱ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر)، اسید هیومیک (صفر، ۱ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر)، گلايسين (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. بر اساس نتایج، تاثیر گلايسين بر صفات اندازه‌گیری شده به جز فلاونوئید کل و فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۵ و ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین تاثیر نیتروکسین بر صفات اندازه‌گیری شده در سطح ۱ درصد اثر معنی‌دار داشت. تاثیر اسید هیومیک بر صفات اندازه‌گیری شده به جز میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کلروفیل و فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۵ و ۱ درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل هر سه تیمار بر صفات اندازه‌گیری شده به جز آنزیم کاتالاز، در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. به طور کلی نتایج نشان داد که تیمارهای بکار رفته در این پژوهش، به صورت جداگانه و به صورت ترکیبی (اثر متقابل) میزان اکثر صفات اندازه‌گیری شده را افزایش دادند. همچنین آزمایشی در خصوص اثر ضد میکروبی عصاره زولنگ علیه جدایه‌های باکتری <i>Pseudomonas aeruginosa</i> و <i>Staphylococcus aureus</i> با استفاده از روش‌های MIC و MBC انجام شد. مشخص گردید که عصاره زولنگ باعث مهار شدن باکتری‌ها نگردید. به طور کلی نتایج نشان داد که ترکیبات بکار رفته قابلیت استفاده برای بهبود صفات بیوشیمیایی گیاه زولنگ را دارند. |
| واژه‌های کلیدی: | |
| اسید هیومیک | |
| زولنگ | |
| کودهای زیستی | |
| نیتروکسین | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> | |
| استناد: نصراله‌نژاد قمی، زينب؛ همتی، خدايار؛ باباربيع، مهرداد. (۱۴۰۲). بررسی واکنش گیاه دارویی زولنگ (<i>Eryngium campestre</i>) به گلايسين، نیتروکسین و اسید هیومیک و تاثیر ضد باکتریایی عصاره آن بر <i>Staphylococcus aureus</i> و <i>Pseudomonas aeruginosa</i> فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۱۱ (۳)، ۹۹-۱۱۴. | |
| ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان | |
| Doi: 10.30495/ejmp.2023.1990721.1737 | |
| Dor: 20.1001.1.23223235.1402.11.3.7.2 | |
| © نویسنده‌گان. | |

2008). علاوه بر تثبیت نیتروژن از تو باکتر و آزوسپریلیوم در محیط اطراف ریشه با تولید هورمون-های محرک رشد از قبیل اکسین، جیبرلین، سیتوکنین، ایندول استیک اسید، ویتامین‌های گروه B و سیدروفورها و همینطور با افزایش حلالیت و جذب عناصر غذایی مانند آهن، فسفر و روی به تقویت گیاه کمک می‌کنند (Rouzbeh et al., 2009) گزارش شده است بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی همیشه بهار با مصرف باکتری‌های ازتوباکتر و آزوسپریلیوم حاصل گردید (Zaferanch et al., 2019).

در بین کودهای سازگار با طبیعت، اسید هیومیک به‌عنوان یک اسید آلی عاری از اثرات مخرب زیست محیطی و دارا بودن ترکیبات هورمونی، منجر به بهبود ساختار فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک شده و همچنین اثرات مثبت قابل توجهی بر صفات کمی و کیفی محصولات کشاورزی دارد (Sabzevari and Abedini (Khazaie. 2009; Sabzevari et al., 2010 و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند کاربرد غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک باعث افزایش فنل کل در گیاه همیشه بهار گردید. که آن‌ها علت این امر را بالارفتن سطوح ترکیبات فنولی در اثر افزایش فعالیت و میزان آنزیم بیوستتزی فنل‌ها (فنیل آلانین آمونیاپاز) گزارش کردند. نتایج تحقیق Mozafari و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد مصرف ۶۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک به‌صورت محلول با آب میزان فنل کل، قند، کارتنوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه خرفه را نسبت به شاهد افزایش داد.

اسید آمینه گلایسین یک ترکیب آمفوتریک^۲ (اسیدی- بازی) است (Bohnert and Jensen, 1996). گلایسین قدرت حل‌شوندگی زیادی دارد که خصوصیت‌های این اسید آمینه مانند ترکیب‌های آنزیمی و پروتئینی این اجازه را به آن می‌دهد که با

زولنگ یک گیاه علفی دو یا چندساله بومی مناطق شمال ایران با نام علمی (*Eryngium campestre*) از خانواده چتریان^۱ می‌باشد (Omidi and Abdolmohammadi, 2022). این گیاه دارویی از سالیان دور مورد توجه بومیان منطقه شمالی کشور بوده و حاوی اسانس معطر است که در غذاهای بومی شمال ایران مصرف زیادی دارد. طبق مطالعات انجام گرفته روی چندین گونه زولنگ مشخص شده است که این گیاه حاوی ترکیبات اسانسی، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، پلی استیلن‌ها و استروئیدها می‌باشد (Wang et al., 2012). زولنگ شمال ایران به‌عنوان سبزی مقوی، محرک، اشتها آور مدر ضد التهاب و ضد عفونی کننده، در درمان کم خونی عفونت‌های گوارشی و سنگ کلیه در بین بومیان این مناطق ارزش فوق‌العاده‌ای داد (Nabavi et al., 2008).

امروزه مصرف کودهای شیمیایی به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است که اثرات جبران ناپذیری بر محیط زیست و سلامت بشر دارد. برای رهایی از این مشکلات و مدیریت حاصل‌خیزی و باروری خاک و همچنین تلاش برای افزایش تولید محصول و رسیدن به کشاورزی پایدار، استفاده از کودهای زیستی به‌جای کودهای شیمیایی اخیراً بسیار مورد توجه گرفته است (Ahmad et al., 2011).

نیتروکسین نوعی کود زیستی مایع است که شامل بهترین و موثرترین باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و محرک رشد از جنس ازتوباکتر و آزوسپریلیوم می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها نیتروژن موجود در جو را به فرم آمونیوم (نیتروژن معدنی) که فرم قابل جذب برای گیاه می‌باشد در می‌آورند و به سیستم رشد گیاه انتقال می‌دهند (Amoaghaei and Mostageran, 2011).

گزنه، بابا آدم و بولغ اوتی اثر ضد میکروبی و التیام بخش روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشتند (Hashemi Olia et al., 2018). سودوموناس آئروژینوزا یک نوع باکتری گرم منفی، متحرک، هوازی و باسیلی شکل است که از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیماری‌زای انسانی در جنس سودوموناس است و امروزه به‌عنوان یک عامل فرصت طلب عفونت اکتسابی بیمارستانی مطرح می‌باشد (Motaghi and Mojafipour, 2016). این باکتری در طیف گسترده‌ای از محیط‌ها که محل فعالیت انسان است زندگی می‌کند (Aslani et al., 2009) هدف از انجام این پژوهش بررسی گلايسين، اسید هیومیک و نیتروکسین بر صفات بیوشیمیایی گیاه زولنگ و همچنین تاثیر عصاره آن با کمک نانوحامل‌ها بر روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: این آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ انجام شد. تیمارها شامل نیتروکسین (صفر، ۱ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر)، اسید هیومیک (صفر، ۱ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر) و گلايسين (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) بوده است. برای تهیه نشا مورد نیاز، بذور گیاه زولنگ از شرکت نوآوران مهرگل گلستان تهیه شد. نیتروکسین و اسید هیومیک نیز از شرکت نیو آگرو اراک و اسید آمینه گلايسين از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. صفات اندازه‌گیری شده شامل فنول کل، فلاونوئید، درصد مهار رادیکال‌های آزاد، کلروفیل، کارتنوئید، قند کل، فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز بودند.

مولکول‌های آبدوست و چربی دوست واکنش دهد (Savari et al., 2009). گلايسين در شکل‌گیری رشد رویشی و کلروفیل نقش مهمی دارد. این ماده همچنین از طریق ایجاد سهولت در جذب، و حمل و نقل عناصر غذایی در سیستم آوندی گیاه از طریق نفوذپذیری غشای سلولی برای گیاه، بر جذب برخی عناصر مغذی تأثیر قابل توجهی دارد (Ghasemi et al., 2013). طبق گزارش Aloulou و همکاران (۲۰۲۰) کاربرد غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار اسید آمینه گلايسين میزان کلروفیل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و همچنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز کارلا را افزایش داد. در مطالعه‌ای دیگر Kanechi و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند مصرف گلايسين در گوجه فرنگی موجب افزایش میزان فتوسنتز و به دنبال آن افزایش قند شد.

پس از گذشت چندین دهه از اولین بیماری که با آنتی‌بیوتیک درمان شد به‌علت شیوع بالای عفونت‌های بیمارستانی و به‌روز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها عفونت‌های بیمارستانی به یک تهدید جدی تبدیل شدند (Seidler, 1975). به همین دلیل امروزه سعی می‌شود از روش‌های جدید برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری استفاده شود و در این راستا مطالعه درباره مواد طبیعی که حاوی خاصیت ضد میکروبی بیشتر و عوارض کمتر هستند، مثل عصاره گیاهان اهمیت بیشتری دارد و این مواد طبیعی به‌عنوان یک دارو به‌دلیل ارزان و مقرون به‌صرف بودن و غیر مضر بودن برای محیط زیست می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. استافیلوکوکوس اورئوس، باکتری گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری و یکی از معضلات بهداشت عمومی و عوامل عفونت‌های بیمارستانی است که به خاطر افزایش مقاومت آن به عوامل ضد میکروبی، شیوع آن رو به ازدیاد است. بر اساس نتایج پژوهشی مشخص شد عصاره گیاهان

میزان فنل کل: اندازه‌گیری میزان فنل کل به روش فولین سیوکالتیو انجام شد. به این منظور ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده‌ی هر تیمار توسط سمپلر در لوله‌های آزمایش ریخته شد و به هر عصاره ۱/۱۶ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد، سپس به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین اضافه شد و لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. پس از ۵ دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به محلول‌ها اضافه شد. بعد از آن نمونه‌ها در بن‌ماری با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شده و در نهایت عدد جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. از آنجایی که اعداد به‌دست آمده برای فنول باید با استفاده از منحنی استاندارد واقعی شوند، بنابراین از گالیک اسید به‌عنوان استاندارد استفاده شد و غلظت‌های مختلف از اسید گالیک (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تهیه شد و پس از خواندن عدد جذب غلظت‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر منحنی استاندارد رسم شد. با استفاده از معادله خط به‌دست آمده (رابطه ۱) از منحنی استاندارد غلظت فنول برای تیمارها محاسبه شد (Li et al., 2007).

$$\text{رابطه ۱: } y=0.0033x-0.0304$$

میزان فلاونوئید کل: برای اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل از روش نورسنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. که در این روش ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره هر تیمار به کمک پیپت در لوله‌های آزمایش ریخته شد و سپس به هر عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪ (۱۰ گرم آلومینیوم کلرید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار (۲/۴۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس محلول‌ها به مدت نیم ساعت در تاریکی قرار گرفتند و پس از آن

عدد جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. جهت تهیه استاندارد نیز غلظت‌های مختلف (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰) از کوئرستین تهیه شد و بعد از خواندن عدد جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر منحنی استاندارد رسم شد. با استفاده از معادله خط (رابطه ۲) به‌دست آمده از منحنی استاندارد غلظت فلاونوئید برای تیمارها محاسبه شد (Chang et al., 2002).

$$\text{رابطه ۲: } y=0.002x+0.0942$$

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش (DDPH)، ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره هر تیمار با ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول متانولی DDPH در لوله‌های آزمایش مخلوط شدند. برای نمونه شاهد نیز به جای عصاره از ۰/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد و مقدار مشابه رادیکال استفاده شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و در انتها جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد و درصد مهار رادیکال‌های آزاد نمونه‌ها بر حسب درصد نسبی DDPH طبق رابطه ۳ انجام شد (Miliauskas et al., 2004).

$$\text{رابطه ۳: } \frac{\text{درصد جذب نمونه} - \text{درصد جذب شاهد}}{\text{درصد جذب شاهد}} \times 100$$

DPPH درصد

میزان کلروفیل و کارتنوئید به روش آرنون اندازه‌گیری شد (Arnon, 1949) جهت اندازه‌گیری قند کل از روش آنترون استفاده شد (Mocreadye et al., 1950).
فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز ابتدا ۰/۵ گرم از برگ تازه هر تیمار با یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۵ مولار و پلی وینیل پلی پیرولیدون (PVPP) دو درصد افزوده، در هاون چینی در زیر یخ له شدند و سپس مخلوط حاصل به

زولنگ انکپسوله شده در نانوذرات با تعیین MIC (Minimum Inhibitory Concentration) و MBC (Minimum Bacteriocidal Concentration) ارزیابی شد. جهت انجام تست MIC برای هر دو عصاره زولنگ (عصاره انکپسوله شده و عصاره معمولی) ۱۶ لوله به صورت جداگانه قرار داده شد و عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف (از ۵۰۰۰۰ ppm تا ۱/۵ ppm) به محیط کشت اضافه شدند. همچنین سوسپانسیون باکتری‌ها شامل 10^8 CFU/mL تهیه و به لوله‌ها اضافه شد. سپس در طول دوره رشد، رشد باکتری در فاصله زمانی ۵ تا ۲۵ ساعت با دستگاه OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و تعداد باکتری‌ها با شمارش تعداد کلونی در طول درمان با عصاره زولنگ ثبت شدند. برای تعیین MBC متعاقباً ۱۰ میکرولیتر از لوله‌های قبل، بر روی محیط کشت در پلیت‌ها، کشت داده شدند و در آنکوباتور در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت برای هر پاتوژن انکوبه شدند و MBC تعیین شد (Parivar et al., 2012).

تجزیه تحلیل داده‌ها با نرم افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون LSD انجام شد.

نتایج

فنل کل: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر جداگانه و اثر متقابل تیمارهای مورد استفاده بر فنل کل در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). بیشترین میزان فنل کل مربوط به اثر متقابل (گلایسین صفر، نیتروکسین ۲ میلی‌لیتر در لیتر و اسید هیومیک ۱ میلی‌لیتر در لیتر) بود. کمترین میزان فنل کل مربوط به شاهد بود (جدول ۲).

فلاونوئید کل: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر جداگانه تیمارهای مورد استفاده (به جز گلایسین) و اثر متقابل تیمارها بر میزان فلاونوئید کل در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). بیشترین میزان فلاونوئید کل مربوط به اثر متقابل (گلایسین ۱۵۰ گرم

میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند. پس از آن میکروتیوپ‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴- درجه سلسیوس با دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (مدل سیگما ساخت آمریکا) شدند. پس از سانتریفیوژ، از محلول رویی هر تیمار برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز و پراکسیداز استفاده شد (Nakano and Asada, 1981).

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه: برای تهیه عصاره اتانولی زولنگ جهت تعیین اثر آن بر باکتری مورد نظر، ابتدا ۷۰ گرم از برگ پودر شده گیاه با ۷۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت عصاره با کاغذ صافی، صاف شد و در مرحله بعد از دستگاه روتاری (مدل JKA, HB10, ساخت آلمان) برای غلیظ شدن عصاره و حذف حلال در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت استفاده گردید. سپس جهت خشک شدن کامل، عصاره غلیظ شده به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز درایر Freeze Dryer مدل Beta 2-8 LDplus ساخت آلمان قرار گرفت (Raeisi et al., 2017). ابتدا عصاره خشک شده با حلال اتانول رقیق شد و سپس به داخل کپسول ساخته شده از tween80 و span85 و لپید squalene تزریق شد که عصاره به صورت محلول پلیمری آلی به شکل یک فاز آبی و روغنی خارجی امولسیون شد. به این صورت که کاربرد سورفاکتانت‌های tween80 و span85 منجر می‌شوند تا مولکول‌های آبدوست عصاره در قسمت خارجی و مولکول‌های چربی دوست در قسمت داخلی کپسول حاوی عصاره قرار بگیرند و همچنین این سورفاکتانت‌ها از رسوب و دوفاز شدن عصاره جلوگیری می‌کنند. برای کشت سلول باکتریایی و بررسی اثر ضد میکروبی، باکتری سودوموناس آروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط LB (Luria-Bertani broth) در حضور یا عدم حضور عصاره زولنگ رشد داده شد. اثر ضد میکروبی عصاره

در لیتر، نیتروکسین ۲ میلی لیتر در لیتر و اسید هیومیک ۱ میلی لیتر در لیتر) و کمترین میزان فلانوئید کل مربوط به شاهد بود (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر گلايسين و کودهای زیستی بر صفات بیوشیمیایی گیاه زولنگ.

| منابع تغییرات | درجه آزادی | فنل کل | فلانوئید | درصد مهار رادیکال‌های آزاد | قند کل |
|-------------------------------|------------|---------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| گلايسين | ۲ | ۱/۲۵۶** | ۰/۰۶۹ ^{NS} | ۸/۷۴۵** | ۱۱۸/۶۹۴** |
| نیتروکسین | ۲ | ۲/۶۴۳** | ۰/۰۴۱** | ۱۵/۶۷۷** | ۵۶/۹۰۹** |
| اسید هیومیک | ۲ | ۳/۲۲۵** | ۰/۰۰۷** | ۰/۵۷۴ ^{NS} | ۲۵/۹۰۳** |
| گلايسين×نیتروکسین | ۴ | ۰/۹۵۸** | ۰/۰۲۹** | ۱۸/۱۱۰** | ۶/۴۱۷ ^{NS} |
| گلايسين×اسید هیومیک | ۴ | ۱/۶۵۰** | ۰/۰۲۲** | ۵/۱۲۴* | ۴۶/۸۵۱** |
| نیتروکسین×اسید هیومیک | ۴ | ۱/۱۷۱** | ۰/۰۰۸** | ۱۴/۵۳۸** | ۳۵/۶۶۸** |
| گلايسين×نیتروکسین×اسید هیومیک | ۸ | ۰/۹۲۴** | ۰/۰۲۱** | ۱۱/۷۴۰** | ۲۴/۴۵۴** |
| خطا | ۵۲ | ۰/۰۲۵ | ۰/۰۰۷ | ۱/۶۷۲ | ۲/۹۸۲ |
| ضریب تغییرات (درصد) | - | ۲/۶۱۰ | ۲/۰۰۱ | ۱/۵۸۳ | ۲/۶۴۱ |

*، ** و ^{NS}: به ترتیب، اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد، اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد و عدم معنی داری.

جدول ۲- مقایسه میانگین تاثیر گلايسين و کودهای زیستی بر صفات بیوشیمیایی گیاه زولنگ.

| تیمار | فنل کل (میلی گرم بر گرم وزن خشک گیاه) | فلانوئید کل (میلی گرم بر گرم وزن خشک گیاه) | فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد نسبی DPPH) | قند کل (میلی گرم بر گرم وزن تر گیاه) |
|--------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|--------------------------------------|
| G1N1H1 | ۵/۲۱۱ ^m | ۱/۱۳۸ ^o | ۷۵/۸۵۶ ⁱ | ۶۳/۳۷۰ ^g |
| G1N1H2 | ۶/۵۳۰ ^d | ۱/۳۶۳ ^g | ۸۰/۵۷۳ ^f | ۷۰/۵۷۰ ^b |
| G1N1H3 | ۵/۹۸۴ ^h | ۱/۳۳۶ ^h | ۸۰/۴۸۶ ^f | ۶۴/۳۴۰ ^f |
| G1N2H1 | ۵/۲۸۶ ^l | ۱/۲۷۵ ^{jk} | ۸۴/۴۷۰ ^a | ۶۷/۷۲۶ ^d |
| G1N2H2 | ۶/۰۲۹ ^h | ۱/۴۵۲ ^c | ۸۱/۵۱۶ ^d | ۶۵/۶۱۰ ^e |
| G1N2H3 | ۶/۴۴۲ ^e | ۱/۳۳۶ ^h | ۸۱/۲۰۳ ^d | ۶۲/۰۵۰ ^h |
| G1N3H1 | ۵/۹۶۲ ^{hi} | ۱/۳۰۵ ⁱ | ۸۳/۵۵۶ ^b | ۶۴/۸۱۶ ^f |
| G1N3H2 | ۷/۳۸۳ ^a | ۱/۴۲۹ ^{cd} | ۸۱/۰۰۳ ^c | ۶۸/۸۶۶ ^c |
| G1N3H3 | ۶/۸۶۸ ^c | ۱/۴۷۹ ^b | ۸۲/۵۰۶ ^c | ۶۷۰۶۳ ^d |
| G2N1H1 | ۵/۵۲۰ ^j | ۱/۲۸۱ ^j | ۸۱/۷۹۳ ^d | ۶۴/۳۳۳ ^f |
| G2N1H2 | ۷/۳۵۳ ^a | ۱/۴۴۱ ^c | ۸۰/۵۶۰ ^f | ۶۷/۷۲۰ ^d |
| G2N1H3 | ۵/۳۲۹ ^l | ۱/۲۰۸ ^m | ۸۴/۴۵۳ ^a | ۶۵/۷۹۶ ^e |
| G2N2H1 | ۷/۲۴۵ ^b | ۱/۴۱۰ ^{de} | ۸۰/۹۶۶ ^f | ۶۸/۷۱۳ ^c |
| G2N2H2 | ۶/۲۴۵ ^f | ۱/۴۰۱ ^e | ۸۳/۴۱۳ ^b | ۶۳/۵۲۳ ^g |
| G2N2H3 | ۷/۲۰۳ ^b | ۱/۲۹۵ ^{ij} | ۷۹/۷۲۰ ^g | ۶۶/۷۲۶ ^d |
| G2N3H1 | ۶/۴۰۹ ^e | ۱/۳۲۳ ^h | ۸۲/۵۹۶ ^c | ۶۵/۵۵۶ ^e |
| G2N3H2 | ۶/۲۳۹ ^f | ۱/۳۸۳ ^f | ۷۷/۹۲۶ ^h | ۶۵/۰۷۳ ^e |
| G2N3H3 | ۶/۲۶۶ ^f | ۱/۳۸۲ ^f | ۸۱/۷۶۰ ^d | ۷۶/۹۰۶ ^a |
| G3N1H1 | ۷/۲۷۳ ^b | ۱/۱۷۴ ⁿ | ۸۱/۹۴۶ ^d | ۶۰/۷۴۰ ⁱ |
| G3N1H2 | ۵/۲۳۳ ^{lm} | ۱/۳۸۳ ^f | ۸۱/۸۷۰ ^d | ۶۲/۱۴۶ ^h |
| G3N1H3 | ۵/۴۱۴ ^k | ۱/۴۰۷ ^{de} | ۸۱/۰۳۰ ^e | ۶۳/۲۹۶ ^g |

| تیمار | فندل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه) | فلاونوئید کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه) | فعالیت آنتی‌اکسیدانی (درصد نسبی DPPH) | قند کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر گیاه) |
|--------|--|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| G3N2H1 | ۶/۲۶۸ ^f | ۱/۴۱۹ ^d | ۸۳/۰۳۶ ^b | ۶۰/۳۱۳ ⁱ |
| G3N2H2 | ۶/۱۱۰ ^g | ۱/۲۳۷ ^l | ۸۴/۵۴۰ ^a | ۶۴/۲۳۳ ^f |
| G3N2H3 | ۵/۳۹۵ ^k | ۱/۲۷۰ ^k | ۸۳/۳۷۳ ^b | ۶۰/۶۹۳ ⁱ |
| G3N3H1 | ۶/۴۳۸ ^e | ۱/۳۶۷ ^g | ۸۲/۳۵۶ ^c | ۶۳/۳۲۰ ^g |
| G3N3H2 | ۶/۱۳۸ ^g | ۱/۵۰۶ ^a | ۸۲/۷۳۳ ^c | ۶۸/۵۱۰ ^c |
| G3N3H3 | ۵/۴۰۶ ^k | ۱/۲۹۰ ^j | ۷۹/۹۹۳ ^g | ۶۴/۳۴۶ ^f |

G1, 2, 3 (به ترتیب: گلایسین صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر). N1, 2, 3 (به ترتیب: نیتروکسین صفر، ۱ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر). H1, 2, 3 (به ترتیب: اسید هیومیک صفر، ۱ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر).

در هر ستون، میانگین‌های با حرف‌های همسان با استفاده از آزمون LSD در سطح اختلاف ۵ و ۱ درصد معنی‌دار نیستند.

تیمارها بر میزان کارتنوئید در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). بیشترین میزان کلروفیل مربوط به اثر متقابل (گلایسین صفر، نیتروکسین ۱ میلی‌لیتر در لیتر و اسید هیومیک صفر) بود و کمترین میزان کلروفیل مربوط به شاهد بود. بیشترین میزان کارتنوئید مربوط به اثر متقابل (گلایسین صفر، نیتروکسین ۱ میلی‌لیتر در لیتر و اسید هیومیک صفر) ببود بود. کمترین میزان کارتنوئید مربوط به شاهد بود (جدول ۴).

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر جداگانه و اثر متقابل تیمارهای مورد استفاده بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به اثر متقابل (گلایسین صفر، نیتروکسین ۱ میلی‌لیتر در لیتر و اسید هیومیک صفر) و کمترین میزان مربوط به اثر متقابل (گلایسین ۷۵ گرم در لیتر، نیتروکسین صفر و اسید هیومیک صفر) بود. در رابطه با فعالیت آنزیم کاتالاز تنها اثر ساده کود زیستی نیتروکسین در سطح ۱ درصد و اثر متقابل آن با گلایسین در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به ترتیب مربوط به اثر متقابل (گلایسین ۷۵ میلی‌گرم و نیتروکسین ۲ میلی‌لیتر در لیتر) و اثر متقابل (گلایسین ۷۵ میلی‌گرم در لیتر و نیتروکسین صفر) بود (جدول ۴).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر جداگانه تیمارهای مورد استفاده (به جز اسید هیومیک) در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل تیمارها (گلایسین و اسید هیومیک) در سطح ۵ درصد و سایر آن‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار شدند (جدول ۱). بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به اثر متقابل (گلایسین ۱۵۰ گرم در لیتر، نیتروکسین ۱ میلی‌لیتر در لیتر و اسید هیومیک ۱ میلی‌لیتر در لیتر) و کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به شاهد بود (جدول ۲).

قند کل: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر جداگانه و اثر متقابل تیمارهای مورد استفاده (به جز نیتروکسین و گلایسین) در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). بیشترین میزان قند کل مربوط به اثر متقابل (گلایسین ۷۵ گرم در لیتر، نیتروکسین ۲ میلی‌لیتر در لیتر و اسید هیومیک ۲ میلی‌لیتر در لیتر) و کمترین میزان قند کل مربوط به اثر متقابل (گلایسین ۱۵۰ گرم در لیتر، نیتروکسین ۱ میلی‌لیتر در لیتر و اسید هیومیک صفر) بود (جدول ۲).

کلروفیل و کارتنوئید: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر جداگانه تیمارهای مورد استفاده (به جز اسید هیومیک) و اثر متقابل تیمارها (به جز اثر متقابل نیتروکسین و اسید هیومیک) بر میزان کلروفیل در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. اثر جداگانه و اثر متقابل

جدول ۳: تجزیه واریانس تاثیر گلايسين و کودهای زیستی بر رنگیزه‌ها و آنزیم‌های گیاه زولنگ.

| منابع تغییرات | درجه آزادی | کلروفیل | کارتونوئید | کاتالاز | پراکسیداز |
|-----------------------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|-----------|
| گلايسين | ۲ | ۰/۰۰۰۱** | ۰/۰۰۳۱** | ۰/۰۰۰۱ ^{NS} | ۰/۰۰۰۴۲** |
| نیتروکسین | ۲ | ۰/۰۰۰۵** | ۰/۰۰۰۵** | ۰/۰۰۱۹** | ۰/۰۰۰۴۵** |
| اسید هیومیک | ۲ | ۰/۰۰۰۰۱ ^{NS} | ۰/۰۰۰۹** | ۰/۰۰۰۰۲ ^{NS} | ۰/۰۰۰۱۳** |
| گلايسين × نیتروکسین | ۴ | ۰/۰۰۰۲** | ۰/۰۰۱۱** | ۰/۰۰۰۲* | ۰/۰۰۰۱۶** |
| گلايسين × اسید هیومیک | ۴ | ۰/۰۰۰۲** | ۰/۰۰۲۱** | ۰/۰۰۰۲ ^{NS} | ۰/۰۰۰۱۷** |
| نیتروکسین × اسید هیومیک | ۴ | ۰/۰۰۰۰۲ ^{NS} | ۰/۰۰۰۷** | ۰/۰۰۰۰۶ ^{NS} | ۰/۰۰۰۲۱** |
| گلايسين × نیتروکسین × اسید هیومیک | ۸ | ۰/۰۰۰۲** | ۰/۰۰۱۸** | ۰/۰۰۰۲ ^{NS} | ۰/۰۰۰۳۹** |
| خطا | ۵۲ | ۰/۰۰۰۰۲ | ۰/۰۰۰۰۲ | ۰/۰۰۰۰۱ | ۰/۰۰۰۰۷ |
| ضریب تغییرات (درصد) | - | ۲/۲۹۶ | ۱/۳۱۳ | ۳/۶۷۵ | ۷/۳۳۸ |

*، ** و ^{NS}: به ترتیب، اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد و عدم معنی‌داری.

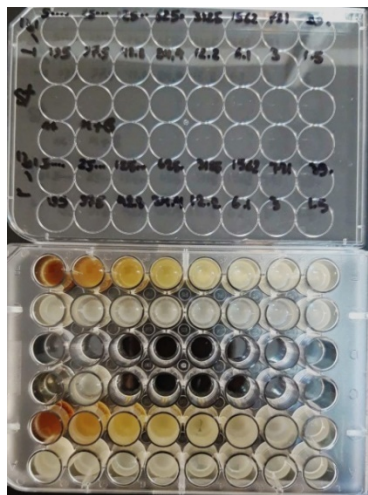
جدول ۴: مقایسه میانگین تاثیر گلايسين و کودهای زیستی بر رنگیزه‌ها و آنزیم پراکسیداز در گیاه زولنگ.

| تیمار | کلروفیل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر گیاه) | کارتونوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر گیاه) | فعالیت آنزیم پراکسیداز (میلی‌مول بر سانتی‌متر مربع) |
|--------|--|---|--|
| G1N1H1 | ۰/۲۰۹ ^r | ۰/۳۲۳ ^t | ۰/۰۸۱ ^s |
| G1N1H2 | ۰/۲۱۳ ^o | ۰/۳۹۰ ^a | ۰/۱۲۵ ^k |
| G1N1H3 | ۰/۲۱۷ ^k | ۰/۳۲۶ ^s | ۰/۰۹۰ ^q |
| G1N2H1 | ۰/۲۳۸ ^a | ۰/۳۹۱ ^a | ۰/۱۷۶ ^a |
| G1N2H2 | ۰/۲۲۳ ^g | ۰/۳۳۸ ^o | ۰/۱۰۰ ^o |
| G1N2H3 | ۰/۲۳۲ ^b | ۰/۳۷۹ ^c | ۰/۱۰۷ ^m |
| G1N3H1 | ۰/۲۱۹ ⁱ | ۰/۳۷۲ ^c | ۰/۱۵۷ ^c |
| G1N3H2 | ۰/۲۱۱ ^q | ۰/۳۸۰ ^c | ۰/۰۹۵ ^p |
| G1N3H3 | ۰/۲۲۸ ^e | ۰/۳۵۲ ^j | ۰/۱۵۰ ^d |
| G2N1H1 | ۰/۲۱۴ ⁿ | ۰/۳۶۸ ^g | ۰/۰۷۴ ^u |
| G2N1H2 | ۰/۲۲۰ ^h | ۰/۳۴۲ ^m | ۰/۰۸۹ ^q |
| G2N1H3 | ۰/۲۰۹ ^r | ۰/۳۲۳ ^t | ۰/۰۸۱ ^s |
| G2N2H1 | ۰/۲۲۰ ^h | ۰/۳۵۴ ⁱ | ۰/۰۷۷ ^t |
| G2N2H2 | ۰/۲۱۳ ^o | ۰/۳۴۰ ⁿ | ۰/۱۶۸ ^b |
| G2N2H3 | ۰/۲۲۵ ^f | ۰/۳۲۹ ^r | ۰/۱۱۰ ^l |
| G2N3H1 | ۰/۲۱۶ ^l | ۰/۳۲۵ ^s | ۰/۱۳۹ ^h |
| G2N3H2 | ۰/۲۱۲ ^p | ۰/۳۵۰ ^k | ۰/۰۸۳ ^r |
| G2N3H3 | ۰/۲۱۸ ^j | ۰/۳۲۶ ^s | ۰/۱۴۳ ^f |
| G3N1H1 | ۰/۲۱۳ ^o | ۰/۳۳۶ ^p | ۰/۱۴۲ ^{fg} |
| G3N1H2 | ۰/۲۰۹ ^r | ۰/۳۴۲ ^m | ۰/۱۳۱ ^j |
| G3N1H3 | ۰/۲۱۵ ^m | ۰/۳۷۰ ^f | ۰/۱۳۴ ⁱ |
| G3N2H1 | ۰/۲۰۹ ^r | ۰/۳۲۳ ^t | ۰/۱۴۷ ^e |
| G3N2H2 | ۰/۲۲۹ ^d | ۰/۳۶۵ ^h | ۰/۰۹۴ ^p |
| G3N2H3 | ۰/۲۱۴ ⁿ | ۰/۳۴۶ ^l | ۰/۱۴۴ ^f |
| G3N3H1 | ۰/۲۳۰ ^c | ۰/۳۳۳ ^q | ۰/۱۵۶ ^c |
| G3N3H2 | ۰/۲۳۰ ^c | ۰/۳۷۷ ^d | ۰/۱۴۰ ^h |
| G3N3H3 | ۰/۲۱۲ ^p | ۰/۳۸۳ ^b | ۰/۱۰۳ ⁿ |

G1, 2, 3 (به ترتیب: گلايسين صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر). N1, 2, 3 (به ترتیب: نیتروکسین صفر، ۱ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر). H1, 2, 3 (به ترتیب: اسید هیومیک صفر، ۱ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر).

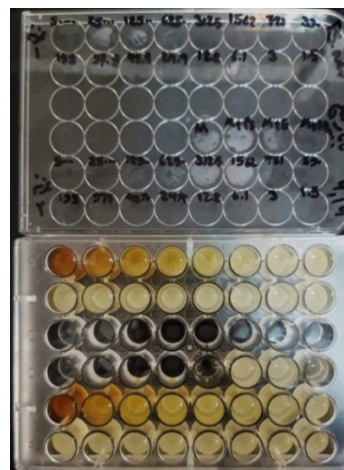
در هر ستون، میانگین‌های با حرف‌های همسان با استفاده از آزمون LSD در سطح اختلاف ۵ و ۱ درصد معنی‌دار نیستند.

کاربرد عصاره انکپسوله شده و عصاره معمولی زولنگ مانع از رشد باکتری‌های مورد نظر نشد. در تست MIC در تمام چاهک‌ها رشد باکتری مشاهده شد.

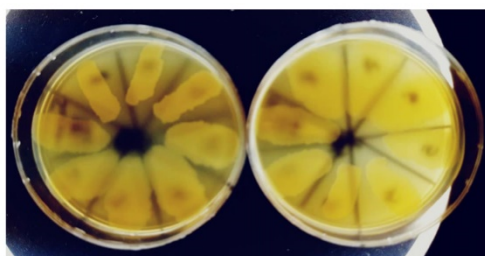


شکل ۲: میزان رشد باکتری در استافیلوکوکوس اورئوس (MIC).

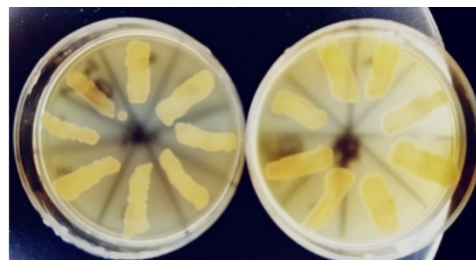
آزمایش میکروبیولوژی: نتایج آزمایش نشان داد که عصاره زولنگ در طی بررسی‌های شاخص MIC و MBC، تاثیر مهارکنندگی نداشت (شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که



شکل ۱: میزان رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا (MIC).



شکل ۴: میزان رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا (MBC).



شکل ۳: میزان رشد استافیلوکوکوس اورئوس (MBC).

به افزایش میزان فنل کل می‌شود (Percianlou et al., 2019). همچنین افزایش ترکیب‌های فنلی با افزایش مقدار نیتروژن رابطه مستقیم دارد (Sadegh et al., 2018) لذا از آنجایی که در این آزمایش میزان عنصر نیتروژن افزایش یافته است به نظر می‌رسد حضور باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن (ازتو باکتر و آزوسپریلیوم) در کود زیستی نیتروکسین منجر به افزایش مقدار نیتروژن در خاک و افزایش جذب آن توسط گیاه شده است و در نتیجه با فراهم شدن میزان

بحث

کودهای زیستی توانایی سنتز و ترشح مواد زیستی فعال مانند ویتامین‌ها، اکسین‌ها و جیبرلین‌ها را دارند که ترشح این مواد به افزایش میزان ماده آلی و کربوهیدرات‌های گیاهان کمک می‌کند و از آنجایی که افزایش ترکیب‌های فنلی با افزایش میزان کربوهیدرات‌ها در گیاهان ارتباط مستقیم دارد، بنابراین ریشه تلقیح شده با کودهای زیستی به‌خاطر افزایش این مواد منجر

مطلوب نیتروژن میزان ترکیبات فنلی نیز افزایش یافته است. Percianlou و همکاران (۲۰۱۹) اعلام کردند اثر متقابل کودهای زیستی بیوسولفور و نیتروکسین بر میزان فنل کل عروسک پشت پرده معنی دار نشد اما سطوح مختلف کود زیستی نیتروکسین بر فنل کل معنی دار شد و با افزایش میزان غلظت نیتروکسین میزان فنل کل گیاه افزایش یافت. یافته‌های Amiri و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد کاربرد کودهای زیستی نیتروکسین، بیوفسفر و بیوسولفور باعث افزایش میزان فنل گیاه دارویی گاوزبان ایرانی شد.

اسید هیومیک علاوه بر تولید ترکیبات فنولیک، در حفظ و نگهداری این ترکیبات نیز مؤثر است. به طوری که با کاهش میزان نشت سبب حفظ این ترکیبات در گیاه می‌شود (Abbaszadeh Farouji et al., 2020). نتایج آزمایش Zaferanchi و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد باکتری‌های زیستی ازتوباکتر و آزوسپریلیوم میزان فنل گیاه همیشه بهار را افزایش دادند و بیشترین میزان فنل از کاربرد تلفیقی این باکتری‌ها با ۱۰ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک حاصل شد که همسو با نتایج تحقیق ما می‌باشد.

کاربرد تلفیقی کودهای زیستی سوپر نیتروپلاس و نیتروکسین میزان فلاونوئید کل گیاه دارویی بابونه شیرازی را افزایش داد (دهقانی مشکاتی و همکاران، ۱۳۸۹). مشخص شده است که حاصلخیزی خاک و استفاده از کودهای آلی بر میزان فلاونوئید گیاهان تاثیر مثبتی دارد (Kutchan, 2001). Gashsbi و همکاران (۱۴۰۰) گزارش کردند که باکتری سودوموناس میزان فلاونوئید را در گیاه آویشن شیرازی افزایش داد. در این آزمایش افزایش میزان

فلاونوئید با کاربرد کود آلی اسید هیومیک نیز به نظری می‌آید به علت تاثیر مثبت اسید هیومیک بر خصوصیات خاک و بهبود جذب عناصر غذایی خصوصا نیتروژن می‌باشد که با افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه رابطه مستقیم دارد. نتایج آزمایش Ahmadabadi Alizadeh و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد افزودن ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید هیومیک به خاک میزان فلاونوئید ریشه سرخارگل را افزایش داد. مطالعه‌های دیگری نشان داده است که اسیدهای آمینه موجب تحریک فعالیت آنزیم فیل‌آل‌انین آمونیاک‌از و راه‌اندازی مسیر فینیل پروپانوئید می‌شوند که در نتیجه سنتز ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی افزایش می‌یابد (Aghdam et al., 2015). بنابراین به نظر می‌رسد طبق مطالب گفته شده مصرف گلیاسین، سنتز میزان متابولیت‌های ثانویه از جمله فلاونوئید را افزایش داده است و آنجایی که گلیاسین به عنوان اسید آمینه شامل ترکیب نیتروژن دار می‌باشد، امکان جذب نیتروژن توسط گیاه را بهبود بخشیده و با افزایش میزان این عنصر میزان فلاونوئید افزایش یافته است.

استفاده از مدیریت تغذیه در بستر کشت و تغییر شرایط محیطی می‌تواند میزان سنتز متابولیت‌های ثانویه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد (Motanari et al., 2008). در این آزمایش نیز کاربرد کود زیستی، آلی و گلیاسین که همگی در جذب عناصر و آب و به طور کلی در تغذیه گیاه نقش دارند از این طریق می‌تواند به نقش مثبت آن‌ها در افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان کل اشاره کرد. نوع خاکی که گیاه در آن کاشته می‌شود و میزان ترکیب‌های هیومیکی موجود در خاک اثر قابل توجهی بر

نیتروکسین با تامین نیتروژن کافی و شرکت در ساختمان کلروفیل (با توجه به اینکه چهار اتم نیتروژن در حلقه‌های درون کلروفیل جای گرفته است) تاثیر مستقیم و قطعی در ساخت کلروفیل دارد (Percianlou et al., 2019). به نظر می‌رسد از آنجایی که در بین عناصر غذایی، نیتروژن سهم مهمی در افزایش فتوسنتز گیاه دارد. بنابراین بهبود جذب نیتروژن سبب بهبود فرآیندهای فیزیولوژیکی و به دنبال آن افزایش سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌شود و در این آزمایش حضور باکتری‌های ازتوباکتر و آزوسپریلیوم در کود زیستی نیتروکسین که توانایی ویژه‌ای در تثبیت زیستی نیتروژن دارند باعث فراهم کردن مقدار بیشتر این عنصر برای ریشه و به دنبال آن افزایش میزان فتوسنتز و رنگیزه‌های فتوسنتزی شده‌اند. Kheiri و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند تیمار کودی نیتروکسین میزان کلروفیل کل گیاه فراسیون را افزایش داد. گزارش شده است کاربرد تلفیقی باکتری‌های ازتوباکتر، آزوسپریلیوم و سودوموناس بر میزان کلروفیل و کارتنوئید کل مرزه تاثیر مثبت داشت (Faraji Mehmani et al., 2013).

طبق گزارش Deh Sheikh و همکاران (۲۰۱۷) کاربرد کود زیستی تثبیت‌کننده نیتروژن میزان کلروفیل کل و کارتنوئید را در گیاه نعناع فلفلی افزایش داد ولی کاربرد اسید هیومیک بر میزان کلروفیل تاثیر معنی‌داری نداشت که نتایج این گزارشات با نتایج ما همسو می‌باشد.

جیریلین به عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاهی در ساخت پروتئین‌ها و بیوسنتز آنزیم‌ها موثر است (Salehi Sardoei et al., 2014) پس به نظر می‌رسد با کاربرد کود زیستی نیتروکسین به احتمال تولید متابولیت‌ها توسط باکتری‌های

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد به طوری که هرچه ترکیب‌های هیومیکی خاک بیشتر باشد اثر آن بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز بیشتر است (Reddy et al., 2004) که به احتمال در پژوهش حاضر کاربرد اسید هیومیک بر خاک تاثیر مثبت داشته و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه را افزایش داده است. همچنین در خصوص افزایش آنتی‌اکسیدان کل توسط گلایسین این عقیده وجود دارد که علت این افزایش تحریک بیولوژیکی گلایسین می‌باشد، اسیدهای آمینه، مثل گلایسین می‌توانند به عنوان تنظیم‌کننده‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه عمل کنند (Souri, 2016).

مواد هیومیکی فعالیت شبه‌هورمونی دارند و جذب عناصر معدنی مانند فسفر و پتاسیم را در گیاهان افزایش می‌دهند که این روند به نوبه خود سبب بهبود فتوسنتز و افزایش مقدار قند تولیدی در گیاهان می‌شود (Atiyeh et al., 2002) گزارش‌های دیگری نیز در رابطه با اسید هیومیک وجود دارد که اسید هیومیک را به عنوان کود و فعال‌کننده‌ای معرفی می‌کند که میزان کربوهیدرات را افزایش می‌دهد و باعث افزایش عملکرد و کیفیت محصول می‌شود. Shorki و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند کاربرد غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک میزان قند آویشن را افزایش داد.

Hosseinzadah و همکاران (۲۰۱۸) معتقدند کاربرد باکتری‌های زیستی باعث افزایش میزان جذب نیتروژن، آهن، منگنز و منیزیم می‌شود و از این طریق محتوی کلروفیل برگ را افزایش می‌دهند. کاربرد باکتری‌های تثبیت‌کننده ازت باعث بهبود کارایی مصرف کودهای نیتروژن گردید (Kordi et al., 2020). به نظر می‌رسد

نتیجه عوامل مختلفی از جمله شرایط اقلیمی مانند آب، هوا، خاک و محل پرورش گیاه و سایر عوامل محیطی نیز ممکن است منجر به تغییر در میزان و تنوع مواد مؤثره گیاهان دارویی شود (Strivastava and Shym, 2002). نتایج آزمایش Manadi Sefidan و Jafari (2020) نشان داد نانوذرات به همراه عصاره گیاه همیشه بهار در هیچ یک از غلظت ها اثر بازدارندگی بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا نداشت که از جهتی همسو با نتایج ما می باشد.

نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج نشان داد که تیمارهای بکار رفته در این پژوهش، به صورت جداگانه و به صورت ترکیبی (اثر متقابل) بر صفات اندازه گیری شده اثر معنی دار داشتند. البته در برخی صفات، کاربرد جداگانه تیمارها تاثیر بیشتری بر افزایش صفات داشتند؛ بیشترین میزان کلروفیل، کارتنوئید و آنزیم پراکسیداز در تیمار نیتروکسین حاصل شد. از آنجایی که برخی گیاهان یا اهمیت از جمله زولنگ نیاز به توسعه تجاری دارند، تیمارهای بکار رفته در پژوهش حاضر، می تواند باعث در بهبود کشت و کار این گیاه استفاده شود.

محرک رشد از جمله هورمون های محرک رشد نقش مهمی در تحریک و بیان پروتئین های آنزیم های آنتی اکسیدان ایفا می کند. ترشح این هورمون افزایش یافته و موجب بهبود فعالیت این آنزیم ها شده است. در آخر به این نکته نیز می توان اشاره کرد که از آنجایی که این آنزیم ها از جمله آنزیم های آنتی اکسیدانی محسوب می شوند پس ممکن است بهبود فعالیت این آنزیم ها به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی این آزمایش مرتبط باشد. گزارش شده است کاربرد اثر ساده کود زیستی نیتروکسین بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز گیاه کینوا معنی دار بود (et al., 2019) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

در تست MBC در پلیت ها نیز در تمام قسمت های مشخص شده، رشد باکتری مشاهده شد که نشان می دهد عصاره گیاه زولنگ بر این دو باکتری اثر مهارکنندگی نداشت. که علت این امر می تواند ناشی از غلظت کم مواد مؤثره عصاره باشد. در رابطه با نتیجه به دست آمده، در گزارش های دیگر نیز نتایج برخی از بررسی ها نشان داد که برخلاف بالا یا پایین تر بودن ترکیب های فنلی و فلاونوئیدی، خواص ضد میکروبی متناسب با این ترکیب ها عمل نمی کند. در تحقیق حاضر نیز ارتباط معنی داری بین دو عامل ذکر شده مشاهده نشد که در راستای توجیه این

References

- Abbaszadeh Faruji, R., Shoor, M., Tehranifar and Abedi, B. (2020). Effects of Humic and Fulvic Acids on Some Physiological Characteristics of Two Ornamental Plants of Granium (*Plargonium* spp.) and Scindapsus (*Scindapsus* spp.). Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture. 11 (1), 45-58.
- Abedini, T., Moradi, P. and Hani, A. (2015). Effect of organic fertilizer and foliar application of humic acid on some quantitative and qualitative yield of Pot marigold. Journal of Novel Applied Sciences. 4 (10), 1100-1103

- Ahmad abadi, Z., Ghajar sepanlo, M., and Bahmanyar, M. A. (2011). Effect of vermico mpost application on amount of micro elements in soil and the content in the medicinal plant of Borage (*Borago officinalis*). Journal of Agriculture 13 (2), 1-12.
- Alizadeh Ahmadabadi, A., Khorasaninejad, S. and Hemti, Kh. (2017). The effect of low irrigation stress and humic acid on the morphological and phytochemical characteristics of *Echinacea angustifolia* roots. Journal of Crops Improvement. 19 (1), 1-14.
- Amiri, M.B., Rezvani Moghadam, P. and Jahan, M. (2018). The effect of biofertilizers and the use of humic and fulvic acids on some phytochemical properties of the medicinal plant *Echium amoenum*. The first national conference of applied chemistry and nanochemistry. Iran, Gonabad.
- Amiryousofi, M., Tedin, M.R. and Ebrahimi, R. (2019). Investigating the biochemical reactions and activity of quinoa antioxidant enzymes under the stress of low irrigation and fertilizer treatments in saline soil. Journal of Crops Improvement. 22 (4), 644-629.
- Amoghacai, R. and Mostageran, A. (2008). Plant-bacteria symbiosis assistance systems Isfahan University Publication. 225 p.
- Aslani, M., Hashemipour, M. and Nikbin, V. (2009). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from respiratory samples using polymerase chain reaction (PCR) specific for outer membrane lipoprotein oprl and exotoxin genes. Yafteh. 11 (2), 23-29.
- Atiyeh, R.M., Lee S.S., Edwards, C.A., Arancon, N.Q. and Metzger, J. (2002). The influence of humic acid derived from earthworm processed organic waste on plant growth. Bioresource Technology. 8,7-14.
- Bohnert, H. J., Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. Trends Biotechnology. 14, 89-97.
- Deh Sheikh, P., Mahmoudi Surestani, M., M., Zulfiqari, M. and Enayati Zamir, N. (2017). Studying the effect of biological, chemical and humic acid fertilizers on vegetative, physiological indicators and the amount of essential oil of *Nepeta cataria* L. Plant production research. 24 (2), 76-61.
- Dehghani Meshkati, M.R., Naghdi Badi, H.A., Darzi, M.T., Mehr Afarin, A. and Rezazadeh, S.A. (2010). The effect of biological and chemical fertilizers on the quantitative and qualitative yield of Shirazi chamomile (*Matricaria recutita* L.) Quarterly Journal of Medicinal Plants. 10 (38), 35-48.
- Faraji Mehmani, A., Ismailpour, B., Sefidkan, F. and Abbaszadeh, B. (2013). The effect of inoculation with biological fertilizers on growth characteristics and quantitative and qualitative yield of savory medicinal plant (*Satureja hortensis* L.). Journal of Agricultural Ecology. 6 (4), 879-870.
- Gashbsbi, F., Heidari, M., Sabbagh, M., and Makarian, H. (2021). Effect of water deficit stress and bio and non -bio-fertilizers on flowering branches yield, photosynthetic pigments and concentration of macro elements in thyme (*Thymus vulgaris* L.). Journal of Field Crop Science. 52 (2), 157-172.
- Ghasemi, S., Khoshgftarmanesh, A., Hadadzadeh, H. and Afyuni, M. (2013). Synthesis, characterizatiation and theoretical and experimental investigations (11) –Amino acid complexes as ecofriendly plant growth promoters and highly bioavailable sources of zinc. Journal of Plant Growth Regulator. 32, 315-323
- Hashemi Olia, M.H., Shapouri, R. and Esrafil, M.H. (2018). Investigating the antimicrobial and healing effect of different extracts of *Urtica dioica*, *Arctium lappa* and *Nasturtium officinale* along with silver sulfadiazine on burn infection caused by *Staphylococcus aureus* in mice. Animal Physiology and Development Quarterly. 12 (2), 72-63.
- Hosseinzadeh, S.R., Amiri, H. and Ismaili, A. (2018). Evaluation of photosynthesis, physiological, and biochemical responses of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. Pirouz) under water deficit stress and use of vermicompost fertilizer. Journal of Integrative Agriculture. 17 (11), 2426-2437
- Jafari, B. and Manadi Sefidan, A.R. (2020). Comparative study of the effects of silver nanoparticles and methanolic extract of *Calendula officinalis* on pathogenic bacteria

- Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in laboratory conditions. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 27 (2), 171-163.
- Kanechi, M., Hikosaka, Y. and Uno, Y. (2013). Application of sugarbeet pure and crude extracts containing glycinebetaine affects root growth, yield, and photosynthesis of tomato grown during summer. *Scientia Horticulturae*. 152, 9-15
- Khairi, A., Zarandod, M., Rezaei-Alulu, A., Barzegar, T. and Alaei, M. (2020). The effects of biofertilizers and ammonium sulfate on some characteristics and antioxidant properties of the medicinal plant *Marrubium vulgare* L. *Plant process and function*. 9 (38), 426-415.
- Küpel, E., Kartal, M., Aslan, S. and Yesilada E. (2006). Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species, *Journal of Ethnopharmacol*. 107, 32-37.
- Kordi, S., Salmasi, S. Z., Kolvanagh, J. S., Weisany, W., and Shannon, D. A. (2020). Intercropping system and N₂ fixing bacteria can increase land use efficiency and improve the essential oil quantity and quality of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Frontiers in Plant Science*. 11, 2069.
- Kutchan, T.M. (2001). Ecological arsenal and development dispatcher, the paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*. 125, 58-60.
- Li, H.B, Cheng, W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F. and Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*. 102 (3), 771-776.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Van Beek, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 85 (2), 231-237.
- Mocready, M., Guggolz, J., Silveira, V. and Owens, H.S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables: application to peas. *Analytical Chemistry*. 22, 1156-1158.
- Motaghi, B. and Mojafipour, S. (2016). Outer Membrane Protein D Gene in clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* and its Role in Antibiotic Resistance. *Journal of Fasa University of medical Sciences*. 5 (4), 501-507
- Mozafari, S., Khorasaninejad, S. and Ghorgini Shabankareh, H. (2017). The effect of irrigation regimes and application of humic acid on some physiological and biochemical characteristics of purslane medicinal plant under greenhouse conditions. *Journal of Crops Improvement*. 19 (2), 416-401.
- Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Ebrahimzadeh, M.A. and Eslami, B. (2009). In Vitro Antioxidant Activity of *Pyrus Boissieriana*, *Diospyros Lotus*, *Eryngium Caucasicum* and *Froriepia Subpinnata*. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 8 (2), 139-150.
- Nabavi, S.M., Ebrahimzadeh M.A., Nabavi, S.F., Jafari, M. (2008). Free radical scavenging activity and antioxidant capacity of *Eryngium caucasicum* Trautv and *Froripia subpinata*. *Pharmacology online*. 3, 19-25.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 22, 867-880.
- Omidi, J. and Abdolmohammadi, S. (2022). Introduction of *Eryngium caeruleum* medicinal plant. *Journal of plant and biotechnology of Iran*. 17 (4), 1-7.
- Parivar, K., Yaghmaie, P., Hayati Roodbari, N. and Mohammadi Mohaghegh, P. (2012). Effect of synchronized oral administration and topical application kombucha on third-degree burn wounds regeneration in mature rats. *Medical Sciences*. 22, 1-11.
- Percianlou, S., Khairi, A. and Arghavani, M. (2019). The effect of biofertilizers on the quantitative and qualitative characteristics of the medicinal plant "*Physalis alkekengi* L.", *plant process and function*. 8 (29), 286-273.
- Raeisi, S., Ojagh, S.M., Sharifi-Red, M., Sharifi-Red, J., Quek, S.Y. (2017). Evaluation of *Allium paradoxum* (MB) G. Don. and *Eryngium caucasicum* Trauve. Extracts on the shelf-life and quality of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 37 (3), 123 - 130

- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M. (2004). Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*. 161: 1189-1202.
- Rouzbeh, R., Daneshian, J. and Aliabadi Farahani, H. (2009). Super nitro plus influence on yield and yield components of two wheat cultivars under NPK fertilizer application. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*. 1 (8), 293-307.
- Sabzevari, S. and Khazaie, H.R. (2009). The effect of foliar application with humic acid on growth, yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agroecology*, 2 (1), 53-63.
- Sabzevari, S. and Khazaie, H.R. (2009). The effect of foliar application with humic acid on growth, yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agroecology*, 2 (1), 53-63.
- Sabzevari, S., Khazaie, H.R., and Kafi, M. (2010). Study on the effects of humic acid on germination of four wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Iranian Field Crop Research*, 8 (3), 473-480
- Sabzevari, S., Khazaie, H.R., and Kafi, M. (2010). Study on the effects of humic acid on germination of four wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Iranian Field Crop Research*, 8 (3), 473-480.
- Sadegh, M., Zaafrani, F., Akbarpour, V. and Emadi, M. (2018). The effect of fertilizer sources on biochemical traits and performance of rosemary (*Rosmarium officinalis* L.) in conditions of competition and non-competition with weeds. *Plant production research journal*. 25 (4), 84-67.
- Salehi Sardoei, A., Shahdadi, F., Shahdadneghad, M. and Fallaah Imani, A. (2014). The Effect of Benzyladenine and Gibberellic Acid on Reducing Sugars of *Spathiphyllum wallisii* Plant. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 3 (3), 328-332.
- Savari, A., Fotokian, M. and Barzali, M. (2009). Evaluation of glycine betaine effects on some agronomic traits of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars under water-drought stress. *Journal of Daneshvar Agronomy Sciences*. 1 (1), 67-76.
- Seidler, R.J., Knittel, M.D. and Brown, C. (1975). Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. *Journal of Applied Microbiology*. 29 (8), 19-25.
- Soleymani Aghdam, M., Razavi, F. and Fatemeh, K. (2015). Maintaining the postharvest nutritional quality of peach fruits by γ -Aminobutyric acid. *Journal of Plant Physiology*. 5, 1457- 1463.
- Soleymani Aghdam, M., Razavi, F. and Fatemeh, K. (2015). Maintaining the postharvest nutritional quality of peach fruits by γ -Aminobutyric acid. *Journal of Plant Physiology*. 5, 1457- 1463.
- Souri, M.K. (2016). Aminochelate fertilizers: the new approach to the old problem. *Open Agriculture*. 1, 118-123.
- Srivastava, A.W. and Shym, S. (2002). *Citrus: Climate and soil*. International Book Distributing Company Delhi, India. p: 65-151.
- Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G. & Li, SH. (2012). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (piaceae). *Pharmaceutical Crops*. 3, 99-120.
- Zaferanchi, Sh., Zehtab Salmasi, S., Salehi Lisar, S.Y. and Sarikhani, M. (2019). Influence of Organics and Bio Fertilizers on Biochemical Properties of *Calendula officinalis* L. *International Journal of Horticultural Science and Technology*. 6 (1), 125-136.
- Zaferanchi, Sh., Zehtab Salmasi, S., Salehi Lisar, S.Y. and Sarikhani, M. (2019). Influence of Organics and Bio Fertilizers on Biochemical Properties of *Calendula officinalis* L. *International Journal of Horticultural Science and Technology*. 6 (1), 125-136.