



Review on studies of zinc-lead waste heaps microbiota

Ewa HANUS-FAJERSKA¹, Ewa MUSZYŃSKA¹, Aneta GIEMZIK¹

¹ Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Zakład Botaniki i Fizjologii Roślin, 31-425 Kraków, Al. 29 Listopada 54, tel.: 12 662 5199, fax: 12 662 5269, e-mail: e.hanus@ogr.ur.krakow.pl; e.muszynska@ogr.ur.krakow.pl

Abstract

Areas polluted with heavy metals are the source of both plant taxons and tolerant microorganism populations adopted to such harsh habitat conditions. The aim of presented paper was to review properly chosen scientific literature on microbiota from terrains characterized by elevated heavy metal level in substratum. A few groups of such microorganisms were distinguished and characterized. The prospective benefits of microbiota connected with plants occurring on substitute waste heap habitats were thoroughly discussed. Afterwards, the matter of phytoremediation efficacy was also considered, regarding complex and multi-faced issue concerning putting into practice properly chosen populations of microorganisms symbiotic with plants.

Keywords: polluted environment, consortia of microorganisms, phytoremediation

Streszczenie

Przegląd literatury –charakterystyka mikrobioty hałd odpadów cynkowo-olowiowych

Tereny zanieczyszczone metalami ciężkimi stanowią źródło zarówno taksonów roślin, jak i populacji tolerancyjnych mikroorganizmów wartościowych ze względu na różnorakie adaptacje do tak ekstremalnych warunków siedliska. Celem pracy był przegląd odpowiednio wybranej literatury naukowej dotyczącej mikrobioty terenów o podwyższonej zawartości metali ciężkich w podłożu. Wyróżniono i opisano kilka grup takich mikroorganizmów. Omówiono również potencjalne korzyści płynące z występowania symbiotycznej mikrobioty, specyficznej dla populacji roślin porastających zastępcze siedliska hałdowe. Następnie, poruszono również problematykę skuteczności technologii fitoremediacji w aspekcie wielorakich możliwości praktycznego zastosowania odpowiednio wyselekcjonowanych szczepów mikroorganizmów towarzyszących roślinom.

Słowa kluczowe: zanieczyszczone środowisko, konsorcja mikroorganizmów, fitoremediacja, odpady cynkowo - ołowiowe

1. Wstęp

W naszym kraju złoża rud cynkowo-olowiowych o znaczeniu przemysłowym występują w mezozoicznych skałach węglanowych dolnego wapienia muszlowego. Na terenie wyżyny Śląsko-Krakowskiej bogate złoża, zalegające w dolomitach kruszczośnych znajdujących się w rejonie Bytomia, Chrzanowa, Zawiercia i Olkusza, odpowiadają lokalizacji bytomsko-tarnogórskiego, chrzanowsko-trzebińskiego i olkusko-siewierskiego obszaru wydobywania, przy czym aktualnie eksploatacja odbywa się w ostatnim z wymienionych ośrodków [1, 2]. W trakcie wydobywania rud metali powstaje urobek, który poddawany jest procesom przetwarzania. Skała płonna oraz odpady technologiczne częściowo składowane są na powierzchni gruntu w postaci rozległych, nadpoziomowych zwałowisk, które zawierają wysoką zawartość pierwiastków metalicznych, zwłaszcza cynku, ołowiu, a czasem również kadmu, manganu i talu [3]. Z tego względu składowany materiał odpadowy stanowi poważne zagrożenie środowiskowe jako źródło substancji toksycznych, wywiewanych na drodze erozji eolicznej oraz wypłukiwanych w procesie erozji wodnej [4, 5]. Zarówno dla roślin, jak i mikroorganizmów, obszary te stanowią specyficzne, skrajnie trudne do zasiedlenia siedliska, w których na drodze ewolucji lub procesów mikroewolucyjnych

dochodzi do wytworzenia dostosowanych odmian i ekotypów roślin [6], a także szczepów mikroorganizmów [7, 8]. Długoletnie badania szaty roślinnej prowadzone na terenie regionów przemysłowych dowiodły, że na terenach poeksploatacyjnych pozostawionych bez ingerencji ze strony człowieka może wykształcić się pokrywa roślinna na drodze naturalnej kolonizacji i sukcesji [9, 10]. Częsta susza oraz wysoka zawartość metali ciężkich nie przeszkadzają lokalnym ekotypom w rozwoju, gdyż wykształciły odpowiednie cechy pozwalające na przetrwanie na siedlisku limitującym wzrost osobników pochodzących z niezaadaptowanych populacji [11, 12]. Taksony odpowiedniej rangi tworzące zbiorowiska muraw i łąk, ze względu na swoje właściwości mogą stać się fundamentem udanej rekultywacji, jak również trafią formą ochrony środowiska przed szkodliwym oddziaływaniem zdeponowanych odpadów. Strefa korzeni dobrze spaja cząstki gleby i tym samym chroni powierzchnię przed procesami erozyjnymi. Dodatkowym atutem jest korzystny wpływ roślin na parametry chemiczne roztworu glebowego oraz na aktywność mikroorganizmów. Co więcej, zachodzi w tym przypadku działanie zwrotne – odpowiednie konsorcja mikroorganizmów odgrywają niezmiernie ważną rolę w tempie zasiedlania terenów zdegradowanych przez rośliny, wpływając na strukturę, właściwości fizykochemiczne i biologiczne podłoża, a zwłaszcza na dostępność dla roślin jonów poszczególnych pierwiastków. Zatem sukcesja i aktywność mikroorganizmów glebowych na terenach zdegradowanych, decyduje o kierunku i dynamice procesów glebotwórczych [13, 14, 15]. Od połowy 90-tych lat XX. wieku zaczęto bardzo intensywnie poszukiwać nowych, skutecznych metod przydatnych do szybkiego tworzenia pokrywy roślinnej na terenach zanieczyszczonych. Do metod ekologicznych, prowadzących do wytworzenia pokrywy roślinnej przy użyciu rodzimych gatunków można zaliczyć wysiewanie nasion zbieranych w okolicy, czy rozkładanie siana. Wprowadza się także darń, rozrzucając jej fragmenty na tereny wymagające ekologicznej odnowy [16, 17, 18, 19]. Użycie darni zwiększa szanse przeżycia wprowadzonych roślin, ich symbiontów oraz mikroflory i fauny glebowej. Sprzyja również dalszemu rozwojowi pokrywy roślinnej. W korzeniach roślin tworzących darń znajdują się bakterie ryzosfery, promieniowce i grzyby mikoryzowe, pomocne w rozwoju roślin w trudnych warunkach siedliskowych [20, 21, 22].

Celem niniejszej pracy był przegląd arbitralnie dobranej literatury dotyczącej mikrobioty terenów poprzemysłowych, charakteryzujących się wysokimi zawartościami metali ciężkich, ze szczególnym uwzględnieniem zanieczyszczeń cynkowo – ołowiowych w podłożu.

2. Typy mikroorganizmów ryzosfery

Dla prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin w stresowych warunkach wymagane jest wytworzenie odpowiednich ekosystemów glebowych. Jednym z czynników warunkujących wzrost roślin oraz ich odporność na stres abiotyczny i biotyczny, jest liczebność oraz aktywność mikroorganizmów ryzosfery [23, 24, 25, 26]. Aby omówić różnorodność tej grupy organizmów w ujęciu biologicznym bądź ekologicznym w pierwszym rzędzie należy zdefiniować pojęcie ryzosfery. Ryzosfera obejmuje glebę otaczającą powierzchnię systemu korzeniowego, a także komórki kory pierwotnej korzenia, które często są skolonizowane przez endofity. Mikroorganizmy mogą oddziaływać na system korzeniowy negatywnie, obojętnie bądź pozytywnie. Zwłaszcza ostatni z wymienionych typów interakcji jest szczególnie istotny w sytuacjach, gdy poszukuje się sposobów poprawy warunków wzrostu roślin na terenach zdegradowanych. Najlepiej poznanymi grupami organizmów ryzosfery są symbiotyczne bakterie brodawkowe roślin motylkowatych [27], grzyby mikoryzowe [28], a także bakterie i grzyby stymulujące wzrost roślin (ang. plant growth promoting rhizobacteria PGPR, plant growth promoting fungi PGPF) [29]. Mikroorganizmy te tworzą swoiste konsorcja oddziałujące na roślinę dzięki interakcji z patogenami lub pobudzające wzrost i rozwój roślin poprzez wydzielanie witamin i fitohormonów [30]. Grzyby mikoryzowe zajmują istotne miejsce w obrębie konsorcjum mikroorganizmów ryzosfery. Na hałdach cynkowo-olowiowych rejonu olkuskiego zwrócono również uwagę na pewne gatunki tak zwanych roślin mikoryzowych [31].

2.1. Grzyby

Gatunki grzybów tworzące mikoryzy są szeroko rozpowszechnione i wykazują zdolność do interakcji mutualistycznej z większością gatunków roślin naczyniowych na Ziemi. Cechą wspólną wszystkich typów grzybów mikoryzowych jest ich obecność we wszystkich strefach ryzosfery. Grzybnia przerasta podłoże wokół korzeni i w ten sposób przyczynia się do stabilizacji podłoża poprzez tworzenie sieci strzępek, a także przez wydzielanie substancji sklejającej lub wiążącej cząsteczki gleby [32]. Z tego względu grzyby mikoryzowe mają duże znaczenie w trakcie formowania pokrywy roślinnej w ekstremalnych warunkach, jakie panują na hałdach [33, 34]. Mikroorganizmy tworzą konsorcja, czego przykładem mogą stanowić grzyby ektomikoryzowe oraz

towarzyszące im bakterie, które współdziałają na rzecz obniżenia stężenia metali ciężkich w nadziemnych częściach rośliny, a co za tym idzie zmniejszenia toksyczności roślinności hałd dla potencjalnych roślinożerców [25]. Sposób kolonizacji korzenia jest zależny od tworzonego typu mikoryzy. Powszechnie wyróżniane są dwa zasadnicze typy: ektomikoryza i endomikoryza. W pierwszym przypadku grzybnia na powierzchni korzenia wytwarza zbitą mufkę, której właściwości ochronne są zależne od gatunku grzyba symbiotycznego, a w szczególności od jego zdolności chłonięcia wody, syntezy pigmentów oraz kwasów organicznych. Interakcja typu ektomikoryzowego charakteryzuje się wnikaniem grzybni pomiędzy komórki kory pierwotnej korzenia, wówczas tworzona jest tak zwana sieć Hartiga, która jest miejscem wymiany substancji pomiędzy partnerami symbiozy. Tworzone „grzybo-korzenie”, mufka grzybniowa, ryzomorfy oraz wolne strzępki to szczególne cechy morfologiczne ektomikoryzy, funkcjonujące jako struktury służące do magazynowania, gromadzenia oraz wymiany soli mineralnych i wody [8]. W przypadku drzew rosnących na terenach zanieczyszczonych ektomikoryzy opisywano jako system zwiększania tolerancji na podwyższone stężenia metali ciężkich w podłożu. Ponadto strategia przetrwania drzew na takich terenach została uzależniona od genetycznie zakodowanych adaptacji partnerów symbiozy do podwyższonych stężeń metali ciężkich [35]. Ektomikoryzę tworzy kilka tysięcy gatunków grzybów, o różnej specyficzności względem poszczególnych gatunków roślin. Partnerami symbiozy są głównie drzewa strefy umiarkowanej i są one wówczas obligatoryjnie mikoryzowe. Do pospolicie występujących na hałdach roślin drzewiastych należą gatunki dwuliścienne z rodzajów *Populus* i *Betula*, podczas gdy nagozależkowe reprezentuje najczęściej *Pinus sylvestris*. Pomimo tego w trudnych warunkach siedliskowych zróżnicowanie gatunków i szczepów grzybów tworzących ektomikoryzy (ang. ectomycorrhizal fungi ECM) jest wysokie. Wśród grzybów tworzących ektomikoryzę z *Pinus sylvestris* na hałdach cynkowo-ołowiowych można wyróżnić między innymi *Scleroderma citrinum*, *Amanita muscaria*, *Lactarius rufus*, *Suillus luteus* lub *Rhizopogon roseolus*. Grzyby te wpływają pozytywnie na wzrost i rozwój drzew dzięki gromadzeniu jonów metali ciężkich w mufce korzeniowej i ryzomorfach, co ogranicza ich transport do nadziemnych części rośliny [25, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41]. Innym gatunkiem często występującym na hałdach jest *Populus tremula*, tworząca najczęściej mikoryzy z kilkoma szczepami grzybów klasyfikowanymi w obrębie rodzajów *Tomentella*, *Inocybe*, *Cortinarius*, *Hebeloma* i *Tuber*.

Funkcjonowanie ektomikoryz na terenach o wysokich stężeniach metali ciężkich ma swoje podłoże na poziomie interakcji genomów obu organizmów tworzących symbiozę mutualistyczną. Stosunkowo niedawno opublikowano wyniki badań obrazujące negatywny wpływ wysokich stężeń metali ciężkich na grzyby mikoryzowe. Przykładowo, niekorzystny wpływ wykazano w przypadku szczepów z rodzajów *Hebeloma* oraz *Inocybe* tworzących ECM z *Pinus sylvestris*. W wyniku analiz przeprowadzonych w Polsce i Francji wykazano, na określonych hałdach podobnego typu, istnienie stosunkowo wysokiego procentu korzeni niemikoryzowych. Autorzy stwierdzili, że tworzenie mikoryzy było na tym terenie hamowane w wyniku czego w podłożu sukcesywnie zmniejszała się liczba propagul. Jednocześnie uważa się, że nawet martwe korzenie z mikoryzami mogą brać udział w biosorpcji i w ten sposób unieruchamiać metale ciężkie [41, 42, 43]. Powszechnie występującym gatunkiem na terenach o podwyższonym stężeniu cynku, ołowiu i kadmu jest *Cadophora finladica*. Szczepy tego grzyba wyizolowano między innymi z ektomikoryzy *Salix caprea*, rosnącej na terenie silnie zanieczyszczonym cynkiem i ołowiem w Arnoldstein (Austria). Przeprowadzono badania ekspresji genów tych szczepów, w wyniku czego wykazano istnienie złożonej regulacji ekspresji informacji genetycznej odnośnie genów związanych z reakcją szczepów grzybów na metale ciężkie [44].

Endomikoryza jest znacznie bardziej zróżnicowanym typem symbiozy. Cechą charakterystyczną tego typu mikoryzy jest zdolność do penetracji przez mikroorganizm grzybowy przestrzeni międzykomórkowych i wnętrza żywych komórek kory pierwotnej korzenia rośliny-gospodarza [28]. Do tego typu symbiozy należą: mikoryza arbuskularna, storczykowa oraz mikoryza erikoidalna. W ostatnich dwóch typach wewnątrz komórek tworzą się zwoje grzybni zwane pelotonami, natomiast w przypadku mikoryzy arbuskularnej wewnątrz komórek kory pierwotnej gospodarza wykształcają się drzewkowate struktury zwane arbuskulami. Mikoryza arbuskularna (ang. arbuscular mycorrhiza, AM) jest najbardziej powszechnym typem, uważanym za najstarszy filogenetycznie i występującym u ponad 90% gatunków roślin. Pomimo tego, bierze w niej udział zaledwie około 120 gatunków grzybów zaliczanych do rzędu *Glomales*. Badania molekularne i paleobotaniczne wydają się potwierdzać hipotezę bliskiego związku grzybów klasyfikowanych do *Glomales* z korzeniami roślin od momentu ich pojawienia się na lądzie. Mikoryza ta odgrywa kluczową rolę w stabilności, produktywności i różnorodności ekosystemów naturalnych [20]. Gleby zbiorowisk naturalnych prawie zawsze zawierają propagule *Glomales*. Jednak zdarzają się tereny ich pozbawione, a zanik wiąże się z poważnymi konsekwencjami, takimi jak krańcowa degradacja zbiorowisk roślinnych, obniżenie biodostępności pierwiastków biogenych czy utrata stabilności

ekosystemu. Typowym przykładem obszarów, na których w celu formowania lub odbudowy zbiorowisk roślinnych niezbędne jest wprowadzenie propagul grzybów arbuskularnych, są tereny powstałe w wyniku wybuchów wulkanów, wycinki lasów, tereny rolnicze o zbyt wysokim poziomie nawożenia, hałdy przemysłowe, odkrywki pogórnice oraz tereny skażone metalami ciężkimi, toksycznymi związkami organicznymi, bądź innym typem ksenobiotyków [23]. Mikoryza w takich sytuacjach jest bardzo ważna ze względu na możliwość wydatnego obniżenia toksyczności związków dla roślin. Jednakże szczególnie istotna jest selekcja odpowiednich, miejscowych szczepów grzybów, które przystosowane są do wzrostu w określonym siedlisku, o określonej toksyczności i klimacie. Zatem grzyby mikoryzowe nie tylko kształtowały, ale wciąż kształtują przebieg ewolucji zachodzącej na terenach zasiedlanych przez rośliny. Wśród roślin występujących na hałdach cynkowo-olowiowych czasem występują przedstawiciele rodziny *Orchidaceae*, jak *Epipactis helleborine* i *Epipactis atrorubens*. Zdolność do zasiedlania terenów zdegradowanych przez te gatunki storczyków przypisuje się symbiozom z grzybami, które działają jak biofiltry, zatrzymując w strzępkach metale ciężkie i powodując ich immobilizację w wyniku czego ograniczają dostępność nadmiaru tych pierwiastków dla roślin [45, 46]. W trakcie badań przeprowadzonych na gatunkach storczyków występujących w Polsce wykazano, że niektórzy przedstawiciele odznaczają się zdolnościami akumulowania metali [47]. Analizy wskazują, że metale są najsilniej akumulowane w korzeniach skolonizowanych przez grzyby mikoryzowe [46, 48]. Również z gatunków traw porastających w wyniku naturalnej sukcesji hałdy cynkowo-olowiowe (hałda Trzebionka) izolowano grzyby endomikoryzowe. Autorzy wykazali, że korzenie wszystkich badanych gatunków traw (*Molinia caerulea*, *Phragmites australis*, *Corynephorus canescens*, *Koeleria glauca* i *Poa compressa*) skolonizowane były przez arbuskularne grzyby mikoryzowe (AMF), a wartości wszystkich parametrów mikoryzacji wzrastały wraz z wiekiem zdeponowanych odpadów. Ponadto trawy pochodzące z naturalnej sukcesji, rozmnażane wegetatywnie, radziły sobie o wiele lepiej, niż rośliny sztucznie inokulowane AMF i rośliny pozbawione AMF. W omawianej pracy sugerowano, że aby zapewnić właściwe środowisko roślinom wprowadzonym w celu bioremediacji, poszczególnym gatunkom muszą towarzyszyć ich symbiotyczne mikroorganizmy, a zwłaszcza grzyby arbuskularne. Mikoryza odgrywa także ważną rolę w tworzeniu gleby i stabilności gruntu [23, 49].

2.2. Bakterie

Tereny zanieczyszczone metalami ciężkimi są źródłem tolerancyjnych mikroorganizmów [50, 51]. Podobnie jak rośliny, mikroorganizmy przystosowały się do ekstremalnych warunków, w wyniku czego mogą sprzyjać tworzeniu zbiorowisk i rozprzestrzenianiu poszczególnych gatunków roślin. Bakterie stymulujące wzrost roślin (ang. plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) mogą wywierać wpływ bezpośredni lub pośredni. Bezpośredni wpływ polega na dostarczeniu roślinie składników mineralnych, syntezie fitohormonów stymulujących jej rozwój (auksyn, giberelin, cytokinin), a także obniżeniu poziomu etylenu wpływającego niekorzystnie na ukorzenianie, podczas gdy pośredni sposób stymulacji polega na ochronie roślin przed skutkami działania fitopatogenów [24].

PGPR ze względu na zwiększanie tolerancji roślin na metale ciężkie, wywierają pozytywny wpływ na żywotność i wzrost poszczególnych osobników na terenach przemysłowych [23, 52]. Bakterie oddziałują na mobilność metali śladowych i ich dostępności dla organizmu gospodarza poprzez uwalnianie czynników chelatujących, zakwaszenie, solubilizację fosforanów lub zmiany potencjału redoks. W pracy Beccera-Castro i in. opublikowanej w 2012 roku [53] wykazano, że wzrost stężenia cynku, ołowiu i kadmu w ryzosferze wiązał się z wyższym poziomem tolerancji przez konsorcjum bakterii. Naukowcy pozyskali, a następnie utworzyli zbiór tolerancyjnych na metale ciężkie izolatów bakterii ryzosfery, reprezentujący siedemdziesiąt cztery szczepy. Kilka z nich wyselekcjonowano jako potencjalnie przydatne dla poprawy wzrostu roślin na terenach zanieczyszczonych cynkiem i ołowiem. Wyizolowane szczepy należały głównie do promieniowców (*Actinobacteria*), oraz do rodzajów *Streptomyces* (61%), *Tsukamurella* (18%) lub *Pseudomonas* (18%). Ponad połowa izolatów posiadała przynajmniej jedną cechę promującą wzrost roślin (solubilizacja fosforu, siderofory, produkcja IAA i inne) i/lub produkowała biosurfaktanty. W trakcie badań prowadzonych na hałdach cynkowo-olowiowych, wykazano również, że populacje bakterii występujące poza ryzosferą jedynie w niewielkim procencie przeżywały w obecności podwyższonego poziomu Zn (1 mM) i Cd (0,8 mM) w porównaniu do bardzo dobrze rozwijających się w takich warunkach bakterii ryzosfery. Obserwacja ta wskazuje na selektywne ulepszanie odporności szczepów, ze względu na zwiększoną dostępność metali w glebie w pobliżu korzeni, w porównaniu z glebą poza ryzosferą [54].

Wprowadzanie ryzobakterii izolowanych z terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi jest korzystne z punktu widzenia powodzenia procesów fitoekstrakcji i fitostabilizacji [51, 55]. Większość bakterii izolowanych z

hałd wykazuje zwiększoną odporność na metale ciężkie oraz bardzo często zwiększoną odporność na antybiotyki, co związane jest często ze sprzężeniem genów odporności, które ulegają wspólnemu transferowi w wyniku działania selekcji środowiska. Wśród izolowanych szczepów pojawia się bardzo często rodzaj *Pseudomonas* o wysokich zdolnościach adaptacji do wzrostu na terenach zanieczyszczonych metalami ciężkimi [52, 56]. Wśród bakterii ryzosfery na szczególną uwagę zasługują tak zwane bakterie pomocnicze mikoryzy (ang. mycorrhiza “helper” bacteria MHB). Najczęściej są to przedstawiciele fluorescencyjnych bakterii z rodzaju *Pseudomonas* oraz sporujące pałeczki, które promują rozwój mikoryzy poprzez różne mechanizmy, które obejmują produkcję hormonów, witamin, aminokwasów, kwasów organicznych, enzymów. Na terenach zanieczyszczonych metalami rozwijają się różne mechanizmy komórkowe wpływające na tolerancję metali ciężkich. Wykazano, że inokulacja siewek *Pinus silvestris* grzybami ektomikoryzowymi i MHB (rodzaj *Pseudomonas*) wpływają korzystnie na zmniejszenie transportu metali ciężkich do nadziemnych części roślin, w porównaniu do siewek nieinokulowanych bądź inokulowanych wyłącznie ektomikoryzowym grzybem [25].

Badania wykazują, że każda z badanych do tej pory roślin posiada niemikoryzowe endofityczne gatunki grzybów występujące w tkankach gospodarza i nie powodujące żadnych widocznych objawów chorobowych. Informacje uzyskane w wyniku badań paleontologicznych wskazują, że endofity mogą być związane z opanowywaniem przez rośliny środowiska lądowego, a ich historia może sięgać ponad 400 mln lat [57]. Literatura naukowa przedstawia grzybowe endofity jako mikroorganizmy posiadające wszechstronny wpływ na roślinę-gospodarza. Korzystny wpływ tej symbiozy na roślinę przejawia się zwiększaniem stopnia tolerancji na niekorzystne warunki środowiskowe, wzrostem biomasy, zmniejszeniem stresu wodnego oraz zmianą alokacji zasobów. Zatem wywierają korzystny wpływ na adaptację roślin, ewolucję oraz kształtowanie zbiorowisk i bioróżnorodność zespołów organizmów im towarzyszących, jak na przykład owadów, nicieni i bakterii. Endofity to zróżnicowana i polifiletyczna grupa grzybów należących głównie do workowców [58].

Prócz mikroorganizmów grzybowych również bakterie posiadają zdolność kolonizowania tkanek roślin; często tworząc konsorcja z innymi mikroorganizmami. Bakterie powszechnie występują na powierzchni organów roślinnych, a także w ich wnętrzu jako endofity. Grupy bakterii endofitycznych mogą występować w różnych tkankach i organach: liściach, łodydze i korzeniu. Korzenie roślin wydzielają eksudaty, których część mikroorganizmy wykorzystują do wzrostu i rozwoju [59]. Bakterie ryzosferyczne mogą przeniknąć do kory pierwotnej korzenia, a nawet przekroczyć barierę endodermy, co umożliwia przedostanie się do tkanek przewodzących. W związku z tym mogą rozwijać się endofitycznie w bulwach, łodydze, liściach oraz innych organach rośliny gospodarza, przy czym nie wywołują jakichkolwiek objawów chorobowych lecz tworzą typowo mutualistyczny związek z rośliną. Zakłada się, że większość endofitów bakteryjnych kolonizuje tkanki roślinne poprzez strefę korzeniową, choć mogą pochodzić z innych źródeł. Endofity mogą występować w przestrzeniach międzykomórkowych, wewnątrz komórek miękiszowych lub wewnątrz układu naczyniowego, najczęściej w naczyniach. Ryzobakterie i bakterie endofityczne posiadają różne nisze ekologiczne, ale bardzo często charakteryzują się analogicznymi mechanizmami wspierania rozwoju i wzrostu roślin, a także kontroli fitopatogenów [60]. Większość badań naukowych potwierdza hipotezę, iż w świecie roślin nie występują organizmy pozbawione specyficznej, endofitycznej mikrobioty. Endofity promują wzrost roślin oraz indukują odporność na stresogenne czynniki zarówno biotyczne i abiotyczne [61]. Gatunki bakterii endofitycznych odporne na metale ciężkie posiadają szereg mechanizmów wpływających pozytywnie na roślinę-gospodarza, takie jak wiązanie azotu, solubilizację minerałów, produkcję fitohormonów, sideroforów, czy wykorzystanie kwasu 1-aminocyclopropanowego-1-karboksyowego jako jedyne źródło azotu i transformacji składników pokarmowych [62].

Bakterie endofityczne tworzą szczepy zaliczane do *Pseudomonaceae*, *Burkholderiaceae* i *Enterobacteriaceae*. Lodewyckx obserwował [63], że ilość metali ciężkich pobieranych przez roślinę-hiperakumulatorkę, można zwiększyć po inokulacji endofitycznymi bakteriami odpornymi na wysokie stężenia metali, lub szczepami posiadającymi system sekwestracji. Być może wiele metalofitów zawdzięcza swój wzrost na hałdach właśnie endofitom, niestety to zagadnienie nie zostało jeszcze dostatecznie zbadane. Jednakże wykazano, że *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria* na hałdach cynkowo-ołowiowych w Belgii posiada w częściach nadziemnych endofity bakteryjne odporne na metale ciężkie. Mimo tego, że podobne szczepy izolowano również z korzeni to różniły się one metaloodpornością od tych występujących w pędach [54].

Wśród grzybów ciekawą i mało zbadaną grupą zdają się być DSE (ang. dark septate endophyte, DSE). Grzyby te charakteryzują się ciemnym zabarwieniem septowanych strzępek (duża zawartość melaniny). Strzępki DSE przerastają korzeń wrastając w przestrzenie międzykomórkowe i niekiedy także do wnętrza komórek kory

pierwotnej, zazwyczaj tworząc niewielkie mikrosklerocja (forma grzybni przetrwalnikowej). Sugeruje się, że DSE mogą stanowić substytut mikoryzy tam, gdzie ona nie występuje, bądź w przypadku gdy jej wytworzenie jest utrudnione. Stąd mogą oddziaływać modyfikująco na pobieranie metali ciężkich, a także zwiększać tolerancję roślin. Jednak wyjaśnienie roli DSE niestety wymaga prowadzenia wielu dalszych badań. Doświadczenia, które prowadzono na *Salix caprea* wykazały, że DSE kolonizowały 80% prób badanych korzeni, przy czym najwyższy stopień kolonizacji odnotowano na glebach o najwyższych stężeniach metali ciężkich w przeciwieństwie do kolonizacji grzybów arbuskularnych i ektomikoryz, gdzie nie wykazano korelacji z poziomem zanieczyszczeń. Wśród grzybów należących do DSE, często izolowane są gatunki z rodzaju *Cadophora*, w tym wspomniana w rozdziale o ektomikoryzach *Cadophora finlandica*, wykazująca odporność na podwyższone zawartości metali ciężkich w podłożu i funkcjonująca w środowisku jako szczepy ektomikoryzowe, erikoidalne jak i DSE [64].

3. Podsumowanie

Związek pomiędzy mikrobiotą hałd i fitoremediacją jest dość ścisły [65]. Do najczęściej stosowanych technik należą fitostabilizacja, fitodegradacja i fitoekstrakcja. W trakcie fitostabilizacji substancje toksyczne zostają unieruchomione w glebie dzięki aktywności życiowej roślin obniżających drenaż zanieczyszczeń do wód gruntowych lub ich wywiewanie przez wiatr. Fitodegradacja stanowi zespół procesów metabolicznych roślin i towarzyszących im mikroorganizmów, co w efekcie prowadzi do degradacji związków organicznych, przykładowo węglowodorów poliaromatycznych czy pestycydów. Natomiast fitoekstrakcja wykorzystuje zdolności roślin do hiperakumulacji metali w organach nadziemnych [48, 55, 66, 67, 68]. Początkowo nie dostrzegano konieczności badania mikroorganizmów glebowych, pomimo iż stosowano substancje chemiczne zwiększające dostępność związków toksycznych, a tym samym zwiększające akumulację metali w roślinach. Badano także zdolność roślin, między innymi z rodzaju łubin (*Lupinus* sp.), do wydzielania do ryzosfery związków organicznych udostępniających metale. Uprawa łubinu może zastąpić stosowanie chemicznych związków zwiększających dostępność metali w podłożu. Stwierdzono również, że aktywność mikroorganizmów stanowi ważny czynnik mający wpływ na procesy wiązania i uruchamiania metali, co odbywa się poprzez precypitację siarczków i uwodnionych tlenków żelaza bądź przez wiązanie ich przez polisacharydy. Pierwiastki takie jak Pb, Zn czy Cu mogą być również wiązane przez węglany i szczawiany produkowane przez mikroorganizmy [51, 69]. W biologicznych metodach usuwania zanieczyszczeń wykorzystywano do niedawna głównie bakterie i grzyby saprobiotyczne, natomiast rola grzybów mikoryzowych i endofitów była niedoceniana. Prawidłowo utworzona mikoryza może zwiększyć przeżywalność roślin w warunkach stresu poprzez podniesienie dostępności biogenów, zwiększoną odporność na niską dostępność wody, wspomaganie obrony przed patogenami, a także wzmożenie produkcji fitohormonów czy poprawę struktury podłoża i dlatego może znacznie poprawić efektywność procesu fitoremediacji.

Literatura

1. Adamek R., Ptak J., *Górnictwo rud*, t. I, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 1986, 16-21.
2. Blajda R. Ocena możliwości wykorzystania niezagospodarowanych złóż rud cynku i ołowiu rejonu górnośląskiego. *Zesz. Nauk. Inst. Gospodarki Surowcami Mineralnymi i Energią PAN*, 2010, 79: 111-120.
3. Cabała J., Idziak A., Kondracka M., Kleczka M., Fizyko-chemiczne własności odpadów występujących w obszarach historycznej przeróbki rud Zn-Pb. *Prace Nauk. GIG, Wyd. Specjalne*, 2007, III: 141-152.
4. Cabała J., Sutkowska K., Wpływ dawnej eksploatacji i przeróbki rud Zn-Pb na skład mineralny gleb industrialnych, rejon Olkusza i Jaworzna. *Prace Nauk. Inst. Górnictwa PW*, 2006, 117: 13-22.
5. Wysocka M., Zych A., Skowronek J., Pajor G., Emisja radonu w obszarze zakładów górnictwo-hutniczych „Bolesław” S.A. *Przegląd. Geolog.*, 2005, 53: 133-136.
6. Wierzbicka M., Rostański A., Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz, Poland: a review. *Acta Biol. Cracov. Series Bot.*, 2002, 44: 7-19.
7. Branco S., Serpentine soils promote ectomycorrhizal fungal diversity. *Molecular Ecol.*, 2010, 19: 5566-5576.

8. Krznanic E., Wevers J.H.L., Cloquet .Ch., Vangronsvelt J., Vanhaecke F., Colpaert J.V., Zn pollution counteracts Cd toxicity in metal-tolerant ectomycorrhizal fungi and their host plant. *Eviron. Microbiol.*, 2010, 12 (8): 2133-2141.
9. Whiting S.M., Reeve S R.D., Richards D., Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restoration Ecol.*, 2004, 12: 106-116.
10. Woźniak G., Zróżnicowanie roślinności na zwalach pogórnich Górnego Śląska. Wyd. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków, 2010.
11. Olko A., Fizjologiczne aspekty tolerancji roślin na metale ciężkie. *Kosmos. Prob. Nauk Biol.*, 2009, 1-2: 221-228.
12. Szarek-Łukaszewska G., Grodzińska K., Naturalna roślinność w rejonach starych zwałowisk odpadów po górnictwie rud Zn-Pb w okolicy Bolesławia i Bukowna (region śląsko-krakowski: południowa Polska). *Przeгляд Geolog.*, 2008, 56 (7): 528-531.
13. Alfordi E.R., Pilon-Smiths E., Paschke M.W., Metallophytes – a view from the rizosphere. *Plant Soil*, 2010, 337: 33-50.
14. Cabała J., Krupa P., Misz-Kennan M., Heavy metals in mycorrhizal rizospheres contaminated by Zn-Pb mining and smelting around Olkusz in southern Poland. *Water Air Soil Pollut.*, 2009, 199: 139-149.
15. Gucwa-Przepióra E., Turnau K., Arbuscular mycorrhiza and plant succession in the zinc smelter spoil heap in Katowice-Wielowiec. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 2001, 70: 153-158.
16. Muszyńska E., Hanus-Fajerska E., Odbudowa bioróżnorodności na terenach zdegradowanych działalnością przemysłu. [w:] *Interdyscyplinarne zagadnienia w górnictwie i geologii. Tom III. Drzymała J., Ciężkowski W. (red.). Oficyna Wyd. Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2012, 209-216.*
17. Muszyńska E., Hanus-Fajerska E., Ciarkowska K., Evaluation of seed germination ability of native calamine species on different substrata. *Polish J. Environ. Stud.*, 2013. 22 (6): 1775-1780.
18. Siuta J., Żukowski B., Ochrona i użytkowanie powierzchni ziemi w prawie i praktyce od roku 1945. *Inżynieria Ekologiczna*, 2010, 22: 7-17.
19. Szarek-Łukaszewska G., Ryszka P., Zarzyka-Ryszka M., Rekultywacja odpadów Zn/Pb metody ekologiczne eksperyment terenowy. [w:] *Polska Inżynieria Środowiska pięć lat po wstąpieniu do Unii Europejskiej Ozonek J., Pawłowski A. (red.) PAN Komitet Inżynierii Środowiska, Monografie, 2009, 59: 219-223.*
20. Doubková P., Suda J., Sudová R., Arbuscular mycorrhizal symbiosis on serpentine soils: the effect of native fungal communities on different *Knautia arvensis* ecotypes. *Plant Soil*, 2011, 345: 325-338.
21. Orłowska E., Zubek Sz., Jurkiewicz A., Szarek- Łukaszewska G., Turnau K., Influence of restoration on arbuscular mycorrhiza of *Biscutella laevigata* L. (Brassicaceae) and *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae) from calamine spoil mounds. *Mycorrhiza*, 2002, 12: 153–159.
22. Turnau K., Orłowska E., Ryszka P., Zubek S., Anielska T., Gawroński S., Jurkiewicz A., Role of mycorrhizal fungi in phytoremediation and toxicity monitoring of heavy metal rich industrial wastes in Southern Poland. [In:] *Viable methods of soil and water pollution monitoring, protection and remediation*, ed. Twardowska I., Springer 2006, 533-552.
23. Garg N., Bhandari P., Influence of cadmium stress and arbuscular mycorrhizal fungi on nodule senescence in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Intern. Journ. Phytorem.*, 2012, 14: 62-74.
24. Kalitkiewicz A., Kępczyńska E., Wykorzystanie ryzobakterii do stymulacji wzrostu roślin. *Biotechnol.*, 2008, 2(81): 102-114.
25. Krupa P., Kozdrój J., Ectomycorrhizal fungi and associated bacteria provide protection against heavy metals in inoculated pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Water Air Soil Pollut.*, 2007, 182: 83–90.
26. Muszyńska E., Koźmińska A., Wybrane skutki działania niektórych stresorów oraz zdolności przystosowawcze roślin do trudnych warunków. [w:] *Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej Nauki. M. Kuczera (red.)*, 2014, 8: 112-116.

27. Brockwell J., Bottomley P. J., Thies J. E., Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil*, 1995, 174: 143–180.
28. Reinhardt D., Programming good relations – development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opinion Plant Biol.*, 2007, 10: 98-106.
29. Ma Y., Prasad M.N.V., Rajkumar M., Freitas H., Plant Growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 2011, 29 (2): 248-258.
30. Barea J. M., Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. [w:] *Biological resource management: connecting science and policy*. Toutant J. P., Balazs E., Galante E., Lynch J. M., Schepers J. S., Werner D., Werry P. A. (red.). (OECD) INRA, Editions and Springer, 2000, 110–125.
31. Bartyzel E., Zubek A., Jurkiewicz G., Szarek-Łukszewska G., Turnau K., Influence of restoration on arbuscular mycorrhiza of *Biscutella laevigata* L. (Brassicaceae) and *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae) from calamine spoil mounds. *Mycorrhiza*, 2002, 12 (3):153-60.
32. Miller R. M., Jastrow J. D., Mycorrhizal fungi influence on soil structure. [w:] *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Kapulnik Y., Douds D. D. (red.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto., 2000, 3–18.
33. Entry J.A., Rygiewicz P.T., Watrud L.S., Donnelly P.K., Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. *Adv Environ Res.*, 2002, 7: 3–138.
34. Muszyńska E., Zając A., Mikoryza w siedliskach zanieczyszczonych metalami ciężkimi. [w:] *Młodzi naukowcy dla polskiej Nauki*. M. Kuczera (red.), 2014, Tom IV. 8: 48-52.
35. Adriaensen K., van der Lelie D., van Laere A., Vangronsveld J., Colpaert. J. V., A zinc-adapted fungus protect pines from zinc stress. *New Phytolog.*, 2003, 161: 549–555.
36. Colpaert J. V., Vandenkoornhuyse P., Adriaensen K., Vangronsveld J., Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytol.*, 2000, 147: 367–379.
37. Haselwandter K., Bowen G. D., Mycorrhizal relations in trees for agroforestry and land rehabilitation. *Forest Ecol. Managem.*, 1996, 81: 1–17.
38. Turnau K., Faber J., Dexheimer J., Botton B., Heavy metal localization in *Rhizopogon roseolum* mycelium energy dispersion spectroscopy and cytochemical investigation. *Acta Soc. Bot Pol.*, 1999, 68: 57-62.
39. Turnau K., Kottke I., Dexheimer J., Toxic element filtering in *Rhizopogon roseolus/Pinus sylvestris* mycorrhizas collected from calamine dumps. *Mycol. Res.*, 1996, 100: 16–22.
40. Turnau K., Kottke I., Dexheimer J., Botton B., Element distribution in *Pisolithus tinctorius* mycelium treated with cadmium dust. *Ann. Bot.*, 1994, 74: 137–142.
41. Turnau K., Mleczko P., Blaudez D., Chalot M., Botton B., Heavy metal binding properties of *Pinus sylvestris* mycorrhizas from industrial wastes. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 2002, 71 (3): 253-261.
42. Tam P. C. F., Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza*, 1995, 5: 181–187.
43. Turnau K., Przybyłowicz W. J., Mesjasz-Przybyłowicz J., Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas-as revealed by micro-PIXE analysis. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B*, 2001,181: 649–658.
44. Gorfer M., Persak H., Berger H., Brynda S., Bandian D., Strauss J., Identification of heavy metal regulated genes from the root associated ascomycete *Cadophora finlandica* using a genomic microarray. *Mycological Research*, 2009, 113 (12): 1377-1388.
45. Giemzik A., Endofity storczyków występujących na hałdach cynkowo-olowiowych. Praca magisterska wykonana w Instytucie Nauk o Środowisku UJ pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Turnau, 2011.
46. Jurkiewicz A., Turnau K., Mesjasz-Przybyłowicz J., Przybyłowicz W., Godzik B., Heavy metal localization in mycorrhizas of *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Bessler (*Orchidaceae*) from zinc mine talings. *Protoplasma*, 2001, 218: 117-124.

47. Kwapuliński J., Sarosiek J., Wiechuła D., Kumulacja wybranych metali przez wybrane gatunki storczyków. Acta Universitatis Wratislaviensis No 1515, Prace Botaniczne, 1993, LVII: 180-184.
48. Muszyńska E., Gąstoł M., Rola mikoryzy w fitoremediacji metali śladowych. [w:] Nowe trendy w naukach przyrodniczych. M. Kuczera (red.), 2012. Tom II, 3: 49-55.
49. Ryszka P., Turnau K., Arbuscular mycorrhiza of introduced and native grasses colonizing zinc wastes: implications for restoration practices, Plant Soil, 2007, 298: 219-229.
50. Epelde L., Becerril J.M., Barrutia O., González-Oreja J.A., Garbisu C., Interactions between plant and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil Environ. Pollut., 2010, 158: 1576–1583.
51. Rabęda I., Woźny A., Krzesłowska M., Bakterie i grzyby zwiększające wydajność roślin w fitoremediacji pierwiastków śladowych. Kosmos. Prob. Nauk Biol., 2011, 3-4: 423-433.
52. Wu C.H., Wood T.K., Mulchandani A., Chen W., Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. Appl. Environ. Microbiol., 2006, 72: 1129–1134.
53. Becerra-Castro C., Monterroso C., Prieto-Fernández A., Rodríguez-Lamas L., Loureiro-Viñas M., Acea M. J., Kidd P. S., Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: A description of the plant-microorganism-rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. J. Hazard. Mater., 2012, 17-218, 350-359.
54. Lodewyckx C., Mergeay M., Vangronsveld J., Clijsters H., van der Lelie D., Isolation, characterization and identification of bacteria associated to the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. Int. J. Phytorem., 2002, 4:101-115.
55. Wang W., Deng Z., Tan H., Cao L., Effects of Cd, Pb, Zn, Cu-resistant endophytic *Enterobacter* sp. CBSB1 and *Rhodotorula* sp. CBSB79 on the growth and phytoextraction of *Brassica* plants in multimetal contaminated soil. Inter. J. Phytoremed., 2013, 15 (5): 488-479.
56. Piotrowska-Seget Z., Beściak G., Bernaś T., Kozdrój J., GFP-tagged multimetal-tolerant bacteria and their detection in the rhizosphere of white mustard. Ann Microbiol., 2012, 62: 559–567.
57. Krings M., Taylor T.N., Hass H., Kerp H., Dotzler N., Hermsen E.J., Fungal endophytes in a 400-million-year-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. New Phytol., 2007, 174: 648–657.
58. Rodriguez R.J., White J.F., Arnold A.E., Redman R.S., Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytol., 2009, 182: 314-330.
59. Cheng Z., McConkey B.J., Glick B.R., Proteomic studies of plant-bacterial interactions. Soil Biol. Biochem., 2010, 42: 1673-1684.
60. Compant S., Clément C., Sessitsch A., Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization, Soil Biol. Biochem., 2010, 42: 669-678.
61. Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N., Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiol. Letters, 2008, 278: 1–9.
62. Rajkumar M., Ae N., Freitas H., Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal extraction. Chemosphere, 2009, 77 (2): 153-160.
63. Lodewyckx C., Taghavi S., Mergeay M., Vangronsveld J., Clijsters H., van der Lelie D., The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria on heavy metal uptake by their host plant. Int. J. Phytorem., 2001, 3: 173-187.
64. Likar M., Regvar M., Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterization of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil. Science of the Total Environment, 2009, 407: 6179–6187.

65. Pacholewska M., Cabała J., Cwalina B., Sozańska M., Środowiskowe uwarunkowania procesów (bio)ługowania metali z odpadów poflotacyjnych rud cynkowo-ołowiowych. *Rudy i Metale Nieżelazne*, 2007, 52 (6): 337-342.
 66. Cycoń M., Piotrowska-Seget Z., Kozdrój J., Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soil. *Intern. Biodeterioration & Bioremed.*, 2010, 64: 86-96.
 67. Hanus-Fajerska E., Augustynowicz J., Muszyńska E., Koźmińska A., Organizmy przydatne w oczyszczaniu Środowiska z nadmiernych stężeń pierwiastków metalicznych. *Ochrona Środ. Zas. Nat.*, 2011, 50: 180-193.
 68. Mroziak A., Piotrowska-Seget Z., Bioaugmentation as a strategy for clearing up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res.*, 2010, 165: 363-375.
 69. Turnau K., Jurkiewicz A., Grzybowska B., Rola mikoryzy w bioremediacji terenów zanieczyszczonych. *Kosmos. Prob. Nauk Biol.*, 2002, 51: 185-194.
-