

## Copper effect on photosynthetic performance, symbiotic efficiency and biosorption of rhizobia associated with Horse gram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.]

### Efecto del cobre en el rendimiento fotosintético, la eficiencia simbiótica y la biosorción de rizobios asociados con el Gramo de caballo [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.]

Prabhavati Edulamudi<sup>1</sup>, Vishnuvardhan Zakkula, Umamaheswara Rao Vanga and Veera Mallaiah Konada

Department of Botany and Microbiology, Acharya Nagarjuna University, Andhra Pradesh, India  
E-mail: <sup>1</sup>prabha\_anumicro@rediffmail.com

The aim of the present study was to evaluate the ability of Copper (Cu) tolerance in rhizobia and enhancing the photosynthetic performance, symbiotic efficiency and biosorption potential in the rhizobia inoculated Horse gram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.] plants. Four rhizobial strains HGR-4, 6, 13, 25 grown under different concentrations of Copper (Cu) were inoculated individually to Horse gram plants. Among them, Horse gram plants inoculated with the strain HGR-4 have shown enhanced PN values up to 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  of Cu concentration. Nodulation was maximum upon inoculation with HGR-6 at 300  $\mu\text{g g}^{-1}$  of Cu and inoculation with HGR-4, 13 and 25 at 100  $\mu\text{g g}^{-1}$ . The amount of leghaemoglobin was maximum in the Horse gram plants inoculated with the strain HGR-13 at 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  of Cu. Biosorption potential of the strain HGR-6 (GQ483458 *Rhizobium sp.*, ATCC 2336) was determined by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS). It has shown maximum biosorption of Cu both in nodules and also in soil samples. This study demonstrates that the Cu tolerant rhizobia i.e. HGR-4, 6, 13 and 25 enhanced the photosynthetic performance, pod formation, symbiotic efficiency and biosorption potential. Hence, Horse gram plants associated with rhizobia could be used effectively in phytoremediation of metal (Cu) contaminated soils.

**Key words:** *Biosorption, metal toxicity, phytoremediation, rhizobia.*

Heavy metal contamination of soils is wide spread due to human, agricultural and industrial activities (Beladi *et al.* 2011). It results in the presence of heavy metal traces in agricultural soils that lead to a threat to food safety and public health (Dary *et al.* 2010). This accumulation of heavy metals leads to abnormal loss of soil fertility and microbial activities (Krujatz *et al.* 2011). One of the stressful environmental conditions is contamination of soils in which they grow with metals such as copper (Cu), zinc (Zn), cobalt (Co) and manganese (Mn). All these metals are essential for plant and microbial growth, but at high concentrations they are toxic and adversely affect plant and microbial growth, nodulation and nitrogenase activity of plants (Ahmad *et al.* 2012). Copper (Cu) is not only a heavy metal but also an essential micronutrient for plant growth (Szira *et al.* 2014) and development (Thounaojam *et al.* 2012).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de la tolerancia al cobre (Cu) en rizobios y mejorar el rendimiento fotosintético, la eficiencia simbiótica y el potencial de biosorción en rizobios inoculados en plantas de Gramo de caballo [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.]. Cuatro cepas de rizobios HGR-4, 6, 13, 25 cultivadas en diferentes concentraciones de cobre (Cu) se inocularon individualmente en plantas de Gramo de caballo. Entre ellas, las plantas de Gramo de caballo inoculadas con la cepa HGR-4 mostraron valores de PN mejorados hasta 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de concentración de Cu. La nodulación fue máxima tras la inoculación con HGR-6 a 300  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Cu e inoculación con HGR-4, 13 y 25 a 100  $\mu\text{g g}^{-1}$ . La cantidad de leghemoglobina fue máxima en las plantas de Gramo de caballo inoculadas con la cepa HGR-13 a 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Cu. El potencial de biosorción de la cepa HGR-6 (GQ483458 *Rhizobium sp.*, ATCC 2336) se determinó mediante espectroscopía de absorción atómica (AA). Se demostró la máxima biosorción de Cu tanto en nódulos como en muestras de suelo. Este estudio demuestra que la rizobio tolerante a Cu, es decir, HGR-4, 6, 13 y 25, mejora el rendimiento fotosintético, la formación de vainas, la eficiencia simbiótica y el potencial de biosorción. Por lo tanto, las plantas de Gramo de caballo asociadas con rizobios podrían usarse eficazmente en la fitorremediación de suelos contaminados con metal (Cu).

**Palabras claves:** *Biosorción, toxicidad metálica, fitorremediación, rizobios.*

La contaminación de metales pesados en los suelos está muy extendida debido a las actividades humanas, agrícolas e industriales (Beladi *et al.* 2011); como resultado la presencia de trazos de metales pesados en los suelos agrícolas que conducen a una amenaza para la seguridad alimentaria y la salud pública (Dary *et al.* 2010). Esta acumulación de metales pesados conduce a la pérdida anormal de la fertilidad del suelo y actividades microbianas (Krujatz *et al.* 2011). Una de las condiciones ambientales estresantes es la contaminación de los suelos en los que crecen con metales como el cobre (Cu), zinc (Zn), cobalto (Co) y manganeso (Mn). Todos estos metales son esenciales para el crecimiento de las plantas y los microbios, pero a altas concentraciones son tóxicos y afectan negativamente el crecimiento microbiano y de las plantas, la nodulación y la actividad nitrogenasa de las plantas (Ahmad *et al.* 2012). El cobre (Cu) no es solo un metal pesado sino también un micronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de

The influence of soil microorganisms on soil quality and plant health has recently received more attention. These microorganisms can promote plant acquisition of nutrients (Vimal *et al.* 2017), mineralization of organic phosphorus (Meyer *et al.* 2017) and production of phytohormones (Kurepin *et al.* 2015) decrease the negative effects of environmental stress. Plant growth promoting bacteria have been widely used to increase the capacity of host plants to tolerate and absorb heavy metals from soil (Kamran *et al.* 2017). Some metal resistant microorganisms could also promote plant growth under heavy metal stress conditions, thus more biomass increases the efficiency of phytoremediation.

The legume-Rhizobium symbiosis has been proposed as a promising technique for the phytoremediation of contaminated soils due to its beneficial activity in symbiotic nitrogen fixation (Jian *et al.* 2019). Some rhizobia have survived under heavy metal contamination. In spite of their symbiotic association their nitrogen fixing ability is lost (Broos *et al.* 2004). Application of heavy metal tolerant Rhizobium species with the plant provides high efficiency for phytoremediation (Dary *et al.* 2014). It also has the additional advantage of providing N-compounds to the soil by biological nitrogen fixation in root nodules even in metal polluted soils (Hao *et al.* 2014). This enhances soil fertility also.

Horse gram is an important pulse crop and it is extensively cultivated on light red and gravel soils of peninsular India. The significance of this crop is its adaptability to poor and adverse climatic conditions, which are unsuitable for other pulse crops. It is widely cultivated as a grain legume and fodder crop in the states of Tamil Nadu, Karnataka, Andhra Pradesh and Orissa of South India.

The current studies target to analyze the effect of Cu tolerant rhizobia-plant symbiosis on photosynthetic performance, symbiotic efficiency and biosorption potential of Horse gram plants upon inoculation with the chosen rhizobial strains.

### Materials and Methods

Horse gram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.], belongs to the species *Macrotyloma uniflorum* of the genus *Macrotyloma* in the family Fabaceae/Leguminosae of the order Fabales in the Kingdom Plantae. Seeds of Horse gram were obtained from local fields of Andhra Pradesh, India were used for nodulation studies.

*Experimental design and treatments. Inoculation with rhizobial strains grown under different concentrations of Copper (Cu):* The experiment was carried out during Kharif season at the Botanical garden, Acharya Nagarjuna University, Andhra Pradesh, India. Horse gram seeds were surface sterilized with 70 % ethanol for 3 min followed by

las plantas (Szira *et al.* 2014) (Thounaojam *et al.* 2012).

La influencia de los microorganismos del suelo en la calidad del suelo y la salud de las plantas ha recibido más atención recientemente. Estos microorganismos pueden promover la adquisición de nutrientes por parte de las plantas (Vimal *et al.* 2017), la mineralización de fósforo orgánico (Meyer *et al.* 2017) y la producción de fitohormonas (Kurepin *et al.* 2015) disminuye los efectos negativos del estrés ambiental. Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas se han utilizado ampliamente para aumentar la capacidad de las plantas huésped para tolerar y absorber metales pesados del suelo (Kamran *et al.* 2017). Algunos microorganismos resistentes a los metales también podrían promover el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés por metales pesados, por lo tanto, más biomasa aumenta la eficiencia de la fitorremediación.

La simbiosis leguminosa-Rhizobium se ha propuesto como una técnica prometedora para la fitorremediación de suelos contaminados debido a su actividad beneficiosa en la fijación simbiótica de nitrógeno (Jian *et al.* 2019). Algunos rizobios han sobrevivido bajo la contaminación por metales pesados. A pesar de su asociación simbiótica, su capacidad de fijación de nitrógeno se pierde (Broos *et al.* 2004). La aplicación de especies de Rhizobium tolerantes a metales pesados con la planta proporciona alta eficiencia para la fitorremediación (Dary *et al.* 2014). También tiene la ventaja adicional de proporcionar compuestos de N al suelo mediante la fijación biológica de nitrógeno en los nódulos de la raíz, incluso en suelos contaminados con metales (Hao *et al.* 2014). Esto mejora la fertilidad del suelo.

El Gramo de caballo es una leguminosa de pulso importante y se cultiva ampliamente en suelos rojo claro y grava de la India peninsular. La importancia de este cultivo es su adaptabilidad a las condiciones climáticas pobres y adversas, que no son adecuadas para otras leguminosas de pulso. Se cultiva ampliamente como una leguminosa de grano y forraje en los estados de Tamil Nadu, Karnataka, Andhra Pradesh y Orissa del sur de la India.

Los estudios actuales apuntan a analizar el efecto de la simbiosis planta-rizobia tolerante a Cu en el rendimiento fotosintético, la eficiencia simbiótica y el potencial de biosorción de las plantas de Gramo de caballo tras la inoculación con las cepas rizobianas elegidas.

### Materiales y Métodos

El Gramo de caballo [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.], pertenece a la especie *Macrotyloma uniflorum* del género *Macrotyloma* en la familia Fabaceae/Leguminosae del orden Fabales en el Reino Plantae. Se obtuvieron semillas de Gramo de caballo de los campos locales de Andhra Pradesh, India, para estudios de nodulación.

*Diseño experimental y tratamientos. Inoculación con cepas de rizobios cultivadas en diferentes concentraciones de cobre (Cu):* El experimento se llevó a cabo durante la temporada de Kharif en el Jardín Botánico, Universidad Acharya Nagarjuna, Andhra Pradesh, India. Las semillas

sodium hypochlorite for 3 min. Then seeds were washed in sterile water and dried. The rhizobial suspension of isolates HGR-4 (GQ483457), HGR-6 (GQ483458), HGR-13 (GQ483459) and HGR-25 (GQ483460) were grown in Yeast Extract Mannitol (YEM) broth in flasks shaken at 120 rpm at  $28 \pm 2$  °C for 3 days (cell density of  $6 \times 10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ). These suspensions were inoculated to Horse gram plants. The inoculation was performed on sterilized seeds were coated with the rhizobial strains (by soaking the seeds in liquid culture medium for 2 h using 10 % (wt/vol) gum Arabic as adhesive to deliver approximately  $10^9$  cells  $\text{seed}^{-1}$ ). The inoculated seeds (20 seeds  $\text{pot}^{-1}$ ) were sown in clay pots using 2 kg sterilized soil (autoclaved at 121 °C for 3 h for three successive days). Controls were maintained with seeds treated in sterilized distilled water. Cu tolerance of Horse gram plants without rhizobial inoculation was also analyzed with various Cu supplements i.e. 50, 100, 300 and 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  of  $\text{kg}^{-1}$  in unsterilized soil. Triplicates were maintained for each treatment. The pots were watered when required and were maintain separately in open field conditions and allowed to grow.

*Analysis of plants for Photosynthetic (PS) performance and symbiotic efficiency.* After 40 d treatment, the Net photosynthetic rate (PN) was determined with a Portable Photosynthetic System ADC Bioscientific, U.K. The measurements were made at ambient  $\text{CO}_2$  concentrations between 09.00 and 10.00 a.m. on a clear sky day. These plants were observed for nodulation regularly after the seedlings came out. Five plants in each treatment were picked up randomly and nodulation characteristics viz., number, size, shape, colour, distribution of the nodules were noted after 40 days of sowing, as it was previously observed that highest nodulation of Horse gram occurred at 40 days.

*Biochemical analysis.* For biochemical analysis, plants raised in different concentrations of Cu were collected, leghaemoglobin content was estimated after 40 (d) of sowing (Tu *et al.* 1970). Soil pH, organic matter, total nitrogen (N) (Jackson 1973) and total phosphorus (P) (Olsen *et al.* 1954) were estimated. The amount of sand, silt and clay present in the soil were also analyzed (Black 1965). Cu concentration present in control as well as in inoculated soil and nodule samples were determined by ICP-AAS (THERMO AAS Model No: ICE 3000).

*Statistical Analysis.* Statistical analysis was done in three replicates for each treatment. The mean and standard error (SE) were calculated using Microsoft Office Excel 2007. To know the statistical significance all the values were analyzed by ANOVA, using IBM SPSS Statistics, Version 20 (Armonk 2011). Bars indicate means of  $\pm$  SE and were significant at 5 % level of significance (LOS). P value < 0.05.

de Gramo de caballo se esterilizaron en la superficie con etanol al 70 % durante 3 minutos seguido de hipoclorito de sodio durante 3 minutos. Luego las semillas se lavaron en agua estéril y se secaron. La suspensión rizobial de los aislados HGR-4 (GQ483457), HGR-6 (GQ483458), HGR-13 (GQ483459) y HGR-25 (GQ483460) se cultivaron en caldo de extracto de levadura de manitol (ELM) en matraces agitados a 120 rpm a  $28 \pm 2$  °C durante 3 días (densidad celular de  $6 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). Estas suspensiones se inocularon en plantas de Gramo de caballo. La inoculación se realizó en semillas esterilizadas que se recubrieron con las cepas de rizobios (remojando las semillas en medio de cultivo líquido durante 2 horas usando goma arábica al 10% (peso/volumen) como adhesivo para administrar aproximadamente  $10^9$  células  $\text{semilla}^{-1}$ ). Las semillas inoculadas (20 semillas  $\text{maceta}^{-1}$ ) se sembraron en macetas de barro utilizando 2 kg de suelo esterilizado (esterilizado en autoclave a 121 °C durante 3 horas durante tres días sucesivos). Los controles se mantuvieron con semillas tratadas en agua destilada esterilizada. La tolerancia al Cu de las plantas de Gramo de caballo sin inoculación rizobial también se analizó con varios suplementos de Cu, es decir, 50, 100, 300 y 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de  $\text{kg}^{-1}$  en suelo no esterilizado. Se mantuvieron triplicados para cada tratamiento. Las macetas se regaron cuando fue necesario y se mantuvieron por separado en condiciones de campo abierto y se les permitió crecer.

*Análisis de plantas para el comportamiento fotosintético (FS) y la eficiencia simbiótica.* Después de 40 días de tratamiento, se determinó la tasa fotosintética neta (FN) con un Sistema Fotosintético Portátil ADC Bioscientific, Reino Unido. Las mediciones se realizaron a concentraciones ambientales de  $\text{CO}_2$  entre las 09.00 y las 10.00 a.m. en un día de cielo despejado. Estas plantas fueron observadas para la nodulación regularmente después de que aparecieron las plántulas. Se recogieron al azar cinco plantas en cada tratamiento y se observaron las características de la nodulación, es decir, número, tamaño, forma, color, distribución de los nódulos después de 40 días de la siembra, ya que se observó previamente que la mayor nodulación de Gramo de caballo ocurrió a los 40 días.

*Análisis bioquímico.* Para el análisis bioquímico, se recolectaron plantas cultivadas en diferentes concentraciones de Cu, se estimó el contenido de leghemoglobina después de 40 d de la siembra (Tu *et al.* 1970). Se estimaron el pH del suelo, la materia orgánica, el nitrógeno total (N) (Jackson 1973) y el fósforo total (P) (Olsen *et al.* 1954). También se analizó la cantidad de arena, limo y arcilla presente en el suelo (Black 1965). La concentración de Cu presente en el control, así como en el suelo inoculado y las muestras de nódulos se determinaron por ICP-AAS (THERMO AAS Modelo No: ICE 3000).

*Análisis estadístico.* El análisis estadístico se realizó en tres réplicas para cada tratamiento. La media y el error estándar (EE) se calcularon utilizando Microsoft Office Excel 2007. Para conocer la significación estadística, todos los valores fueron analizados por ANOVA, utilizando

## Results and Discussion

Horse gram plants have shown significant changes in their net photosynthetic rate (PN) upon inoculation with *Rhizobium* strains grown under different concentrations of Cu. Plants exposed to Cu have shown a decline in PN (Ahmad and Naim 2008). At 20  $\mu\text{M}$  concentration Cu decreased the PN of about 55 % over the control (Burzynski and Zurek 2007). Horse gram plants inoculated with the strain HGR-6 have shown their maximum PN [ $10.44 \mu\text{mol} (\text{CO}_2) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ] at  $100 \mu\text{g g}^{-1}$ . HGR-25 inoculated plants also have shown maximum PN values at this concentration. But, the values were low when compared to HGR-6 (figure 1). The plants inoculated with the strain HGR-4 have enhanced PN values with increase in Cu concentration up to  $500 \mu\text{g g}^{-1}$ .  $\text{CuCl}_2$  at low concentrations (0.1 mM) enhanced maximum  $\text{CO}_2$  assimilation rate in sweet sorghum (Poor *et al.* 2015). The plants inoculated with the strain HGR-13 have shown maximum PN only at  $50 \mu\text{g g}^{-1}$ . PN was significantly inhibited (100 %) and most similarly affected by two concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  i.e. 0.062 and 0.33 M (González-Mendoza *et al.* 2013). Cu has shown strong negative effect on PN in barley plants. At 20 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$  it was decreased to 56-57 % when compared to control plants (Vassilev *et al.* 2003). That effect is found to be low below 20 %. Cu initially destroys the photosynthetic carbon reduction cycle and subsequently influences the photosynthetic electron transport (Burzynski and Klobus 2004). Plants kept (96 h) in Hoagland nutrient solution without Cu, in full Hoagland solution ( $0.5 \mu\text{M}$  Cu) and in Hoagland medium with Cu from 1 to  $100 \mu\text{M}$ . The absence and the presence of Cu at above to  $1 \mu\text{M}$  inhibited PN (Costa *et al.* 2018). PN declined 24, 77 and 89 % at 0.1, 1 and 3 m mol  $\text{L}^{-1}$  Cu treatment when compared

IBM SPSS Statistics, Versión 20 (Armonk 2011). Las barras indican medias de  $\pm$  EE y fueron significativas al 5 % de nivel de significancia (NDS). Valor de  $p < 0.05$ .

## Resultados y Discusión

Las plantas de Gramo de caballo han mostrado cambios significativos en su tasa fotosintética neta (FN) tras la inoculación con cepas de *Rhizobium* cultivadas en diferentes concentraciones de Cu. Las plantas expuestas a Cu han mostrado una disminución en la FN (Ahmad *et al.* 2008). A 20  $\mu\text{M}$  de concentración de Cu disminuyó la FN de aproximadamente 55 % sobre el control (Burzynski y Zurek 2007). Las plantas de Gramo de caballo inoculadas con la cepa HGR-6 han mostrado su FN máxima [ $10.44 \mu\text{mol} (\text{CO}_2) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ] a  $100 \mu\text{g g}^{-1}$ . Las plantas inoculadas con HGR-25 también han mostrado valores máximos de FN a esta concentración. Pero, los valores fueron bajos en comparación con HGR-6 (figura 1). Las plantas inoculadas con la cepa HGR-4 tienen valores de FN mejorados con un aumento en la concentración de Cu de hasta  $500 \mu\text{g g}^{-1}$ . El  $\text{CuCl}_2$  a bajas concentraciones (0.1 mM) mejoró la tasa máxima de asimilación de  $\text{CO}_2$  en el sorgo dulce (Poor *et al.* 2015). Las plantas inoculadas con la cepa HGR-13 han mostrado FN máxima solo a  $50 \mu\text{g g}^{-1}$ . La FN se inhibió significativamente (100 %) y se vio afectada de manera similar por dos concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$ , es decir, 0.062 y 0.33 M (González-Mendoza *et al.* 2013). Cu ha mostrado un fuerte efecto negativo en la FN en las plantas de cebada. A 20 mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  se redujo a 56-57 % en comparación con las plantas de control (Vassilev *et al.* 2003). Este efecto está por debajo del 20 %. Inicialmente, el Cu destruye el ciclo de reducción de carbono fotosintético y posteriormente influye en el transporte de electrones fotosintéticos (Burzynski y Klobus 2004). Las plantas se mantuvieron (96 horas) en solución nutritiva Hoagland sin Cu, en solución Hoagland completa (Cu  $0.5 \mu\text{M}$ ) y en medio Hoagland con Cu de 1 a  $100 \mu\text{M}$ . La ausencia y la presencia de Cu por encima de  $1 \mu\text{M}$  inhibió la FN

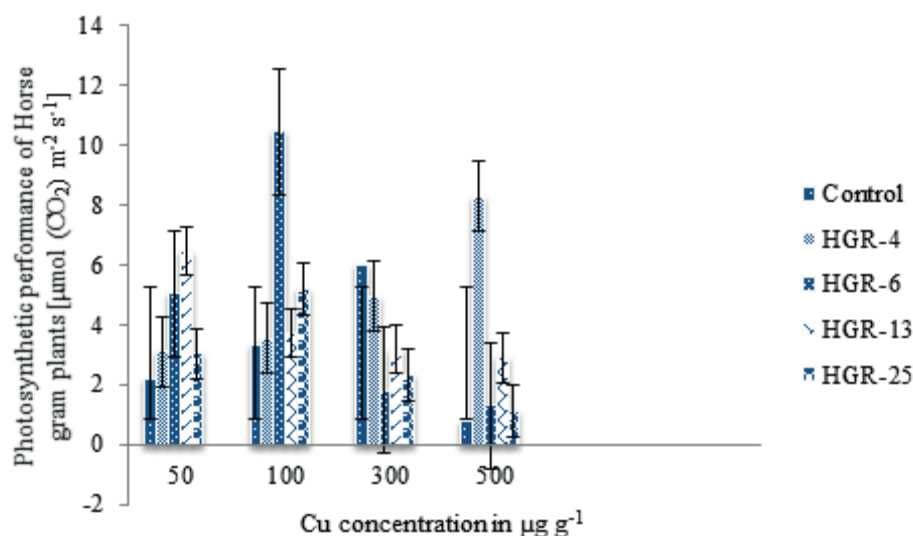


Figure 1. Copper effect on photosynthetic performance of Horse gram plants inoculated with four *Rhizobium* strains. Bars indicate mean  $\pm$  SE. All the values were analyzed by ANOVA using IBM SPSS Statistics Version 20 and were significant at 5% level of significance (LOS). P value  $< 0.05$ .

to control (Nisha *et al.* 2016). It clearly shows that Cu enhanced PN values of Horse gram plants with prior inoculation of rhizobia.

Horse gram rhizobial strains have shown their ability to form effective nodules at all the metal concentrations tested. In our study, nodules were observed after 13 days of sowing and were formed both on tap root and as well as on lateral roots. The total number of nodules formed per plant ranged from 12 to 18 (figure 2). The plants inoculated with the strain HGR-6 inoculated plants have shown maximum nodulation at 300  $\mu\text{g g}^{-1}$ . But, the strains HGR-4, 13 and 25 have shown at 100  $\mu\text{g g}^{-1}$ . After that the number of nodules was decreased with increasing Cu concentration. The increasing concentrations of Cu in N-free solution or potted soil reduced fresh nodule mass and volume (Sánchez-Pardo *et al.* 2012). Adverse effect of excessive Cu, on symbiotic biological nitrogen fixation (BNF) have shown inhibitory growth effect on the microsymbiont (Stan *et al.* 2011) nodule growth, development and function (Sanchez-Pardo *et al.* 2012). Cu at 192  $\mu\text{M}$  in N-free nutrient solution reduced nodule weight along with nodule number in *Lupines albus L.* and *Glycine max L.* (Sánchez-Pardo *et al.* 2012). Heavy metals at high concentration reduce the efficiency of symbiotic nodulation with *Rhizobium* and also inhibit plant

(Costa *et al.* 2018). La FN disminuyó 24, 77 y 89 % en el tratamiento con 0.1, 1 y 3  $\text{m mol L}^{-1}$  Cu en comparación con el control (Nisha *et al.* 2016). Se muestra claramente que el Cu aumentó los valores de FN de las plantas de Gramo de caballo con la inoculación previa de rizobios.

Las cepas de rizobios de Gramo de caballo han demostrado su capacidad para formar nódulos efectivos en todas las concentraciones de metales analizadas. En nuestro estudio, se observaron nódulos después de 13 días de la siembra y se formaron tanto en la raíz principal como en las raíces laterales. El número total de nódulos formados por planta varió de 12 a 18 (figura 2). Las plantas inoculadas con la cepa HGR-6 han mostrado una nodulación máxima a 300  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Pero, las cepas HGR-4, 13 y 25 han mostrado 100  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Después de eso, el número de nódulos disminuyó al aumentar la concentración de Cu. Las concentraciones crecientes de Cu en solución libre de N o suelo en maceta redujeron la masa y el volumen de nódulos frescos (Sánchez-Pardo *et al.* 2012). El efecto adverso del Cu excesivo en la fijación biológica simbiótica de nitrógeno (FBN) ha demostrado un efecto inhibitorio del crecimiento, desarrollo y función del nódulo del microsimbionte (Stan *et al.* 2011) (Sánchez-Pardo *et al.* 2012). El Cu a 192  $\mu\text{M}$  en solución nutritiva libre de N redujo el peso del nódulo junto con el número de nódulos en *Lupines albus L.* y *Glycine max L.* (Sanchez-Pardo *et al.* 2012). Los metales pesados a altas concentraciones reducen la eficiencia de la

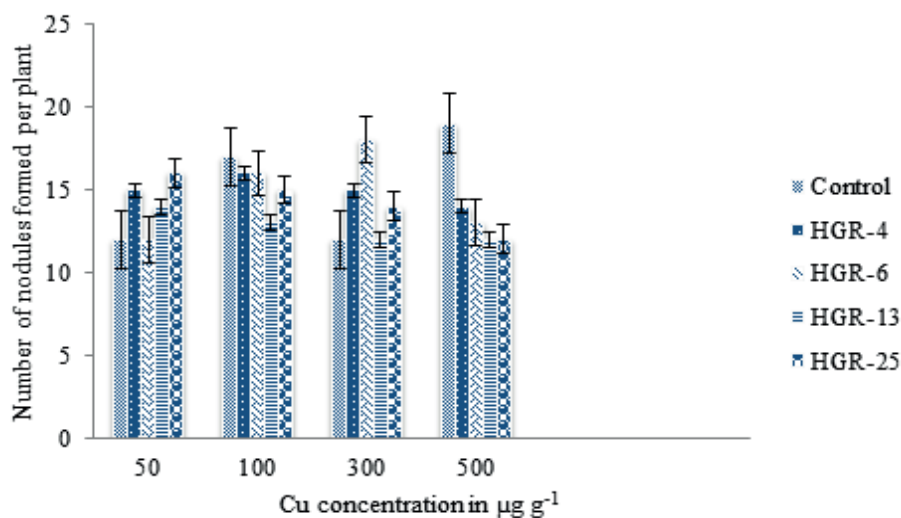


Figure 2. Nodulation of Horse gram plants inoculated with *Rhizobium* strains in response to Copper. Bars indicate mean  $\pm$  SE. All the values were analyzed by ANOVA using IBM SPSS Statistics Version 20 and were significant at 5% level of significance (LOS). P value < 0.05.

growth (Jian *et al.* 2019).

There are some variations in the ability to tolerate Cu toxicity among rhizobia-legume associations. The rhizobia-*Acacia auriculaeformis* association has high tolerance to  $\text{Cu}^{2+}$  than the *Rhizobium-Lespedeza formosa* association (Nie *et al.* 2002). Excess Cu reduced the number of functional nodules and the infected cells in nodules (Hao *et al.* 2015). Inoculation of green gram with *Bradyrhizobium sp.* under Cu stress decreased the number of nodules

nodulación simbiótica con *Rhizobium* y también inhiben el crecimiento de las plantas (Jian *et al.* 2019).

Existen algunas variaciones en la capacidad de tolerar la toxicidad de Cu entre las asociaciones de rizobia-leguminosa. La asociación rizobia-*Acacia auriculaeformis* tiene mayor tolerancia a  $\text{Cu}^{2+}$  que la asociación *Rhizobium-Lespedeza formosa* (Nie *et al.* 2002). El exceso de Cu redujo el número de nódulos funcionales y las células infectadas en los nódulos (Hao *et al.* 2015). La inoculación de gramo verde con *Bradyrhizobium sp.* bajo estrés de Cu

by 23 % at 1338 mg kg<sup>-1</sup> soil, when compared with control (Wani *et al.* 2007). High levels of Cu reduced nodule number and weight in *Vigna unguiculata* (Kopittke *et al.* 2007). The number of nodules formed were high at low concentration of Cu (50 mg kg<sup>-1</sup>) after that, they were decreased with increasing Cu concentration (Manivasagaperumal *et al.* 2011). The reduction in nodule number under Cu stress was also observed in Lupin, soy bean and *Vigna* (Sanchez-Pardo *et al.* 2012). Pot experiments have shown that 400 mg kg<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> greatly inhibited plant growth of *Medicago lupulina* but dual inoculation of *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 and *Agrobacterium tumefaciens* CCNWGS0286 significantly increased the number of nodules (Jian *et al.* 2019).

The amount of leghaemoglobin was maximum in Horse gram plants inoculated with the strains HGR-4, 6 and 25 at 300 µg g<sup>-1</sup> of Cu (figure 3). But, the plants inoculated with the strain HGR-13 have shown at 500 µg g<sup>-1</sup>. Cu at 192 µM concentration, in N-free nutrient solution reduced total plant nitrogen in *Lupinus albus* L. and *Glycine max* L. (Sanchez-Pardo *et al.* 2012). Cu causes reduction in protein content of nodule cytosol, bacteroid fractions and leghaemoglobin concentration of nodule cytosol (Younis 2007). Cu toxicity to plant on the production of leghaemoglobin was independent of inoculated rhizobia (Hao *et al.* 2014). A significant reduction in total shoot nitrogen was observed when Cu was increased from 0 to 100 mg Cu L<sup>-1</sup> in vitro and in vivo. In the potted soil based studies, increasing Cu concentration from 0-100 mg g<sup>-1</sup> resulted in drastic decrease in total shoot nitrogen of 39.2 and 36.2 % for GM3 and CP1 compared to 17.2 and 18.2 for PV1 and PV2 respectively (Hamisi Tindwa *et al.* 2014). The reduction in nitrogen fixation under Cu stress is due to its accumulation on the inner cortex and infected zones of the nodule there by inducing abnormalities in the structure and ultrastructure of

disminuyó el número de nódulos en 23 % a 1338 mg kg<sup>-1</sup> del suelo, en comparación con el control (Wani *et al.* 2007). Los altos niveles de Cu redujeron el número de nódulos y el peso en *Vigna unguiculata* (Kopittke *et al.* 2007). El número de nódulos formados fue alto a baja concentración de Cu (50 mg kg<sup>-1</sup>) después de eso, disminuyeron al aumentar la concentración de Cu (Manivasagaperumal *et al.* 2011). La reducción en el número de nódulos bajo estrés de Cu también se observó en Lupin, soya y *Vigna* (Sanchez-Pardo *et al.* 2012). Los experimentos con macetas han demostrado que 400 mg kg<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> inhibieron en gran medida el crecimiento de la planta de *Medicago lupulina*, pero la doble inoculación de *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 y *Agrobacterium tumefaciens* CCNWGS0286 aumentó significativamente el número de nódulos (Jian *et al.* 2019).

La cantidad de leghemoglobina fue máxima en las plantas de Gramo de caballo inoculadas con las cepas HGR-4, 6 y 25 a 300 µg g<sup>-1</sup> de Cu (figura 3). Pero, las plantas inoculadas con la cepa HGR-13 han mostrado 500 µg g<sup>-1</sup>. Cu a una concentración de 192 µM, en solución nutritiva libre de N redujo el nitrógeno total de las plantas en *Lupinus albus* L. y *Glycine max* L. (Sanchez-Pardo *et al.* 2012). Cu causa reducción en el contenido de proteínas del nódulo citosol, las fracciones de bacteroides y la concentración de leghemoglobina del nódulo citosol (Younis 2007). La toxicidad de Cu en la producción de leghemoglobina fue independiente de la rizobia inoculada (Hao *et al.* 2014). Se observó una reducción significativa en el nitrógeno total del brote cuando se aumentó el Cu de 0 a 100 mg de Cu L<sup>-1</sup> in vitro e in vivo. En los estudios basados en suelo en macetas, el aumento de la concentración de Cu de 0-100 mg g<sup>-1</sup> resultó en una drástica disminución en el nitrógeno total del brote de 39.2 y 36.2 % para GM3 y CP1 en comparación con 17.2 y 18.2 para PV1 y PV2 respectivamente (Hamisi Tindwa *et al.* 2014). La reducción en la fijación de nitrógeno bajo estrés de Cu se debe a su acumulación en la corteza interna y las zonas infectadas del nódulo induciendo anomalías en

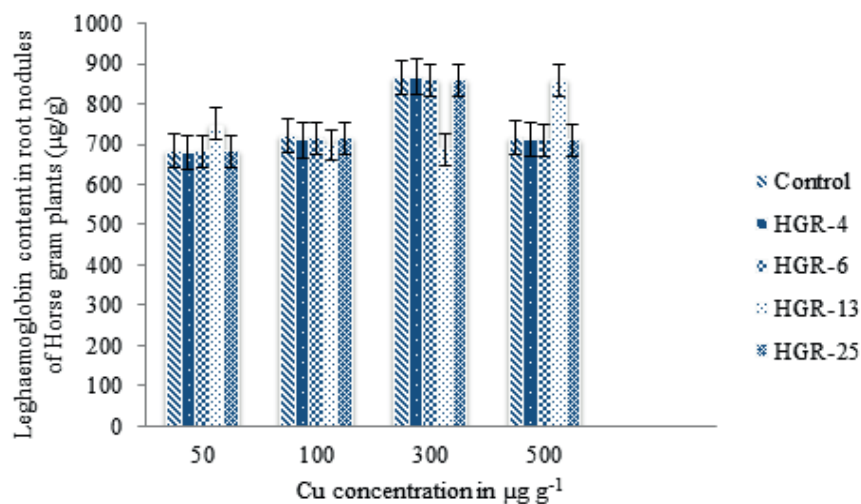


Figure 3. Leghaemoglobin content in root nodules of Horse gram plants inoculated with Rhizobium strains in response to Copper. Bars indicate mean ± SE. All the values were analyzed by ANOVA using IBM SPSS Statistics Version 20 and were significant at 5% level of significance (LOS). P value < 0.05.

the nodules (Sanchez-Pardo *et al.* 2012). Cu tolerant *S. meliloti* CCNWSX0020 can establish a normal symbiotic relationship with the host plant under Cu stress and the nitrogenase activity indicated that it has formed effective nodules under Cu stress (Jian *et al.* 2019).

The production of leghaemoglobin was quite sensitive to Cu stress in nodules generated by both wild-type and mutant strains. Nitrogen fixation in white clover was halved at 428 mg Cu kg<sup>-1</sup> (Broos *et al.* 2004) but, these concentrations were above the normal value in Woburn for total Cu (99 mg kg<sup>-1</sup>). The inoculated *Medicago lupulina* plants grown in the presence of excess Cu have shown a slight increase in N content in both shoots and roots (Kong *et al.* 2015). The nitrogen content in shoots could be considered as the supply of N through N-fixation in root nodules. Cu-resistant strain *S. meliloti* CCNWSX0020 is able to survive under the Cu concentration used and promotes a normal level of plant nitrogen (Kong *et al.* 2015). A significant increase in nitrogen content in plants was detected after co-inoculation of *S. meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens* which significantly increased the N content of the above ground portion by 19% compared to that of control in the presence of 400 mg kg<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> (Jian *et al.* 2019). The amount of total nitrogen (%) and phosphorus (%) present in the soil are 0.85 and 1.24 respectively. The total content of organic matter in soil is 1.20, sand 18, silt 16, clay 42 and the pH of the soil is 6.44.

In addition to nitrogen fixation, metal-resistant rhizobia demonstrate the production of plant growth-regulating substances or effects on metal solubility and bioavailability which affects plant metal uptake (Pajuelo *et al.* 2011). Bacterial biosorption/bioaccumulation mechanism together with other plant growth promoting features accounted for improved plant growth in metal contaminated soils (Zaidi *et al.* 2006). In the present study, biosorption potential of the strain HGR-6 was determined by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS), as the amount of metal present in the medium after the treatment with the isolate. The results have shown that the isolate was able to absorb Cu at a concentration of 500 µg g<sup>-1</sup> in root nodules and also in soil samples inoculated with the strain HGR-6 (figure 4 and 5). Therefore, the use of microbes for reduction/detoxification of heavy metals is one of the preferred choices and is considered a cost-effective approach in remediation technologies.

These bacteria can also protect the plants from the toxic effects of metals through an adsorption/desorption mechanism. The decrease in metal concentration after rhizobial inoculation suggested the role of strain RP5 in the removal of these metals through adsorption-desorption mechanism (Mammari *et al.* 1997). The dead cells of *Mesorhizobium amorphae* CCNWS0123 are an effective absorbent for removal of Cu from aqueous

la estructura y ultraestructura de los nódulos (Sanchez-Pardo *et al.* 2012). El *S. meliloti* CCNWSX0020 tolerante a Cu puede establecer una relación simbiótica normal con la planta hospedadora bajo estrés de Cu y la actividad de la nitrogenasa indica que ha formado nódulos efectivos bajo estrés de Cu (Jian *et al.* 2019).

La producción de leghemoglobina fue bastante sensible al estrés del Cu en los nódulos generados por cepas mutantes y de tipo salvaje. La fijación de nitrógeno en el trébol blanco se redujo a la mitad a 428 mg Cu kg<sup>-1</sup> (Broos *et al.* 2004) pero estas concentraciones estaban por encima del valor normal en Woburn para el Cu total (99 mg kg<sup>-1</sup>). Las plantas inoculadas de *Medicago lupulina* cultivadas en presencia de exceso de Cu han mostrado un ligero aumento en el contenido de N en brotes y raíces (Kong *et al.* 2015). El contenido de nitrógeno en los brotes podría considerarse como el suministro de N a través de la fijación de N en los nódulos de la raíz. La cepa *S. meliloti* CCNWSX0020 resistente a Cu puede sobrevivir bajo la concentración de Cu utilizada y promueve un nivel normal de nitrógeno vegetal (Kong *et al.* 2015). Se detectó un aumento significativo en el contenido de nitrógeno en las plantas después de la coinoculación de *S. meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* que aumentó significativamente el contenido de N de la porción sobre el suelo en un 19 % en comparación con el control en presencia de 400 mg kg<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> (Jian *et al.* 2019). La cantidad de nitrógeno total (%) y fósforo (%) presente en el suelo es 0.85 y 1.24, respectivamente. El contenido total de materia orgánica en el suelo es 1.20, arena 18, limo 16, arcilla 42 y el pH del suelo es 6.44.

Además de la fijación de nitrógeno, la rizobia resistente a los metales demuestra la producción de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas o los efectos sobre la solubilidad y la biodisponibilidad de los metales que afectan la absorción de los metales en la planta (Pajuelo *et al.* 2011). El mecanismo de bioacumulación / biosorción bacteriana junto con otras características promotoras del crecimiento de las plantas explicaron el crecimiento mejorado de la planta en suelos contaminados con metales (Zaidi *et al.* 2006). En este estudio, el potencial de biosorción de la cepa HGR-6 se determinó mediante Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA), como la cantidad de metal presente en el medio después del tratamiento con el aislado. Los resultados han demostrado que el aislado fue capaz de absorber Cu a una concentración de 500 µg g<sup>-1</sup> en nódulos de la raíz y también en muestras de suelo inoculadas con la cepa HGR-6 (figura 4 y 5). Por lo tanto, el uso de microbios para la reducción/desintoxicación de metales pesados es una de las opciones preferidas y se considera un enfoque rentable en tecnologías de remediación.

Estas bacterias también pueden proteger a las plantas de los efectos tóxicos de los metales a través de un mecanismo de adsorción/desorción. La disminución en la concentración de metales después de la inoculación de rizobios sugirió el papel de la cepa RP5 en la eliminación de estos metales a través del mecanismo de adsorción-desorción (Mammari

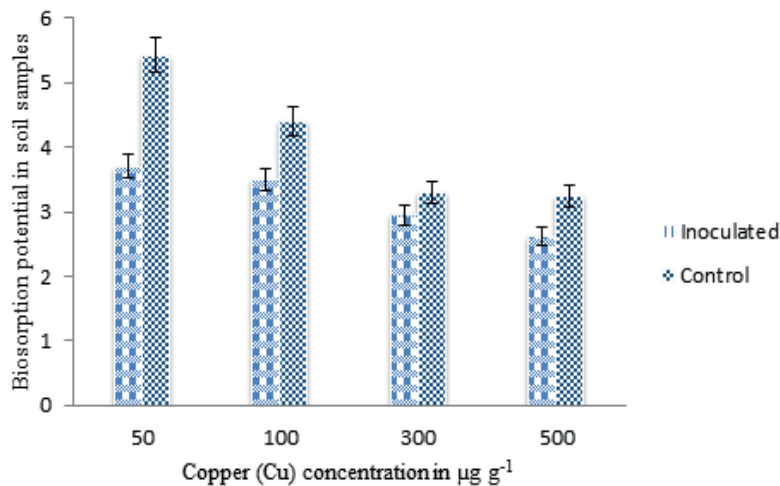


Figure 4. Metal (Cu) biosorption by the strain HGR-6 in soil determined by AAS. Bars indicate mean of  $\pm$  SE. All the values were analyzed by ANOVA using IBM SPSS Statistics Version 20 and were significant at 5 % level of significance (LOS). P value < 0.05.

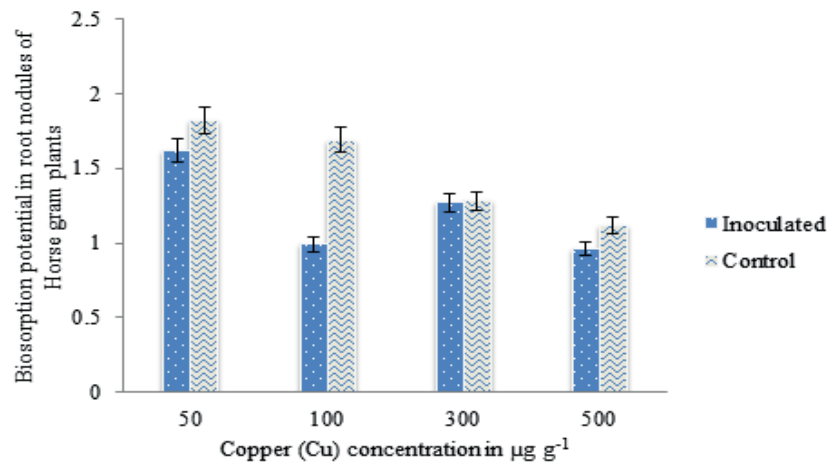


Figure 5. Metal (Cu) biosorption in root nodules of Horse gram plants inoculated with the strain HGR-6 determined by AAS. Bars indicate mean of  $\pm$  SE. All the values were analyzed by ANOVA using IBM SPSS Statistics Version 20 and were significant at 5 % level of significance (LOS). P value < 0.05.

solution. The removal of  $\text{Cu}^{2+}$  increased significantly by decreasing the pH up to 5.0 (Mohamd *et al.* 2012).

This study demonstrates that the Cu tolerant rhizobia i.e. HGR-4, 6, 13 and 25 enhanced the photosynthetic performance, symbiotic efficiency and biosorption potential in the rhizobia inoculated Horse gram plants. Hence, Horse gram plants associated with rhizobia could be used in the phytoremediation of metal (Cu) contaminated soils.

#### Acknowledgements

E.P is grateful to University Grants Commission (UGC), New Delhi for financial assistance under Post-Doctoral Fellowship (PDF). Heartfelt thanks to the Department of Botany and Microbiology, Acharya Nagarjuna University, Andhra Pradesh, India for providing photosynthetic analyzer facility.

*et al.* 1997). Las células muertas de Mesorhizobium amorphae CCNWGS0123 son un absorbente eficaz para la eliminación de Cu de una solución acuosa. La eliminación de  $\text{Cu}^{2+}$  aumentó significativamente al disminuir el pH hasta 5.0 (Mohamd *et al.* 2012).

Este estudio demuestra que los rizobios tolerantes a Cu, es decir, HGR-4, 6, 13 y 25, mejoraron el rendimiento fotosintético, la eficiencia simbiótica y el potencial de biosorción en las plantas de Gramo de caballo inoculadas con rizobios. Por lo tanto, las plantas de Gramo de caballo asociadas con rizobios podrían usarse en la fitorremediación de suelos contaminados con metal (Cu).

#### Agradecimientos

E.P agradece a la University Grants Commission (UGC), Nueva Delhi, por su ayuda financiera en virtud de la Beca Post-Doctoral (PDF). Un sincero agradecimiento al Departamento de Botánica y Microbiología, Universidad Acharya Nagarjuna, Andhra Pradesh, India, por proporcionar un analizador fotosintético.



## References

- Ahmed, H. A.H. & Naim, S. I. 2008. Heavy metals in eleven common species of fish from the Gulf of Aqaba, Red sea. Jordan. Journal of Biological Science, 1(1): 13-18. ISSN: 17273048 (print); 18125719 (online).
- Ahmad, E., Zaidi, A., Khan, K. S. & Oves, M. 2012. Heavy metal toxicity to symbiotic nitrogen-fixing microorganism and host legumes. In: Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation. pp. 29-44. ISBN: 978-3-7091-0729-4 (print); 978-3-7091-0730-0 (online).
- Armonk, N. Y. 2011. IBM Corp. SPSS Statistics for windows, Version 20.0. In: [ftp://public.dhe.ibm.com/software/analytics/spss/documentation/statistics/20.0/de/client/Manuals/IBM\\_SPSS\\_Conjoint.pdf](ftp://public.dhe.ibm.com/software/analytics/spss/documentation/statistics/20.0/de/client/Manuals/IBM_SPSS_Conjoint.pdf).
- Beladi, M., Habibi, D., Kashani, A., Paknejad, F. & Nooralvandi, T. 2011. Phytoremediation of Lead and Copper by Sainfoin (*Onobrychis vicifolia*): Role of antioxidant enzymes and biochemical biomarkers. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 10(3): 440-449. ISSN: 1818-6769 (print); 1990-4053 (online).
- Black, C. A. 1965. Methods of Soil Analysis. Part. 2 Chemical and biological properties. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. ISBN: 0-89118-072-9.
- Broos, K., Uyttendaele, M., Mertens, J. & Smolders, E. 2004. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry, 36(4): 633-640. ISSN: 0038-0717.
- Burzynski, M. & Klobus, G. 2004. Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. Photosynthetica, 42(2): 505-510. ISSN: 0300-3604 (print); 1573-9058 (online).
- Burzynski, M. & Zurek, A. 2007. Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. Photosynthetica, 45(2): 239-244. ISSN: 0300-3604 (Print) 1573-9058 (Online).
- Costa, M. B., Tavares, F.V., Martinez, C. B., Colares, I. G. & Martins, G. M. G. 2018. Accumulation and effects of copper on aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* L.: Potential application to environmental monitoring and phytoremediation. Ecotoxicology and Environmental Safety, 155(1): 117-124. ISSN: 0147-6513. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.01.062.
- Dary, M., Chamber-Perez, M. A., Palomeres, A. J. & Pajuelo, E. 2010. In situ phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant growth promoting rhizobacteria. Journal of Hazardous Materials, 177(1-3): 323-330. ISSN: 0304-3894.
- González-Mendoza, D., Espaday Gil, F., Escoboza-García, F., Santamaria, J. M. & Zapata-Perez, O. 2013. Copper stress on photosynthesis of Black Mangle (*Avicennia germinans*). Academia Brasileira de Ciências, 85(2): 665-670. ISSN: 0001-3765 (print); 1678-2690 (online).
- Hamisi Tindwa, Ernest Semu & Gottfried P. Msumali. 2014. Effects of elevated copper levels of biological nitrogen fixation and occurrence of rhizobia in Tanzanian coffee-cropped soil. Journal of Agricultural Science and Applications, 3(1): 13-19. ISSN: 2227-6475 (print); 2227-6483 (online). DOI: 10.14511/jasa.2014.030103.
- Hao, X., Taghavi, S., Xie, P., Orbach, M. J., Alwathnani, H. A., Rensing, C. & Wei, G. H. 2014. Phytoremediation of heavy and transition metals aided by legume-rhizobia symbiosis. International Journal of Phytoremediation, 16(2): 179-202. ISSN: 15226514 (print); 15497879 (online).
- Hao, X., Xie, P., Zhu, Y.G., Taghavi, S., Wei, G. & Rensing, C. 2015. Copper tolerance mechanisms of *Mesorhizobium amorphae* and its role in aiding phytostabilization by Robinia pseudoacacia in copper contaminated soil. Environmental Science and Technology, 49(4): 2328-2340. ISSN: 0013-936X (print); 1520-5851 (online). DOI: 10.1021/es504956a.
- Jackson, M. L. 1973. Soil Chemical Analysis. Prentice Hall of India Ltd., New Delhi, India. ISBN: 0-88192-453-9.
- Jian, L., Bai, X., Zhang, H., Song, X. & Li, Z. 2019. Promotion of growth and metal accumulation of alfalfa by coinoculation with Sinorhizobium and Agrobacterium under copper and zinc stress. Peer J, 5(7): 7.e6875. ISSN: 2167-8359. DOI: 10.7717/peerj.6875.
- Kamran, M., Bibi, S., Xu, R., Hussain, S., Mehmood, K. & Chaudhary, H. J. 2017. Phyto-extraction of chromium and influence of plant growth promoting bacteria to enhance plant growth. Journal of Geochemical Exploration 182(2): 269-274. ISSN: 03756742. DOI 10.1016/j.gexplo.2016.09.005.
- Kong, Z. Y., Glick, B. R., Duan, J., Ding, S. L., Tian, J., McConkey, B. J. & Wei, G. H. 2015. Effects of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase-over producing *Sinorhizobium meliloti* on plant growth and copper tolerance of *Medicago lupulina*. Plant Soil, 391(1-2): 383-398. ISSN: 0032-079X (Print); 1573-5036 (Online) doi: 10.1007/s11104-015-2434-4.
- Kopittke, P. M., Dart, P. J. & Menzies, N. W. 2007. Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). Environmental Pollution, 145(1): 309-315. ISSN: 0957-4352.
- Krujatz, F., Harstrick, A., Neortemann, B. & Greis, T. 2011. Assessing the toxic effects of nickel, cadmium and EDTA on growth of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas brassicacearum*. Water Air and Soil Pollution, 223(3): 1281-1293. Doi: 10.1007/s11270-011-0944-0. ISSN: 1567-7230 (print); 1573-2940 (online).
- Kurepin, L. V., Park, M. J., Lazarovits, G. & Bernards, M. A. 2015. *Burkholderia phytofirmans*-induced shoot and root growth promotion is associated with endogenous changes in plant growth hormone levels. Plant Growth Regulation, 75(1): 199-207. ISSN: 0167-6903 (Print) 1573-5087 (Online). DOI 10.1007/s10725-014-9944-6.
- Mamaril, J. C., Paner, E. T. & Alpante, B. M. 1997. Biosorption and desorption studies of chromium (iii) by free and immobilized Rhizobium (BJVr 12) cell biomass. Biodegradation, 8(4): 275-285. ISSN: 0923-9820.
- Manivasagaperumal, R., Vijayarengan, P., Balamurugan, S. & Thiyagarajan, G. 2011. Effect of copper on growth, dry matter yield and nutrient content of Vigna radiata (L.) Wilczek. Journal of Phytology, 3(3): 53-62. ISSN: 20756240.
- Meyer, G., Bunemann, E. K., Frossard, E., Maurhofer, M., Mader, P. & Oberson, A. 2017. Gross phosphorus fluxes in a calcareous soil inoculated with *Pseudomonas protegens* CHA0 revealed by 33P isotopic dilution. Soil Biology and Biochemistry, 104(1): 81-94. ISSN: 0038-0717. DOI 10.1016/j.soilbio.2016.10.001.

- Mohamad, O. A., Hao, X., Xie, P., Hatab, S., Lin, Y. & Wei, G. 2012. Biosorption of copper (II) from aqueous solution using non-living *Mesorhizobium amorphae* strain CCNWGS0123 *Microbes Environment*, 27(3): 234-41. ISSN: 1342-6311.
- Nie, X., Lan, C., Zhang, Z., Shu, W. & Huang, M. 2002. Effects of copper on rhizobia-*Acacia auriculaeformis* symbiotic association. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 13(2): 137-40. ISSN: 1001-9332.
- Nisha V. K. & Sharma, P. K. 2016. Photosynthesis in Copper mediated plant is affected due to oxidative damage caused by reactive oxygen species (ROS) generation. *International Journal of Recent Scientific Research*, 7(10): 14009-14115. ISSN: 0976-3031.
- Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F. S. & Dean, L. A. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium carbonate. 19. USDA Circular No. 939.
- Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I. D., Lafuente, A. & Caviedes, M. A. 2011. Legume-Rhizobium symbioses as a tool for bioremediation of heavy metal polluted soils. In: *Biomanagement of metal-contaminated soils*. Khan, M. S., Zaidi, A., Goel, R. & Musarrat, J. (eds.), 20: 95-123. ISBN: 978-94-007-1913-2 (print); 978-94-007-1914-9 (online). DOI: 10.1007/978-94-007-1914-9.
- Poor, P., Ordog, A., Wodala, B. & Tari, I. 2015. Effect of EDTA-assisted copper uptake on photosynthetic activity and biomass production of Sweet Sorghum. *Cereal Research Communications*, 43(4): 604-615. ISSN: 0133-3720 (print); 1788-9170 (online).
- Sánchez-Pardo, B., Fernández-Pascual, M. & Zornoza, P. 2012. Copper micro localisation, ultrastructural alterations and antioxidant responses in the nodules of white lupin and soybean plants grown under conditions of copper excess. *Environmental and Experimental Botany*, 84(1): 52-60. ISSN: 0098-8472.
- Stan, V., Gament, E., Corena, C.P., Voaides, C., Dusa, M. & Plopeanu, G. 2011. Effects of heavy metal from polluted soils on the Rhizobium diversity. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39 (1): 88-95. ISSN: 0255-965X.
- Szira, F., Monostori, I., Galiba, G., Rakszegi, M. & Balint, A. F. 2014. Micronutrient contents and nutritional values of commercial wheat flours and flours of field-grown wheat varieties - A survey in Hungary. *Cereal Research Communications*, 42(2): 293-302. ISSN: 0133-3720 (print); 1788-9170 (online).
- Thounaojam, T. C., Panda, P., Mazumdar, P., Kumar, D., Sharma, G. D., Sahoo, L. & Panda, S. K. 2012. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53(1): 33-39. ISSN: 0981-9428. DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.01006.
- Tu, J. C., Ford, R. E. & Garu, C. R. 1970. Some factors affecting the nodulation and nodule efficiency in Soy beans infected by Soy bean mosaic virus. *Phytopathology*, 60(11): 1653-1656. ISSN: 0031-949X (print); 1943-7684 (online). DOI: 10.1094/Phyto-60-1653.
- Vimal, S. R., Singh, J. S., Arora, N. K. & Singh, S. 2017. Soil-plant-microbe interactions in stressed agriculture management: a review. *Pedosphere*, 27(2): 177-192. ISSN: 1002-0160. DOI: 10.1016/S1002-0160(17)60309-6.
- Vassilev, A., Lidon, F., Ramalho, J.C., Dp Ceu Matos, M. & Gracam, D.A. 2003. Effects of excess Cu on growth and photosynthesis of Barley plants. Implication with a screening test for Cu tolerance. *Journal of central European Agriculture*, 4(3): 225-236. ISSN: 1332-9049.
- Wani, P. A., Khan, M. S. & Zaidi, A. 2007. Cadmium, chromium and copper in green gram plants. *Agronomy for Sustainable Development*, 27(2): 145-153. ISSN: 1774-0746.
- Younis, M. 2007. Response of Lablab purpureus-Rhizobium symbiosis to heavy metals in pot and field experiments. *World Journal of Agricultural Science*, 3(1): 111-122. ISSN: 1817-3047.
- Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B. R. & Musarrat, J. 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64(6): 991-997. ISSN: 0045-6535. DOI: 10.1016/j.Chemosphere.2005.12.057.

**Received: June 26, 2019**