Journal of Vegetables Sciences, Spring & Summer 2023, Vol 7, No 13(1), Pages 148-166

doi: 10.22034/IUVS.2023.1989570.1271 Article Type: Research Online ISSN: 2676-4822

The Influence of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescence* Bacteria on Alleviation of Negative Effects of Copper Chloride Toxicity on *Mentha spicata* L.

Maryam Haghmadad Milani[1*], Nasim Sefidi[1], Mohammad Kazem Bahrami[2], Habib Farhadi[3], Gholamreza Gohari[4] and Seyed Karim Tahami[5]

1- M.Sc. Gratuate, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Maragheh University, Maragheh, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Maragheh University, Maragheh, Iran
3- M.Sc. Gratuate, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Maragheh, Iran
4- Associate Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Maragheh, Iran
5- Faculty Member, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR) of Ardabil, Ardabil, Iran

[*]**Corresponding author:** maryam.haghmadad@gmail.com

(**Received:** 10 February 2023 **Revise:** 25 April 2023 **Accepted:** 25 April 2023)

Extended Abstract

1. **Introduction:** *Mentha spicata* is one of main cultivated crops in temperate, Mediterranean and sub-tropical regions. This plant is an enriched source of vitamins and mineral nutrients. Also, it is used for various medicinal purposes such as treatment of gastrointestinal and respiratory diseases. Nowadays, among the plant stresses, heavy metals toxicity is considered as dominant and global issue damaginh the environment. Heavy metals toxicity is mainly caused by human activities such as mining, irrigation with wastewater and using the products with high content of heavy metals. Heavy metals can negatively affect soil and water quality and human health even in low concentrations. Copper (Cu) is one of most dangerous heavy metals which threatens the human health and reduces the crops quality. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* bacteria are plant growth-promoting bacteria. They can stimulate growth and enhance plant resistance to different environmental stresses such as heavy metals toxicity. The aime of this study was to alleviate the adverse effects of Cu heavy metal toxicity on some of most important characteristics of Mentha spicata through the application of bacterial treatments.
2. **Materials and Methods:** In order to evaluate the influence of bacterial treatments including *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* + *P. fluorescens* on copper chloride toxicity stress at three levels including 0 (control), 100 and 200 mg kg^{-1} soil, a factorial experiment was carried out based on completely randomized design with four replications, at Department of Horticultural Science and Engineering of Maragheh University, during 2019. Some of most important characteristics of *Mentha spicata* such as plant height, aerial part fresh weight, root fresh weigh, photosynthetic pigments content, malondialdehyde (MDA) content, free proline content and antioxidant enzymes activity were measured under stress conditions.
3. **Results and Discussion:** The results of the current study showed that copper chloride toxicity stress had a negative effect on plant growth parameters such as plant height, fresh weight of aerial parts and root as well as photosynthetic pigments content, while the use of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* bacteria significantly alleviated these negative effects through increasing the activity of antioxidant enzymes and proline content. The highest fresh weight of aerial part (5.65 g) was recorded in plants treated with *P. putida* + *P. fluorescens* under control condition. The lowest weight of aerial part (2.95 g) was measured in plants treated with *P. fluorescens* under stress level of 200 mg kg^{-1} copper chloride. According to reports, the growth-promoting bacteria improve plant growth parameters by reduction of ethylene concentration in plant tissues under heavy metals stress conditions. Also these bacteria, directly increase plants growth rate through the increasing solubility of nutrients such as N and P in soil and biosynthesis of plant growth regulators and phytohormones. The highest SOD activity (35.55 U g^{-1} min^{-1}) was measured in plants treated with *P. putida* + *P. fluorescens* under stress level of 100 mg kg^{-1} copper chloride.
4. **Conclusion:** Based on the results of the present study, copper chloride stress decreased stem height, fresh weight of aerial parts, fresh weigh of roots and the leaf photosyntheyic pigments content (chlorophyll *a* and *b*), and increased malondialdehyde and proline content in *Mentha spicata* plants. However, the use of *P. putida* and *P. fluorescens* bacteria alleviated the negative effects of heavy metal stress by increasing

the activity of antioxidant enzymes (SOD and GPX) and proline content and reducing the amount of MDA (MDA is considered as indicator for cell membrane damages rate). Therefore, using *P. putida* and *P. fluorescens* bacteria treatment could be introduced as efficient and widely used technique to enhance tolerance rate of *Mentha spicata* against copper chloride toxicity stress.

Keywords: Bio-fertilizers, Edible vegetables, Growth-promoting bacteria, Heavy metals.

Citation: Haghmadad Milani, M., Sefidi, N., Bahrami, M. K., Farhadi, H., Gohari, Gh. & Tahami, S. K. (2023). The influence of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescence* bacteria on alleviation of negative effects of copper chloride toxicity on *Mentha spicata* L.. *Journal of Vegetables Sciences*, 13(1), 148-166. doi: 10.22034/IUVS.2023.1989570.1271

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/ by/4.0).

دوفصلنامه علمی علوم سبزی‌ها، سال ۷، دوره ۱۳، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۲، صفحات (۱۶۶-۱۴۸)

دانشگاه ایلام شاپا الکترونیکی: ۴۸۲۲-۲۶۷۶ نوع مقاله: پژوهشی doi: 10.22034/IUVS.2023.1989570.1271

تأثیر باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* بر کاهش اثرات منفی سمیت کلرید مس بر گیاه نعناع سنبله‌ای

مریم حق‌مدد میلانی[1*]، نسیم سفیدی[1]، محمد کاظم بهرامی[2]، حبیب فرهادی[3]، غلامرضا گوهری[4] و سید کریم تهامی[5]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۵- عضو هیأت علمی، مرکز جهاد دانشگاهی اردبیل، اردبیل، ایران

[*]نویسنده مسئول: maryam.haghmadad@gmail.com

(**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۱۱/۲۱ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۲/۰۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۲/۰۵)

چکیده

باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* از جمله باکتری‌های محرک رشد گیاه هستند که می‌توانند باعث تحریک رشد و افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های مختلف محیطی مانند فلزات سنگین شوند. لذا، این پژوهش در سال ۱۳۹۹ به‌منظور بررسی تأثیر باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* بر کاهش اثرات نامطلوب تنش کلرید مس در گیاه نعناع سنبله‌ای در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه مراغه اجرا گردید. این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. تیمارهای پژوهش شامل *سودوموناس پوتیدا*، *سودوموناس فلورسنس* و تیمار ترکیبی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* در سه سطح تنش کلرید مس (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) بودند. نتایج این پژوهش نشان داد تنش سمیت کلرید مس تأثیر منفی بر شاخص‌های رشدی مانند ارتفاع گیاه، وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه و نیز رنگیزه‌های فتوسنتزی داشت، در حالی که کاربرد باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* باعث افزایش معنی‌دار این شاخص‌ها گردید. این باکتری‌ها از طریق افزایش فعالیت مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای پرولین و نیز با کاهش میزان مالون دی‌آلدئید باعث بهبود عملکرد و رشد گیاه و درنهایت افزایش مقاومت گیاه نعناع سنبله‌ای در برابر تنش کلرید مس شدند. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد استفاده از باکتری‌های محرک رشد در مناطقی که گیاهان از مشکل تنش سمیت عناصر سنگین خاک رنج می‌برند می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مفید برای افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش فوق در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های محرک رشد، سبزی‌های خوراکی، فلزات سنگین، کودهای زیستی

استناد: حق‌مدد میلانی، م.، سفیدی، ن.، بهرامی، م. ک.، فرهادی، ح.، گوهری، غ. ر. و تهامی، س. ک. (۱۴۰۲). تأثیر باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* بر کاهش اثرات منفی سمیت کلرید مس بر گیاه نعناع سنبله‌ای. *علوم سبزی‌ها*، ۱۳(۱)، ۱۶۶-۱۴۸.

حق چاپ:

حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به‌صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل‌دسترس است.

مقدمه

سبزی‌ها به‌دلیل فوائد متعدد به‌طور گسترده‌ای در رژیم-های غذایی مختلف استفاده می‌شوند. سبزیجات دارای غلظت بالای ویتامین‌ها به‌ویژه ویتامین‌های A و C، مواد معدنی و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند. علاوه‌براین، سبزیجات به‌عنوان منبع فیبر غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Slavin & Lloyd., 2012). خانواده نعناعیان، یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهان دارویی، معطر و از سبزی‌های خوراکی محسوب می‌شوند و گیاهان این خانواده از لحاظ کاربرد در محصولات دارویی، آرایشی، صنایع غذایی و نیز کاربرد اقتصادی از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Zargari, 2004). نعناع سنبله‌ای (*M*entha *spicata* L.) یکی از گونه-های اصلی کشت‌شده در مناطق معتدل، مدیترانه‌ای و نیمه‌گرمسیری می‌باشد و از این گیاه برای درمان مشکلات گوارشی، تنفسی، بوی بد دهان و اسپاسم عضلات استفاده می‌شود. در طب سنتی ایران از روش-های مختلف (جوشانده، تنتور و قرص) برای درمان اختلالات نفخ استفاده شده است (Mahboubi., 2021). نعناع سنبله‌ای مانند سایر گیاهان باغی، در طول مراحل رشدی می‌تواند تحت تأثیر عوامل تنش‌زای محیطی مختلف قرار گیرد. در این بین، تنش کلرید مس می‌تواند بسیاری از پارامترهای مرتبط با رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد و مانع فعالیت بسیاری از واکنش‌های آنزیمی و متابولیکی گیاهان شود (Baycu *et al*., 2006).

در حال حاضر، در میان عوامل مختلف تنش‌زا برای گیاهان، سمیت فلزات سنگین یک مشکل زیست-محیطی جهانی است. این سمیت عمدتاً ناشی از فعالیت-های انسانی مانند استخراج معادن، آبیاری با فاضلاب و استفاده از محصولاتی است که حاوی فلزات سنگین بیش از حد مجاز می‌باشند. فلزات سنگین حتی در غلظت‌های کم می‌توانند اثرات جدی بر محیط‌زیست و موجودات زنده داشته باشند (Chen *et al*., 2022). در میان فلزات سنگین، مس خطرناکترین فلزی است که از طریق زنجیره‌غذایی و علوفه، سلامتی انسان و دام را به-خطر می‌اندازد (Kumar *et al*., 2021). مس یکی از هشت عنصر ریزمغذی می‌باشد که برای رشد گیاه ضروری است و با بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان مرتبط می‌باشد (Chen *et al*., 2022)، اما در غلظت‌های سمی، اثرات منفی قابل-توجهی بر ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه دارد و این اثرات در تمام مراحل رشد گیاه مشهود می‌باشد؛ به‌طوریکه، غلظت‌های سمی مس می-تواند رشد و متابولیسم گیاه، جذب مواد مغذی، رشد ریشه و گسترش برگ را مهار کند (Ali *et al*., 2013; Gong *et al*., 2021). مس در غلظت بالا به‌طور غیرمستقیم با برهم زدن تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و سم‌زدایی آن‌ها منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود (Møller *et al*., 2007). بنابراین، فلزات سنگین با تحریک تشکیل رادیکال‌های آزاد (ROS) مانند اکسیژن منفرد ($^1O_2$)، رادیکال سوپراکسید (O^-_2)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل ($^{\bullet}OH$) باعث ایجاد اختلال در هموستازی ROS گیاهان می‌شوند (Sharma and Dietz., 2009; Gupta., 2010). این افزایش ROS، سلول‌ها را در معرض تنش اکسیداتیو قرار می‌دهد که منجر به پراکسیداسیون لیپیدی، تخریب ماکرومولکول‌های بیولوژیکی، از بین رفتن غشاء، نشت یونی، جدا شدن رشته DNA و در نهایت مرگ گیاهان می‌شود (Braconi *et al*., 2011). بنابراین، یافتن فاکتورهایی برای افزایش عملکرد و تحمل گیاهان در برابر چنین تنش‌هایی می‌تواند گامی مهم و ارزشمند در بخش کشاورزی باشد.

کودهای زیستی یکی از مهم‌ترین ارکان کشاورزی ارگانیک یا آلی و پایدار را تشکیل می‌دهند که استفاده صحیح و مناسب از آن‌ها می‌تواند ضمن افزایش عملکرد کمی و کیفی محصولات کشاورزی، باعث کاهش قابل-توجه مصرف انواع کودهای شیمیایی و حفظ محیط-زیست شود. این کودها حاوی ریزجانداران زنده (باکتری‌ها و قارچ‌های سودمند) یا متابولیت‌های تولیدی

آن‌ها می‌باشند که از طریق روش‌هایی مانند تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات، رهاسازی پتاسیم، تأمین آهن و دیگر عناصر به بهبود تغذیه گیاه کمک می‌نمایند (Bhanse *et al*., 2022). یکی از مهمترین جنس‌های مختلف باکتری‌های محرک رشد (PGPR= Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) جنس *سودوموناس* می‌باشد که در تولید کودهای باکتریایی برای افزایش عملکرد گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند و در حال حاضر جزء محصولات تجاری محسوب می‌شوند (Rodríguez & Fraga., 1999). باکتری‌های محرک رشد از طریق افزایش جذب عناصر غذایی، حفاظت گیاه در برابر پاتوژن‌ها، تولید هورمون‌های گیاهی، بهبود ساختار خاک و قدرت حل‌کنندگی فسفات، باعث بهبود رشد گیاهان می‌شوند (Bhanse *et al*., 2022). در پژوهشی نشان داده شد که کودهای زیستی (باکتری‌های محرک رشد) باعث بهبود صفات مورفولوژیکی مانند ارتفاع ساقه، وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه در سیب‌زمینی شد (Barzegari Barogh *et al*., 2021). Goldani و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که حضور باکتری‌های *نیتروژنوباکتر* و *سودوموناس* در ترکیبات دو کود نیتروکسین و بیوسفر سبب تسهیل در انجام فرآیند فتوسنتز شده و به‌عبارتی مواد لازم برای انجام این فرآیند به سهولت در دسترس واکنش‌های فتوسنتزی قرار می‌گیرد. باکتری‌های جنس *سودوموناس فلورسنس* (*Pseudomonas fluorescens*) و *سودوموناس پوتیدا* (*Pseudomonas putida*) نیز باعث حفاظت و بهبود بافت خاک و جذب عناصری مانند روی، کلسیم، پتاسیم و منیزیم می‌شوند. این باکتری‌ها با ترشح ترکیبات سیدروفور و با ایجاد اثر آنتاگونیستی علیه ریزجانداران، گیاه را در مقابل تنش‌های اکسیداتیو و آثار سمی آلاینده‌ها و فلزات سنگین محافظت می‌کنند (Vocciante *et al*., 2022). از آنجایی که نعناع سنبله‌ای دارای خواص تغذیه‌ای، آنتی‌اکسیدانی و دارویی بالایی می‌باشد، یافتن روش‌هایی برای افزایش تحمل این گیاه در مقابل تنش‌های مختلف محیطی از اهمیت زیادی برخوردار است. یکی از راهکارهای موثر برای غلبه بر اثرات نامطلوب تنش کلرید مس، کاربرد باکتری‌های محرک رشد جنس *سودوموناس* می‌باشد که بر رشد و متابولیسم گیاهان مفید هستند. باتوجه به مطالب ذکرشده هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثرات کاربرد باکتری‌های محرک رشد *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* بر گیاه نعناع سنبله‌ای تحت تنش کلرید مس و ارزیابی این اثرات بر برخی شاخص‌های مورفولوژیکی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و بیوشیمیایی گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۹ درگلخانه تحقیقاتی گروه علوم و مهندسی باغبانی در دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار اجرا گردید. برای آماده‌سازی بستر کشت، از گلدان‌های پنج لیتری پلاستیکی به‌عنوان ظروف کشت استفاده شد و خاک مورد استفاده از مزارع تحقیقاتی دانشگاه مراغه تهیه شد. به‌منظور آلوده‌سازی خاک، محلول کلرید مس در سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک تهیه و ب طور یکنواخت بر روی خاک موجود در گلدان‌های پنج کیلوگرمی اسپری شد و کاملاً با خاک مخلوط گردید. گیاهان نعناع سنبله‌ای از طریق تقسیم بوته تکثیر شدند. بدین صورت که در هر گلدان پنج لیتری، دو ریزوم با طول پنج سانتی‌متر قرار داده و درگلدان‌های مجزا کشت داده شدند. به‌منظور یکنواختی واحدهای آزمایشی، گیاهان تقریباً هم‌اندازه و با قدرت رشدی یکسان، جهت تیمار استفاده شدند. عملیات آبیاری و نگهداری گیاهان بر اساس شرایط طبیعی برای تمام گیاهان انجام گردید.

باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش (*Pseudomonas fluorescence* و *Pseudomonas putida*) از آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه تبریز تهیه گردید. به‌ازای هر سویه باکتری مورد استفاده در این پژوهش ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت نوترینت براث تهیه گردید. محیط‌کشت تهیه‌شده اتوکلاو گردید و پس از آن تلقیح سویه‌های باکتری مورد نظر به‌طور جداگانه در زیر

هود لامینار، انجام شد، سپس دو روز در شیکر انکوباتر در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰ قرار گرفت. در مرحله بعد، یک ماه پس از کاشت و در مرحله سه برگی، تلقیح خاک با باکتری‌های محرک رشد صورت گرفت. عملیات تلقیح خاک در سه مرحله و با فاصله زمانی یک هفته انجام پذیرفت. بدین صورت که اطراف هر بوته ۵ میلی‌لیتر از مایه تلقیح ریخته شد. ضمناً گیاهان شاهد نیز با آب مقطر تیمار شدند. یک ماه بعد از انجام آخرین مرحله تلقیح و در زمان گلدهی، گیاهان برای اندازه‌گیری صفات رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی برداشت گردیدند.

بررسی صفات رشدی

صفات رشدی مانند ارتفاع بوته، وزن تر اندام هوایی و وزن تر ریشه در مرحله تمام گل اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی، ۰/۲ گرم از برگ تر گیاه با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی خرد گردید. سپس ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به نمونه اضافه و همگن شد و در ادامه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b قرائت شد. در نهایت با استفاده از روابط زیر میزان کلروفیل a و کلروفیل b بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ نمونه به‌دست آمد (Arnon, 1967).

رابطه ۱ $\text{Chlorophyll } a = (19.3\times A_{663} - 0.86\times A_{645})V/100W$

رابطه ۲ $\text{Chlorophyll } b = (19.3\times A_{645} - 3.6\times A_{663})V/100W$

V= حجم محلول صاف‌شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفوژ)

A= جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر

W= وزن تر نمونه برگ بر حسب گرم

مالون دی‌آلدئید (MDA)

برای اندازه‌گیری میزان MDA، ۰/۲ گرم از برگ تر گیاه با ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری‌کلرو استیک اسید همگن شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. ۲ میلی‌لیتر از سوپرناتانت نمونه با ۴ میلی‌لیتر از محلول ۲۰ درصد تری کلرواستیک اسید محتوی ۰/۵ درصد اسید تیوباربیتوریک مخلوط شد. کمپلکس حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس به حمام آب سرد منتقل گردید. نمونه‌ها مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت گردید. میزان پراکسید شدن لیپیدها با استفاده از اختلاف بین طول موج‌های جذبی و ضریب خاموشی $155\ cm^{-1}\ mmol^{-1}$ بدست آمد (Heath & Packer, 1968).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم SOD طبق روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) انجام شد. کمپلکس واکنش شامل ۰/۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی-مولار، ۰/۲ میلی‌لیتر متیونین ۰/۲ مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر EDTA۳ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۱ میلی-لیتر سدیم کربنات ($NaCO_3$) ۱/۵ مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر ریبوفلاوین ۰/۰۶ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر NBT (نیتروبلو تترازولیوم کلرید) ۲/۲۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی می‌باشد. لوله‌های آزمایش حاوی کمپلکس واکنش به‌مدت ۱۶ دقیقه در فاصله ۳۰ سانتی‌متری در منبع نور قرار گرفته و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی کامل نگهداری شد. تغییرات جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. یک واحد آنزیمی براساس حجم عصاره آنزیمی مرتبط با ۵۰ درصد ممانعت از انجام واکنش بیان می‌شود. فعالیت آنزیم SOD براساس واحد آنزیمی به‌ازای هر میلی‌گرم بر وزن تر برگ برای تمام نمونه‌ها محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

کمپلکس واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده می‌باشد. تغییرات جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت و میزان فعالیت آنزیم GPX با استفاده از ضریب خاموشی cm^{-1} ۲۶/۶$mmol^{-1}$ محاسبه شد (Panda., 2003).

پرولین

برای اندازه‌گیری میزان پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. ابتدا ۰/۲ گرم از نمونه برگ تر گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۳ درصد به‌وسیله هاون ساییده شد و عصاره‌های بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. ۲ میلی‌لیتر از عصاره را به فالکون منتقل نموده و ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید سالسیلیک‌گلاسیال اضافه شد. سپس به‌مدت یک ساعت در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از سرد شدن، ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. غلظت پرولین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۲۰ نانومتر و باتوجه به منحنی استاندارد برحسب میلی‌گرم بر گرم برگ تر، تعیین شد.

آنالیز آماری

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت و مقایسات میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد صورت گرفت. برای ترسیم نمودارها و جدول‌ها از نرم‌افزارهای Excel و Word استفاده شد.

نتایج و بحث

شاخص‌های رشدی

ارتفاع ساقه گیاه با افزایش غلظت کلرید مس و بدون تیمار باکتریایی کاهش یافت. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین میانگین ارتفاع بوته (۲۸ سانتی‌متر) مربوط به گیاهان شاهد (بدون تنش و بدون تیمار) و کمترین میانگین ارتفاع بوته (۱۴/۵ سانتی‌متر) در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک کلرید مس و بدون تیمار باکتریایی بدست آمد. بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش تیمارهای حاوی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* باعث افزایش میزان ارتفاع بوته در هر دو سطح تنش کلرید مس (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) شدند (شکل ۱).

با افزایش غلظت تنش کلرید مس، میزان وزن تر اندام‌های هوایی کاهش یافت. میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین وزن تر اندام‌های هوایی (۵/۶۵ گرم) مربوط به گیاهان تیمارشده با تیمار ترکیبی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* و بدون تنش کلرید مس و کمترین میزان وزن تر اندام‌های هوایی (۲/۹۵ گرم) در گیاهان تیمار شده با تیمار *سودوموناس فلورسنس* در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک تنش کلرید مس مشاهده گردید. با این حال، افزایش سطح تنش سمیت کلرید مس تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن تر اندام‌های هوایی گیاه نعناع سنبله‌ای نداشت (شکل ۲).

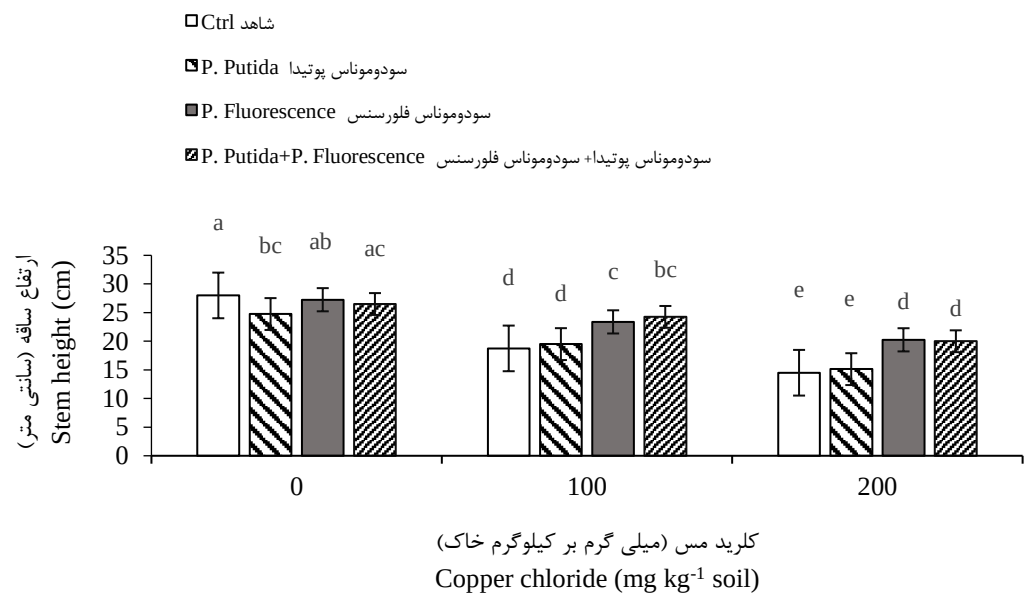
با افزایش غلظت تنش کلرید مس میزان وزن تر ریشه در گیاه کاهش یافت. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین وزن تر ریشه (۱۱/۱۲ گرم) در گیاهان تیمارشده با تیمار ترکیبی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* تحت تنش کلرید مس با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و کمترین وزن تر ریشه (۵/۷ گرم) در گیاهان تیمارشده با تیمار ترکیبی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* بدون تنش کلرید مس بدست آمد (شکل ۳).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد تنش کلرید مس منجر به ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و اختلالات متابولیکی در گیاه مورد مطالعه شد. تنش فلزات سنگین منجر به کاهش قطر ساقه، ممانعت از رشد ساقه، کاهش بافت‌های پارانشیمی و آوندهای چوبی و تشکیل بیشتر تریکوم‌ها در گیاهان می‌شوند (Riyazuddin *et al.*, 2022). بنابراین، کاهش رشد گیاه ممکن است به‌دلیل

کاهش میزان فتوسنتز در گیاه باشد؛ به طوریکه، تنش مس باعث کاهش عملکرد فتوسنتزی، بازده کوانتومی پایین PSII و کاهش رشد طولی سلول می‌شود (Alaoui-Sossé *et al*., 2004). در همین زمینه، Panou-Filotheou و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که با افزایش غلظت مس در خاک میزان ارتفاع ساقه و حجم ریشه در گیاه پونه کوهی کاهش می‌یابد و گزارش کردند که کاهش حجم ریشه و ارتفاع ساقه گیاه به دلیل محدود شدن جذب مواد معدنی توسط گیاه می‌باشد.

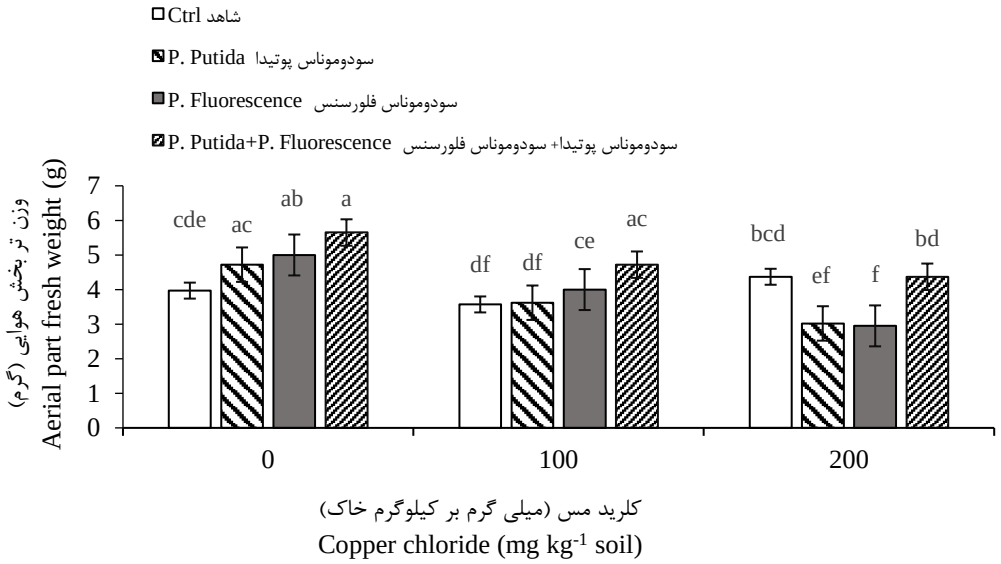
باکتری‌های محرک رشد با کاهش غلظت اتیلن در بافت‌های گیاهی باعث افزایش و بهبود رشد گیاهان تحت تنش فلزات سنگین می‌شوند (Mayak *et al*., 2004; Glick, 2005). همچنین، این باکتری‌ها با افزایش انحلال عناصر غذایی نظیر فسفر، تولید تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفورها، به‌طور مستقیم در افزایش رشد گیاهان نقش ایفا می‌کنند (Ping *et al*., 2004). *سودوموناس فلورسنس* به‌دلیل داشتن مکانیزم‌های متعدد برای تحریک رشد گیاه و مهار پاتوژن‌های گیاهی دارای اهمیت بالایی در رشد گیاه می‌باشد (Haas *et al*., 2005). باکتری *سودوموناس پوتیدا* از طریق مکانیزم‌های مختلف مانند تحریک ترشح هورمون اکسین، انحلال فسفات نامحلول، تولید سولفور و کاهش سطح مواد کاهنده رشد از جمله هورمون اتیلن می‌تواند سبب القای رشد در گیاهان گردد (Ahemad & Kibert, 2014). همچنین این باکتری از طریق تولید ایندول استیک اسید باعث تحریک طویل‌شدگی و تمایز سلولی و در نتیجه باعث رشد قارچ می‌گردد (Ortiz-Castro *et al*., 2020). مشخص شده است که اکسین باعث افزایش طول سلول‌های گیاهی، تحریک تقسیم سلولی، تمایز گیاهی و در نتیجه افزایش وزن تر اندام هوایی در گیاهان می‌شود (Cleland, 1987). همچنین این باکتری در غیرفعال‌سازی عناصر فلزات سنگین و جذب یون‌هایی نظیر مس مشارکت می‌کند (Rashid *et al*., 2004).

اولین اثر آشکار سمیت فلزات سنگین، مهار طویل-شدن ریشه در گیاهان می‌باشد. تقسیم سلولی در رأس ریشه و طویل‌شدن سلول در ناحیه رشد طولی، دو مکانیزم متفاوت رشد ریشه می باشند که هر دو مکانیزم، توسط فلزات سنگین تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Riyazuddin *et al*., 2022). در پژوهش حاضر با افزایش غلظت مس، میزان وزن تر ریشه کاهش یافت. سمیت مس تا حد زیادی بر رشد ریشه و مورفولوژی آن تأثیر می‌گذارد، زیرا تمایل به تجمع در بافت ریشه دارد و می‌تواند به اندام‌های هوایی منتقل شود (Yang *et al*., 2015). همچنین، غلظت بالای مس به ریشه گیاه آسیب می‌رساند که با علائمی مانند اختلال در کوتیکول ریشه و کاهش تکثیر ریشه تا تغییر شکل شدید ساختار ریشه همراه است (Sheldon & Menzies, 2005).



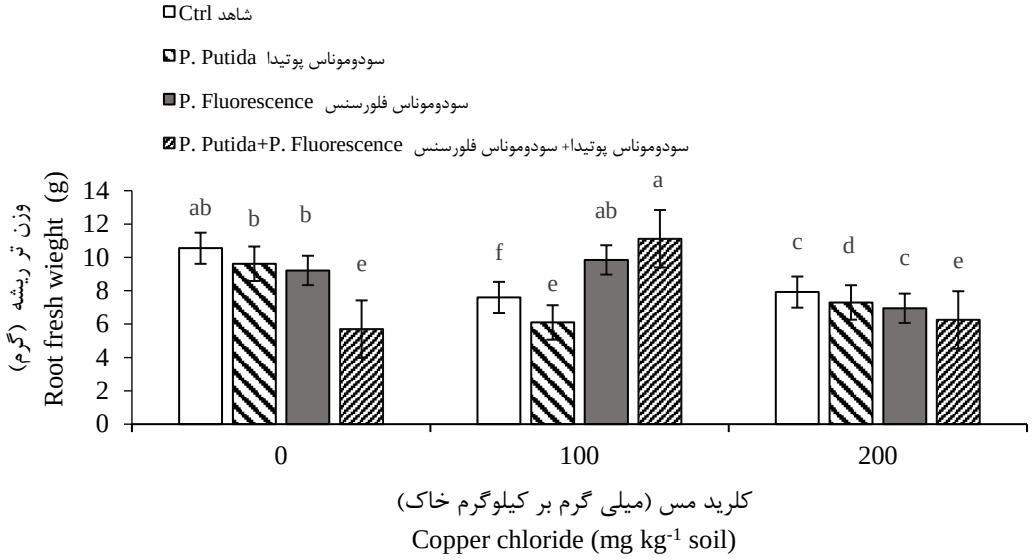
شکل ۱- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلرید مس و باکتری‌های محرک رشد بر ارتفاع ساقه گیاه نعناع سنبله‌ای

Figure 1- The interaction of different concentrations of copper chloride and growth-promoting bacteria on the stem height of *Mentha spicata* L.



شکل ۲- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلرید مس و باکتری‌های محرک رشد بر وزن تر اندام‌های هوایی گیاه نعناع سنبله‌ای

Figure 2- The interaction of different concentrations of copper chloride and growth-promoting bacteria on the aerial part fresh weight of *Mentha spicata* L.



شکل ۳- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلرید مس و باکتری‌های محرک رشد بر وزن تر ریشه گیاه نعناع سنبله‌ای
Figure 3- The interaction of different concentrations of copper chloride and growth- promoting bacteria on the root fresh weight of *Mentha spicata* L.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

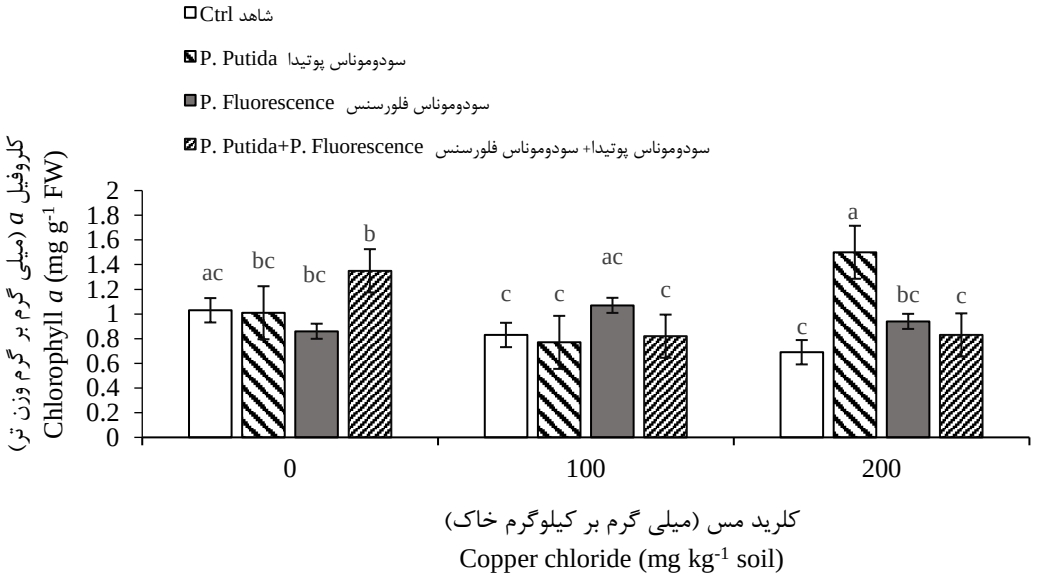
بیشترین میزان کلروفیل *a* (۱/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) مربوط به گیاهان تیمارشده با *سودوموناس پوتیدا* و تنش کلرید مس با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و کمترین میزان کلروفیل *a* (۰/۶۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) مربوط به گیاه با تنش کلرید مس با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و بدون تیمار باکتریایی شد (شکل ۴). بیشترین میزان کلروفیل *b* (۰/۳۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) مربوط به گیاهان تیمارشده با تیمار باکتری *سودوموناس پوتیدا* تحت تنش کلرید مس با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و کمترین میزان کلروفیل *b* (۰/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) مربوط به گیاه تحت تنش کلرید مس با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بدون تیمار باکتریایی شد (شکل ۵).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد با افزایش غلظت کلرید مس میزان کلروفیل *a* و کلروفیل *b* کاهش یافت. مهار فتوسنتزی یکی از اقدامات اولیه دفاعی در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین محسوب می‌شود؛ زیرا آن‌ها همواره بر دستگاه فتوسنتزی و عملکرد آن تأثیر می گذارند و فلزات سنگین سنتز کلروفیل و فعالیت‌های چرخه کالوین را به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با مهار واکنش‌های نوری و بی‌نیاز از نور فتوسنتزی مهار می کنند (Küpper *et al*., 2003). بنابراین، دستگاه فتوسنتزی هدف شناخته‌شده فلزات سنگین از جمله مس می‌باشد. جذب مس منجر به مهار تولید رنگدانه-های کاروتنوئیدی و کلروفیل، مهار آنزیم‌های سنتزکننده کلروفیل و روبیسکو می‌شود و دستگاه فتوسنتزی را در سطح تیلاکوئید و کلروپلاست تغییر می دهد (Maksymiec, 2007; Hattab *et al*., 2009). کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش فلزات سنگین ممکن است به دلیل کمبود ناحیه مسئول جذب نور در برگ و فتوسنتز باشد، یا ممکن است به‌دلیل تخریب کلروفیل با افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه-کننده کلروفیل (کلروفیلاز) باشد (Usman *et al*., 2020). از دلایل دیگر کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش می‌توان به انواع گونه‌های فعال اکسیژن اشاره کرد که موجب تخریب کلروفیل و آسیب به رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌گردد. اما کاهش غلظت کلروفیل تحت تنش عناصر سنگین، فقط به‌علت ممانعت از بیوسنتز کلروفیل نیست، بلکه جایگزینی منیزیم موجود در ساختار کلروفیل از مهم‌ترین اثرات تخریبی

این عناصر محسوب می‌شود (Zhang *et al*., 2020). در نتیجه، تجمع مس بیش از حد در بافت‌های گیاهی ممکن است ساختار کلروپلاست را مختل کند و در نتیجه باعث ایجاد تغییراتی در اجزای تشکیل‌دهنده غشای تیلاکوئید شود (Rehman *et al*., 2019).

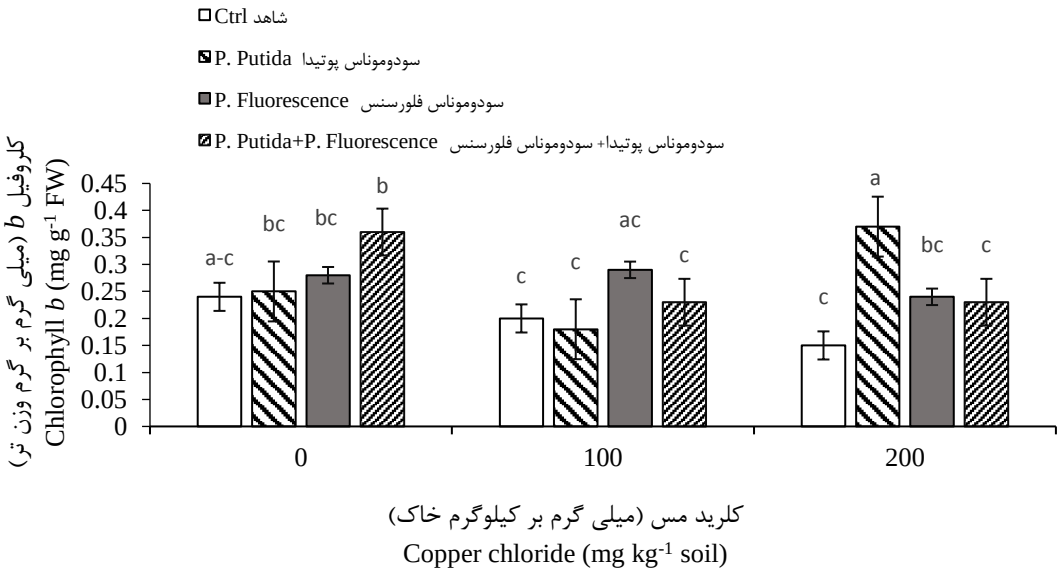
باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* با افزایش میزان کلروفیل *a* و کلروفیل *b* باعث بهبود فتوسنتز شدند. همچنین، تنظیم‌کننده‌های رشدی القاء شده توسط این باکتری‌ها می‌توانند گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده را توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی حذف کنند، درغیر این صورت گونه‌های فعال اکسیژن رنگدانه‌های فتوسنتزی را تخریب می‌کنند (Strzałka *et al*., 2003). علاوه بر این، سیدروفورهای ترشح‌شده توسط باکتری‌های سودوموناس، باعث کاهش علائم نکروز و افزایش مقدار کلروفیل *a* و کلروفیل *b* می‌شوند (Sharma *et al*., 2003)

.



شکل ۴- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلرید مس و باکتری‌های محرک رشد بر میزان کلروفیل *a* گیاه نعناع سنبله‌ای

Figure 4- The interaction of different concentrations of copper chloride and growth-promoting bacteria on the chlorophyll *a* content of *Mentha spicata* L.



شکل ۵- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلرید مس و باکتری‌های محرک رشد بر میزان کلروفیل *b* گیاه نعناع سنبله‌ای.

Figure 5- The interaction of different concentrations of copper chloride and growth-promoting bacteria on the chlorophyll *b* content of *Mentha spicata* L.

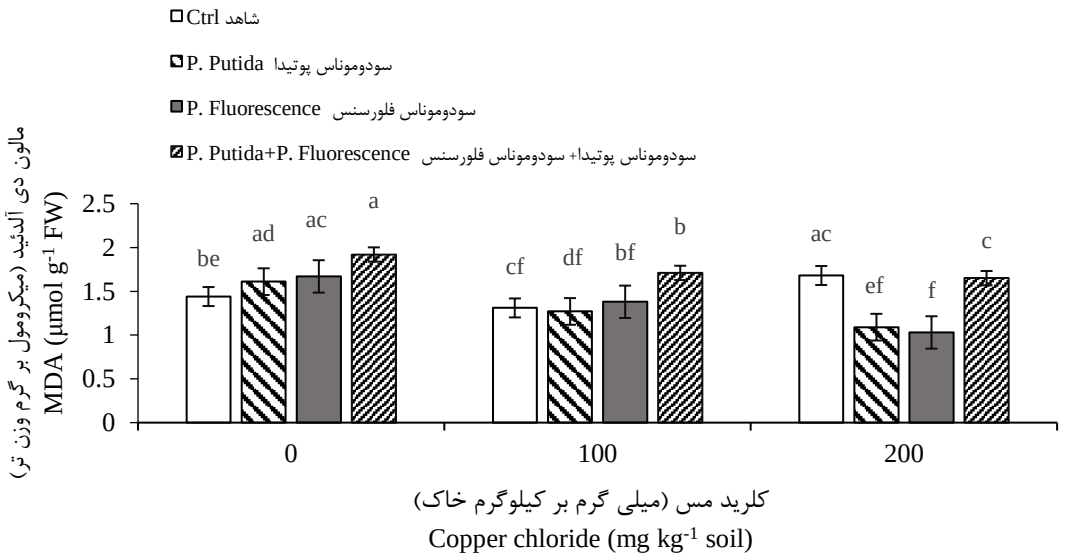
عملکرد بیوشیمیایی

مالون دی‌آلدئید (MDA)

بیشترین میزان MDA (۱/۹۲ میکرومول بر گرم وزن تر برگ) مربوط به گیاه تیمارشده با تیمار ترکیبی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* و بدون تنش کلرید مس و کمترین میزان MDA (۱/۰۳ میکرومول بر گرم وزن تر برگ) مربوط به گیاه تیمار شده با *سودوموناس فلورسنس* و تنش کلرید مس با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بود (شکل ۶).

شرایط تنش غیرزیستی باعث افزایش تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن در سطح سلولی می‌شود که این پدیده درنهایت باعث پراکسیداسیون لیپیدی غشاء می‌شود (Sgherri *et al*., 2000; Upadhyaya *et al*., 2010). اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر لیپیدها و پراکسیداسیون آن‌ها به‌دلیل تأثیر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع است که سبب تحریک واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون و تخریب اسیدهای چرب می‌گردد (Ding *et al*.,2017) و در نتیجه متابولیسم کربوهیدرات‌ها را مختل می‌کند (Marques *et al*., 2018).

باکتری‌های محرک رشد گیاه، بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه را افزایش می‌دهند و منجر به بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش پایداری غشاء و کاهش MDA و H_2O_2 در گیاهان تلقیح‌شده با باکتری‌های محرک رشد در مقایسه با گیاهان شاهد رشدیافته در شرایط تنش فلز سنگین می‌شوند (Gururani *et al*., 2012).



شکل ۶- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلرید مس و باکتری‌های محرک رشد بر میزان مالون دی‌آلدئید گیاه نعناع سنبله‌ای.

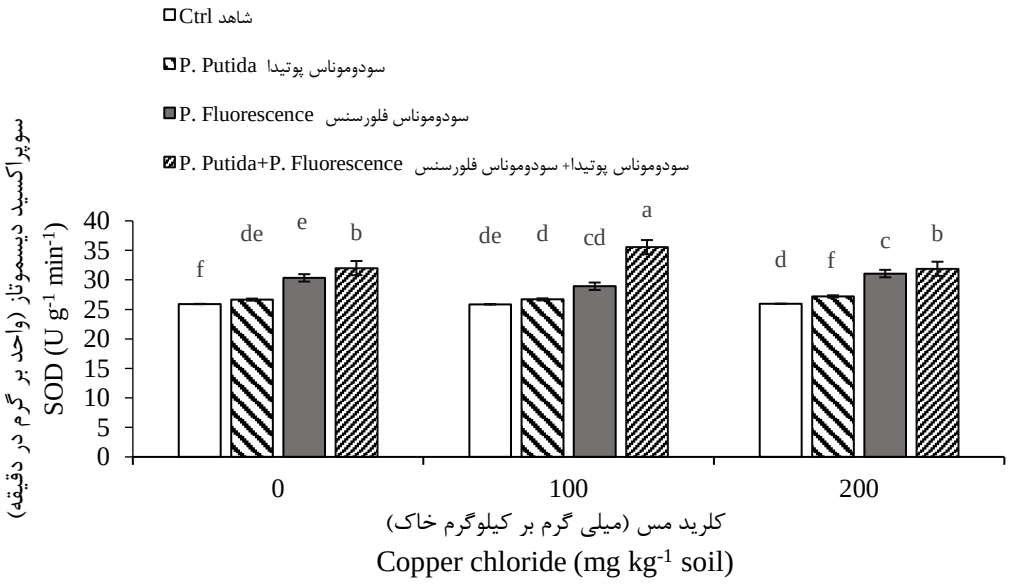
Figure 6- The interaction of different concentrations of copper chloride and growth-promoting bacteria on the malondialdehyde (MDA) content of *Mentha spicata* L.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گایاکول پراکسیداز (GPX)

بیشترین میزان فعالیت آنزیم SOD (۳۵/۵۵ واحد بر گرم در دقیقه) مربوط به گیاهان تیمارشده با تیمار ترکیبی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* تحت تنش کلرید مس با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و کمترین میزان فعالیت آنزیم SOD (۲۵/۸۷ واحد بر گرم در دقیقه) مربوط به گیاه تحت تنش کلرید مس با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و بدون تیمار باکتریایی بود (شکل ۷). همچنین، بیشترین میزان فعالیت آنزیم GPX (۴/۶۹ واحد بر گرم در دقیقه) مربوط به گیاهان تیمارشده با تیمار ترکیبی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* تحت تنش کلرید مس با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و کمترین میزان فعالیت آنزیم GPX (۱/۰۹ واحد بر گرم در دقیقه) مربوط به گیاه شاهد (بدون تنش و بدون تیمار) بود (شکل ۸). باتوجه به نتایج پژوهش حاضر، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و GPX با افزایش غلظت کلرید مس افزایش یافت. تیمار ترکیبی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* باعث افزایش فعالیت این آنزیم‌ها نسبت به گیاهان شاهد تحت تنش کلرید مس شد.

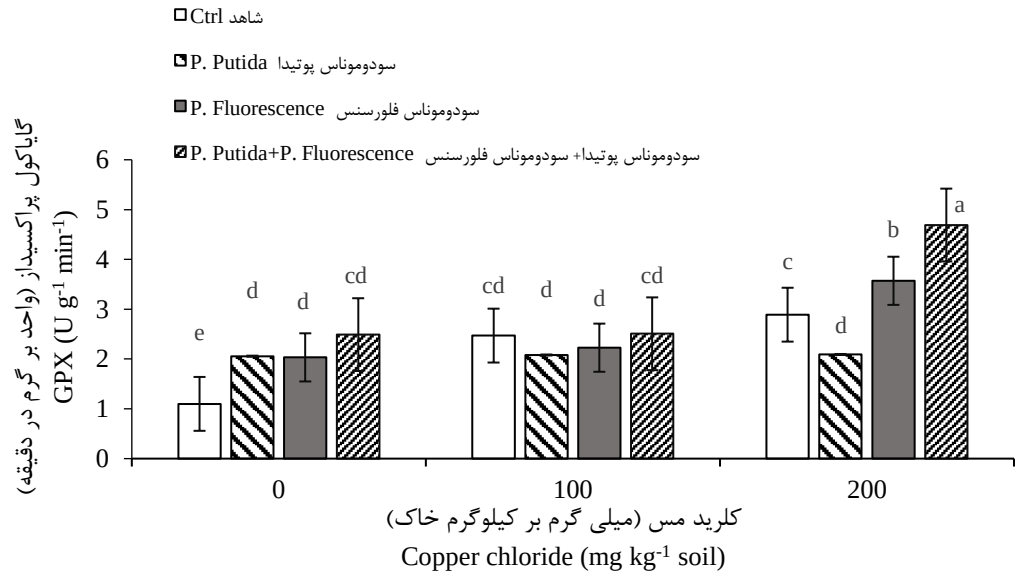
با قرار گرفتن گیاهان در معرض سمیت مس، پاسخ دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاهان به‌دلیل تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان یک مکانیزم دفاعی ثانویه محسوب می‌شود که با افزایش فعالیت این آنزیم-ها، آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش مس به حداقل می‌رسد (Islam *et al*.,2016). افزایش فعالیت آنزیم‌ها ممکن است بتواند غلظت‌های $NADP^+$ را افزایش دهد تا الکترون‌ها را از زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی دریافت کند و در نتیجه تولید ROS را کاهش دهد (Temel & Gozukirmizi, 2015).

در پژوهشی مشخص شد که باکتری‌های محرک رشد گیاهان، فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX را تحت تنش فلزات سنگین افزایش می‌دهند که این پدیده منجر به افزایش کارایی فتوسنتزی و در نهایت افزایش رشد گیاه می‌شود (Gururani *et al*., 2012).



شکل ۷- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلرید مس و باکتری‌های محرک رشد بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گیاه نعناع سنبله‌ای.

Figure 7- The interaction of different concentrations of copper chloride and growth-promoting bacteria on the superoxide dismutase (SOD) of *Mentha spicata* L.



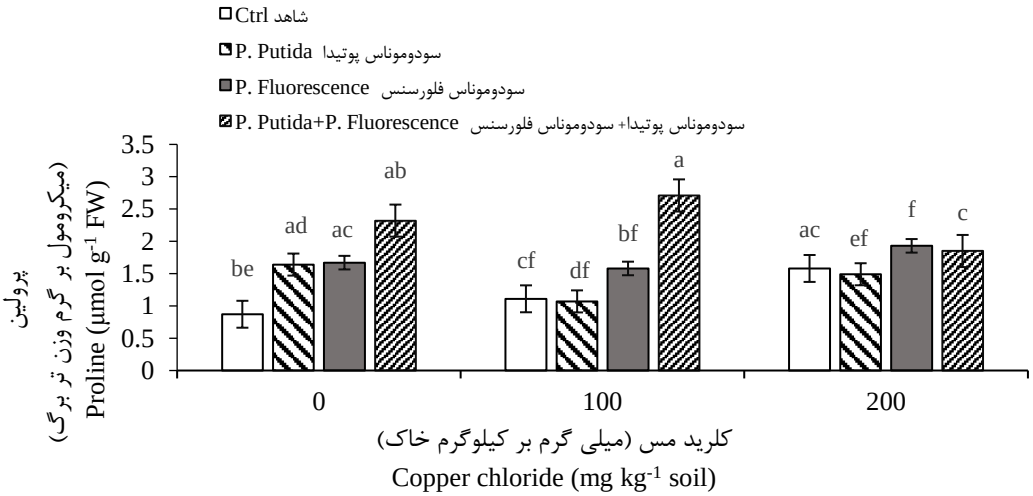
شکل ۸- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلرید مس و باکتری‌های محرک رشد بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز گیاه نعناع سنبله‌ای.

Figure 8- The interaction of different concentrations of copper chloride and growth-promoting bacteria on the guaiacol peroxidase (GPX) of *Mentha spicata* L.

پرولین

بیشترین میزان پرولین (۲/۷۱ میکرومول بر گرم وزن تر برگ) مربوط به گیاهان تیمارشده با تیمار ترکیبی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* تحت تنش کلرید مس با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و کمترین میزان پرولین (۰/۸۷ میکرومول بر گرم وزن تر برگ) مربوط به گیاه شاهد (بدون تنش و بدون تیمار) بود (شکل ۹).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد با افزایش تنش کلرید مس، میزان پرولین گیاه افزایش می‌یابد. همچنین، تیمار ترکیبی *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* باعث افزایش میزان پرولین گیاه نسبت به گیاهان شاهد تحت تنش کلرید مس شد. پرولین به‌عنوان ماده‌ای موثر در تنظیم اسمزی، پایدارکننده غشای پلاسمایی، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، نقش محافظتی در برابر اثرات زیان‌بار تنش‌های مختلف دارد. همچنین، این ماده با جلوگیری از تخریب پروتئین‌ها، حفظ تعادل پتانسیل اکسایش-کاهش، حذف رادیکال‌های آزاد و ROS، افزایش مقاومت به تنش، جلوگیری از مهار نوری و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای اشباع و اکسیداسیون پروتئین، نقش مثبتی بر کاهش اثرات تنش واردشده بر گیاه دارد (Islam *et al.*, 2009). پرولین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و پراکسیداز را افزایش می‌دهد و در غلظت‌های بالاتر ممکن است برای گیاه کشنده باشد و با اعمال خسارت-های ساختاری، منجر به تولید ROS شود (Shahid *et al.*, 2020). گزارش شده است افزایش پرولین احتمالاً به‌دلیل افزایش سنتز آنزیم‌های مؤثر در بیوسنتز پرولین (دلتا- پیرولین -۵- کربوکسیلات سنتاز و دلتا-پیرولین-۵-کربوکسیلات ردوکتاز) باشد (Kumar *et al.*, 2015).



شکل ۹- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلرید مس و باکتری‌های محرک رشد بر میزان پرولین گیاه نعناع سنبله-ای.

Figure 9- The interaction of different concentrations of copper chloride and growth-promoting bacteria on the proline content of *Mentha spicata* L.

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج بدست‌آمده از پژوهش حاضر تنش کلرید مس باعث کاهش ارتفاع ساقه، وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه، میزان کلروفیل a و b و افزایش میزان MDA در گیاه نعناع سنبله‌ای گردید. اما کاربرد باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* از طریق افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD و GPX) و پرولین باعث کاهش میزان MDA و افزایش

میزان ارتفاع ساقه، وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه، میزان کلروفیل a و b و درنهایت رشد گیاه نعناع سنبله-ای در شرایط تنش فلز سنگین مس گردید. بنابراین می‌توان گفت کاربرد باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس فلورسنس* می‌تواند در شرایط تنش فلز سنگین مس باعث بهبود صفات رشدی، فتوسنتزی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نعناع سنبله‌ای شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت‌های مدیریت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه مراغه و نیز آزمایشگاه مرکزی دانشگاه مراغه در طول اجرای پژوهش، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از گروه آموزشی علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز بخاطر فراهم نمودن باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26(1), 1-20.
- Alaoui-Sossé, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M.-L., Epron, D. & Badot, P.-M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166(5), 1213-1218.
- Ali, H., Khan, E. & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.
- Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23(1), 112-121.
- Barzegari Barogh, R., Hassanpanah, D., Esmaielpour, B., Jahanbakhsh Gade Kahriz, S. & Kalateh Jari, S. (2021). The effect of using biological fertilizers on the morphological characteristics, nutrients, and soluble solids of the obtained plantlets from tissue culture of (*Solanum tuberosum* L.) cv. Gelli and Agria. *Journal of Vegetables Sciences*, 12(2), 95-105. (In Farsi)
- Bates, L. S., Waldren, R. A. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Baycu, G., Tolunay, D., Özden, H. & Günebakan, S. (2006). Ecophysiological and seasonal variations in Cd, Pb, Zn, and Ni concentrations in the leaves of urban deciduous trees in Istanbul. *Environmental Pollution*, 143(3), 545-554.
- Bhanse, P., Kumar, M., Singh, L., Awasthi, M. K. & Qureshi, A. (2022). Role of plant growth-promoting rhizobacteria in boosting the phytoremediation of stressed soils: Opportunities, challenges, and prospects. *Chemosphere*, 303, 134954.
- Braconi, D., Bernardini, G. & Santucci, A. (2011). Linking protein oxidation to environmental pollutants: redox proteomic approaches. *Journal of Proteomics*, 74(11), 2324-2337.
- Chen, G., Li, J., Han, H., Du, R. & Wang, X. (2022). Physiological and molecular mechanisms of plant responses to copper stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12950.

- Cleland, R. E. (1987). Auxin and cell elongation. *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, 4, 132-148.
- Ding, F., Liu, B. & Zhang, S. (2017). Exogenous melatonin ameliorates cold-induced damage in tomato plants. *Scientia Horticulturae*, 219, 264-271.
- Giannopolitis, C. N. & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant Physiology*, 59(2), 315-318.
- Glick, B. R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 251(1), 1-7.
- Goldani, M., Fazeli Kakhki, S. F. & Beikzadeh, N. (2021). The Effect of application method and biofertilizer type on some morphophysiological, biochemical and yield components traits of tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Vegetables Sciences*, 10(2), 1-17. (In Farsi)
- Gong, Q., Li, Z. H., Wang, L., Zhou, J. Y., Kang, Q. & Niu, D. D. (2021). Gibberellic acid application on biomass, oxidative stress response, and photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) seedlings under copper stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(38), 53594-53604.
- Gupta, S. D. (2010). Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants* (pp. 193-220). CRC Press.
- Gururani, M. A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Nookaraju, A., Pandey, S. K. & Park, S. W. (2012). Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 51-65.
- Haas, D. & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319.
- Hattab, S., Dridi, B., Chouba, L., Kheder, M. B. & Bousetta, H. (2009). Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. *Journal of Environmental Sciences*, 21(11), 1552-1556.
- Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198.
- Islam, F., Yasmeen, T., Ali, Q., Mubin, M., Ali, S., Arif, M. S. & Abbas, F. (2016). Copper-resistant bacteria reduces oxidative stress and uptake of copper in lentil plants: potential for bacterial bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 220-233.
- Islam, M. M., Hoque, M. A., Okuma, E., Banu, M. N. A., Shimoishi, Y., Nakamura, Y. & Murata, Y. (2009). Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, 166(15), 1587-1597.
- Kumar, A., Sharma, S., Mishra, S. & Dames, J. F. (2015). Arbuscular mycorrhizal inoculation improves growth and antioxidative response of *Jatropha curcas* (L.) under Na_2SO_4 salt stress. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 149(2), 260-269.

- Kumar, V., Pandita, S., Sidhu, G. P. S., Sharma, A., Khanna, K., Kaur, P. & Setia, R. (2021). Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere*, 262, 127810.
- Küpper, H., Šetlík, I., Šetliková, E., Ferimazova, N., Spiller, M. & Küpper, F. C. (2003). Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in Scenedesmus quadricauda. *Functional Plant Biology*, 30(12), 1187-1196.
- Mahboubi, M. (2021). *Mentha spicata* L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 11(2), 75-81.
- Maksymiec, W. (2007). Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29, 177-187.
- Marques, D. M., Veroneze Júnior, V., da Silva, A. B., Mantovani, J. R., Magalhães, P. C. & de Souza, T. C. (2018). Copper toxicity on photosynthetic responses and root morphology of *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinioideae). *Water, Air, & Soil Pollution*, 229, 1-14.
- Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565-572.
- Møller, I. M., Jensen, P. E. & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annul Review Plant Biology*, 58, 459-481.
- Ortiz-Castro, R., Campos-García, J. & López-Bucio, J. (2020). *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* influence Arabidopsis root system architecture through an auxin response mediated by bioactive cyclodipeptides. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(1), 254-265.
- Panda, S. K., Singha, L. B. & Khan, M. H. (2003). Does aluminium phytotoxicity induce oxidative stress in greengram (*Vigna radiata*). *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 29(1-2), 77-86.
- Panou-Filotheou, H., Bosabalidis, A. & Karataglis, S. (2001). Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. hirtum). *Annals of botany*, 88(2), 207-214.
- Ping, L. & Boland, W. (2004). Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, *9*(6), 263-266.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., & Latif, F. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pakistan Journal Biological Sciences*, 7(2), 187-196.
- Rehman, M., Maqbool, Z., Peng, D. & Liu, L. (2019). Morpho-physiological traits, antioxidant capacity and phytoextraction of copper by ramie (*Boehmeria nivea* L.) grown as fodder in copper-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 5851-5861.
- Riyazuddin, R., Nisha, N., Ejaz, B., Khan, M. I. R., Kumar, M., Ramteke, P. W. & Gupta, R. (2022). A comprehensive review on the heavy metal toxicity and sequestration in plants. *Biomolecules*, 12(1), 43.
- Rodríguez, H. & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319-339.
- Sgherri, C. L. M., Maffei, M. & Navari-Izzo, F. (2000). Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit

and rewatering. *Journal of Plant Physiology*, 157(3), 273-279.
- Shahid, M. A., Sarkhosh, A., Khan, N., Balal, R. M., Ali, S., Rossi, L. & Garcia-Sanchez, F. (2020). Insights into the physiological and biochemical impacts of salt stress on plant growth and development. *Agronomy*, 10(7), 938.
- Sharma, A. & Johri, B. N. (2003). Growth promoting influence of siderophore-producing Pseudomonas strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiological Research*, 158(3), 243-248.
- Sharma, S. S. & Dietz, K. J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14(1), 43-50.
- Sheldon, A. R., & Menzies, N. W. (2005). The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant and Soil*, 278, 341-349.
- Slavin, J. L. & Llo;yd, B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in Nutrition*, 3(4), 506-516.
- Strzałka, K., Kostecka-Gugała, A. & Latowski, D. (2003). Carotenoids and environmental stress in plants: significance of carotenoid-mediated modulation of membrane physical properties. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(2), 168-173.
- Temel, A. & Gozukirmizi, N. (2015). Physiological and molecular changes in barley and wheat under salinity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 2950-2960.
- Upadhyaya, C. P., Akula, N., Young, K. E., Chun, S. C., Kim, D. H. & Park, S. W. (2010). Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses. *Biotechnology Letters*, 32, 321-330.
- Usman, K., Al Jabri, H., Abu-Dieyeh, M. H. & Alsafran, M. H. (2020). Comparative assessment of toxic metals bioaccumulation and the mechanisms of chromium (Cr) tolerance and uptake in Calotropis procera. *Frontiers in Plant Science*, 11, 883.
- Vocciante, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G. & Franchi, E. (2022). The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. *Applied Sciences*, 12(3), 1231.
- Yang, Z., Chen, J., Dou, R., Gao, X., Mao, C. & Wang, L. (2015). Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(12), 15100-15109.
- Zargari A. 2004. Medicinal plants. Tehran: Tehran University Publication, pp: 356-52. (In Farsi).
- Zhang, H., Xu, Z., Guo, K., Huo, Y., He, G., Sun, H. & Sun, G. (2020). Toxic effects of heavy metal Cd and Zn on chlorophyll, carotenoid metabolism and photosynthetic function in tobacco leaves revealed by physiological and proteomics analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110856.