

IRENA RABĘDA, ADAM WOŹNY, MAGDALENA KRZESŁOWSKA

*Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza
Umultowska 89, Poznań
E-mail: irkar@amu.edu.pl*

BAKTERIE I GRZYBY MIKORYZOWE ZWIĘKSZAJĄ WYDAJNOŚĆ ROŚLIN W FITOREMEDIACJI METALI ŚLADOWYCH

WSTĘP

Zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego to szeroko rozpowszechniony i poważny problem w Europie. Zgodnie z danymi Europejskiego Wydziału do Spraw Środowiska w 32 krajach członkowskich Unii Europejskiej stwierdzono 250 000 ha zanieczyszczonych gleb. Dodać do tego należy ok. 3 mln ha obszarów przypuszczalnie zanieczyszczonych, w których rodzaj prowadzonej działalności sugeruje silne zanieczyszczenie. Głównym zanieczyszczeniem gleby są metale śladowe oraz oleje mineralne (EEA 2007). Zwiększony poziom dostępnych dla roślin metali śladowych oddziałuje szkodliwie na ekosystemy i stanowi poważne ryzyko dla zdrowia zwierząt i ludzi, gdyż metale wchodzi do łańcucha pokarmowego poprzez produkcję rolniczą oraz zanieczyszczenie wód (LAI i CHEN 2009).

Opracowano liczne metody oczyszczania środowiska z metali śladowych. Można je podzielić na konwencjonalne, tj. mechaniczne, fizyczne i chemiczne (GARBISU i ALKORTA 2001, PULFORD i WATSON 2003, MCGRATH i współaut. 2007) oraz niekonwencjonalne, np. fitoremediacja. Jest to metoda przyjazna dla środowiska, często określana mianem „zielonej technologii” (PULFORD i WATSON 2003, KÄRENLAMPPI 2000). Metody konwencjonalne natomiast są drastyczne dla ekosystemu lądowego i niezwykle kosztowne. Oczyszczenie 1 m³ gleby metodami konwencjonalnymi jest szacowane na 10–1000 USD (GHOSH i SINGH 2005). Koszty spopielenia i składowania od-

padów tego typu, zawierających metale śladowe, na specjalnym składowisku wyniosłyby od 200–1500 USD za Mg. W przypadku fitoremediacji natomiast zamknęłyby się one w przedziale 10–50 USD za Mg (MCGRATH i współaut. 2007, GERHARDT i współaut. 2009).

Fitoremediacja została omówiona w licznych opracowaniach, zarówno polskojęzycznych, np. MARECIK i współaut. (2006) czy ZEMLEDUCH i TOMASZEWSKA (2007a), jak i angielskich, np. LONE i współaut. (2008) czy MUDGAL i współaut. (2010). W niniejszym artykule zostaną zatem przedstawione jedynie niektóre zagadnienia cieszące się dużym zainteresowaniem badaczy.

Roślina idealna do fitoremediacji powinna odznaczać się kilkoma cechami: małym kapitałem początkowym założenia i utrzymania takiej plantacji, nieinwazyjnością w środowisko przyrodnicze, dużą produkcją biomasy, szybkim tempem wzrostu, nagromadzeniem dużych ilości metalu(i) w części zbieranej jako plon, tolerancją na duże stężenia metali oraz łatwością uprawy i zbioru (KÄRENLAMPPI 2000, LONE i współaut. 2008, MUDGAL i współaut. 2010).

Wyróżnia się trzy główne grupy roślin wykorzystywanych w fitoremediacji terenów zanieczyszczonych przez metale śladowe. Są to hiperakumulatory (metalofity – gatunki, które tolerują i kumulują w częściach nadziemnych bardzo duże ilości metali (mg kg⁻¹; >10,000 (Mn lub Zn), >1000 (Cu, Co, Cr, Ni, Pb) lub >100 (Cd). Użycie hiperakumulato-

rów w fitoremediacji jest jednak najczęściej nieoptymalne, przede wszystkim ze względu na ich niewielkie wymiary (KIDD i współaut. 2009). Zamiast nich stosuje się niektóre gatunki roślin uprawnych oraz drzewiastych.

Fitoremediacja, chociaż stosunkowo tania i przyjazna dla środowiska przyrodniczego, jest metodą długotrwałą. Dlatego, aby podnieść efektywność fitoremediacji ciągle poszukuje się gatunków roślin bardziej wydajnych w tym procesie. Modyfikuje się też niektóre gatunki zwiększając głównie ich tolerancję na wysoki poziom dostępnych metali w podłożu, transport pobranych metali z korzenia do pędu oraz zdolność do ich kumulacji. Do tego celu wykorzystuje się m.in.

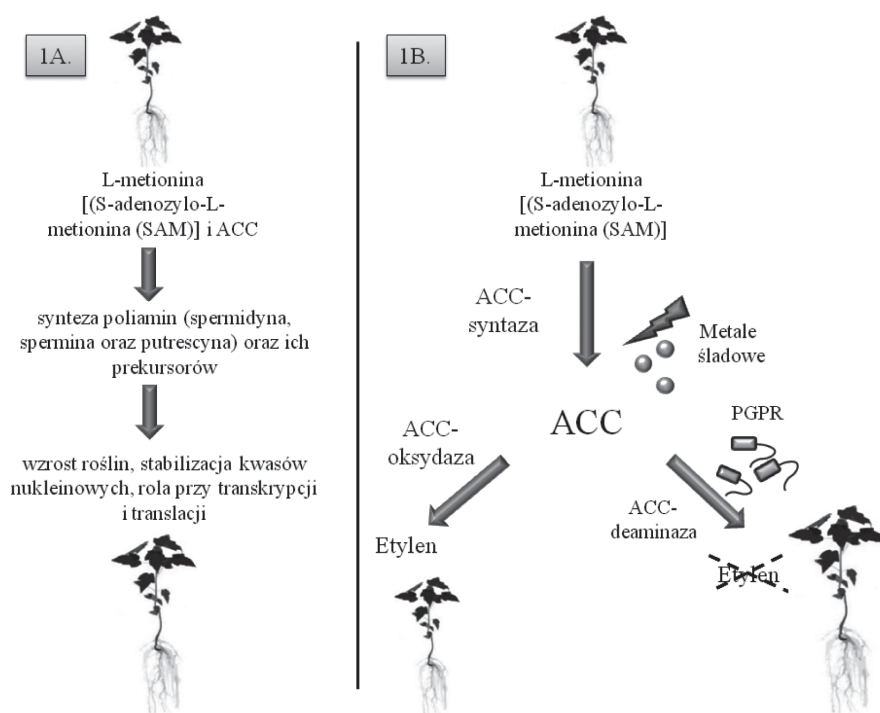
metody inżynierii genetycznej, które są omówione szczegółowo w licznych artykułach, np. MACEK i współaut. (2006), ZEMLEDUCH i TOMASZEWSKA (2007b) czy FULEKAR i współaut. (2009) i dlatego nie zostały tu opisane. W ciągu ostatnich 6 lat ukazują się artykuły informujące o możliwościach zwiększenia potencjału fitoremediacyjnego roślin także innymi metodami, m.in. poprzez inokulację (sztuczne zakażenie) bakteriami, m.in. wytwarzającymi siderofory, czy endofitami, a także grzybami mikoryzowymi. Tym sposobom zwiększenia efektywności fitoremediacji metali śladowych poświęcono niniejszy artykuł.

UDZIAŁ BAKTERII W ZWIĘKSZANIU POTENCJAŁU FITOREMEDIACYJNEGO

Część bakterii żyjących w ryzosferze (m.in. *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas (fluorescens)*, *Rhizobium*, *Serratia* (SARAN 2001 i cyt. tam lit.), to bakterie sfery korzeniowej wspomagające wzrost (ang. plant growth-promoting rhizobacteria/bacteria, PGPR/PGPB) (GAMALERO i współaut. 2009).

Korzystne oddziaływanie tej grupy mikroorganizmów może polegać m.in. na wytwarzaniu przez bakterie różnych związków pobieranych przez rośliny (witamin, np. biotyny, kwasu pantotenowego, niacyny, pirydok-

syny, taminy,) zwiększeniu przyswajalności substancji pokarmowych zawartych (upłynianie minerałów), zwiększeniu przyswajalności substancji pokarmowych zawartych w podłożu czy hamowaniu rozwoju patogenów i ograniczaniu pobierania związków hamujących wzrost rośliny (np. etylenu czy cyjanowodoru) (Ryc. 1) (SARAN 2001 i cyt. tam lit.). PGPR/PGPB powodują także zmianę morfologii korzenia na bardziej rozłożysty oraz oddziałują korzystnie na pobieranie substancji pokarmowych poprzez zwiększenie jego powierzchni chłonnej (KIDD i współaut. 2009). Dzięki PGPR/PGPB rośliny lepiej przyswajają



Ryc. 1. (1.A) Niezaburzony mechanizm przemian SAM i ACC. (1.B) Wpływ PGPR/PGPB na zahamowanie syntezy etylenu w obecności metali śladowych.

azot, co wpływa na stymulację wzrostu rośliny (KLAMA 2004 i cyt. tam lit.). Lepsze odżywianie mineralne oraz większa odporność roślin na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe to cechy ważne także w fitoremediacji metali śladowych.

Na przykład u gorczycy sarepskiej (*Brassica juncea*) rosnącej na podłożu zanieczyszczonym związkami Cd, Cu, Pb oraz Zn, dzięki obecności w ryzosferze takich szczepów jak *Azotobacter chroococcum* HKN-5, *Bacillus megaterium* HKP-1 czy *B. mucilaginosus* HKK-1, odnotowano zwiększenie wiązania N₂ oraz fosforanów przez te szczepy co wpływało dodatnio na tolerowanie metali śladowych przez roślinę (KIDD i współaut. 2009 i cyt. tam lit.). Również inokulacja *B. juncea* rosnącej na glebie bogatej w Ni szczepami *Pseudomonas sp* Ps29C oraz *Bacillus megaterium* Bm4C, wyizolowanymi z obszarów bogatych w ten metal, w znaczącym stopniu redukowałą toksyczne objawy nadmiaru tego pierwiastka oraz stymulowała wzrost rośliny (RAJKUMAR i współaut. 2009).

Mechanizmy korzystnego oddziaływania PGPR/PGPB można podzielić na bezpośrednie i pośrednie (Tabela 1). Mechanizmy bezpośrednie polegają na wzbogacaniu gleby w składniki pokarmowe oraz zwiększeniu ich przyswajalności przez bezpośrednie oddziaływanie mikroorganizmów ryzosfery. Mechanizmy pośrednie natomiast polegają głównie na poprawie zdrowotności roślin przez inhibicję wzrostu fitopatogenów oraz indukcję odporności roślin na choroby (SARAN 2001 i cyt. tam lit., GAMALERO i współaut. 2009).

Innym powodem korzystnego oddziaływania PGPR/PGPB na wzrost roślin w obecności metali śladowych (m.in. Cu i Zn) w podłożu jest zapobieganie nadmiernej produkcji etylenu, jednego z fitohormonów, który jeśli występuje w nadmiarze to powoduje przedwczesne starzenie się roślin i hamowanie wzrostu (GAMALERO i współaut. 2009). Nadprodukcja etylenu to jeden z ważnych powodów, dla których biomasa gatunków roślin rosnących na terenach zanieczyszczonych metalami śladowymi jest mała, stąd ekonomiczna potrzeba uzyskania rośliny idealnej do fitoremediacji terenów, o cechach omówionych powyżej.

Etylen powstaje z S-adenozyno metioniny (SAM), która zostaje przekształcona w kwas aminoacylocyklopropanowy (ACC) przez syntazę ACC w obrębie cytozlu i dalej w etylen przez oksydazę ACC. Udział PGPR/PGPB w zahamowaniu produkcji etylenu przez rośliny polega na tym, że bakterie ryzosfery pobierają ACC wydzielony przez rośliny i przekształcają przy udziale ACC-deaminazy, nieobecnej w komórkach roślinnych, w amoniak oraz -ketobutaran. Tak więc w wyniku działania bakteryjnego enzymu ACC-deaminazy zostaje zablokowany szlak produkcji etylenu. Dzięki temu rośliny nie wykazują objawów przedwczesnego starzenia, a ich wzrost nie zostaje zahamowany (Ryc. 1) (GAMALERO i współaut. 2009 i cyt. tam lit.).

Powyższe mechanizmy przyczyniają się do neutralizacji toksycznego oddziaływania metali śladowych na gatunki roślin rosnące w środowiskach zanieczyszczonych. Stąd oddziaływaniu PGPR/PGPB na rośliny i ich wykorzystaniu do zwiększania wydajności roślin

Tabela 1. Zestawienie pośrednich i bezpośrednich mechanizmów korzystnego oddziaływania PGPR/PGPB (SARAN i cyt. tam lit. 2001, GALAMERO i współaut. 2009).

Mechanizm bezpośredni	Mechanizm pośredni
produkcja fitohormonów	produkcja sideroforów
wiązanie N ₂	syntezowanie antybiotyków
upłynnianie minerałów	produkowanie witamin
wykorzystywanie przez rośliny Fe związanego przez siderofory	wytwarzanie cyjanowodoru
synteza enzymów modulujących wzrost i rozwój rośliny	wydzielanie enzymów hydrolizujących ścianę komórkową (CW) fitopatogenów

w fitoremediacji metali śladowych poświęca się ostatnio wiele uwagi (KIDD i współaut. 2009, RAJKUMAR i współaut. 2010). Szczególnie interesująca grupą z tej perspektywy wydają się bakterie z grupy PGPR/PGPB wytwarzające siderofory.

BAKTERIE PRODUKUJĄCE SIDEROFORY

W zwiększeniu potencjału fitoremediacyjnego roślin ważną rolę odgrywa grupa bakterii symbiotycznych produkujących siderofory, która bytuje w ryzosferze (ang. siderophore-producing bacteria, SPB) (RAJKUMAR i współaut. 2010). Siderofory (gr. *sideros* – żelazo, *phorein* – nosić) (GWINNER 2008), to drobnocząsteczkowe chelatory (~1 kDa), charakteryzujące się wysokim powinowactwem do Fe^{+3} , dzięki czemu odgrywają ważną rolę w ich pobieraniu (BRZOSTEK 2004 i cyt. tam lit.). Siderofory są produkowane przez bakterie, grzyby (SCHRÖEDER i WYRWAŁ 2004) i rośliny. W tym ostatnim przypadku są one nazywane fitosideroforami (KIDD 2009 i cyt. tam lit.). Dotychczasowe badania pokazują jednak, że najskuteczniejsze w pobieraniu Fe są siderofory produkowane przez bakterie zarówno Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne (RAJKUMAR i współaut. 2010).

Wykryto ok. 500 rodzajów sideroforów i można je zaklasyfikować do kilku grup chemicznych: hydroksykarboksylanów, katecholi oraz soli kwasu hydroksamowego (BUDZIKIEWICZ 2001, GWINNER 2008). Ponadto, wiele sideroforów należy do polipeptydów syntezowanych przez nierybosomowe syntetazy peptydowe, odpowiedzialne u bakterii także za syntezę antybiotyków (RAJKUMAR i współaut. 2010). Udział sideroforów w pobieraniu Fe polega na zwiększeniu jego dostępności, szczególnie w warunkach małego stężenia tego metalu. W środowisku naturalnym bowiem pierwiastek ten występuje przede wszystkim w postaci wodorotlenków lub hydroksytlenków, w których żelazo jest trójwartościowe (Fe^{3+}), niedostępne dla organizmów (KABATA-PENDIAS i PENDIAS 1999, BRZOSTEK 2004). Wydzielane przez mikroorganizmy do środowiska siderofory wiążą Fe^{3+} w kompleksy w stosunku 1:1. Kompleks Fe-siderofor jest wychwytywany przez receptory błony komórkowej i transportowany do protoplastu przy udziale transporterów ABC. W przestrzeni peryplazmatycznej dochodzi do zredukowania Fe^{3+} do Fe^{2+} , które dalej jest uwalniane do cytozolu i wykorzystywane w metabolizmie komórki (BRZOSTEK 2004).

Stwierdzono, że siderofory biorą udział nie tylko w pobieraniu Fe, ale także Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb, Zn oraz niektórych radionuklidów U i Np. Zatem dodatni wpływ SPB, żyjących w obrębie ryzosfery polega generalnie na lepszym jej zaopatrzeniu w składniki mineralne (głównie Fe ale nie tylko), co przekłada się na lepszy wzrost rośliny i przyrost jej biomasy (RAJKUMAR i współaut. 2010).

Możliwość kompleksowania metali innych niż Fe oraz zwiększanie w ten sposób ich dostępności dla roślin ma duże znaczenie w ich zastosowaniu do fitoremediacji metali śladowych (RAJKUMAR i współaut. 2010). Badania takie są prowadzone od kilku lat, a do inokulacji wykorzystuje się najczęściej szczepy SPB, tolerujące stosunkowo wysokie stężenia metali śladowych, pobrane z siedlisk bogatych w metale śladowe, t.j. tereny naturalnego występowania rud metali czy gleb serpentynowych (RAJKUMAR i współaut. 2010). Inokulacja roślin SPB zwiększa efektywność fitoremediacji (i) bezpośrednio, przez wzrost ilości zakumulowanych metali w tkankach rośliny, oraz (ii) pośrednio, przez zwiększenie tolerancji roślin na zwiększoną dostępność metali śladowych w podłożu oraz lepszy przyrost biomasy zarówno pędów, jak i korzeni (RAJKUMAR i współaut. 2010). Na przykład jednym z głównych przejawów toksycznego oddziaływania metali śladowych jest zaburzenie odżywiania mineralnego rośliny. Szczególnie częsty jest niedobór żelaza, który powoduje obniżenie poziomu chlorofilu (widoczne chlorozy), zaburzenia w budowie i funkcjonowaniu chloroplastów, obniżenie efektywności fotosyntezy, a co za tym idzie zmniejszenie przyrostów rośliny (KRZESŁOWSKA i współaut. 2010). W tych warunkach bakterie produkujące siderofory zwiększają dostępność żelaza w roztworze glebowym, a tym samym jego pobieranie przez roślinę. Niejednokrotnie stwierdzano, że rośliny z inokulowanymi SPB nie wykazywały symptomów toksyczności metali śladowych. Fasola (*Phaseolus vulgaris*), inokulowana mało wrażliwym na Cd i Pb szczepem *Pseudomonas putida* produkującym siderofory, nie wykazywała symptomów toksyczności tych metali (w porównaniu do roślin kontrolnych bez SPB), a nawet zwiększał się przyrost jej biomasy. W roślinach stwierdzono znacznie wyższy, niż w kontroli, poziom Fe, który był efektem dostarczania tego pierwiastka przez sidero-

fory inokulowanych bakterii *P. putida* (RAJKUMAR i współaut. 2010). Podobnie, inne gatunki roślin pobierające Fe z kompleksów Fe-siderofory, m.in. *Cucurbita pepo*, *Brassica juncea*, *Heliantus annuus*, *Medicago sativa* i *Vigna unguiculata*, wykazywały po inokulacji znaczną stymulację wzrostu na terenach zanieczyszczonych metalami śladowymi (RAJKUMAR i współaut. 2010). W wielu przypadkach inokulacja bakteriami produkującymi siderofory powoduje zwiększenie kilku kluczowych dla fitoremediacji cech rośliny, takich jak duża akumulacja metali śladowych w tkankach przy jednoczesnym braku objawów ich toksyczności oraz zwiększenie przyrostu biomasy. Cechy takie stwierdzono m.in. u *Brassica juncea* inokulowanej *Pseudomonas* sp. Ps29C i *Bacillus megaterium* Bm4C, w obecności Ni, u słonecznika inokulowanego *Streptomyces tendae* F4, w obecności Cd, czy u kukurydzy inokulowanej *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* i *Ralstonia metallidurans*, w obecności Cr i Pb (RAJKUMAR i współaut. 2010). W tym ostatnim przypadku bakterie powodowały ponadto zwiększenie kumulacji Cr w pędzie o 4,3, a Pb o 3,4 razy w stosunku do kontroli (LEUNG 2008).

Niemniej należy zauważyć, że w niektórych gatunkach roślin inokulacja SPB powodowała zmniejszenie pobierania metali. Stwierdzono to m. in. u *Salix caprea* inokulowanej *Pseudomonas* sp., *Serratia marcescens*, *Streptomyces* sp., rosnącej w obecności Zn i Cd (KUFFNER i współaut. 2008), czy fasoli inokulowanej *P. putida*, rosnącej w obecności Pb i Cd. W tym ostatnim przypadku zaobserwowano wprawdzie polepszenie wzrostu rośliny, ale zmniejszenie pobierania obu metali (TRIPATHI i współaut. 2005). Wydaje się zatem, że reakcja roślin na inokulację SPB w obecności metali śladowych zależy przede wszystkim od gatunku rośliny (RAJKUMAR i współaut. 2010). Tak więc, aby osiągnąć zwiększenie kumulacji metali śladowych w tkankach rośliny oraz ich transportu z korzenia do pędu bez efektów toksycznych, należy dokonać właściwego doboru gatunku rośliny i inokulowanych szczepów SPB.

BAKTERIE ENDOFITYCZNE

Jest to grupa definiowana jako bakterie (Gram-dodatnie i Gram-ujemne) zasiedlające tkanki roślinne (co dla wielu ryzobakterii jest utrudnione), nie powodujące zakażenia ani nie wpływające negatywnie na gospodarza. Bytują one w apoplacie lub symplacie. Wpływają korzystniej na roślinę niż wiele ryzobakterii. Mają jednak wiele ich cech. W niektórych przypadkach zwiększają tolerancję rośliny-gospodarza na metale śladowe, ale mogą także stymulować jego wzrost. Dzieje się tak dlatego, że indukują one system odporności rośliny na patogeny, wiążą związki azotu, produkują regulatory wzrostu, zwiększają pobieranie przez roślinę składników mineralnych oraz wody (RAJKUMAR i współaut. 2009, MA i współaut. 2010).

Wiele gatunków hiperakumulatorów jest zasiedlonych przez endofity. Na przykład korzenie *B. napus* zasiedla *P. fluorescens* i *Mirco bacterium* sp. Prowadzone w ostatnich 11 latach badania molekularne wykazały ogromne zróżnicowanie populacji tych bakterii, a także umożliwiły znalezienie genów odpowiedzialnych za wzrost tolerancji na metale. Na przykład 83% rodzajów bakterii wyizolowanych z *Arabidopsis bertolonii* produkuje siderofory i zwiększa wzrost roślin w warunkach stresu wywołanego Ni (RAJKUMAR i współaut. 2009). Stwierdzono też, że endofit odporny na Cd, wyizolowany z *Nicotiana tabacum*, zmniejszał toksyczny efekt Cd na roślinę zwiększając pobieranie Cd, Zn i Fe przez korzenie (MASTRETTA i współaut. 2009). Prowadzono również badania bakterii zaszczepionych z *Salix caprea* akumulującej Zn i Cd, pod kątem ich potencjału do zwiększania fitoekstrakcji metali śladowych (KUFFNER i współaut. 2010).

Inokulacja wybranych gatunków roślin endofitami (korzystnie wpływającymi na ich dalszy wzrost i rozwój poprzez wyżej omówione mechanizmy) wydaje się zatem bardzo obiecującym zabiegiem polepszania efektywności fitoremediacji metali śladowych (RAJKUMAR i współaut. 2009 i cyt. tam lit.).

INOKULACJA ROŚLIN GRZYBAMI MIKORYZOWYMI

Inokulacja roślin grzybami mikoryzowymi, szczególnie odpornymi na podwyższone stężenie metali śladowych w glebie, to kolej-

na obiecująca modyfikacja roślin zwiększająca ich efektywność w fitoremediacji metali śladowych.

W warunkach naturalnych około 80-90% gatunków roślin kwiatowych jest skolonizowana przez grzyby mikoryzowe (KHAN 2006). Wyróżnia się mikoryzę zewnętrzną (ektomikoryzę) i mikoryzę arbuskularną (wewnętrzną, AM). Dla roślin drzewiastych strefy borealnej i alpejskiej oraz dosyć często klimatu umiarkowanego charakterystyczna jest ektomikoryza. Mikoryzy arbuskularne występują w roślinach zielnych, a wśród roślin drzewiastych są spotykane u jesionu, klonu, wiązu, platanu i drzew owocowych (KRZESŁOWSKA i współaut. 2010).

Obydwa rodzaje mikoryzy mogą się przyczynić do ograniczenia toksycznego oddziaływania metali śladowych na roślinę gospodarza (KRZESŁOWSKA i współaut. 2010). Najwięcej danych dotyczy jednak mikoryzy arbuskularnej. Strzępki grzybów mikoryzowych zwiększają powierzchnię chłonną systemu korzeniowego umożliwiając roślinom znacznie lepszy dostęp do zasobów pokarmowych gleby i zwiększając ich pobieranie. Dotyczy to głównie fosforu nieorganicznego (Pi), innych składników mineralnych oraz wody (GÖHRE i PASZKOWSKI 2006, KHAN 2006). Ponadto grzyby ektomikoryzowe zmieniają morfologię oraz topografię korzeni, często wydłużając je i zwiększając liczbę ich rozgałęzień. Dzięki tym modyfikacjom zwiększa się również ich powierzchnia chłonna, co przekłada się na zwiększone pobieranie substancji niezbędnych roślinie, a tym samym jej lepszy wzrost i przyrost biomasy (GÖHRE i PASZKOWSKI 2006, KHAN 2006, GAMALERO i współaut. 2009).

MIKORYZOREMEDIACJA

Technologia wykorzystująca grzyby mikoryzowe do zwiększenia tolerancji na metale śladowe u roślin oraz przyczyniająca się do oczyszczania środowiska zanieczyszczonego metalami śladowymi nazywa się mikoryzoremediacją (KHAN 2006, LIANG i współaut. 2009).

Generalnie, rośliny pozostające w symbiozie z grzybami mikoryzowymi charakteryzują się zwiększoną tolerancją na stres środowiskowy, w tym również na podwyższone stężenie metali śladowych w podłożu (GAMALERO i współaut. 2009). Mikoryza wpływa bowiem z jednej strony na lepszą kondycję rośliny poprzez jej lepsze odżywianie mineralne, z drugiej natomiast kumuluje często znaczą część metali w swoich komórkach oraz na terenie ryzosfery, dzięki czemu zmniejsza się ilość metali, która może się przedostać do tkanek roślinnych (LIANG i współaut. 2009).

ZNACZENIE GRZYBÓW W FITOSTABILIZACJI

Zwiększenie tolerancji rośliny na podwyższone stężenie metali śladowych w podłożu oraz kumulacja dużych ich ilości w obrębie ryzosfery ma bardzo duże znaczenie w strategii fitostabilizacji. Stwierdzono, że w obecności metali śladowych grzyby mikoryzowe mogą wydzielać liczne eksudaty wiążące ich jony. Jednym z najważniejszych i najlepiej poznanych eksudatów jest glomalina (GONZALES-CHAVEZ i współaut. 2004). Jest to glikoproteina trudno rozpuszczalna w wodzie i słabo podatna na rozkład mikrobiologiczny (potrzeba na to ok. 10-50 lat), która wydzielona do gleby silnie wiąże znaczne ilości metali śladowych. Wykazano, że z roślin laboratoryjnie inokulowanych grzybami mikoryzowymi (hodowanych w kulturach doniczkowych), z grama glomaliny można wyekstrahować 0,08 mg Cd, 4,3 mg Cu oraz 1,12 mg Pb. Eksperyment przeprowadzony *in vitro* wykazał, że *Gigaspora rosea* sekwestruje 28 mg Cu na gram glomaliny, co stanowiło 35% ogółu Cu dodanej do podłoża.

Grzyby mikoryzowe gromadzą ponadto znaczne ilości metali w obrębie swoich komórek, wykorzystując podobne mechanizmy ich immobilizacji i detoksykacji jak komórki roślinne. Na terenie strzępek są więc metale akumulowane m.in. w ścianie komórkowej, gdzie są wiązane głównie przez chitynę, sekwestrowane w wakuoli i innych organelach systemu błon wewnętrznych oraz wiązane na terenie cytozolu przez bogate w cysteinę białka, metalotioneiny (SCHÜTZENDÜBEL i POLLE 2002, KRZESŁOWSKA 2011). Tak więc, obecność grzybów mikoryzowych będących w symbiozie z roślinami powoduje unieruchomienie stosunkowo dużych ilości metali śladowych zarówno w obrębie ryzosfery, jak i w strzępkach. Bardzo wspomaga zatem fitostabilizację dzięki zmniejszeniu rozprzestrzeniania metali na inne tereny oraz ich penetracji w głąb profilu glebowego i przedostawania się do wód gruntowych. Związanie metali śladowych w obrębie ryzosfery zmniejsza także ryzyko ich toksycznego oddziaływania na mikroorganizmy glebowe, rośliny mikoryzowe, oraz inne rosnące w sąsiedztwie (GÖHRE i PASZKOWSKI 2006, GAMALERO i współaut. 2009).

ZNACZENIE GRZYBÓW W FITOEKSTRAKCJI

Grzyby mikoryzowe poprzez liczne typy interakcji z roślinami mogą także zwiększać ich efektywność w fitoekstrakcji. Jednym z głównych problemów tej technologii, który

czyni ją mało wydajną, a jednocześnie słabo opłacalną jest występowanie metali w formie mało dostępnej dla roślin, co powoduje zmniejszone ich pobieranie. Dostępność tę zwiększa się w sposób sztuczny dodając do gleby chelatory metali, które są łatwo pobierane przez rośliny, jak np. EDTA. Takie zabiegi zwiększają wprawdzie dostępność metali śladowych dla roślin, a tym samym ich pobieranie; wywołują jednak liczne skutki ujemne. Zwiększają np. możliwość migracji metali w głąb profilu glebowego do wód gruntowych, ich toksyczne oddziaływanie na rośliny oraz mikroorganizmy glebowe, zwiększają koszt zastosowania tej technologii itp. Więcej informacji na ten temat można znaleźć w licznych artykułach przeglądowych (KOCIAŁKOWSKI i współaut. 1999, TURNAU i współaut. 2002, CAO i współaut. 2007, DICKINSON i współaut. 2009, KARCZEWSKA i współaut. 2009, i cyt. tam lit.). Stąd potrzeba poszukiwania bardziej przyjaznych dla środowiska sposobów zwiększenia dostępności i pobierania metali śladowych przez rośliny. Jedną z obiecujących metod wydaje się zastosowanie grzybów mikoryzowych (GÖHRE i PASZKOWSKI 2006, PUNAMIYA i współaut. 2010).

Jednak w obecności wysokiego stężenia metali śladowych w środowisku obserwuje się często redukcję, a nawet eliminację całych kolonii gatunków grzybów mikoryzowych z gleby. Szczególnie wrażliwe na działanie metali są niektóre rodzaje zarodników, a znacznie mniej grzyby będące już w symbiozie z rośliną gospodarzem. Jednak pomimo występowania w glebach dużych stężeń metali, propagule grzybów często przeżywiają, a następnie, w sprzyjających warunkach, rozwijają się. Stwierdzono także, że zarodniki z terenów niezanieczyszczonych są mniej odporne na działanie metali niż te występujące na terenach zanieczyszczonych (GÖHRE i PASZKOWSKI 2006). Wyniki badań zespołu Pagano wykazały, że zarodniki AM należące do *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus* i *Scutellospora*, zebrane z terenów zanieczyszczonych metalami w Brazylii, mają CW bogatsze w składniki mineralne, co zwiększa ich szanse na przetrwanie (PAGANO i współaut. 2010). Stąd koncepcją inokulacji roślin wykorzystywanych w fitoekstrakcji grzybami mikoryzowymi pochodzącymi z terenów zanieczyszczonych przez metale śladowe, ponieważ charakteryzują się one zwiększoną tolerancją na czynniki stresowe.

Badania inokulacji grzybami mikoryzowymi roślin wykorzystywanych do fitoekstrakcji

pokazały, że można w ten sposób polepszyć pobieranie i kumulację metali śladowych przede wszystkim w strzępach, a tylko w niewielkim stopniu w roślinie. Niemniej na skutek znaczącego wzrostu biomasy rośliny ta ilość pobranego metalu wydatnie zmniejsza obciążenie środowiska. Zdarzają się jednak także przypadki zwiększonego pobierania metalu przez roślinę. Na przykład *Peris vittata*, jedyny gatunek stosowany komercyjnie do fitoekstrakcji As („edenfern”; <http://www.eden-space.com./index.html>), po inokulacji grzybami mikoryzowymi (*Glomus intraradices* i *G. mosseae*), zwiększyła pobieranie tego metalu z podłoża. W przypadku dodania 100 mg As kg⁻¹ gleby, rośliny nieinokulowane skumulowały 60.4 mg As kg⁻¹ świeżej masy, natomiast inokulowane grzybami mikoryzowymi wyizolowanymi z obszarów kopalnianych, 88.1 mg kg⁻¹ świeżej masy. Takie efekty wynikały z lepszego zaopatrzenia w fosfor rośliny mikoryzowej, co najprawdopodobniej przełożyło się na zwiększenie biomasy roślin, a także zwiększenie pobierania i kumulacji metalu przez roślinę (LEUNG 2008). Podobnie pomidory inokulowane grzybami mikoryzowymi miały o 30% zwiększony przyrost biomasy i wykazywały zwiększoną kumulację As do 75 mg As kg⁻¹ gleby (GÖHRE i PASZKOWSKI 2006).

INOKULACJA ROŚLIN MIESZANKAMI GRZYBÓW MIKORYZOWYCH

Dużą uwagę poświęca się inokulacji roślin mieszkankami grzybów mikoryzowych, które przyczyniają się do zwiększonego pobierania różnych metali (GAO i współaut. 2010). Wykazano także, że inokulacja kukurydzy (*Zea mays*) przez *Glomus mosseae* i *G. species* powodowała, że osobniki skolonizowane przez grzyby mikoryzowe cechowały się większą zawartością Pb, Zn i Cd w korzeniach. Dodatkowo biomasa oraz rozmiary pędów i korzeni roślin skolonizowanych były większe niż u roślin nieskolonizowanych. Jednak transport z korzeni do pędów przy małych i umiarkowanych stężeniach metali był podobny w roślinach skolonizowanych i nieskolonizowanych, natomiast przy bardzo dużych stężeniach metali w podłożu, spadał o 50% (LIANG i współaut. 2009).

Odmienne wyniki dotyczące translokacji metalu otrzymano dla trawy *Chrysopogon zizanioides* (szybko rosnącej o dużym przyroście biomasy i głębokim, rozgałęzionym systemie korzeniowym), podobnie jak kukurydza, skolonizowanej przez *G. mosseae*.

Uważa się, że ten gatunek grzyba powoduje rozpuszczanie składników mineralnych i zwiększenie zarówno dostępności metali śladowych, jak i zwiększony ich transport z korzenia do pędu (PUNAMIYA i współaut. 2010). Akumulację i translokację metalu z korzeni do pędów badano dla Pb, który jest jednym z najsłabiej pobieranych przez rośliny z gleby (KABATA-PENDIAS i PENDIAS 1999). Wykazano, że rośliny będące w symbiozie z *G. mosseae* cechowały się wzrostem pobierania tego metalu z gleby oraz zwiększeniem jego translokacji z korzeni do pędu. Jest to bardzo ważne w przypadku fitoekstrakcji. Stwierdzono bowiem m.in. zwiększone o 85–98% pobieranie Pb przez korzenie roślin mikoryzowych (w zależności od stężenia Pb w podłożu) w stosunku do roślin niemikoryzowych oraz o 37–70% zwiększoną translokację tego metalu z korzeni do pędów (PUNAMIYA i współaut. 2010). Warto przypomnieć, że ilość skumulowanego metalu w pędzie jest jedną z najważniejszych cech roślin wykorzystywanych do fitoekstrakcji metali. Ponadto rośliny skolonizowane przez grzyby mikoryzowe charakteryzowały się większą biomasa, wyższym poziomem chlorofili i związków tiulowych, odpowiedzialnych m.in. za neutralizację metali i stresu oksydacyjnego w komórkach (PUNAMIYA i współaut. 2010).

MIKORYZACJA GATUNKÓW DRZEWIASTYCH

Duży potencjał fitoremediacyjny roślin drzewiastych, szczególnie należących do rodziny Salicaceae (gatunki *Populus* i *Salix*), wynika z ich predyspozycji do fitoekstrakcji oraz fitostabilizacji. Obecnie prowadzone badania skupiają się na zwiększaniu pobierania metali przez tę grupę roślin. Bardzo obiecująco zapowiada się możliwość wykorzystania w tym celu grzybów mikoryzowych (CAPUANA 2011).

ZASTOSOWANIE MIESZANEK INOKULACYJNYCH W CELU ZWIĘKSZANIA POTENCJAŁU FITOREMEDIACYJNEGO

Sukcesy związane z zastosowaniem PGPR/PGPB oraz AMF zachęciły do badania wpływu mieszanek inokulatów na zwiększanie potencjału fitoremediacyjnego roślin. Badano m.in. efekt mieszanki mikoryzowej (*Glomus intraradices*, GI i *G. mosseae*, GM) na *Pteris vittata*, hiperakumulatora arsenu, i stwierdzono, że po inokulacji w roślinie wzrosła zawartość związków fosforu, co przełożyło się na utrzymanie prawidłowego uwodnienia

Wykazano, że inokulacja *Salix viminalis* oraz mieszańca *Populus × generosa* grzybem mikoryzowym *G. intraradices* wpłynęła znacząco na zwiększenie biomasy u *S. viminalis*. Większe ilości metali pobierała *S. viminalis* niż *Populus × generosa*. Cd oraz Zn były kumulowane w pędach, głównie w liściach, natomiast Cu i Pb koncentrowały się przede wszystkim w korzeniach. Inokulacja nie wpłynęła jednak znacząco na zwiększenie przemieszczania metali ciężkich do pędu. Rośliny stały się natomiast bardziej tolerancyjne wobec metali. Na przykład w liściach obu klonów zanotowano stężenie Zn znacznie przekraczające stężenie toksyczne, które wynosi 100–400 mg kg⁻¹. W warunkach normalnych stężenie Zn w liściach wynosi zazwyczaj 5–30 mg kg⁻¹ (BISSONNETTE i ARNAUD 2010).

Badania przeprowadzone na rocznych siewkach *Betula pendula* wykazały kumulację Cu (2,585–3,725 mg kg⁻¹ suchej masy) i Pb (1,459–1,812 mg kg⁻¹ suchej masy) przede wszystkim w korzeniach i liściach. Obecność tych metali negatywnie wpłynęła na fizjologię zastosowanych grzybów ektomikoryzowych, m.in. na aktywność dehydrogenazy oraz obniżyła zasiedlanie roślin przez te symbionty. Pb²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ i Zn²⁺ ograniczały pobierania przez siewki brzozy srebrnej związków azotu. Jednak symbioza z grzybami mikoryzowymi wpłynęła korzystnie na pobieranie przez korzenie brzozy składników mineralnych, a także na kumulację Pb i Cu (BOJARCZUK i KIELISZEWSKA-ROKICKA 2010).

Przedstawione powyżej dane pokazały, że inokulacja roślin grzybami mikoryzowymi stanowi jedno z bardziej obiecujących rozwiązań zwiększających ich efektywność w fitoremediacji metali śladowych i to zarówno w strategii fitostabilizacji metali, jak i ich usuwania poprzez fitoekstrakcję.

tkanek oraz wzrost biomasy i zwiększenie pobierania metali z gleby (LEUNG 2008).

Stosowano także mieszanki inokulatów złożonych z połączenia AMF oraz bakterii. Na przykład *Trifolium repens* zaszczepiona mieszanką: AM *G. mosseae* (przystosowanego do pobierania Cd) oraz szczepem bakterii *Brevibacillus sp.* zwiększyła: (i) powierzchnię korzenia w stosunku do rośliny nie inokulowanej, (ii) przyrost jego biomasy (głów-

nie dzięki większej zasobności w związki P i N) oraz (iii) liczbę symbiotycznych struktur (brodawki korzeniowe, AM) niż przy zastosowaniu pojedynczego inokulatu. Jednak w wyniku zastosowania podwójnej inokulacji zmniejszyła się ilość pobranego przez roślinę Cd. Podobne wyniki otrzymano w przypadku hodowli roślin na glebach bogatych w Zn oraz Ni (GAMALERO i współaut. 2009 i cyt. tam lit.).

W relacjach tego typu ważną rolę pełnią bakterie wspomagające mikoryzację (ang. micorrhization helper bacteria, MHB), które wiążą się z korzeniami roślin oraz z grzybami mikoryzowymi. Na przykład *Pseudomonas* sp., który produkuje enzym degradujący

CW grzyba mikoryzowego *G.mosseae*, wspomaga kiełkowanie jego zarodników, przez co wpływa na zwiększoną kolonizację korzeni koniczyny (*Trifolium* sp.) przez ten grzyb (KHAN 2006 i cyt. tam lit.).

Współdziałanie AM z bakteriami może ponadto stymulować wzrost roślin w trakcie procesów fitoremediacyjnych terenów zanieczyszczonych. Mechanizm tych interakcji nie został jednak w pełni poznany. Wykazano natomiast istnienie dużego potencjału wykorzystania mikoryz do zwiększania wydajności roślin w fitoremediacji. Taka perspektywa powinna zachęcać badaczy do dalszych prac związanych z tym zagadnieniem.

PODSUMOWANIE

Wysoki stopień skażenia środowiska metalami śladowymi spowodował konieczność poszukiwania skutecznych, opłacalnych, a jednocześnie przyjaznych dla środowiska metod jego oczyszczania. Jedną z takich metod jest niewątpliwie fitoremediacja. Niemniej na obecnym etapie metoda ta, mimo że bardzo obiecująca, jest jeszcze zbyt mało efektywna i opłacalna (szczególnie fitoekstrakcja). Przede wszystkim z tego powodu jest stosowana w ograniczonym zakresie (DICKINSON i współaut. 2009).

Przedstawione w tym artykule niegenetyczne możliwości modyfikacji roślin, czyli inokulację bakteriami strefy korzeniowej polepszającymi wzrost, PGPR/PGPB, a szczególnie produkującymi siderofory, SPB, endofitami i/lub grzybami mikoryzowymi, są przyjazne dla środowiska. Zarówno PGPR/PGPB, jak i grzyby mikoryzowe przyczyniają się przede wszystkim do wzrostu tolerancji

roślin na obecność dużych stężeń metali śladowych w podłożu oraz ich silną kumulację w obrębie ryzosfery a także korzeni przy niezahamowanym wzroście rośliny i przyroście jej biomasy. Rośliny takie, jak na przykład niektóre gatunki drzewiaste, wydają się mieć korzystne cechy do fitostabilizacji. W strategii tej jest bowiem bardzo ważne, aby posadzone na silnie zanieczyszczonym terenie rośliny przetrwały wiele lat i związały maksymalną ilość toksycznych metali w obrębie ryzosfery. Stosowanie tej grupy roślin jest również korzystne dla środowiska glebowego ze względu na wzbogacania gleby w składniki mineralne, a także zapobiegania jej erozji. Badania dotyczące roli mikoryz oraz PGPR/PGPB w fitoekstrakcji są w fazie początkowej, choć niektóre wyniki przedstawione w niniejszym opracowaniu wskazują, że modyfikacje takie mogą także znaleźć zastosowanie w tej strategii.

BAKTERIE I GRZYBY MIKORYZOWE ZWIĘKSZAJĄ WYDAJNOŚĆ ROŚLIN W FITOREMEDIACJI METALI ŚLADOWYCH

Streszczenie

Zanieczyszczenie środowiska przez metale śladowe jest nadal szeroko rozpowszechnionym i poważnym problemem. Wymusza to powstanie nowych strategii jego oczyszczania. Jedną z bardzo obiecujących, stosunkowo taniach i przyjaznych środowisku technologii jest fitoremediacja. Wykorzystuje ona trzy grupy roślin: hiperakumulatory, rośliny uprawne i drzewiaste. Pomimo wielu zalet, którymi cechują się te grupy roślin istnieją także liczne ograniczenia, w ich komercyjnym zastosowaniu.

Do zwiększania potencjału fitoremediacyjnego roślin, stosuje się obecnie ich modyfikacje, zarówno genetyczne, jak i niegenetyczne.

Wśród niegenetycznych wyróżnia się: inokulację (sztuczne zakażanie) ryzobakteriami/bakteriami stymulującymi wzrost strefy korzeniowej (ang., odpowiednio, PGPR/PGPB), na przykład bakteriami produkującymi siderofory (ang. SPB). Wykorzystuje się do tego celu również endofity czy grzyby mikoryzowe.

W efekcie obserwuje się na przykład: (1) lepsze odżywianie mineralne roślin, (2) modyfikacje

morfologii oraz topografii korzeni, co przekłada się na zwiększenie ich powierzchni absorpcyjnej, (3) wzrost odporności na patogeny, (4) wzrost akumulacji i tolerancji na metale śladowe. Pozwala to zmodyfikowanym roślinom, przeżyć na terenach bardzo skażonych mimo kumulowania stosunkowo dużej ilości metali śladowych. Nie zmniejsza się też znacząco ich biomasa. Dzięki takim zabiegom można więc

uzyskać u roślin kluczowe cechy decydujące o sukcesie fitoremediacji.

Przykłady modyfikacji niegenetycznych przedstawione w tym opracowaniu są przyjazne środowisku.

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane poprzez modyfikacje niegenetyczne roślin obecny kierunek w fitoremediacji terenów skażonych metalami śladowymi wydaje się obiecujący.

BACTERIA AND MICORRHIZAL FUNGI ENHANCE PLANTS' EFFICIENCY IN TRACE METAL PHYTOREMEDIATION OF TRACE METALS CONTAMINATED AREAS

Summary

The environmental pollution caused by trace metals is still a widespread and serious problem. Numerous methods of metal clean-up strategies were developed. The phytoremediation, is considered as a very promising, environmentally friendly and relatively cheap technology. Three main groups of plants are used for this technology: hyperaccumulators, crop plants and tree species. However, no one group of plants is enough efficient for this technology what limits their commercial application.

In order to increase plant phytoremediation potential, genetic and non-genetic modifications are carried out. In this review we focused on non-genetic ones.

Plant non-genetic modifications include: inoculation (an artificial infection) by Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)/Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), for instance Siderophore Producing Bacteria (SPB) and by endophytes or micorrhizal fungi.

In brief, all used modifications resulted in: (1) improvement of mineral nutrition of the plant, (2) better root's morphology and topography what increased the surface of mineral and trace metals absorption, (3) increase the plant resistance for pathogens and (4) increase its accumulation and tolerance of trace metals. It lets the modified plants, survive on high contaminated areas, do not markedly decrease the biomass together with relatively high accumulation of trace metals in their tissues. Consequently they obtained all key features for successful phytoremediation.

It is worth noting moreover, that non-genetic plant modifications depicted in this review are environmentally friendly.

Taking into account the facts this direction of plant modifications for phytoremediation of trace metals contaminated areas seems to be promising.

LITERATURA

- BISSONNETTE C., ARNAUD M., 2010. *Phytoextraction of heavy metals by two Salicaceae clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial*. Plant Soil 332, 55–67.
- BOJARCZUK K., KIELISZEWSKA-ROKICKA B., 2010. *Effect of ectomycorrhiza on Cu and Pb accumulation in leaves and roots of silver birch (Betula pendula Roth.) seedlings grown in metal-contaminated soil*. Water Air Soil Pollut. 207, 227–240.
- BRZOSTEK K., 2004. *Mechanizmy regulacji czynników wirulencji Yersinia enterocolitica*. Post. Mikrobiol. 43,1, 7–38.
- BUDZIKIEWICZ H., 2001. *Siderophore-antibiotic conjugates used as Trojan Horses against Pseudomonas aeruginosa*. Curr. Topics Med. Chemist. 1, 73–82.
- CAO A., CARUCCI A., LAI T., LA COLLA P., TAMBURINI E., 2007. *Effect of biodegradable chelating agents on heavy metals phytoextraction with Mirabilis jalapa and on its associated bacteria*. Eur. J. Soil Biol. 43, 200–206.
- CAPUANA M., 2011. *Heavy metals and woody plants - biotechnologies for phytoremediation*; SISEF (<http://www.sisef.it/iforest/>), dostęp z dnia 5.01.2001, iForest 4, 7–15.
- DICKINSON N. M., BAKER A. J. M., DORONILA A., LAIDLAW S., REEVES R. D., 2009. *Phytoremediation of inorganics: realism and synergies*. Int. J. Phytoremediat. 11, 97–114.
- EEA (EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY), 2007. *Progress in management of contaminated sites* (http://themes.eea.europa.eu/IMS/ISpecs/ISpecification20041007131746/IAssessment1152619898983/view_content) dostęp z dnia 07.02.08.
- FULEKAR M. H., SINGH A., BHADURI A. M., 2009. *Genetic engineering strategies for enhancing phytoremediation of heavy metals*. Afr. J. Biotechnol. 8, 529–535.
- GAMALERO E., LINGUA G., BERTA G., GLICK B. R., 2009. *Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress*. Can. J. Microbiol. 55, 501–514.
- GAO Y., LI Q., LING W., ZHU X., 2010. *Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene*. J. Hazard. Mat. 185, 703–709.
- GARBISU C., ALKORTA I., 2001. *Basic concepts on heavy metal soil bioremediation*. Eur. J. Mineral Process. Environ. Protect. 3, 58–66.
- GERHARDT K. E., XIAO-DONG HUANG, BERNARD R. GLICK, BRUCE M. GREENBERG., 2009. *Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges*. Plant Sci. 176, 20–30.
- GHOSH M., SINGH S. P., 2005. *A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts*. Appl. Ecol. Environ. Res. 3, 1–18.
- GÖHRE V. PASZKOWSKI U., 2006. *Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation*. Planta 223, 1115–1122.

- GONZALEZ-CHAVEZ M. C., CARRILLO-GONZALEZ R., WRIGHT S. F., NICHOLS K. A., 2004. *The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements*. Environ. Pollut. 130, 317–323.
- GWINNER T., 2008. *Das Siderophor-Antibiotikum Salmycin*. Praca doktorska, Uniwersytet Karla Eberharda w Tübingen.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H., 1999. *Biogeochemia pierwiastków śladowych*. Wyd. Nauk PWN, Warszawa, 35–71.
- KARCZEWSKA A., GAŁKA B., SZOPKA K., KABAŁA C., LEWIŃSKA K., 2009. *Wpływ zróżnicowanego dawkowania biodegradowalnego EDDS na pobranie miedzi i innych pierwiastków metalicznych przez kukurydzę z gleb zanieczyszczonych*. Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych 41, 555–562.
- KÄRENLAMP I., 2000. *Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils*. Environ. Pollut. 107, 107–132.
- KHAN A. G., 2006. *Mycorrhizoremediation - an enhanced form of phytoremediation*. J. Zhejiang Univ. Science B 7, 503–514.
- KIDD P., BARCELO J., BERNAL M. P., NAVARI-IZZO F., POSCHENRIEDER C., SHILEV S., CLEMENTEC R., MONTERROSO C., 2009. *Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation*. Environ. Exp. Botan. 67, 243–259.
- KLAMA J., 2004. *Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami*. Acta Sci. Pol., Agricult. 3, 19–28.
- KOCIAŁKOWSKI W.Z., DIATTA J.B., GRZEBISZ W., 1999. *Evaluation of Chelating Agents as Heavy Metals*. Polish J. Environ. Stud. 8, 149–154.
- KRZESŁOWSKA M., LENARTOWSKA M., SAMARDAKIEWICZ S., BILSKI H., WOŹNY A., 2010. *Lead deposited in the cell wall of Funaria hygrometrica protonemata is not stable - A remobilization can occur*. Environ. Pollut. 158, 325–338.
- KRZESŁOWSKA M., 2011. *The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy*. Acta Physiol. Plant 33, 35–51.
- KUFFNER M., DE MARIA S., PUSCHENREITER M., FALLMANN K., WIESHAMMER G., GORFER M., 2010. *Culturable bacteria from Zn- and Cd-accumulating Salix caprea with differential effects on plant growth and heavy metal availability*. J. Appl. Microbiol. 108, 1471–1484.
- KUFFNER M., PUSCHENREITER M., WIESHAMMER G., GORFER M., SESSITSCH A., 2008. *Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows*. Plant Soil 304, 35–44.
- LAI H.Y., CHEN Z. S., 2009. *In-situ selection of suitable plants for the phytoremediation of multi-metals-contaminated sites in central Taiwan*. Int. J. Phytoremed. 11, 235–250.
- LEUNG H. M., 2008. *Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with an arsenic hyperaccumulator plant (Pteris vittata) on the uptake of arsenic*. Praca doktorska, Uniwersytet Baptisty w Hong Kongu.
- LIANG C. C., LI T., XIAO Y. P., LIU M. J., ZHANG H. B., ZHAO Z. W., 2009. *Effects of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on maize grown in multi-metal contaminated soils*. Int. J. Phytoremed. 11, 692–703.
- LONE M. I., HE Z. L., STOFFELLA P. J., YANG X. E., 2008. *Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives*. University Science B 9, 210–20.
- MA Y., PRASAD M. N., RAJKUMAR M., FREITAS H., 2010. *Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metal-liferous soils*. Biotechnol. Adv. 29, 248–258.
- MACEK T., FRANCOVA K., SURA M., MACKOVA M., 2006. *Genetically modified plants with improved properties for phytoremediation purposes*. Phytoremed. Metal Contamin. Soils 68, 85–108.
- MARECIK R., KRÓLICZAK P., CYPLIK P., 2006. *Fitoremediacja – alternatywa dla tradycyjnych metod oczyszczania środowiska*. Biotechnologia 3, 88–97.
- MASTRETTA C., TAGHAVI S., VAN DER LELIE D., MENGONI A., GALARDI F., GONNELLI C., 2009. *Endophytic bacteria from seeds of Nicotiana tabacum can reduce cadmium phytotoxicity*. Internat. J. Phytoremed. 11, 251–267.
- MCGRATH S. P., SHEN Z. G., ZHAO F. J., 2007. *Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of Thlaspi caerulescens and Thlaspi ochroleucum grown in contaminated soils*. Plant Soil 197, 71–78.
- MUDGAL V., MADAAN N., MUDGAL A., 2010. *Heavy metals in plants: phytoremediation: Plants used to remediate heavy metal pollution*. Agricult. Biol. J. North Am. 1, 40–46.
- PAGANO M. C., PERSIANO A. I. C., CABELLO M. N., SCOTTI M. R., 2010. *Elements sequestered by arbuscular mycorrhizal spores in riverine soils: A preliminary assessment*. J. Biophys. Struct. Biol. 2, 16–21.
- PULFORD I. D., WATSON C., 2003. *Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review*. Environ. Internat. 29, 529–540.
- PUNAMIYA P., DATTAB R., SARKARA D., BARBERC S., PATELC M., DASA P., 2010. *Symbiotic role of Glomus mosseae in phytoextraction of lead in vetiver grass [Chrysopogon zizanioides (L.)]*. J. Hazard. Mat. 177, 465–474.
- RAJKUMAR M., NORIHARU A., FREITAS H., 2010. *Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction*. Chemosphere 77, 153–160.
- RAJKUMAR M., AE N., PRASAD M.N., FREITAS H., 2009. *Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction*. Trends Biotechnol. 28, 142–149.
- SARAN O., 2001. *Klonowanie i sekwencjonowanie genów odpowiedzialnych za syntezę niacyny z Pseudomonas fluorescens 267*. Praca magisterska, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie.
- SCHRÖEDER G., WYRWAŁ J., 2004. *Maszyny molekularne [W:] Chemia Supramolekularna*. Betagraf P.U.H., Poznań.
- SCHÜTZENDÜBEL A., POLLE A., 2002. *Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization*. J. Exp. Bot. 53, 1351–1365.
- TRIPATHI M., MUNOT H. P., SHOUCHE Y., MEYER J. M., GOEL R., 2005. *Isolation and functional characterization of siderophore-producing lead- and cadmium-resistant Pseudomonas putida KNP9*. Curr. Microbiol. 50, 233–237.
- TURNAU K., JURKIEWICZ A., GRZYBOWSKA B., 2002. *Rola mikoryzy w bioremediacji terenów zanieczyszczonych*. Kosmos 51, 185–194.
- ZEMLEDUCH A., TOMASZEWSKA B., 2007a. *Mechanizmy, procesy i oddziaływania w fitoremediacji. Biodostępność zanieczyszczeń organicznych w środowisku*. Kosmos 56, 393–407.
- ZEMLEDUCH A., TOMASZEWSKA B., 2007b. *Organizmy zmodyfikowane genetycznie w fitoremediacji związków organicznych*. Biotechnologia 4, 66–81.