

Grażyna Dąbrowska, Katarzyna Hryniewicz, Katarzyna Kłosowska, Anna Goc

## Selekcja bakterii ryzosferowych usprawniających procesy fitoremediacji gleb zawierających związki metali ciężkich

Fitoremediacja jest skuteczną i tanią metodą oczyszczania gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi, jednakże duża zawartość metali ciężkich w glebie bardzo często uniemożliwia prawidłowy wzrost i rozwój roślin [1]. Mikroorganizmy zasiedlające ryzosferę roślin mogą niwelować skutki niekorzystnych warunków środowiska naturalnego [2–4], jak również w istotny sposób przyczynić się do zwiększenia wydajności procesów fitoremediacji [5, 6]. Bakterie ryzosferowe mogą stymulować wzrost roślin poprzez dostarczanie składników mineralnych oraz syntezę fitohormonów stymulujących ich rozwój (np. auksyny, gibbereliny, cytokininy), a także obniżanie poziomu etylenu wpływającego niekorzystnie na ukorzenianie się roślin [7]. Ponadto bakterie te mogą chronić rośliny przed niekorzystnym wpływem metali ciężkich [8–10] oraz zanieczyszczeń organicznych [11, 12], jak również skutkami działania fitopatogenów [9]. Nieliczne – jak dotąd – badania wykazały, że niektóre z bakterii ryzosferowych mogą stymulować wzrost rzepaku w obecności metali ciężkich, takich jak nikiel [13], kadm [14] i ołów [15]. Ze względu na dużą tolerancję rzepaku na wzrost w niekorzystnych warunkach środowiskowych (np. skażenie metalami ciężkimi) [13, 14], roślina ta może znaleźć zastosowanie w fitoremediacji terenów zanieczyszczonych.

Celem prezentowanych badań było wyselekcjonowanie bakterii ryzosferowych, charakteryzujących się zwiększoną tolerancją na jony metali ciężkich (Cu, Zn, Cd i Pb) oraz stymulacją wzrostu siewek rzepaku w podłożu zawierającym związki tych metali. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów wpływających na wzrost aklimatyzacji tych roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych, jak również usprawnienia technik fitoremediacji.

### Materiały i metody

W badaniach wykorzystano sześć szczepów bakterii – *Bacillus* sp. (ML 1-2), *Bacteroidetes bacterium* (RI 116-1), *Flavobacterium* sp. (RI 111-11), *Pseudomonas fluorescens* (LI C1), *Serratia entomophila* (RI 111-21) oraz *Variovorax* sp. (ML 3-12). Bakterie wyizolowano z gleb skażonych metalami ciężkimi lub w inny sposób antropogenicznie

zdegradowanych [3]. Wyizolowane szczepy bakterii przechowywano na skosach agarowych w temperaturze 4 °C. Selekcji szczepów dokonano na podstawie analizy ich właściwości fizjologicznych, takich jak aktywność enzymatyczna, synteza sideroforów oraz wykorzystywanie różnych źródeł węgla. Szczegółowe wyniki tych analiz przedstawiono w pracy [3]. Szczepy bakteryjne hodowano na pożywce stałej R2A (Difco) (18 g/dm<sup>3</sup>) w temperaturze 25 °C. Po 1–2d od zaszczepienia pożywki, w zależności od indywidualnego tempa wzrostu badanych bakterii, przygotowano inokulum zawierające bakterie w postaci zawiesiny w wodzie w ilości 5,0·10<sup>7</sup> jtk/cm<sup>3</sup>. Otrzymane zawiesiny każdego szczepu bakterii wykorzystano do inokulacji pożywek płynnych wzbogaconych w jony metali ciężkich (rys. 1) oraz w doświadczeniu *in vitro* (rys. 2), w którym testowano wzrost rzepaku w obecności związków metali ciężkich.

Wpływ zawartości jonów metali ciężkich (Cu, Zn, Cd, Pb) na wzrost bakterii badano wprowadzając po 10 μl mieszaniny inokulacyjnej do probówek zawierających 5 cm<sup>3</sup> płynnej pożywki R2A (Difco) i związki metali ciężkich (CuSO<sub>4</sub>, CdSO<sub>4</sub> i (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Pb) w ilościach odpowiednio 50 mmol/m<sup>3</sup>, 100 mmol/m<sup>3</sup> i 250 mmol/m<sup>3</sup> oraz ZnSO<sub>4</sub> – 250 mmol/m<sup>3</sup>, 500 mmol/m<sup>3</sup> i 1000 mmol/m<sup>3</sup>. Doboru związków chemicznych użytych w przeprowadzonym doświadczeniu dokonano w oparciu o wcześniej prowadzone i opisane w literaturze eksperymenty [15, 17]. Kontrolę stanowiły próbki niezawierające metali ciężkich w podłożu. Dla każdego szczepu bakterii wykonano po trzy powtórzenia. Wzrost trzydniowych hodowli bakterii oceniono na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 600 nm za pomocą spektrofotometru Hitachi U-1800.

W badaniach *in vitro* wykorzystano nasiona rzepaku ozimego *Brassica napus* L. odmiany Kronos (AgroBras, Polska), które miały polimerową otoczkę z owadobójczej zaprawy nasiennej Chinook 200FS. Przed przystąpieniem do badań nasiona sterylizowano w mieszaninie 30% perhydrolu i 96% alkoholu etylowego (1:1) przez 7 min, a następnie przepłukiwano sterylną wodą destylowaną przez 20 min. Poszczególne etapy sterylizacji pozwoliły na odplukanie zaprawy nasiennej i zbadanie rzeczywistego wpływu użytych w doświadczeniu bakterii na wzrost siewek rzepaku w obecności metali ciężkich. We wcześniejszych badaniach opisanych w pracy [16] zaprezentowano wpływ zaprawy nasiennej Chinook 200FS na wzrost i rozwój badanych szczepów bakteryjnych. Nasiona wykładano na sterylną bibułę filtracyjną umieszczoną w szalkach Petriego (śr. 90 mm). W każdym wariantcie doświadczenia analizowano 30 nasion (po 15 nasion na płytkę). Bibułę nasączono

Dr G. Dąbrowska, mgr K. Kłosowska, dr hab. A. Goc: Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład Genetyki, ul. J. Gagarina 9, 67–100 Toruń, [browsk@umk.pl](mailto:browsk@umk.pl), [goc@umk.pl](mailto:goc@umk.pl)  
Dr hab. K. Hryniewicz: Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład Mikrobiologii, ul. J. Gagarina 9, 67–100 Toruń, [hryn@umk.pl](mailto:hryn@umk.pl)

6 cm<sup>3</sup> roztworu o odpowiedniej zawartości jonów metali ciężkich. Nasiona rzepaku inokulowano przygotowanymi zawiesinami poszczególnych bakterii. Próbkę kontrolną stanowiły nasiona inkubowane w sterylnej wodzie bez obecności metali ciężkich oraz nasiona inokulowane bakteriami w podłożu pozbawionym związków metali ciężkich. Płytki inkubowano w ciemności w temperaturze 25 °C. Po 3 d dokonano pomiaru długości hypokotyli i korzenia.

Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu programu Statistica (StatSoft Inc., 1995). Istotne różnice we wzroście rzepaku inokulowanego bakteriami w obecności jonów metali ciężkich określono na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) (tab. 1) oraz testu t-Studenta –  $p \leq 0,05$  (rys. 2).

## Wyniki badań

Najlepszym wzrostem w obecności jonów badanych metali ciężkich (rys. 1) charakteryzowały się bakterie *S. entomophila* (RI 111-21) i *P. fluorescens* (LI C1). Bakterie te uzyskały najlepszy wzrost spośród wszystkich badanych bakterii w obecności jonów Zn i Pb (wszystkie ilości) oraz Cu (50 mmol/m<sup>3</sup>). Najślabszy wzrost w obecności jonów metali ciężkich zanotowano w przypadku bakterii *Flavobacterium* sp. (RI 111-11) i *B. bacterium* (RI 116-1). W przypadku większości badanych szczepów zaobserwowano zbliżony lub wyższy, w porównaniu z próbką kontrolną, wzrost w obecności jonów Pb. Najsilniejszy – hamujący – wpływ na wzrost bakterii miały jony kadmu (50 mmol/m<sup>3</sup>) i miedzi (250 mmol/m<sup>3</sup>).

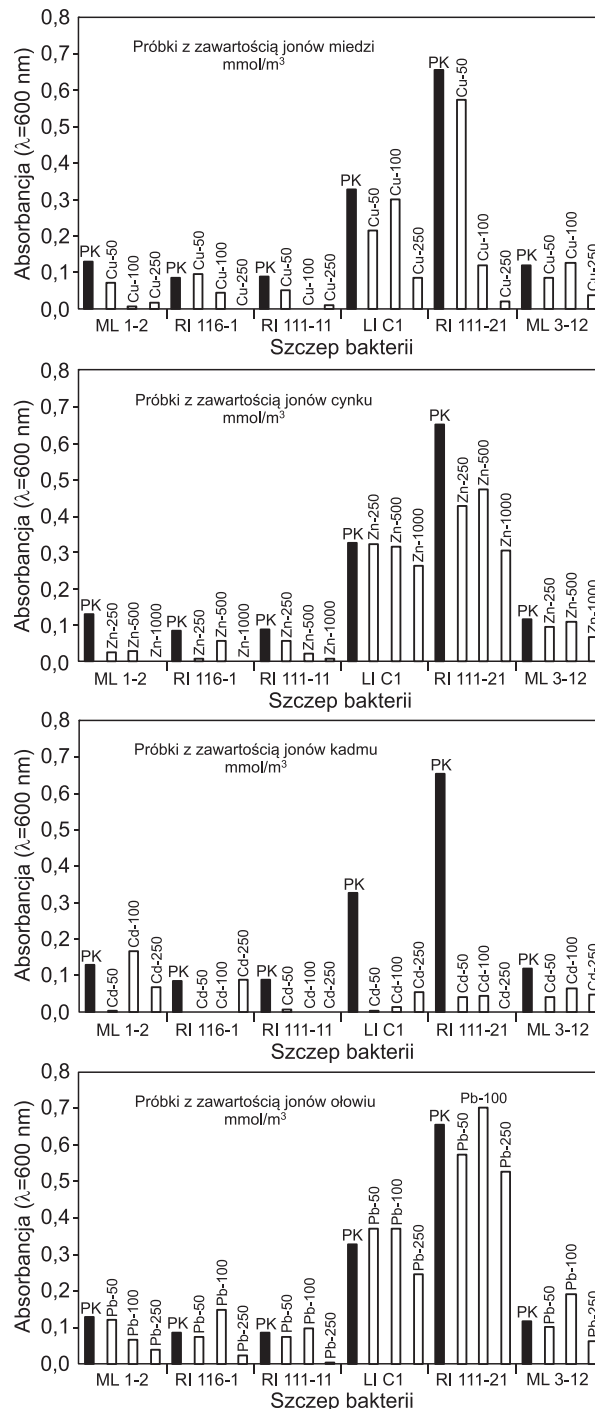
## Selekcja bakterii stymulujących wzrost rzepaku w obecności metali ciężkich

Średnia długość korzeni i hypokotyli roślin etiolowanych, których kiełkowanie i wzrost odbywał się w wodzie (próbka kontrolna bez metali ciężkich) wynosiła odpowiednio 2,5 cm i 1,0 cm (tab. 1). W obecności jonów metali ciężkich zaobserwowano hamowanie elongacji korzenia i hypokotyli przy wszystkich analizowanych ilościach jonów metali. Wykazano, że poziom hamowania wzrostu badanych siewek rzepaku zwiększał się wraz ze wzrostem zawartości danego metalu (z wyjątkiem Pb). Najistotniejszy hamujący wpływ na wzrost roślin zaobserwowano w przypadku najwyższych (250 mmol/m<sup>3</sup>) ilości miedzi i kadmu – średnie długości wynosiły odpowiednio 0,39 ± 0,24 cm i 0,46 ± 0,42 cm w przypadku korzenia oraz 0,33 ± 0,16 cm i 0,17 ± 0,14 cm w przypadku hypokotyli. Cynk, w większości badanych przypadków, wpływał negatywnie na rozwój siewek rzepaku. Jony ołowiu hamowały wzrost hypokotyli rzepaku, jednakże nie była to różnica istotna statystycznie. Istotnie statystycznie hamujący wpływ jonów Pb (50 mmol/m<sup>3</sup> i 250 mmol/m<sup>3</sup>) zaobserwowano natomiast na wzrost korzenia (tab. 1).

## Wpływ ryzobakterii na wzrost siewek rzepaku w obecności metali ciężkich

Spośród analizowanych szczepów bakterii najkorzystniejszy wpływ na badane parametry wzrostu siewek rzepaku rosnącego w obecności związków metali ciężkich zaobserwowano w przypadku bakterii *Bacillus* sp. (ML 1-2). Inokulacja nasion rzepaku tym szczepem stymulowała długość korzenia i hypokotyli siewek w obecności większości badanych metali i ich zawartości (tab. 1, rys. 2). Istotnie statystycznie stymulujący wpływ inokulacji szczepem

*Bacillus* sp. (ML 1-2) na wzrost korzenia zaobserwowano w przypadku jonów miedzi (100 mmol/m<sup>3</sup> – 155% w porównaniu z próbką kontrolną), cynku (1000 mmol/m<sup>3</sup> – 160%) i kadmu (100 mmol/m<sup>3</sup> – 275%). W przypadku długości hypokotyli, najsilniejszą stymulację wzrostu zaobserwowano natomiast w obecności jonów miedzi (100 mmol/m<sup>3</sup> i 250 mmol/m<sup>3</sup> – odpowiednio 125% i 210% w porównaniu z próbką kontrolną) (tab. 1, rys. 2).

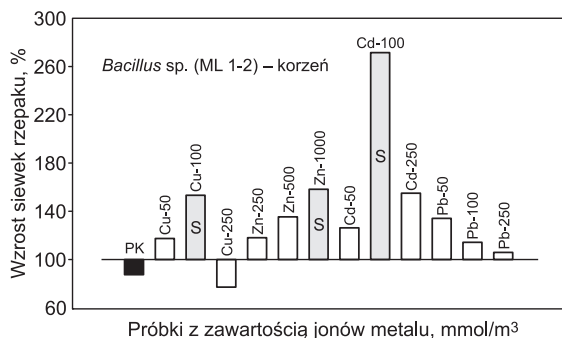


Rys. 1. Wzrost bakterii ryzobakterii (jako absorbancja przy  $\lambda=600$  nm) *Bacillus* sp. (ML 1-2), *B. bacterium* (RI 116-1), *Flavobacterium* sp. (RI 111-11), *P. fluorescens* (LI C1), *S. entomophila* (RI 111-21) i *Variovorax* sp. (ML 3-12) w obecności jonów metali ciężkich (Cu, Zn, Cd i Pb) (n=3)  
Fig. 1. Growth (measured as absorbance at  $\lambda=600$  nm) of the rhizobacteria *Bacillus* sp. (ML 1-2), *B. bacterium* (RI 116-1), *Flavobacterium* sp. (RI 111-11), *P. fluorescens* (LI C1), *S. entomophila* (RI 111-21) and *Variovorax* sp. (ML 3-12) in the presence of heavy metals (Cu, Zn, Cd and Pb) (n=3)

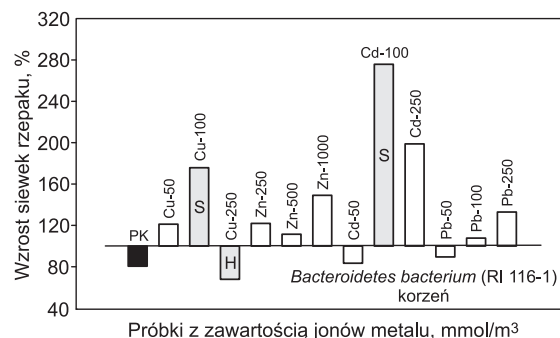
Tabela 1. Długość korzenia (K) i hypokotylu (H) w próbce kontrolnej (PK) i w próbkach inokulowanych bakteriami w obecności jonów metali ciężkich (Cu, Zn, Cd i Pb) (wartość śr.  $\pm$ odch. stand.; n=30)Table 1. Root (K) and hypocotyl (H) lengths in control sample (PK), and in samples inoculated with bacteria in the presence of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb) (average value  $\pm$ standard deviation; n=30)

Metal mmol/m <sup>3</sup>	Próbka kontrolna		Długość korzenia (K) i hypokotyłu (H), cm											
			ML 1-2		RI 116-1		RI 111-11		LI C1		RI 111-21		ML 3-12	
	K	H	K	H	K	H	K	H	K	H	K	H	K	H
PK	2,49 (d) $\pm 1,29$	1,03 (b) $\pm 0,50$	2,17 (b) $\pm 2,05$	0,90 (b) $\pm 0,62$	2,00 (bc) $\pm 2,16$	0,90 (b) $\pm 0,66$	1,83 (c) $\pm 1,99$	0,72 (c) $\pm 0,60$	1,68 (c) $\pm 1,37$	0,77 (b) $\pm 0,60$	1,57 (b) $\pm 1,96$	0,67 (b) $\pm 0,58$	2,46 (b) $\pm 2,52$	0,86 (a) $\pm 0,67$
Cu-50	0,99 (b) $\pm 0,74$	0,83 (b) $\pm 0,47$	1,16 (ab) $\pm 0,99$	0,96 (b) $\pm 0,52$	1,20 (b) $\pm 1,39$	0,97 (b) $\pm 0,74$	0,77 (c) $\pm 0,76$	0,73 (c) $\pm 0,47$	0,58 (ab) $\pm 0,59$	0,66 (b) $\pm 0,68$	0,53 (ab) $\pm 0,48$	0,67 (b) $\pm 0,45$	0,78 (a) $\pm 1,03$	0,66 (a) $\pm 0,65$
Cu-100	0,56 (ab) $\pm 0,32$	0,76 (b) $\pm 0,31$	0,86 (ab) $\pm 0,63$	0,97 (b) $\pm 0,37$	0,99 (ab) $\pm 0,62$	0,91 (b) $\pm 0,39$	0,68 (c) $\pm 0,42$	0,71 (c) $\pm 0,33$	0,67 (ab) $\pm 0,52$	0,77 (b) $\pm 0,49$	0,39 (ab) $\pm 0,42$	0,49 (b) $\pm 0,42$	0,43 (a) $\pm 0,50$	0,62 (a) $\pm 0,51$
Cu-250	0,39 (ab) $\pm 0,24$	0,33 (a) $\pm 0,16$	0,30 (a) $\pm 0,24$	0,70 (b) $\pm 0,34$	0,27 (a) $\pm 0,23$	0,55 (b) $\pm 0,35$	0,19 (b) $\pm 0,26$	0,36 (b) $\pm 0,18$	0,37 (ab) $\pm 0,32$	0,72 (b) $\pm 0,50$	0,19 (a) $\pm 0,12$	0,72 (b) $\pm 1,93$	0,65 (a) $\pm 0,74$	0,68 (a) $\pm 0,50$
Zn-250	2,36 (d) $\pm 1,50$	0,96 (b) $\pm 0,58$	2,79 (b) $\pm 2,01$	1,11 (b) $\pm 0,64$	2,88 (c) $\pm 2,35$	1,07 (b) $\pm 0,59$	1,76 (c) $\pm 1,98$	0,78 (c) $\pm 0,59$	1,79 (c) $\pm 1,62$	0,93 (b) $\pm 0,84$	1,21 (b) $\pm 1,57$	0,69 (b) $\pm 0,57$	2,22 (b) $\pm 2,50$	0,80 (a) $\pm 0,69$
Zn-500	1,94 (cd) $\pm 1,46$	0,85 (b) $\pm 0,48$	2,62 (b) $\pm 2,22$	1,15 (b) $\pm 0,67$	2,16 (bc) $\pm 1,83$	0,78 (b) $\pm 0,44$	1,69 (c) $\pm 1,67$	0,81 (c) $\pm 0,59$	2,19 (c) $\pm 0,96$	0,63 (b) $\pm 0,41$	1,15 (b) $\pm 1,19$	0,57 (b) $\pm 0,36$	1,88 (ab) $\pm 2,41$	0,83 (a) $\pm 0,66$
Zn-1000	0,91 (b) $\pm 0,87$	0,68 (b) $\pm 0,37$	1,44 (b) $\pm 1,14$	0,84 (b) $\pm 0,42$	1,36 (b) $\pm 1,72$	0,63 (b) $\pm 0,47$	0,96 (c) $\pm 0,84$	0,60 (b) $\pm 0,29$	0,79 (b) $\pm 0,59$	0,63 (b) $\pm 0,35$	0,60 (ab) $\pm 0,68$	0,56 (b) $\pm 0,35$	1,28 (ab) $\pm 0,97$	0,78 (a) $\pm 0,28$
Cd-50	1,59 (c) $\pm 0,90$	0,91 (b) $\pm 0,46$	2,01 (b) $\pm 1,39$	1,02 (b) $\pm 0,45$	1,33 (b) $\pm 1,23$	0,72 (b) $\pm 0,40$	1,09 (c) $\pm 1,03$	0,70 (bc) $\pm 0,46$	1,21 (b) $\pm 1,10$	0,78 (b) $\pm 0,61$	1,25 (b) $\pm 0,82$	0,74 (b) $\pm 0,33$	0,99 (a) $\pm 1,26$	0,63 (a) $\pm 0,46$
Cd-100	0,47 (ab) $\pm 0,35$	0,64 (b) $\pm 0,37$	1,27 (b) $\pm 1,02$	0,80 (b) $\pm 0,44$	1,29 (b) $\pm 1,03$	0,75 (b) $\pm 0,38$	0,49 (bc) $\pm 0,47$	0,43 (b) $\pm 0,30$	0,74 (b) $\pm 1,00$	0,72 (b) $\pm 0,57$	0,38 (a) $\pm 0,42$	0,48 (b) $\pm 0,27$	0,52 (a) $\pm 0,59$	0,62 (a) $\pm 0,44$
Cd-250	0,46 (a) $\pm 0,42$	0,17 (a) $\pm 0,14$	0,07 (a) $\pm 0,10$	0,26 (a) $\pm 0,30$	0,09 (a) $\pm 0,12$	0,32 (a) $\pm 0,31$	0,94 (a) $\pm 0,78$	0,10 (a) $\pm 0,13$	0,05 (a) $\pm 0,08$	0,23 (a) $\pm 0,22$	0,08 (a) $\pm 0,11$	0,15 (a) $\pm 0,13$	0,93 (a) $\pm 1,13$	0,63 (a) $\pm 0,43$
Pb-50	1,71 (c) $\pm 1,45$	0,80 (b) $\pm 0,59$	2,29 (b) $\pm 1,98$	1,07 (b) $\pm 0,62$	1,53 (b) $\pm 1,83$	0,74 (b) $\pm 0,53$	1,98 (c) $\pm 1,41$	0,96 (a) $\pm 0,61$	1,46 (c) $\pm 1,22$	0,80 (b) $\pm 0,66$	1,48 (b) $\pm 1,25$	0,82 (b) $\pm 0,58$	2,88 (b) $\pm 2,87$	0,89 (a) $\pm 0,70$
Pb-100	1,92 (cd) $\pm 1,46$	0,87 (b) $\pm 0,56$	2,20 (b) $\pm 1,78$	1,01 (b) $\pm 0,55$	2,07 (bc) $\pm 1,45$	0,85 (b) $\pm 0,50$	0,99 (c) $\pm 1,15$	0,60 (b) $\pm 0,47$	0,93 (b) $\pm 0,96$	0,61 (b) $\pm 0,66$	1,45 (b) $\pm 1,27$	0,92 (b) $\pm 0,63$	2,51 (b) $\pm 2,31$	0,91 (a) $\pm 0,62$
Pb-250	1,53 (c) $\pm 0,84$	0,95 (b) $\pm 0,48$	1,62 (b) $\pm 1,17$	0,88 (b) $\pm 0,53$	2,03 (bc) $\pm 1,22$	0,98 (b) $\pm 0,44$	0,78 (c) $\pm 0,74$	0,53 (b) $\pm 0,28$	1,10 (b) $\pm 0,91$	0,75 (b) $\pm 0,60$	1,05 (b) $\pm 0,82$	0,77 (b) $\pm 0,50$	2,49 (b) $\pm 1,82$	0,82 (a) $\pm 0,49$

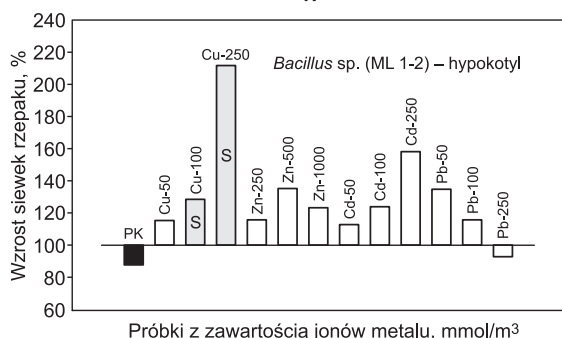
Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie ( $p \leq 0,05$ )



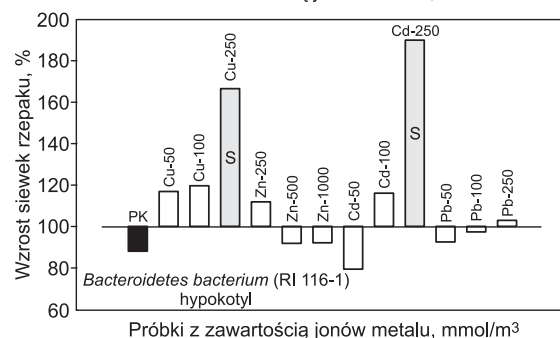
Próbki z zawartością jonów metalu, mmol/m<sup>3</sup>



Próbki z zawartością jonów metalu, mmol/m<sup>3</sup>



Próbki z zawartością jonów metalu, mmol/m<sup>3</sup>



Próbki z zawartością jonów metalu, mmol/m<sup>3</sup>

Rys. 2. Procentowy wzrost 3-dniowych siewek rzepaku (dł. korzenia i hypokotyłu) inokulowanych bakteriami

*Bacillus* sp. (ML 1-2) i *B. bacterium* (RI 116-1) w odniesieniu do próbki kontrolnej – 100% (PK – próbka kontrolna z bakteriami w podłożu bez metali; po symbolu metalu podano jego zawartość (mmol/m<sup>3</sup>), S – stymulacja, H – hamowanie; wyniki istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ))

Fig. 2. Percentage growth of three-day rape seedlings (root and hypocotyl length) inoculated with *Bacillus* sp. (ML 1-2) and *B. bacterium* (RI 116-1), related to control sample – 100% (PK = control sample with bacteria in the substrate with no metal; the concentration of the metal (mmol/m<sup>3</sup>) is indicated after its symbol; S = stimulation, H = hampering; statistically significant results ( $p \leq 0,05$ ))

Szczep *B. bacterium* (RI 116-1) stymulował wzrost siewek rzepaku jedynie w obecności wybranych ilości jonów metali ciężkich. Istotną statystycznie stymulację wzrostu korzeni zaobserwowano w obecności miedzi i kadmu ( $100\text{ mmol/m}^3$  – odpowiednio 175% i 275% w porównaniu z próbką kontrolną). W pozostałych wariantach doświadczenia (wszystkie analizowane ilości Zn oraz największe Cd i Pb) obserwowana stymulacja wzrostu korzenia nie wykazała statystycznie istotnych różnic. Istotny statystycznie wzrost hypokotyli w obecności badanego szczepu zanotowano w doświadczeniach z miedzią ( $250\text{ mmol/m}^3$  – 175% w porównaniu z próbką kontrolną) oraz kadmem ( $250\text{ mmol/m}^3$  – 190%). W pozostałych wariantach doświadczenia nie wykazano stymulacji wzrostu hypokotyli. W przypadku korzenia zaobserwowano hamujący wpływ jonów Cu w ilości  $250\text{ mmol/m}^3$  (tab. 1, rys. 2).

Inokulacja siewek rzepaku szczepem *Flavobacterium* sp. (RI 111-11) w przypadku większości badanych wariantów doświadczenia istotnie hamowała wzrost siewek rzepaku w obecności metali ciężkich (zarówno korzeń, jak i hypokotyl) (tab. 1). Istotny statystycznie stymulujący wpływ tego szczepu na wzrost korzeni w obecności jonów kadmu zanotowano jedynie w ilości  $250\text{ mmol/m}^3$  (ok. 100% – tab. 1).

Szczep *P. fluorescens* (LI C1) wykazał brak stymulacji wzrostu korzenia i hypokotyli w obecności badanych jonów metali ciężkich (tab. 1). Wyjątek stanowił wariant doświadczenia, w którym odnotowano istotną stymulację wzrostu korzenia w obecności jonów miedzi w ilości  $250\text{ mmol/m}^3$ . Szczep *S. entomophila* (RI 111-21) hamował wydłużanie korzeni i hypokotyli rzepaku w obecności większości badanych ilości metali ciężkich, zaś zaobserwowana stymulacja wzrostu korzeni (Cd –  $250\text{ mmol/m}^3$ ) i hypokotyli (Cu –  $100\text{ mmol/m}^3$  oraz Pb –  $50\text{ mmol/m}^3$  i  $100\text{ mmol/m}^3$ ) nie była istotna statystycznie (tab. 1).

W obecności jonów miedzi, kadmu i ołowiu w ilości  $250\text{ mmol/m}^3$  szczep *Variovorax* sp. (ML 3-12) promował wzrost siewek rzepaku. Najintensywniej wpływ ten zaznaczył się w obecności największej zastosowanej zawartości kadmu ( $250\text{ mmol/m}^3$ ) w przypadku korzenia (ok. 100%) i hypokotyli (ponad 270%). Hamowanie nastąpiło jedynie w obecności jonów kadmu w ilości  $50\text{ mmol/m}^3$  (tab. 1).

## Dyskusja wyników

Bakterie ryzosferowe charakteryzują się dużą tolerancją na obecność metali ciężkich w podłożu [18–20], przy czym bakterie pochodzące z terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi są mniej wrażliwe na większą zawartość metali, w porównaniu z bakteriami wyizolowanymi z obszarów nieskażonych [14, 21]. Tolerancja bakterii na dużą zawartość metali ciężkich regulowana jest przez szereg mechanizmów, np. aktywne usuwanie metali, biosorpcja lub bioakumulacja [19].

Szczepy bakterii badane w prezentowanej pracy pochodziły z terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi lub zdegradowanych antropogenicznie [3]. Wrażliwość bakterii na obecność metali ciężkich zależała w dużym stopniu od jonu metalu w następującej kolejności:  $\text{Pb} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Cd}$  (rys. 1). Większość badanych szczepów bakterii (z wyjątkiem *Bacillus* sp. ML 1-2) wykazywała oporność na działanie jonów ołowiu (w ilościach  $50\text{ mmol/m}^3$  i  $100\text{ mmol/m}^3$ ). Szczepy *S. entomophila* (RI 111-21) i *P. fluorescens* (LI C1) charakteryzowały się największą opornością na jony cynku. Najmniejszy toksyczny wpływ jonów

miedzi wykazano na szczepy *Variovorax* sp. (ML 3-12) i *P. fluorescens* (LI C1). Wysoką oporność na jony kadmu wykazano jedynie w przypadku szczepu *Bacillus* sp. (ML 1-2).

W pracy [21] wykazano, że bakterie wyizolowane z terenów pokopalnianych (zwłaszcza należące do *K. ascorbata*) charakteryzują się niezwykle dużą tolerancją na wysoką zawartość niklu ( $1\text{ mol/m}^3$ ), cynku ( $1\text{ mol/m}^3$ ), ołowiu ( $1\text{ mol/m}^3$ ) oraz chromu ( $0,1\text{ mol/m}^3$ ). Ponadto w badaniach [13] wykazano, że 8% wszystkich szczepów bakterii wyizolowanych z gleby pochodzącej z okolic zakładów galwanizerskich (Nanjing, Chiny) charakteryzowało się wysoką opornością na jony kadmu. Zostały one zidentyfikowane jako *Xanthomonas* sp., *Azomonas* sp., *Pseudomonas* sp. i *Bacillus* sp.

Bakterie ryzosferowe promujące wzrost roślin (Plant Growth Promoting Rhizobacteria – PGPR) mogą niwelować negatywny wpływ metali ciężkich znajdujących się w podłożu i przyczyniać się do poprawy wzrostu i rozwoju roślin w niekorzystnych warunkach środowiska [19, 22]. Bakterie te charakteryzują się niezwykle różnorodnością właściwości fizjologicznych (np. wykorzystywanie różnych źródeł węgla, aktywność enzymatyczna) [3] oraz wrażliwością na metale ciężkie [14, 21], stąd też ich pozytywny wpływ na rośliny w dużym stopniu zależy od właściwej selekcji szczepu bakterii, badanego gatunku rośliny oraz warunków środowiskowych.

Spośród przebadanych w prezentowanej pracy szczepów bakterii, najistotniejszy stymulujący wpływ na wzrost i rozwój siewek rzepaku rosnących w obecności związków metali ciężkich miał szczep *Bacillus* sp. (ML 1-2) (tab. 1, rys. 2). Bakteria ta stymulowała wzrost roślin w przypadku większości badanych ilości metali ciężkich. Obserwacje dokonane w pracy [23] wykazały, że szczepy *Bacillus megaterium*, *B. mucillaginosus* i *B. subtilis* niwelowały negatywny wpływ jonów metali ciężkich (Zn i Pb) na wzrost i rozwój gorczycy. Badania [24] wykazały ochronny wpływ inokulacji szczepem *B. cereus* przed toksycznym działaniem jonów chromu na rośliny. Ochronna rola szczepów należących do rodzaju *Bacillus* sp. może być związana ze zdolnością tej grupy bakterii do syntezy biosurfaktantów, które wykazują zdolność do skutecznego usuwania metali ciężkich (np. Pb i Cd) z podłoża [22]. Wykorzystanie biosurfaktanta produkowanego przez szczep *Bacillus* sp. wpływało na zwiększenie biomasy roślin i absorpcję kadmu przez tkanki pomidora [15].

Wyniki prezentowanych badań wykazały, że szczep *B. bacterium* (RI 116-1) wykazywał zdolność do promowania wzrostu rzepaku ozimego w obecności jonów badanych metali ciężkich (zwłaszcza w środowisku zawierającym Cu i Cd) (tab. 1, rys. 2). Inokulacja nasion rzepaku szczepem *Flavobacterium* sp. (RI 111-11) niwelowała toksyczne działanie jonów kadmu na siewki rzepaku (zwłaszcza część korzeniową) (tab. 1). Podobne rezultaty otrzymano w badaniach [25], w których szczep *Flavobacterium* sp. stymulował wzrost korzeni roślin *B. juncea* rosnących w glebie zawierającej związek kadmu.

Bakterie należące do gatunku *P. fluorescens* uważane są za grupę mikroorganizmów dominujących w ryzosferze, zwłaszcza w strefie włóśnikowej korzeni [15, 26, 27]. Inokulacja nasion rzepaku ozimego szczepem *P. fluorescens* (LI C1) w większości analizowanych w pracy wariantów, działała hamująco na wzrost korzenia i hypokotyli siewek rzepaku w obecności jonów metali ciężkich, zwłaszcza w obecności jonów ołowiu i miedzi. Jedynie w obecności

jonów miedzi zanotowano stymulację wzrostu hypokotyli (tab. 1). W przeciwieństwie do dokonanych obserwacji, pozytywny wpływ inokulacji siewek rzepaku rosnącego w obecności jonów ołowiu szczepami *P. fluorescens* G10 i *Mycobacterium* sp. G16 opisano w pracy [15]. Bakterie te stymulowały wzrost korzeni siewek *B. napus* o 21÷35%. Badania [28] wykazały stymulację wzrostu tytoniu inokulowanego *Pseudomonas* sp. i *Sanguibacter* sp. w obecności jonów kadmu oraz akumulację jonów kadmu, żelaza i cynku w tkankach roślinnych. Podobnie szczepienie nasion *Phragmites australis* bakteriami *P. aspleni* wpływało na wydajność kiełkowania i wzrost inokulowanych roślin rosnących w obecności jonów miedzi [29]. W pracy [30] wykazano stymulację wzrostu siewek *Triticum aestivum* inokulowanych szczepami *Pseudomonas* w obecności jonów ołowiu.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że obecność szczepu *S. entomophila* (RI 111-21) nie wpływała na zwiększenie oporności siewek rzepaku na jony metali ciężkich. Jedynie w przypadku największej z zastosowanych ilości jonów kadmu zaobserwowano nieznaczny stymulację wzrostu korzeni roślin (tab. 1). W przeciwieństwie do wyników prezentowanych w niniejszej pracy, szczep *Serratia* sp. SY5, wyizolowany z terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi i ropą naftową, wykazywał korzystny wpływ na wzrost pędów i biomasa kukurydzy (*Zea mays*) w kulturach hydroponicznych zarówno w podłożach kontrolnych, jak i wzbogaconych w jony kadmu [31].

Badany przez nas szczep *Variovorax* sp. (ML 3-12) stymulował wzrost rzepaku w obecności jonów kadmu, miedzi i ołowiu. Największą stymulację wzrostu siewek rzepaku obserwowano w środowisku zawierającym jony kadmu. Pozytywny wpływ inokulacji roślin rosnących w obecności tych jonów zaobserwowano w przypadku szczepów bakterii należących do rodzin *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Variovorax*, *Bacillus* i *Rhodococcus*. Szczepy te wpływały na stymulację elongacji korzeni kapusty sitowej i rzepaku w obecności jonów kadmu (300 mmol/m<sup>3</sup>) [32]. Inokulacja *B. napus* szczepem *Pseudomonas* sp. RJ10 (opornym na Cd i zdolnym do produkcji IAA), stymulowała wzrost korzeni tych roślin w obecności jonów kadmu i transport tego pierwiastka z kiełków do korzeni [14]. U bakterii opornych na kadm wykazano zdolność do syntezy sideroforów, fitohormonów i rozkładania ACC jako źródła azotu, co wpływało na zwiększenie biomasy roślin [15].

## Wnioski

♦ Wykorzystana w pracy technika umożliwiła szybką i tanią selekcję szczepów bakteryjnych przystosowanych do wzrostu w środowisku zawierającym związki metali ciężkich.

♦ Największą odpornością na jony metali ciężkich w podłożu charakteryzowały się szczepy *Serratia entomophila* (RI 111-21) i *Pseudomonas fluorescens* (LI C1).

♦ Negatywny wpływ jonów metali ciężkich na wzrost siewek rzepaku zmieniał się w następującej kolejności: Pb>Zn>Cu>Cd.

♦ Szczepy *Bacillus* sp. (ML 1-2) i *Bacteroides bacterium* (RI 116-1) najsilniej promowały wzrost siewek rzepaku w obecności jonów badanych metali ciężkich.

♦ Wyselekcjonowane szczepy bakterii mogą być wykorzystane w praktyce do inokulacji rzepaku rosnącego na terenach zawierających metale ciężkie, co przyczyni się do aklimatyzacji roślin i podwyższenia wydajności fitoremediacji gleb.

Praca została częściowo sfinansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, jako projekty N N310 285337 i N N305 187337.

## LITERATURA

1. A.D. PEUKE, H. RENNENBERG: Phytoremediation with transgenic trees. *Zeitschrift für Naturforschung C* 2005, Vol. 60, No. 3–4, pp. 199–207.
2. M. KUFFNER, M. PUSCHENREITER, G. WIESHAMMER, M. GORFER, A. SESSITSCH: Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 2008, Vol. 304, pp. 35–44.
3. K. HRYNKIEWICZ, C. BAUM, P. LEINWEBER: Density, metabolic activity and identity of cultivable rhizosphere bacteria on *Salix viminalis* in disturbed arable and landfill soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 2010, Vol. 173, pp. 747–756.
4. B. KOŁWZAN: Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi. *Ochrona Środowiska* 2008, vol. 30, nr 4, ss. 3–14.
5. D. ZIMMER, C. BAUM, P. LEINWEBER, K. HRYNKIEWICZ, R. MEISSNER: Associated bacteria increase the phytoextraction of cadmium and zinc from a metal-contaminated soil by mycorrhizal willows. *International Journal of Phytoremediation* 2009, Vol. 11, No. 2, pp. 200–213.
6. A.V. STURZ, J. NOWAK: Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology* 2000, Vol. 15, pp. 183–190.
7. M. RAJKUMAR, R. NAGENDRAN, K.J. LEE, W.H. LEE, S.Z. KIM: Response of endophytic growth promoting bacteria and Cr<sup>6+</sup> on the growth of Indian mustard. *Chemosphere* 2006, Vol. 62, pp. 741–748.
8. A. KALITKIEWICZ E. KEPCZYŃSKA: Wykorzystanie ryzobakterii do stymulacji wzrostu roślin. *Biotechnologia* 2008, vol. 2, nr 81, ss. 102–114.
9. V.S. SARAVANAN, M. MADHAIYAN, M. THANGARAJU: Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere* 2007, Vol.66, pp. 1794–1798.
10. U. GUZIK, D. WOJCISZYŃSKA, I. GREŃ, K. HUPERT-KOCUREK: Badania aktywności dioksygenaz katecholowych w obecności jonów wybranych metali ciężkich w aspekcie bioremediacji środowisk zanieczyszczonych związkami aromatycznymi. *Ochrona Środowiska* 2010, vol. 32, nr 1, ss. 9–13.
11. B. KOŁWZAN: Effect of bioremediation on genotoxicity of soil contaminated with diesel oil. *Environment Protection Engineering* 2009, Vol. 35, No. 1, pp. 95–103.
12. B. KOŁWZAN: Usuwanie zanieczyszczeń naftowych z gruntu metodą pryzmowania. *Ochrona Środowiska* 2009, vol. 31, nr 2, ss. 3–10.
13. A.J. FARWELL, S. VESELY, V. NERO, H. RODRIGEZ, S. SHAH, D.G. DIXON, B.R. GLICK: The use of transgenic canola (*Brassica napus*) and plant growth-promoting bacteria to enhance plant biomass at a nickel-contaminated field site. *Plant Soil* 2006, Vol. 288, pp. 309–318.
14. X.-F. SHENG, J.-J. XIA: Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium resistant bacteria. *Chemosphere* 2006, Vol. 64, pp. 1036–1042.
15. X.-F. SHENG, J.-J. XIA, C.-Y. JIANG, L.-Y. HE, M. QIAN: Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution* 2008, Vol. 156, pp. 1164–1170.
16. G. DĄBROWSKA, K. HRYNKIEWICZ, K. KŁOSOWSKA, A. TREJGELL, A. ADAMSKA-MIEREK: Wpływ bakterii ryzosferowych na kiełkowanie nasion *Brassica napus* L. w obecności metali ciężkich (Cd, Cu, Pb, Zn). *Rośliny Oleiste–Oilseed Crops* 2010, vol. 31, ss. 85–97.

17. E.A. BARKA, C. CLEMENT: Plant-Microbe Interactions. Research Signpost, Trivandrum Kerala, India 2008.
18. A.A. BELIMOV, V.I. SAFRONOVA, T.A. SERGEYEVA, T.N. EGOROVA, V.A. MATVEYEVA, V.E. TSYGANOV, A.Y. BORISOV, I.A. TIKHONOVICH, C. KLUGE, A. PREISFELD, K.J. DIETZ, V.V. STEPANOK: Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology* 2001, Vol. 47, pp. 642–652.
19. M. RAJKUMAR, N. AE, H. FREITAS: Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere* 2009, Vol. 77, pp. 153–160.
20. A.A. JUWARKAR, A. NAIR, K.V. DUBEY, S.K. SINGH, S. DEVOTTA: Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. *Chemosphere* 2007, Vol. 68, pp. 1996–2002.
21. G.I. BURD, D.G. DIXON, B.R. GLICK: Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology* 2000, Vol. 46, pp. 237–245.
22. X.-F. SHENG, L.-Y. HE, Q. WANG, H. YE, C. JIANG: Effects of inoculation of bisurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil. *Journal of Hazardous Materials* 2008, Vol. 155, pp. 17–22.
23. C.H. WU, T.K. WOOD, A. MULCHANDANI, W. CHEN: Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* 2006, Vol. 72, pp. 1129–1134.
24. M.S. KHAN, A. ZAIDI, P.A. WANI, M. OVES: Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental Chemistry* 2009, Vol. 7, pp. 1–19.
25. A.A. BELIMOV, N. HONTZEAS, V.I. SAFRONOVA, S.V. DEMCHINSKAYA, G. PILUZZA, S. BULLITTA, B.R. GLICK: Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry* 2005, Vol. 37, pp. 241–250.
26. T.A. DELORME, J.V. GAGLIARDI, J.S. ANGLE, R.L. CHANEY: Influence of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J.&C. Presl. and the nonmetal accumulator *Trifolium pratense* L. on soil microbial populations. *Canadian Journal of Microbiology* 2001, Vol. 47, pp. 773–776.
27. M. ROSENBLUETH, E. MARTINEZ-ROMERO: Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2006, Vol. 19, pp. 827–837.
28. C. MASTRETTA, S. TAGHAVI, D. van der LELIE, A. MENGONI, F. GALARDI, C. GONNELLI, T. BARAC, J. BOULET, N. WEYENS, J. VANGRONSVELD: Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *International Journal of Phytoremediation*. 2009, Vol. 11, pp. 251–267.
29. M.L.E. REED, B.R. GLICK: Growth of canova (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology* 2005, Vol. 51, pp. 1061–1069.
30. S. HASNAIN, A.N. SABRI: Growth stimulation of *Triticum aestivum* seedlings under Cr-stresses by non-rhizospheric pseudomonad strains. *Environmental Pollution* 1997, Vol. 97, pp. 265–273.
31. S.Y. KOO, K.S. CHO: Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009, Vol. 19, No. 11, pp. 1431–1438.
32. A.A. BELIMOV, K.J. DIETZ: Effects of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations. *Research in Microbiology* 2000, Vol. 155, pp. 113–121.

**Dąbrowska, G., Hryniewicz, K., Kłosowska, K., Goc, A. Selection of Rhizobacteria Improving Phytoremediation of Soil Contaminated with Heavy Metal Compounds. *Ochrona Środowiska* 2011, Vol. 33, No. 2, pp. 53–58.**

**Abstract:** Many soil bacteria show a high tolerance to heavy metals and play a vital role in promoting plant growth in a heavy-metal-contaminated environment. In the study reported on in this paper the bacterial strains being analyzed included *Bacillus* sp. (ML 1-2), *Bacteroidetes bacterium* (RI 116-1), *Flavobacterium* sp. (RI 111-11), *Pseudomonas fluorescens* (LI C1), *Serratia entomophila* (RI 111-21), and *Variovorax* sp. (ML 3-12), which had been isolated from soils contaminated by heavy metal compounds, or degraded due to anthropogenic activity. Under *in-vitro* conditions selected were bacteria tolerant to Cd, Cu, Zn and Pb. It has been demonstrated that among the strains examined *S. entomophila* (RI 111-21) and *P. fluorescens*

(LI C1) are endowed with the highest tolerance to the heavy metals in the substrate, specifically to Zn and Pb, whereas *B. bacterium* (RI 116-1) and *Flavobacterium* sp. (RI 111-11) display the highest vulnerability to heavy metals. Taking into account their negative influence on the growth and development of rape seedlings, the four heavy metals have been listed in the following order: Pb>Zn>Cu>Cd. Inoculation of winter rape (*Brassica napus* L. var. Kronos) has shown that some of the bacterial strains promote the growth and development of seedlings in the presence of heavy metals, especially copper and cadmium. The strains *Bacillus* sp. (ML 1-2) and *B. bacterium* (RI 116-1), which were particularly active in promoting rape seedling growth in an environment containing heavy metals, seem to have the greatest potential for the phytoremediation of soils.

**Keywords:** Phytoremediation, soil, heavy metals, rhizobacteria, rape.