

Daniel Wasilkowski^{1*}, Agnieszka Mrozik¹

¹Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski

Wpłynęło w kwietniu 2016 r.
Zaakceptowano w lipcu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Strategie tolerancji metali ciężkich u mikroorganizmów i roślin. 3. Koncepcja fitostabilizacji wspomaganiej. 4. Aktywność mikrobiologiczna gleby w warunkach fitostabilizacji wspomaganiej. 5. Wskaźniki mikrobiologiczne a jakość gleby. 6. Przykłady *in situ* fitostabilizacji wspomaganiej. 7. Podsumowanie

Recultivation of heavy metal-contaminated soils using aided phytostabilization

Abstract: The main anthropogenic sources of heavy metals in the environment are mining and smelting, refining and chemical industry, industrial and municipal wastes, transport as well as fertilizers and pesticides used in agriculture. Among all heavy metals, Cd, Cu, Pb, Hg, Ni and Zn are of major environmental and human health concern. The high toxicity of heavy metals causes the need to remove them from the contaminated soil using minimally invasive remediation solutions, called gentle remediation options (GRO). One of the attractive methods to reduce the labile fractions and toxicity of heavy metals in soil seems to be aided phytostabilization. It is a combination of phytostabilization using plants tolerant to trace metals and stabilizing soil against erosion with the initial chemical immobilization achieved by adding various organic and inorganic additives. The potential toxicity of trace elements depends on their specific form present in the environment, their reactivity, mobility, concentration and their availability to living organisms. The bioavailability of heavy metals in soil is constantly changing and depends on different physicochemical, biological and environmental parameters. Due to the fact that microorganisms respond quickly to the presence of stressors in the environment, the changes in metabolic activity, size and structure can be used as good indicators of the effectiveness of applied remediation technology for cleaning up contaminated sites and ecosystem quality.

1. Introduction. 2. Tolerance strategies in microorganisms and plants. 3. Concept of aided phytostabilization. 4. Microbial activity of soil under aided phytostabilization. 5. Microbial indexes and soil quality. 6. Examples of *in situ* aided phytostabilization. 7. Summary

Słowa kluczowe: fitostabilizacja wspomaganiana, gleba, metale ciężkie, mikroorganizmy, rośliny

Key words: aided phytostabilization, heavy metals, microorganisms, plants, soil

1. Wprowadzenie

Skażenie gleby metalami ciężkimi stanowi poważny problem w wielu uprzemysłowionych krajach na świecie i dotyczy terenów silnie zurbanizowanych [43]. Głównymi antropogenicznymi źródłami metali ciężkich w środowisku są zakłady przemysłu górniczego i hutniczego, petrochemicznego i chemicznego, odpady działalności przemysłowej i komunalnej, transport oraz stosowane w rolnictwie nawozy i pestycydy [2, 14]. Spośród wszystkich metali ciężkich za najbardziej niebezpieczne uważane są Cd, Cu, Pb, Hg, Ni i Zn. Pierwiastki te należą do priorytetowych zanieczyszczeń środowiska, zagrażających zdrowiu ludzkiemu zarówno ze względu na właściwości toksykologiczne, jak i powszechność występowania [29, 61].

Atrakcyjną alternatywą dla fizykochemicznych rozwiązań w detoksykacji i/lub eliminacji metali z gleby wydają się być bardziej bezpieczne i mniej ingerujące w środowisko biologiczne metody, określane wspólną nazwą GRO (gentle remediation options) [16, 40]. Należy do nich między innymi fitostabilizacja wspo-

magana, stosowana z powodzeniem w rekultywacji terenów zanieczyszczonych odpadami pokopalnianymi o dużej zawartości metali ciężkich. Polega ona na chemicznej stabilizacji metali z zastosowaniem różnych nieorganicznych i organicznych dodatków doglebowych w połączeniu z odpowiednio dobranymi gatunkami roślin [7, 11, 21, 31]. Celem tej technologii jest nie tylko usunięcie lub ograniczenie biodostępności metali ciężkich, ale także przywrócenie odpowiedniej jakości biologicznej gleby.

O potencjalnej toksyczności metali/metaloidów decyduje postać, w jakiej występują w środowisku, ich mobilność oraz stężenie i dostępność dla organizmów żywych [63, 80]. Biodostępność metali w glebie zmienia się dynamicznie i zależy od różnych czynników fizykochemicznych, biologicznych i środowiskowych [32]. Z uwagi na to, że mikroorganizmy charakteryzują się wyjątkową zdolnością adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych pomiary ich aktywności metabolicznej, liczebności i bioróżnorodności mogą być dobrymi wskaźnikami jakości, funkcjonowania i zmian zachodzących w glebie [8, 12, 78]. W połączeniu

* Autor korespondencyjny: Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, ul Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 2009576; e-mail: daniel.wasilkowski@us.edu.pl

z czynnikami fizykochemicznymi, taka kompleksowa analiza stanu i funkcji gleby może dostarczyć szczegółowych informacji o kierunku zmian zachodzących w glebie oraz zapewnić ocenę efektywności procesów remediacyjnych [8, 29, 60].

1. Strategie tolerancji metali ciężkich u mikroorganizmów i roślin

Mikroorganizmy i rośliny wyższe odgrywają istotną rolę w modyfikowaniu właściwości fizykochemicznych gleby, wpływając tym samym na biodostępność zawartych w niej metali. Kooperacja pomiędzy mikroflorą strefy ryzosferowej i roślinami stanowi bardzo ważny rodzaj pozytywnego oddziaływania, mającego wpływ na redukcję toksycznego charakteru metali ciężkich w glebie oraz kontrolowanie ich wnikania i akumulację w komórkach mikroorganizmów i roślin [23, 45, 69].

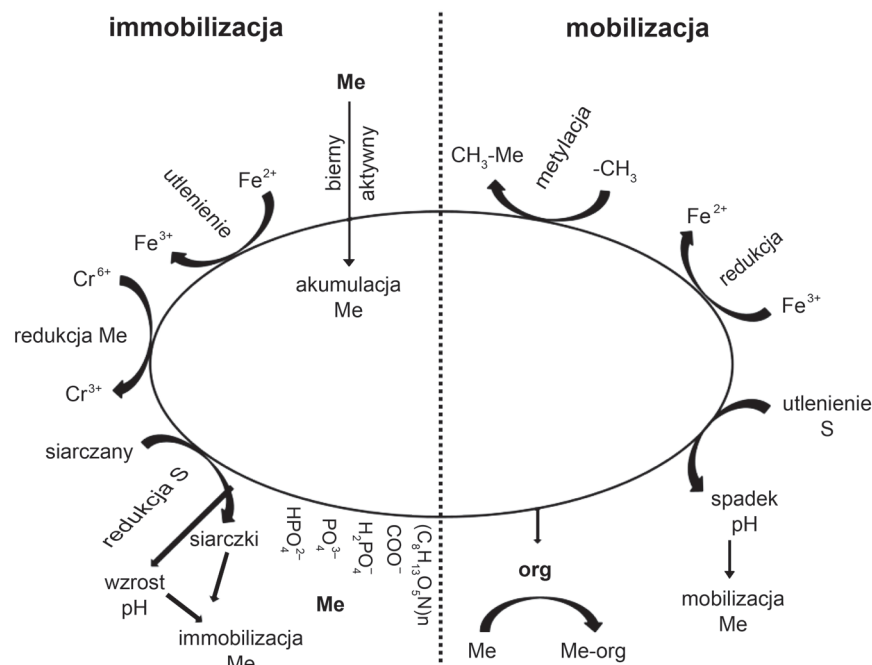
Aktywność mikroorganizmów glebowych jest jednym z istotnych czynników wpływającym na procesy związane z mobilizacją i immobilizacją metali. Mikroorganizmy posiadają zdolność wiązania form organicznych i nieorganicznych metali, zarówno rozpuszczalnych jak i nierozpuszczalnych, na powierzchni komórek w procesie zwanym biosorpcją [26, 44, 53]. Grupy karboksylowe peptydoglikanu bakterii Gram-dodatnich stanowią główne miejsca wiązania kationów metali na powierzchni komórki, natomiast u bakterii Gram-ujemnych taką funkcję pełnią grupy fosforanowe. U grzybów natomiast w wiązaniu metali na powierzchni komórki uczestniczy chityna wchodząca w skład ściany komórkowej [69]. Powinowactwo metali do powierzchni komórek mikroorganizmów przedstawia następujący szereg: Ni >> Hg > U >> As > Cu > Cd > Co > Cr > Pb [84].

Metale ciężkie mogą również ulegać akumulacji wewnątrzkomórkowej w drodze ich transportu biernego/aktywnego przez błonę, a następnie ich wiązaniu, precypitacji i magazynowaniu przez wewnątrzkomórkowe struktury i organelle w postaci fosforanów, szczawianów i węglanów [26, 27, 45]. Wiele związków będących produktami metabolizmu mikroorganizmów może wiązać metale ciężkie. Do niespecyficznych związków o takim charakterze należą niskocząsteczkowe kwasy organiczne i alkohole oraz wielocząsteczkowe polisacharydy [69]. Specyficznymi natomiast związkami syntezowanymi przez mikroorganizmy w obecności toksycznych metali są metalotioneiny. Te niskocząsteczkowe białka zawierają liczne reszty cysteinowe, które uczestniczą w wiązaniu i detoksykacji jonów metali [58, 86]. Z kolei do precypitacji metali może dochodzić w drodze pozyskiwania energii z utleniania Fe^{2+} do Fe^{3+} lub utleniania związków siarki do H_2SO_4 [27]. Redukcja U^{6+} do U^{4+} i Cr^{6+} do Cr^{3+} prowadzi do zmniejszenia rozpuszczalności tych metali. Niektóre

bakterie redukujące metale i siarczany charakteryzują się zdolnością do wytrącania metali głównie w postaci wodorotlenków i siarczanów [26, 69].

Mikroorganizmy mogą również uwalniać metale ciężkie w glebie poprzez ich ługowanie, chelatację i metylację. Procesy te prowadzą do rozpadu nierozpuszczalnych związków metali i minerałów [26]. Aktywność bakterii heterotroficznych może prowadzić do zakwaszenia gleby i uwolnienia kationów metali związanych na przykład ze związkami organicznymi. Następuje to w wyniku między innymi uwolnienia z komórki do środowiska kwasów organicznych, spośród których kwas cytrynowy, glukonowy i szczawiowy mogą tworzyć wysoce mobilne, stabilne kompleksy z metalami [69, 73, 86]. Zdolność mikroorganizmów do detoksykacji Fe, Mg, Mn, Cr, Pb, Zn, Cd, Ga i Pu wynika ze zdolności do syntezowania i wydalania z komórki niskocząsteczkowych białkowych chelatorów, zwanych sideroforami [68, 74]. Innymi metabolitami bakteryjnymi zwiększającymi mobilność metali są biosurfaktanty. Te amfipatyczne cząsteczki tworzą kompleksy z metalami ciężkimi obecnymi w macierzy glebowej, a następnie uwalniają je do roztworu glebowego zwiększając ich biodostępność [83]. Niektóre gatunki bakterii i grzybów mogą usuwać z gleby związki Se, As i Hg w drodze ich metylacji do lotnych pochodnych związków, takich jak: $(CH_3)_2Se$ i $(CH_3)_2Se_2$, $(CH_3)_2HAs$ i $(CH_3)_3As$ oraz $HgCH_3^+$ i $Hg(CH_3)_2$ [11, 71]. Mikroorganizmy mogą także uwalniać potencjalnie biodostępne metale i metaloidy poprzez procesy oksydoredukcyjne. Redukcję większości metali przeprowadzają bakterie beztlenowe wykorzystujące Fe^{3+} jako końcowy akceptor elektronów. Do uwalniania metali może dochodzić w wyniku redukcji Fe^{3+} do Fe^{2+} lub obniżenia pH w następstwie utlenienia S [27]. Redukcja Fe^{3+} do Fe^{2+} i Mn^{4+} do Mn^{2+} zwiększa ich rozpuszczalność. Natomiast redukcja jonów Hg^{+2} do rtęci metalicznej Hg^0 i jej dyfuzja poza komórkę jest głównym mechanizmem unieszkodliwiania toksycznej formy Hg^{2+} [26, 86]. Procesy immobilizacji i mobilizacji metali ciężkich w glebie przez mikroorganizmy ilustruje rys. 1.

Rośliny wyższe posiadają zdolność do pochłaniania i neutralizowania aktywnych chemicznie zanieczyszczeń. Podczas swojego wzrostu wpływają na stężenie metali ciężkich w zanieczyszczonej glebie na dwa sposoby. Jednym z nich jest unikanie przyswajania metali ciężkich i blokowanie ich wchłaniania przez korzenie do tkanek roślinnych, natomiast drugim sposobem jest zdolność do pobierania, magazynowania i immobilizowania metali ciężkich poprzez ich wiązanie z cząsteczkami czynnymi biologicznie [17]. Pierwszą linią obrony roślin przed migracją metali ciężkich do wnętrza komórek jest poziom pozakomórkowy. Obecność zjawiska mikoryzy arbuskularnej z systemem korzeniowym roślin naczyniowych stanowi barierę chroniącą



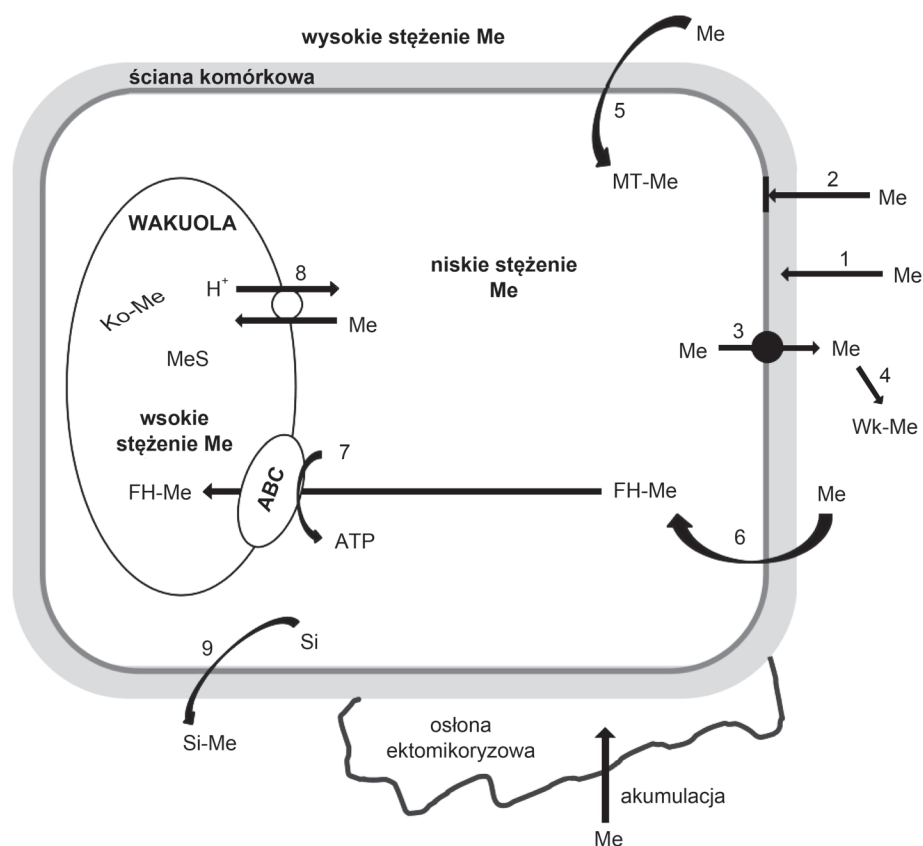
Rys. 1. Procesy immobilizacji i mobilizacji metali ciężkich w glebie przez mikroorganizmy
Me – metal, org – związek organiczny [23, 26, zmodyfikowany]

przed wnikaniem metali do tkanek roślinnych. Mikroryza odpowiada za adsorpcję lub chelatację biodostępnych w glebie form metali/metaloidów, w szczególności Hg, Se, Cd, Cu i Zn, ograniczając ich dostępność dla roślin [17, 69]. W zapobieganiu transportu metali przez ścianę komórki roślinnej biorą udział również elementy strukturalne ściany zdolne do immobilizowania metali ciężkich, jak na przykład: pektyny, grupy histydynowe i zewnątrzkomórkowe węglowodany. Innym rozwiązaniem pozwalającym roślinom na przetrwanie na terenach zanieczyszczonych metalami ciężkimi jest tworzenie trwałych kompleksów z wydzielinami korzeniowymi, co ogranicza dostępność i toksyczność metali. Składnikami tych wydzielin są między innymi: aminokwasy, kwasy organiczne, jony nieorganiczne, węglowodany, proste związki fenolowe, wodorowęglany, polisacharydowy śluz roślinny, czy siderofory [17, 35]. Drugą strategią obrony roślin przed toksycznym oddziaływaniem metali ciężkich jest ich wewnątrzkomórkowa detoksykacja. Polega ona na zapobieganiu transportowi jonów metali w poprzek błony komórkowej i ich inaktywacji poprzez wiązanie w komórce i/lub modyfikowanie do form mniej toksycznych. W wychwytywaniu toksycznych jonów metali ciężkich w cytozolu komórek roślinnych i ich transporcie uczestniczą bogate w grupy – SH polipeptydy, jak fitochelatyny i metalotioneiny. Podobne właściwości wiązania metali posiada także glutation. Związane w kompleksy metale są transportowane wzdłuż tonoplastu do wakuoli głównie z udziałem antyportu metal/H⁺ lub transportera ABC (ATP-binding cassette), czy rodziny transporterów ZIP (iron-,

zinc-regulated transporter-like proteins). W tonoplastach metale ciężkie unieruchamiane są w drodze ich wiązania z kwasami organicznymi (mugeinowym, fitowym) lub siarczkami [15, 17, 36, 57, 86]. Niskocząsteczkowe kwasy organiczne, takie jak: cytrynian, jabłczan, szczawian, fumaran i malonian mogą również chelatować metale ciężkie (szczególnie Cr³⁺, Cd²⁺ i U⁻), co prowadzi do ich akumulacji w liściach [73]. Mechanizmy tolerancji metali ciężkich u roślin ilustruje rys. 2.

2. Koncepcja fitostabilizacji wspomaganej

Fitostabilizacja wspomagana jest to metoda stosunkowo nowa, opracowana na przestrzeni ostatniej dekady, polegająca na zastosowaniu doglebowych dodatków immobilizujących metale w połączeniu z odpowiednio dobranymi gatunkami roślin (rys. 3). W charakterze dodatków do gleby stosuje się pojedyncze lub w układach kombinowanych różne materiały nieorganiczne, takie jak: związki wapnia (szczególnie CaO) i fosforany (np. apatyt, wodorofosforan amonu), materiały ilaste (np. montmorylonit i zeolit), hematyt czy Fe(0) i/lub związki organiczne, na przykład: węgiel brunatny i drzewny, osady ściekowe, kompost, torf, popiół, trociny czy korę drzew. Ich aplikacja alkalinizuje glebę, wzmacnia efekt wiązania mobilnej frakcji metali ciężkich poprzez absorbowanie, kompleksowanie bądź strącanie metali, zmniejszając tym samym ich biodostępność i toksyczność oraz zwiększa zawartość materii organicznej i zdolność zatrzymywania wody [10, 11, 29,



Rys. 2. Mechanizmy tolerancji metali ciężkich u roślin

1) wiązanie Me ze ścianą komórkową i z wydzielinami komórkowymi; 2) blokowanie przepływu Me przez błonę komórkową; 3) aktywny transport Me do apoplastu; 4) wiązanie metali z wydzielinami korzeniowymi; 5) kompleksowanie metali z metalotioneinami w cytozolu; 6) chelatacja Me z fitochelatynami w cytozolu; 7) transport kompleksu FH-Me do wakuoli za pośrednictwem transportera białkowego wiążącego ATP; 8) antyport protonowy i akumulacja Me w wakuoli; 9) wiązanie metali z sideroforami w apoplaście. FH – fitochelatyna, Ko-Me – kompleks kwasu organicznego z metalem, Me – metal, MeS – siarczek metalu, MT – metalotioneina, Si – siderofory, Wk – wydzieliny korzeniowe [17, 67, zmodyfikowany]

31, 56, 59]. Obecnie nowym podejściem w ograniczaniu biodostępnych form metali ciężkich w glebie jest stosowanie nanomateriałów, takich jak nanocząstki apatytu czy wapnia i tlenku wapnia [49, 54].

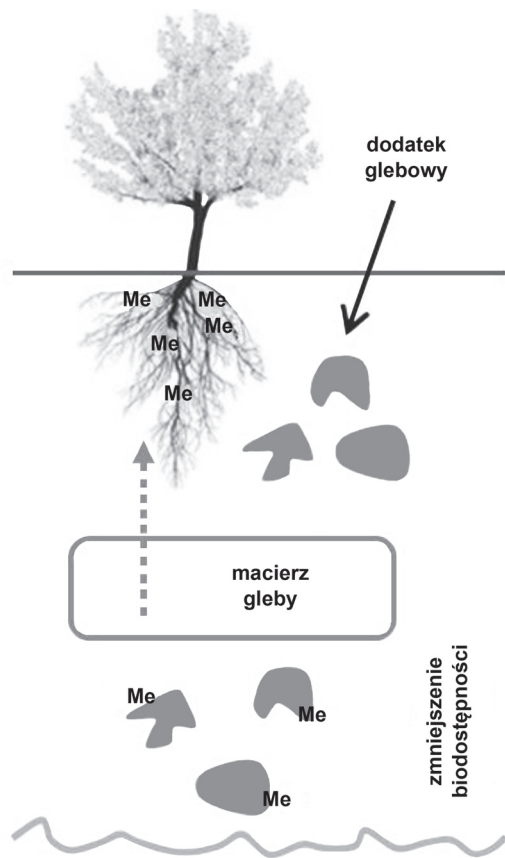
Dobór odpowiednich gatunków roślin na potrzeby fitostabilizacji jest najistotniejszym zadaniem poprzedzającym remediację skażonego terenu. Zaleca się używanie do tego celu roślin charakteryzujących się: tolerancją na wysokie stężenia metali ciężkich i ich magazynowaniem głównie w częściach podziemnych, małymi wymaganiami siedliskowymi, szybkim wzrostem i produkcją dużej biomasy, zdolnością tworzenia zwartej okrywy roślinnej oraz posiadających gęsty, wiązkowy system korzeniowy [18, 29, 64]. Przykłady roślin stosowanych w oczyszczaniu gleb skażonych metalami ciężkimi przedstawia tabela I.

Wzmocnienie efektu fitostabilizacji można również osiągnąć poprzez zwiększenie wzrostu roślin z wykorzystaniem bakterii promujących wzrost roślin (PGPB, plant growth-promoting bacteria) [10]. Mogą one stymulować proces fitoremediacji wpływając na biodostępność metali poprzez zmiany pH gleby, ułatwianie poboru z gleby azotu, fosforu i niezbędnych

mikroelementów przez rośliny, syntezę sideroforów i hormonów roślinnych (np. kwasu indoliloctowego) oraz zwiększenie wiązania metali ze związkami chelatującymi. Stymulacja wzrostu roślin przez PGPB lub inokulacja gleby PGPB może skutkować zwiększeniem tolerancji roślin na obecność metali ciężkich, dużym przyrostem biomasy roślinnej oraz zmniejszeniem

Tabela I
Wybrane rośliny jako fitostabilizatory metali ciężkich

Roślina	Metale	Źródło
<i>Lolium perenne</i> L.	As	[13]
	Pb, Cu	[37]
	Pb, Cu, Zn	[62]
<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.	Cd, Pb i Zn	[31]
<i>Festuca ovina</i> L.	Pb, Cd, Zn	[51]
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Pb, Cd, Zn	[72]
<i>Lactuca sativa</i> L.	As, Pb, Cd, Zn	[43]
<i>Triticum aestivum</i> L.	Zn, Cd, Pb, Cu, Ni	[82]
<i>Spinacia oleracea</i> L.	Cu, Cd, Zn	[33]
<i>Trifolium repens</i> L.	Pb, Cd, Zn	[52]
<i>Miscanthus giganteus</i> L.	As	[34]



Rys. 3. Fitostabilizacja wspomagana metali ciężkich w glebie
Me – metal [opracowanie własne]

stresu środowiskowego. Takie podejście pozwala na zastosowanie mniejszej dawki dodatków stabilizujących metale ciężkie i stanowić może potencjalne źródło oszczędności finansowych [1, 19, 30, 75]. Liu i wsp. [50] badali na przykład wpływ PGPB z rodzajów: *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium* i *Ochrobactrum*, wyselekcjonowanych ze strefy ryzosferowej roślin rosnących na odpadach zanieczyszczonych Cu, na przyrost biomasy *Pennisetum purpureum* Schumach., *Oenothera erythrosepala* Borbás i *Medicago sativa* L. Po 60 dniach wzrostu roślin w obecności PGPB stwierdzili 4-krotnie większą biomasę części nadziemnych *P. purpureum* i 2-krotnie większą *O. erythrosepala* i *M. sativa* w stosunku do biomasy roślin kontrolnych. Inokulację gleby skażonej As, Cu, Pb i Zn bakteriami PGPB przeprowadzili również Grandlic i wsp. [30]. Celem tego eksperymentu było zbadanie wpływu trzech szczepów PGPB: *Clavibacter* sp. (MTR-21A), *Rhodanobacter* sp. (MTR-45B) i *Arthrobacter* sp. (K4-10C i MTR-44) na wzrost dwóch rodzimych, pustynnych gatunków traw *Atriplex lentiformis* Torr. i *Buchloe dactyloides* Nutt. Po upływie 72 dni od wysiewu traw stwierdzili, że biomasę *A. lentiformis* w glebie inokulowanej PGPB była 1,6–3-krotnie większa, a *B. dactyloides* 1,5–5-krotnie większa w porównaniu z biomasą traw w glebie kontrolnej.

3. Aktywność mikrobiologiczna gleby w warunkach fitostabilizacji wspomaganej

Utrzymanie wysokiej jakości gleby zapewniają organizmy glebowe, w tym przede wszystkim mikroorganizmy odpowiedzialne za zachodzące w niej procesy biogeochemiczne oraz za jej strukturę i produktywność [24]. Ze względu na to, że mikroorganizmy szybko reagują i dostosowują się do nowych warunków środowiskowych, skład i aktywność mikroflory gleby odzwierciedla interakcje pomiędzy czynnikami biotycznymi i abiotycznymi [9, 79]. Obecność w glebie metali/metaloidów może powodować w dłuższym czasie poważne skutki w funkcjonowaniu ekosystemu i negatywnie wpływać na biologiczne procesy glebowe [12, 78]. Aby rzetelnie ocenić skuteczność podjętych działań remediacyjnych w przywracaniu glebie jej funkcji i właściwości, wynikających ze standardów jakości określonych w Rozporządzeniu Ministra Środowiska z 9 września 2002 r. [20] powinno brać się pod uwagę nie tylko parametry fizykochemiczne gleby, ale również koniecznie uwzględniać jej aktywność biologiczną [43]. Takie podejście daje możliwość poznania słabo dotąd zbadanych reakcji mikroflory gleby w odpowiedzi na działanie czynnika zanieczyszczającego w zakresie zachodzących zmian w bioróżnorodności funkcjonalnej i strukturalnej zespołów mikroorganizmów. Na podstawie uzyskanych z takich badań informacji można wnioskować o charakterze zmian w całym ekosystemie oraz oceniać jakość biologiczną gleby [41, 58, 79]. Mimo, że takie podejście ma swoje uzasadnienie, wciąż stosunkowo niewiele jest prac o charakterze kompleksowym, poszerzających zakres prowadzonych pomiarów parametrów fizykochemicznych o szczegółowe analizy mikrobiologiczne i biochemiczne.

Mimo przewagi analiz fizykochemicznych nad mikrobiologicznymi, znane są doniesienia literaturowe o bardziej kompleksowym podejściu w ocenie odpowiedzi mikroflory gleby na zmiany stężenia metali podczas fitostabilizacji wspomaganej. Przykładem takich badań może być rekultywacja gleby skażonej Cd, Pb i Zn, wzbogaconej w kompost z odpadów rolniczych (ok. 269 t ha⁻¹ gleby) z wysianą trawą *Panicum virgatum* L. [6]. Wyniki tych badań wskazują, że po 711 dniach prowadzenia eksperymentu stężenia biodostępnych frakcji Zn, Cd i Pb w rekultywowanej glebie zmniejszyły się odpowiednio o 20, 30 i 75% w porównaniu do gleby kontrolnej. Dodatkowo stwierdzono, że całkowita biomasę mikroorganizmów (oznaczona na podstawie zawartości PLFAs) w tej glebie wynosiła 80,3 μmol kg⁻¹ s.m.⁻¹ gleby i była 2,5-krotnie wyższa od ich biomasy w glebie kontrolnej. W całkowitej biomasie mikroorganizmów biomasę bakterii Gram-dodatnich w glebie z dodatkiem kompostu stanowiła 53% i była ponad 3,5-krotnie wyższa od ich biomasy

w kontroli. Natomiast biomasy bakterii Gram-ujemnych, promieniowców i grzybów stanowiły odpowiednio 30, 2,5 i 20% i były 2-krotnie wyższe niż w glebie kontrolnej. Ponadto w glebie z dodatkiem kompostu wykazano 4-, 3-, 2 i 1,5-krotny wzrost aktywności enzymów, odpowiednio arylsulfatazy, fosfatazy zasadowej, β -glukozydazy i fosfatazy kwaśnej w stosunku do ich aktywności w kontroli. W innych badaniach Ascher i in. [5] stwierdzili, że biodostępność As w glebie poddanej chemicznej stabilizacji przez okres 6 lat w obecności beringitu (5%) i Fe (0) (1%) oraz ich mieszaniny była mniejsza niż w kontroli ($11,4 \mu\text{mol kg}^{-1}$ s.m. gleby) i wynosiła odpowiednio 8,14, 0,63 i $0,88 \mu\text{mol kg}^{-1}$ s.m. gleby. Dodatkowo w liściach sałaty (*Lactuca sativa* L.) po 2 miesiącach uprawy roślin w glebie z dodatkiem Fe (0) oraz Fe(0) i beringitu wykazano, że stężenie As było niższe odpowiednio o 50 i 79% niż w liściach roślin kontrolnych. Ponadto w układach tych oznaczono ponad 2-krotnie wyższą w odniesieniu do kontroli aktywność fosfatazy alkalicznej, fosfodiesterazy, β -glukozydazy i proteazy. W podobnych badaniach dotyczących wykorzystania Fe(0) (1%) i beringitu (5%) oraz kompostu (5%) w długoterminowej (4 lata) fitostabilizacji wspomaganą gleby skażonej As Rajkumar i wsp. [69] stwierdzili 2,5–4-krotny wzrost stężenia biodostępnej frakcji tego metalu w stosunku do gleby kontrolnej. Jednocześnie w glebie z tymi dodatkami oznaczono znacznie wyższą aktywność wybranych enzymów glebowych w stosunku do kontroli. W szczególności wprowadzenie wszystkich dodatków w postaci skojarzonej wpłynęło na wzrost aktywności w glebie fosfatazy zasadowej (4-krotny), fosfodiesterazy (7-krotny), β -glukozydazy (5-krotny) i ureazy (10-krotny). Dodatki doglebowe stymulowały również wzrost 2 rodzimych gatunków roślin kłosołki wełniastej (*Holcus lanatus* L.) i sosny nadmorskiej (*Pinus pinaster* Aiton). Z kolei bogactwo gatunkowe bakterii wyrażone wartościami indeksu Shannona było największe w rekultywowanej glebie wzbogaconej w kompost.

Z badań Kohlera i wsp. [39] wynika, że aktywności dehydrogenaz i fosfatazy kwaśnej w glebie skażonej Zn, Cd, Cu i Pb, pochodzącej z terenów kopalni srebra i poddanej fitostabilizacji wspomaganą, uzależnione były także od rodzaju dodatku doglebowego i gatunku hodowanej rośliny. Największą aktywność badanych enzymów stwierdzono w glebie z dodatkiem sfermentowanego odpadu z przetwórstwa buraka cukrowego, a najmniejszą w glebie z dodatkiem kompostu zielonego. Najwyższą aktywnością dehydrogenaz charakteryzowała się gleba z wysianym rodzimym gatunkiem *Bituminaria bituminosa* L., natomiast aktywność fosfatazy była najwyższa w glebie z wysianą trawą *Piptatherum miliaceum* L. Dla porównania aktywności tych enzymów w kontroli były niższe o 47% dla dehydrogenaz i o 19% dla fosfatazy. W innych badaniach

Mingorance i wsp. [59] mierzyli z kolei aktywność dehydrogenaz i fosfatazy alkalicznej w glebie skażonej Zn i Pb oraz stabilizowanej osadami ściekowymi, na której prowadzili uprawy pomidora jadalnego (*Lycopersicon esculentum* Mill.) i życicy trwałej (*Lolium perenne* L.). Podczas badań stwierdzili stymulujący wpływ osadów ściekowych na aktywności oznaczanych enzymów glebowych. Aktywności dehydrogenaz i fosfatazy zasadowej wzrastały w glebie wraz z aplikowanym stężeniem osadu. Ich aktywności w glebie z dodatkiem osadu w najwyższym stężeniu (10%) wynosiły odpowiednio $3664 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{godz.}^{-1}$ i $530 \mu\text{g PNP g}^{-1} \text{godz.}^{-1}$, natomiast w kontroli były znacznie niższe i wynosiły $60 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{godz.}^{-1}$ i $2,63 \mu\text{g PNP g}^{-1} \text{godz.}^{-1}$. Istotny wpływ na wzrost aktywności ureazy oraz fosfatazy w glebie skażonej Cd w wyniku aktywności górniczej miało również wzbogacenie jej w kompost oraz uprawa pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) [46]. W glebie tej z dodatkiem kompostu w najwyższej dawce (216 t ha^{-1}) w odniesieniu do kontroli oznaczono 4-krotnie wyższą aktywność ureazy, natomiast po dodaniu kompostu w najniższej dawce (27 t ha^{-1}) stwierdzono w niej 2-krotnie wyższą aktywność fosfatazy. Podobny materiał doglebowy w celu oceny jego wpływu na aktywność ureazy zastosowali Zornoza i wsp. [89]. Najwyższą aktywność enzymu oznaczyli w glebie z wysianą trawą *Piptatherum miliaceum* L. i łobodą solniskową (*Atriplex halimus* L.), natomiast w glebie kontrolnej ureaza była nieaktywna. Baker i wsp. [6] oceniali również w glebie skażonej Zn, Pb i Cd wpływ różnych stężeń nawozu krowiego na aktywność fosfataz kwaśnej i zasadowej w obecności prosa różgowego (*Panicum virgatum* L.) Stwierdzili, że dodanie nawozu w dawce 269 t ha^{-1} powodowało ponad 2-krotny wzrost aktywności fosfatazy zasadowej i ponad 3-krotny aktywności fosfatazy kwaśnej niż w glebie z dawką nawozu 45 t ha^{-1} . Po 18 miesiącach eksperymentu aktywności fosfatazy kwaśnej i zasadowej w glebie z najwyższą aplikowaną dawką nawozu wzrosły odpowiednio o 24% i 34% w stosunku do ich aktywności w glebie kontrolnej.

Badaniom dotyczącym wpływu różnorodnych materiałów wprowadzanych do gleby na aktywność enzymatyczną i bioróżnorodność funkcjonalną mikroorganizmów towarzyszą niejednokrotnie analizy biomasy mikroorganizmów, oznaczanej na podstawie zawartości markerowych dla wybranych grup mikrobiologicznych fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs) [25]. Przykładem takich badań może być analiza biomasy bakterii i grzybów w glebie skażonej Pb-Ag i Zn z dodatkiem sfermentowanych odpadów roślinnych i popiołu lotnego [28]. Na podstawie analizy stężeń markerowych PLFAs dla bakterii, promieniowców i grzybów stwierdzono największą biomasę bakterii ($383,60 \mu\text{g kg}^{-1}$), promieniowców ($39 \mu\text{g kg}^{-1}$) i grzybów ($9,30 \mu\text{g kg}^{-1}$) w glebie z dodatkiem odpadu organicznego, a najmniej-

szą w glebie wymieszanej z popiołem (odpowiednio $174,00 \mu\text{g kg}^{-1}$, $26,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $1,00 \mu\text{g kg}^{-1}$). Z kolei Lee i wsp. [42] obserwowali 2-krotny wzrost biomasy mikroorganizmów w glebie z dodatkiem kompostu w porównaniu z ich biomasa w glebie kontrolnej. Podobnie Treonis i wsp. [81] stwierdzili wzrost całkowitej biomasy mikroorganizmów (o 37%) w następstwie wprowadzenia do gleby kompostu zielonego w porównaniu z ich biomasa w glebie kontrolnej. Odmienne natomiast wyniki uzyskali Watzinger i wsp. [85], którzy po wprowadzeniu do gleby węgla drzewnego stwierdzili spadek całkowitego stężenia PLFAs izolowanych z gleby o 13%.

Przykładem innych badań, w których przeprowadzono analizy PLFAs izolowanych bezpośrednio z gleby skażonej Zn i Pb, poddanej rekultywacji metodą fitostabilizacji wspomaganej w warunkach *in situ* na terenie kopalni, był eksperyment Zornoza i wsp. [89]. Badano w nim wpływ nawozu zwierzęcego dodanego do gleby na biomasę mikroorganizmów. Wyniki tych badań okazały się interesujące, ponieważ największą biomasę całkowitą bakterii oznaczono nie w glebie stabilizowanej, ale w glebie kontrolnej skażonej metalami (około $6,0 \mu\text{mol g}^{-1} \text{C}$). W glebie tej biomasy bakterii Gram-dodatnich ($1,6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{C}$) i Gram-ujemnych ($1,4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{C}$) były zbliżone. Dla porównania zawartość całkowita PLFAs w rekultywowanej glebie wynosiła $3\text{--}4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{C}$, niezależnie od uprawianego gatunku rośliny. Ponadto dominowały w niej bakterie Gram-ujemne, których biomasa zawierała się w przedziale $0,5\text{--}0,9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{C}$. W innych badaniach Baker i wsp. [6] oceniali między innymi wpływ nawozu krowiego dodanego do gleby zanieczyszczonej Zn, Pb i Cd na skład populacji mikroorganizmów. Rekultywację gleby prowadzono metodą fitostabilizacji wspomaganej w miejscu pierwotnego skażenia z wykorzystaniem prosa różgowego (*Panicum virgatum* L.). Analiza profili PLFAs wykazała, że w glebie z największą dawką materiału organicznego (269 t ha^{-1}) biomasa mikroorganizmów wynosiła $80,3 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ s.m. gleby}$ i była o 62% wyższa niż w kontroli. W glebie tej dominowały bakterie, przy czym biomasa bakterii Gram-dodatnich była większa o 36% niż Gram-ujemnych. Z gleby tej wyizolowano również najwięcej markerowych PLFAs dla promieniowców i grzybów, których biomasy wynosiły odpowiednio $2,0$ i $16,4 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ s.m. gleby}$ i były wyższe o 40% i 47% niż w kontroli.

4. Wskaźniki mikrobiologiczne a jakość gleby

Koncepcja „jakości gleby” powstała w latach 90. XX wieku. Termin ten definiowany jest jako „zdolność gleby do pełnienia swoistych dla niej funkcji” lub „stan funkcjonowania gleby odpowiedni do jej przeznaczenia” [38]. Dlatego też w ocenie skuteczności

podjętych działań w oczyszczaniu gleby skażonej metalami ciężkimi powinno się uwzględniać nie tylko parametry fizyczne gleby, ale także czynniki chemiczne i biologiczne [29, 59]. Dotychczas nie opracowano uniwersalnej formuły pozwalającej w sposób mierzalny przedstawić jakość gleby. Przyczyną tego może być brak standaryzacji wielu metod, powszechne stosowanie różnych metod na świecie, a także heterogeniczność gleby i warunki naturalne (roślinność i klimat) [8].

Z danych literaturowych wynika, że do oceny jakości gleby można stosować różne wskaźniki. Jednym z nich jest indeks jakości gleby, definiowany jako najmniejszy zestaw parametrów gleby, które w powiązaniu ze sobą dostarczają informacji o jej jakości i zdolności pełnienia określonej funkcji. Parametry te obejmują najczęściej: odczyn pH, zawartość substancji organicznych, biomasę mikroorganizmów, wydajność procesów oddechowych oraz aktywność enzymatyczną. Dotychczas wśród tych parametrów w charakterze jednej ze zmiennych indeksu jakości gleby nie znalazły zastosowania wskaźniki molekularne. Takie wskaźniki mogłyby być niezwykle przydatne w ustaleniu roli konkretnych mikroorganizmów w glebie oraz w selekcji kluczowych enzymów związanych z funkcjonowaniem gleby. Opracowanie takich wskaźników prawdopodobnie będzie możliwe dzięki osiągnięciom współczesnej genomiki, transkryptomiki i proteomiki [8].

Innym wskaźnikiem zaproponowanym przez Wyszowską i Wyszowskiego [87] w badaniach wpływu Cd i Mg na aktywność enzymów w glebie jest wskaźnik żyzności gleby M_w (soil fertility index). Jest on iloczynem procentowej zawartości węgla organicznego (%C) i sumy aktywności ureazy, dehydrogenaz, fosfatazy alkalicznej i kwaśnej. Kolejnym wskaźnikiem jakości gleby, opracowanym we wczesnych latach 90., jest indeks jakości gleby SQI (soil quality index), będący sumą i-tego wskaźnika wyrażonego jako iloczyn współczynnika regresji i linearnej lub nielinernej wartości i-tego wskaźnika [55, 76]. Jakość gleby można także wyrażać indeksem zmian w glebie SAI (soil alteration index), w którym zmiennymi mogą być aktywności wybranych enzymów glebowych lub stężenie określonych fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs). Indeks ten jest sumą iloczynu współczynnika a równania korelacji kanonicznej (raw canonical coefficients) i aktywności enzymów/stężeń PLFAs istotnych statystycznie w danych badaniach [66, 67].

Wyszowska i Wyszowski [87] na podstawie wartości indeksu M_w stwierdzili mniejszą żyzność gleby w obecności Cd. Poza tym nie stwierdzili wpływu ograniczenia mobilności tego metalu w glebie na jej żyzność. Puglisi i wsp. [67] wykazali wzrost wartości SAI w glebie pochodzącej z terenów kopalnianych, na których prowadzono zabiegi zmierzające do przywrócenia szaty roślinnej. Z kolei w innych badaniach indeks SAI

przyjmował niższe wartości dla gleb poddanych działalności antropogenicznej i intensywnemu nawożeniu niż dla gleb niezmiennych działalnością człowieka [66].

Jedynym opracowanym indeksem wiążącym parametry fizykochemiczne z biologicznymi jest indeks jakości gleby SQI. Badania Erkossa i wsp. [22] wykazały największy wzrost jakości gleby po wzbogaceniu jej w nawóz organiczny w porównaniu z innymi glebami poddanymi różnym zabiegom antropogenicznym. Indeks SQI znalazł również zastosowanie w badaniach dotyczących oceny wpływu rodzaju uprawianych roślin [77], częstotliwości [4] i rodzaju nawożenia [56] na jakość gleby. Pomimo, że autorzy różnych doniesień zwracają uwagę na istotność wyznaczania jakości gleby w oparciu o parametry fizyczne, chemiczne i biologiczne, to nie jest to powszechnie stosowaną praktyką.

5. Przykłady *in situ* fitostabilizacji wspomaganej

Fitostabilizacja wspomagana znalazła głównie zastosowanie w remediacji gleb terenów działalności wydobywczej i hutniczej. Była i jest ona szeroko praktykowana w wielu krajach Unii Europejskiej oraz w innych częściach świata. Badania w tym zakresie są jednak ograniczone częściej do kontrolowanych warunków laboratoryjnych niż do eksperymentów polowych. Takie badania pilotażowe mają swoje uzasadnienie, gdyż umożliwiają poznanie losów zanieczyszczeń w glebie i optymalizację fitotechnologii przed jej praktycznym zastosowaniem, ale niejednokrotnie nie są wdrażane na szerszą skalę [7].

Mimo potwierdzonej w wielu badaniach laboratoryjnych skuteczności fitostabilizacji wspomaganej w remediacji gleb skażonych metalami ciężkimi, wciąż niewiele jest publikacji na temat jej stosowania i efektywności w warunkach polowych. Pavel i wsp. [64] przeprowadzili badania w warunkach *in situ* na terenach przyległych do zamkniętej huty cynku i ołowiu w Rumunii. Autorzy pracy zmieszali glebę z czerwonym szlamem i założyli na niej plantację trawy miskanta chińskiego (*Miscanthus giganteus* L.) W wyniku tych zabiegów udało się zmniejszyć stężenia biodostępnych frakcji Pb, Cd i Zn w glebie oraz uzyskać zmniejszoną akumulację metali ciężkich w korzeniach i częściach nadziemnych trawy. W innych badaniach prowadzonych bezpośrednio na terenach skażonych odciekami kopalnianymi w Hiszpanii oceniano potencjał kompostu bogatego w kwasy humusowe, leonardyty o dużej zawartości kwasów humusowych oraz wapna jako stabilizatorów Cd, Cu i Zn w glebie [88]. Aplikacja tych materiałów nie tylko znacząco wpłynęła na zmniejszenie stężeń biodostępnych frakcji metali ciężkich w skażonej glebie, ale również spowodowała ekspansję endemicznego gatunku *Cyndona dactylon* L.

na objętym badaniami terenie. Ponadto stwierdzono, że w obecności kompostu akumulacja Cu i Zn w tkankach nadziemnych tej rośliny była niewielka. Fitostabilizację wspomaganą wykorzystano również w warunkach polowych w Afryce do remediacji terenów silnie zanieczyszczonych Cu w wyniku działania huty [76]. Dodany do gleby wapień i kompost ograniczyły w niej mobilność jonów tego metalu. Dodatki doglebowe stymulowały także wzrost rodzimej rośliny *Microchloa altera* Rendle i ograniczały poziom akumulacji Cu w jej liściach. Próbę immobilizacji Cd w glebie na terenie kopalni w Chinach poprzez intensywne jej nawożenie kompostem i uprawę pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) podjęli Li i wsp. [46]. Z badań tych wynika, że zabiegi te doprowadziły do redukcji biodostępnej frakcji Cd w glebie oraz zmniejszenia akumulacji tego metalu w łodygach roślin.

6. Podsumowanie

Zanieczyszczenie gleby metalami ciężkimi stanowi poważny problem ekologiczny, wymagający nie tylko monitorowania ich losów w środowisku, ale także opracowania i wdrażania innowacyjnych rozwiązań ich eliminacji i detoksykacji. Spośród różnych metod fitoremediacji obiecującą technologią w ograniczaniu mobilności metali ciężkich w glebie jest fitostabilizacja wspomagana, wykorzystująca zdolności roślin do redukcji stężeń bioprzyswajalnych zanieczyszczeń w obecności różnych dodatków doglebowych. Kluczowe znaczenie w intensyfikacji procesów usuwania metali z gleby oraz poprawy jej jakości ma dokładne poznanie relacji pomiędzy mikroorganizmami a roślinami, zbadanie mechanizmów unieruchamiania metali w obecności różnych materiałów oraz określenie wpływu czynników środowiskowych na zakres tych zależności i przebieg procesów. Znajomość takich zagadnień jest niezbędna, aby rekultywować skażone gleby zgodnie z unijnymi i krajowymi programami oraz strategiami w dziedzinie ochrony gleb i zapobieganiu dalszemu jej zanieczyszczeniu.

Aby określić stopień efektywności podjętych działań bioremediacyjnych na danym terenie z praktycznego punktu widzenia istnieje potrzeba wdrażania długoterminowego monitoringu ekologicznego. Monitoring obejmuje systematyczne prowadzenie empirycznych pomiarów wybranych parametrów i ich analizę przez okres minimum 10 lat. Taki długoterminowy program jest potrzebny, aby regularnie oceniać efekt zanieczyszczenia na zdrowie ludzi i środowisko [3, 19, 47]. Rozszerzeniem monitoringu ekologicznego jest proponowany przez Lindenmayera i wsp. [48] tzw. „monitoring adaptacyjny”. Obejmuje on powtarzające się cyklicznie w trakcie trwania remediacji danego obszaru

następujące działania: rozwój modeli koncepcyjnych, projektowanie eksperymentu, zbiór i analizę danych oraz ich interpretację. „Monitoring adaptacyjny” jest jedyną koncepcją, która może się rozwijać w odpowiedzi na pojawiające się problemy, nowe informacje, sytuacje lub warunki i wprowadzać w trakcie jego trwania stosowne rozwiązania.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu nr 2015/17/N/NZ9/01109 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

7. Piśmiennictwo

- Ahemad M.: Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: paradigms and prospects. *Arab. J. Chem.*, DOI:10.1016/j.arabjc.2014.11.020 (2014)
- Ahmadpour P., Ahmadpour F., Mahmud T.M.M., Abdu A., Soleimani M., Tayefeh F.H.: Phytoremediation of heavy metals: a green technology. *Afr. J. Biotechnol.* **11**, 14036–14043 (2012)
- Alvarenga P., Palma P., de Varennes A., Cunha-Queda A.C.: A contribution towards the risk assessment of soils from the São Domingos Mine (Portugal): chemical, microbial and ecotoxicological indicators. *Environ. Pollut.* **161**, 50–56 (2012)
- Armenise E., Redmile-Gordon M.A., Stellacci A.M., Ciccarese A., Rubino P.: Developing a soil quality index to compare soil fitness for agricultural use under different managements in the Mediterranean environment. *Soil Tillage Res.* **130**, 91–98 (2013)
- Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Mench M., Pietramellara G., Nannipieri P., Renella G.: Composition, biomass and activity of microflora, and leaf yields and foliar elemental concentrations of lettuce, after *in situ* stabilization of an arsenic-contaminated soil. *Appl. Soil Ecol.* **41**, 351–359 (2009)
- Baker L.R., White P.M., Pierzynski G.M.: Changes in microbial properties after manure, lime, and bentonite application to a heavy metal-contaminated mine waste. *Appl. Soil Ecol.* **48**, 1–10 (2011)
- Barbafieri M., Japenga J., Romkens P., Petruzzelli G.: Protocols for applying phytotechnologies in metal-contaminated soils (w) Plant-based remediation processes, red. D.K. Gupta, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2013, s. 19–37
- Bastida F., Zsolnay A., Hernández T., García C.: Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma*, **147**, 159–171 (2008)
- Bending G.D., Turner M.K., Jones J.E.: Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 1073–1082 (2002)
- Bolan N.S., Park J.H., Robinson B., Naidu R., Huh K.Y.: Phytostabilization. A green approach to contaminant containment. *Adv. Agron.* **112**, 145–204 (2011)
- Bolan N.B., Kunhikrishnan A., Thangarajana R., Kumpiened J., Parke J., Makinof T., Kirkham M.B., Scheckel K.: Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – to mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mater.* **266**, 141–166 (2014)
- Burns R.G., DeForest J.L., Marxsen J., Sinsabaugh R.L., Stromberger M.E., Wallenstein M.D., Weintraub M.N., Zoppini A.: Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.* **58**, 216–234 (2013)
- Cárcamo V., Bustamante E., Trangolao E., de la Fuente L.M., Mench M., Neaman A., Ginocchio R.: Simultaneous immobilization of metals and arsenic in acidic polluted soils near a copper smelter in central Chile. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **19**, 1131–1143 (2012)
- Caussy D., Gochfeld M., Gurzau E., Neagu C., Ruedel H.: Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **56**, 45–51 (2003)
- Cobbett C.S.: Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **123**, 825–832 (2000)
- Cundy A.B., Bardos R.P., Church A., Puschenreiter M., Friesl-Hanl W., Müller I., Neu S., Mench M., Witters N., Vangronsveld J.: Developing principles of sustainability and stakeholder engagement for „gentle” remediation approaches: the European context. *J. Environ. Manage.* **129**, 283–291 (2013)
- Dalvi A., Bhalerao S.: Response of plants towards heavy metal toxicity: an overview of avoidance, tolerance and uptake mechanism. *Ann. Plant Sci.* **2**, 362–368 (2013)
- de-Bashan L.E., Hernandez J.P., Nelson K.N., Bashan Y., Maier R.M.: Growth of Quail bush in acidic, metalliferous desert mine tailings: effect of *Azospirillum brasilense* Sp6 on biomass production and rhizosphere community structure. *Microb. Ecol.* **60**, 915–927 (2010)
- de-Bashan L.E., Hernandez J.P., Bashan Y.: The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – a comprehensive evaluation. *Appl. Soil Ecol.* **61**, 171–189 (2012)
- Dz.U. z 2002 r. Nr 165, poz. 1359
- Epelde L., Becerril J.M., Alkorta I., Garbisu C.: Adaptive long-term monitoring of soil health in metal phytostabilization: ecological attributes and ecosystem services based on soil microbial parameters. *Int. J. Phytoremediation*, **16**, 971–981 (2014)
- Erkossa T., Itanna F., Stahr K.: Indexing soil quality: a new paradigm in soil science research. *Soil Res.* **45**, 129–137 (2007)
- Fiałkowski K., Kacprzak M., Grobelak A., Placek A.: The influence of selected soil parameters on the mobility of heavy metals in soils. *Inż. Ochr. Środow.* **15**, 81–92 (2012)
- Fraç M., Jezierska-Tys S.: Różnorodność mikroorganizmów środowiska glebowego. *Post. Mikrobiol.* **40**, 47–58 (2010)
- Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E.: Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 1621–1625 (2011)
- Gadd G.M.: Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, **122**, 109–119 (2004)
- Gadd G.M., Bahri-Esfahani J., Li Q., Rhee Y.J., Wei Z., Fomina M., Liang X.: Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. *Fungal Biol. Rev.* **28**, 36–55 (2014)
- García-Sánchez M., García-Romera I., Cajthaml T., Tlustoš P., Száková J.: Changes in soil microbial community functionality and structure in a metal-polluted site: the effect of digestate and fly ash applications. *J. Environ. Manage.* **162**, 63–73 (2015)
- Gómez-Sagasti M.T., Alkorta I., Becerril J.M., Epelde L., Anza M., Garbisu C.: Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. *Water Air Soil Pollut.* **223**, 3249–3262 (2012)
- Grandlic C.J., Palmer M.W., Maier R.M.: Optimization of plant growth-promoting bacteria-assisted phytostabilization of mine tailings. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 1734–1740 (2009)
- Grobelak A., Nopora A.: The chemophytostabilisation process of heavy metal polluted soil. *Plos One*, **10**, 1–15 (2015)
- Guala S.D., Vega F.A., Covelo E.F.: The dynamics of heavy metals in plant-soil interactions. *Ecol. Modell.* **221**, 1148–1152 (2010)
- Hanauer T., Felix-Henningsen P., Steffens D., Kalandadze B., Navrozashvili L., Urushadze T.: *In situ* stabilization of metals

- (Cu, Cd, and Zn) in contaminated soils in the region of Bolnisi, Georgia. *Plant Soil*, **341**, 193–208 (2011)
34. Hartley W., Dickinson N.M., Riby P., Lepp N.W.: Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environ. Pollut.* **157**, 2654–2662 (2009)
 35. Kabata-Pendias A., Pendias H.: Trace elements in soils and plants. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 2001
 36. Kabata-Pendias A., Mukherjee A.: Trace elements from soil to human. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007
 37. Karami N., Clemente R., Moreno-Jiménez E., Lepp N.W., Beesley L.: Efficiency of green waste compost and biochar soil amendments for reducing lead and copper mobility and uptake to ryegrass. *J. Hazard. Mater.* **191**, 41–48 (2011)
 38. Karlen D.L., Ditzler C.A., Andrews S.S.: Soil quality: why and how? *Geoderma*, **114**, 145–156 (2003)
 39. Kohler J., Caravaca F., Azcón R., Diaz G., Roldán A.: Selection of plant species-organic amendment combinations to assure plant establishment and soil microbial function recovery in the phytostabilization of a metal-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* **225**, 1930–1943 (2014)
 40. Komárek M., Vaněk A., Ettler V.: Chemical stabilization of metals and arsenic in contaminated soils using oxides – a review. *Environ. Pollut.* **172**, 9–22 (2013)
 41. Kumpiene J., Lagerkvist A., Maurice C.: Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – a review. *Waste Manage.* **28**, 215–225 (2008)
 42. Lee J.J., Park R.D., Kim Y.W., Shim J.H., Chae D.H., Rim Y.S., Sohn B.K., Kim T.H., Kim K.Y.: Effect of food waste compost on microbial population, soil enzyme activity and lettuce growth. *Bioresour. Technol.* **93**, 21–28 (2004)
 43. Lee S.H., Kim E.Y., Park H., Yun J., Kim J.G.: *In situ* stabilization of arsenic and metal-contaminated agricultural soil using industrial by-products. *Geoderma*, **161**, 1–7 (2011)
 44. Leung K.T., Nandakumar K., Sreekumari K., Lee H., Trevors J.T.: A case study of bioremediation of polluted soil: biodegradation and toxicity of chlorophenols in soil (w) Modern soil microbiology, red. J.D. van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997
 45. Li M., Mohamed I., Raleve D., Chen W., Huang Q.: Field evaluation of intensive compost application on Cd fractionation and phytoavailability in a mining-contaminated soil. *Environ. Geochem. Health*, DOI 10.1007/s10653-015-9784-y (2015)
 46. Li Q., Csetenyi L., Gadd G.M.: Biomineralization of metal carbonates by *Neurospora crassa*. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 14409–14416 (2014)
 47. Lindenmayer D.B., Likens G.E.: The science and application of ecological monitoring. *Biol. Conserv.* **143**, 1317–1328 (2010)
 48. Lindenmayer D.B., Likens G.E., Haywood A., Miezis L.: Adaptive monitoring in the real world: proof of concept. *Trends Ecol. Evol.* **26**, 641–646 (2011)
 49. Liu R., Zhao D.: Synthesis and characterization of a new class of stabilized apatite nanoparticles and applying the particles to *in situ* Pb immobilization in a fire-range soil. *Chemosphere*, **91**, 594–601 (2013)
 50. Liu W., Yang C., Shi S., Shu W.: Effects of plant growth-promoting bacteria isolated from copper tailings on plants in sterilized and non-sterilized tailings. *Chemosphere*, **97**, 47–53 (2014)
 51. Lopareva-Pohu A., Pourrut B., Waterlot C., Garçon G., Bidar G., Pruvot C., Shirali P., Douay F.: Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial. Part I. Influence on soil parameters and metal extractability. *Sci. Total Environ.* **409**, 647–654 (2011a)
 52. Lopareva-Pohu A., Verdin A., Garçon G., Sahraoui A.L.H., Pourrut B., Debiane D., Waterlot C., Laruelle F., Bidar G., Douay F., Shirali P.: Influence of fly ash aided phytostabilisation of Pb, Cd and Zn highly contaminated soils on *Lolium perenne* and *Trifolium repens* metal transfer and physiological stress. *Environ. Pollut.* **159**, 1721–1729 (2011b)
 53. Ma Y., Prasad M.N.V., Rajkumar M., Freitas H.: Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol. Adv.* **29**, 248–258 (2011)
 54. Mallampati S.R., Mitoma Y., Okuda T., Sakita S., Kakeda M.: Solidification and immobilization of heavy metals in soil using with nano-metallic Ca/CaO dispersion Mixture. *E3S Web of Conferences*, **35002**, 1–4 (2013)
 55. Mamindy-Pajany Y., Hurel C., Geret F., Roméo M., Marmier N.: Comparison of mineral-based amendments for *ex-situ* stabilization of trace elements (As, Cd, Cu, Mo, Ni, Zn) in marine dredged sediments: a pilot-scale experiment. *J. Hazard. Mater.* **252–253**, 213–219 (2013)
 56. Mastro R.E., Chhonkar P.K., Singh D., Patra A.K.: Alternative soil quality indices for evaluating the effect of intensive cropping, fertilisation and manuring for 31 years in the semi-arid soils of India. *Environ. Monit. Assess.* **136**, 419–435 (2008)
 57. Meagher R.B.: Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 153–162 (2000)
 58. Meharg A.: The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol. Res.* **107**, 1253–1265 (2003)
 59. Mench M., Lepp N., Bert V., Schwitzguébel J.P., Gawronski S.W., Schröder P., Vangronsveld J.: Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J. Soils Sediments*, **10**, 1039–1070 (2010)
 60. Mingorance M.D., Olivia S.R., Valdés B., Gata F.J.P., Leidi E.O., Gurmán I., Peña A.: Stabilized municipal sewage sludge addition to improve properties of an acid mine soil for plant growth. *J. Soils Sediments*, **14**, 703–712 (2014)
 61. Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F.: Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Eng. Geol.* **60**, 193–207 (2001)
 62. Nwachukwu O.I., Pulford I.D.: Soil metal immobilization and ryegrass uptake of lead, copper and zinc as affected by application of organic materials as soil amendments in a short-term greenhouse trial. *Soil Use Manag.* **25**, 159–167 (2009)
 63. Panagos P., Hiederer R., van Liedekerke M., Bampa F.: Estimating soil organic carbon in Europe based on data collected through an european network. *Ecol. Indic.* **24**, 439–450 (2013)
 64. Pandey V.C.: Invasive species based efficient green technology for phytoremediation of fly ash deposits. *J. Geochem. Explor.* **123**, 13–18 (2012)
 65. Pavel P.B., Puschenreiter M., Wenzel W.W., Diacu E., Barbu C.H.: Aided phytostabilization using *Miscanthus sinensis* × *giganteus* on heavy metal-contaminated soils. *Sci. Total Environ.* **479–480**, 125–131 (2014)
 66. Puglisi E., Nicelli M., Capri E., Trevisan M., Del Re A.A.M.: A soil alteration index based on phospholipid fatty acids. *Chemosphere*, **61**, 1548–1557 (2005)
 67. Puglisi E., Del Re A.A.M., Rao M.A., Gianfreda L.: Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 1673–1681 (2006)
 68. Rajkumar M., Ae N., Prasad M.N.V., Freitas H.: Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* **28**, 142–149 (2010)
 69. Rajkumar M., Sandhya S., Prasad M.N.V., Freitas H.: Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1562–1574 (2012)
 70. Renella G., Landi L., Ascher J., Ceccherini M.T., Pietramellara G., Mench M., Nannipieri P.: Long-term effects of aided phytosta-

- bilisation of trace elements on microbial biomass and activity, enzyme activities, and composition of microbial community in the Jales contaminated mine spoils. *Environ. Pollut.* **152**, 702–712 (2008)
71. Robinson J.B., Tuovinen O.H.: Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiol. Rev.* **48**, 95–124 (1984)
 72. Ruttens A., Mench M., Colpaert J.V., Boissonc J., Carleerd R., Vangronsveld J.: Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. I: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant availability of metals. *Environ. Pollut.* **144**, 524–532 (2006)
 73. Ryan P.R., Delhaize E.F., Jones D.L.: Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 527–560 (2001)
 74. Schalk I.J., Hannauer M., Braud A.: New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **13**, 2844–2854 (2011)
 75. Shinwari K.I., Shah A., Afridi M.I., Zeeshan M., Hussain H., Hussain J., Ahmad O., Jamil M.: Application of plant growth promoting rhizobacteria in bioremediation of heavy metal polluted soil. *AJMS*, **3**, 179–185 (2015)
 76. Shutcha M.N., Faucon M.P., Kissi C.K., Colinet G., Mahy G., Luhembwe M.N., Visser M., Meerts P.: Three years of phytostabilisation experiment of bare acidic soil extremely contaminated by copper smelting using plant biodiversity of metal-rich soils in tropical Africa (Katanga, DR Congo). *Ecol. Eng.* **82**, 81–90 (2015)
 77. Sinha N.K., Mohanty M., Meena B.P., Das H., Chopra U.K., Singh A.K.: Soil quality indicators under continuous cropping systems in the arid ecosystem of India. *Afr. J. Agric. Res.* **9**, 285–293 (2014)
 78. Stefanis C., Alexopoulos A., Voidarou C., Vavias S., Bezirtoglou E.: Principle methods for isolation and identification of soil microbial communities. *Folia Microbiol.* **58**, 61–68 (2013)
 79. Stefanowicz A.: The Biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. *Pol. J. Environ. Stud.* **15**, 669–676 (2006)
 80. Takáč P., Szabová T., Kozáková L., Benková M., Takáč, P.: Heavy metals and their bioavailability from soils in the long-term polluted central Spiš region of SR. *Plant Soil Environ.* **55**, 167–172 (2009)
 81. Treonis A.M., Austin E.E., Buyer J.S., Maul J.E., Spicer L., Zasada I.A.: Effects of organic amendment and tillage on soil microorganisms and microfauna. *Appl. Soil Ecol.* **46**, 103–110 (2010)
 82. Usman A.R.A., Kuzyakov Y., Lorenz K., Stahr K.: Remediation of a soil contaminated with heavy metals by immobilizing compounds. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **169**, 205–212 (2006)
 83. Venkatesh N.M., Vedaraman N.: Remediation of soil contaminated with copper using rhamnolipids produced from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 using waste frying rice bran oil. *Ann. Microbiol.* **62**, 85–91 (2012)
 84. Violante A., Cozzolino V., Perelomov L., Caporale A., Pigna M.: Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **10**, 268–292 (2010)
 85. Watzinger A., Feichtmair S., Kitzler B., Zehetner F., Kloss S., Wimmer B., Zechmeisters-Boltenstern S., Soja G.: Soil microbial communities responded to biochar application in temperate soils and slowly metabolized ¹³C-labelled biochar as revealed by ¹³C PLFA analyses: results from a short-term incubation and pot experiment. *Eur. J. Soil Sci.* **65**, 40–51 (2014)
 86. Wu G., Kanga H., Zhang X., Shao H., Chu L., Ruand C.: A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *J. Hazard. Mater.* **174**, 1–8 (2010)
 87. Wyszowska J., Wyszowski M.: Effect of cadmium and magnesium on enzymatic activity in soil. *Pol. J. Environ. Stud.* **12**, 473–479 (2003)
 88. Xiong J., Madejón P., Madejón E., Cabrera F.: Assisted natural remediation of a trace element-contaminated acid soil: an eight-year field study. *Pedosphere*, **25**, 250–262 (2015)
 89. Zornoza R., Acosta J.A., Martínez-Martínez S., Faz A., Bååth E.: Main factors controlling microbial community structure and function after reclamation of a tailing pond with aided phytostabilization. *Geoderma*, **245–246**, 1–10 (2015)