

Małgorzata Pawlik<sup>1\*</sup>, Tomasz Płociniczak<sup>1</sup>, Zofia Piotrowska-Seget<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Śląski

Wpłynęło w styczniu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Bakterie endofityczne – charakterystyka. 3. Kolonizacja tkanek roślinnych. 4. Endofity promujące wzrost roślin (PGPE). 5. Rola endofitów w fitodegradacji. 6. Rola endofitów w fitoekstrakcji. 7. Endofity w rolnictwie i ochronie roślin. 8. Metabolity endofitów w medycynie. 9. Produkcja bioplastiku. 10. Podsumowanie

#### Endophytic bacteria and their role in environmental microbiology, medicine and industry

**Abstract:** Endophytic bacteria have been known for more than 120 years. They live inside plant tissues without causing any apparent symptoms of disease or negative effects on the host. Each of the nearly 300 000 plant species that exist on the earth is host to one or more endophytes. Only a few of these plants have ever been completely studied relative to their endophytic biology. Consequently, the opportunity to find new and beneficial endophytic microorganisms among the diversity of plants in different ecosystems is considerable. During the long co-evolutionary process with their hosts, endophytes have developed many significant and novel characteristics. The relationships between plants and endophytic bacteria are very close. The endophytes which reside inside plant tissues can be classified as 'obligate' or 'facultative'. The first group is strictly dependent on the host plant for their growth and survival and transmission to other plants. The second group has a stage in their life cycle in which they are able to exist outside the host plant. Recent studies have shown that endophytes accelerate the adaptation of plants to unbalanced environmental conditions such as saline soil, drought, stress caused by pesticides, heavy metals or hydrocarbons. Therefore, the exploitation of the interaction of plant endophytes for the remediation of contaminated soils is a promising area; however, role of these microorganisms is still unclear.

1. Introduction. 2. Characterization of endophytic bacteria. 3. Colonization of plant tissues. 4. Plant growth-promoting endophytes (PGPE). 5. The role of endophytes in phytodegradation. 6. The role of endophytes in phytoextraction. 7. Endophytes in agriculture and plant protection. 8. Endophytic metabolites in medicine. 9. Bioplastic production. 10. Summary

**Słowa kluczowe:** bakterie endofityczne, fitoremediacja, mechanizmy promujące wzrost roślin

**Key words:** endophytic bacteria, phytoremediation, plant growth-promoting mechanisms

## 1. Wstęp

Termin bakterie endofityczne odnosi się do grupy bakterii, która stale bytuje w tkankach roślin nie powodując przy tym objawów chorobowych. Mikroorganizmy te zamieszkują wewnątrz prawdopodobnie każdej rośliny występującej na Ziemi. Wiele z tych bakterii korzystnie wpływa na wzrost i rozwój roślin. Wyniki ostatnich badań wskazują, że endofity ułatwiają roślinom także adaptację do niekorzystnych warunków środowiska takich jak nadmierne zasolenie [40], brak wody, stres spowodowany pestycydami [5], metalami ciężkimi [24, 50] czy węglowodorami [2, 41, 52]. Ponadto, obecność bakterii endofitycznych szczególnie korzystnie wpływa na wzrost i rozwój roślin.

Endofity są grupą mikroorganizmów, na którą w ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę. Jednym z najnowszych trendów w biotechnologii środowiskowej jest wykorzystanie bakterii endofitycznych do wspomaganie procesów fitoremediacji terenów skażonych metalami ciężkimi i/lub związkami ropopochodnymi. Niektóre bakterie endofityczne są zdolne do produkowania

nieznanych dotąd substancji o działaniu przeciwwgrzybowym, przeciwwirusowym oraz przeciwmalarycznym. Dla intensywnie rozwijającego się przemysłu tworzyw sztucznych bakterie te są źródłem polimerów, z których produkuje się między innymi bioplastik [38, 47, 54].

## 2. Bakterie endofityczne – charakterystyka

Znane już od ok. 120 lat bakterie endofityczne (endofity), to mikroorganizmy izolowane z powierzchniowo wysterylizowanych organów roślinnych. Mikroorganizmy te zasiedlają zdrowe tkanki roślin wyższych nie powodując żadnych zmian i objawów chorobowych u swojego gospodarza. Przypuszcza się, że każda z blisko 300 000 obecnie znanych roślin jest zasiedlana przez jeden lub wiele gatunków bakteryjnych endofitów. Dlatego też szansa znalezienia mikroorganizmów o korzystnych i poszukiwanych cechach takich jak produkcja bioaktywnych substancji, nowych antybiotyków, czy zdolność do degradacji ksenobiotyków i wspomaganie wzrostu roślin, jest bardzo duża [16, 38].

\* Autor korespondencyjny: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Mikrobiologii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel.: 32 2009 442; e-mail: malgorzata.pawlik@us.edu.pl

Większość poznanych endofitów należy do rodzajów *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Erwinia* oraz *Microbacterium* [18]. Mikroorganizmy endofityczne pochodzą z gleby pozakorzeniowej, ryzosfery i/lub ryzoplany. Potwierdzeniem tej tezy jest fakt, że niektóre bakterie izolowane z tych niszy ekologicznych mają zdolność do kolonizacji tkanek korzeni i łodyg. Endofity najliczniej zasiedlają korzenie, ich liczba może osiągnąć nawet  $10^8$  j.t.k./g świeżej masy korzenia. W mniejszych ilościach występują one w pozostałych organach roślinnych, to jest łodygach, liściach a także kwiatach i owocach [11, 34, 35].

Bakterie endofityczne dzieli się na dwie podstawowe grupy: obligatoryjne i fakultatywne [16]. Pierwsza grupa jest bardzo ściśle związana ze swoim gospodarzem, co związane jest z faktem, że bakterie te utraciły wiele cech umożliwiających im przeżycie poza rośliną. Natomiast druga grupa, endofity fakultatywne to bakterie, które rezydują wewnątrz tkanek roślinnych tylko przez pewien czas, w określonym stadium rozwojowym rośliny. Ze względu na specyficzność zajmowanej niszy ekologicznej prowadzenie hodowli endofitów w warunkach laboratoryjnych jest bardzo trudne. To powoduje, że wiedza na temat ilościowego i jakościowego składu zespołów bakterii endofitycznych roślin jest nadal niepełna. Trudność w ocenie rzeczywistej bioróżnorodności endofitów wynika, w dużej mierze, z niemożliwości izolacji i hodowli większości z tych mikroorganizmów klasycznymi metodami hodowlanymi. Przełomem w badaniach nad bioróżnorodnością zespołów mikroorganizmów endofitycznych było zastosowanie real-time PCR oraz metody DGGE, które pozwalają na charakterystykę hodowlanej i niehodowlanej frakcji tej grupy mikroorganizmów [11, 15, 20, 23, 29, 31, 36].

### 3. Kolonizacja tkanek roślinnych

Głównymi drogami wejścia endofitów do rośliny są naturalnie powstające pęknięcia epidermy korzenia głównego, miejsca powstawania korzeni bocznych, strefy wydłużania lub różnicowania korzeni, a także uszkodzenia epidermy powstałe w wyniku działania fitopatogenów. Badania wykorzystujące techniki obrazowania struktury materiału biologicznego (np. mikroskopia elektronowa, znakowanie białkiem zielonej fluorescencji) pokazują, że mikroorganizmy endofityczne najczęściej kolonizują przestrzenie międzykomórkowe i ksylem. Wewnątrz rośliny mogą się one znajdować w ściśle określonych tkankach, bądź mogą być cyklicznie transportowane przez system wiązek przewodzących lub apoplast [11, 19, 35].

Czynnikami determinującymi możliwość przenikania endofitów do roślin są aktywny ruch, chemo-

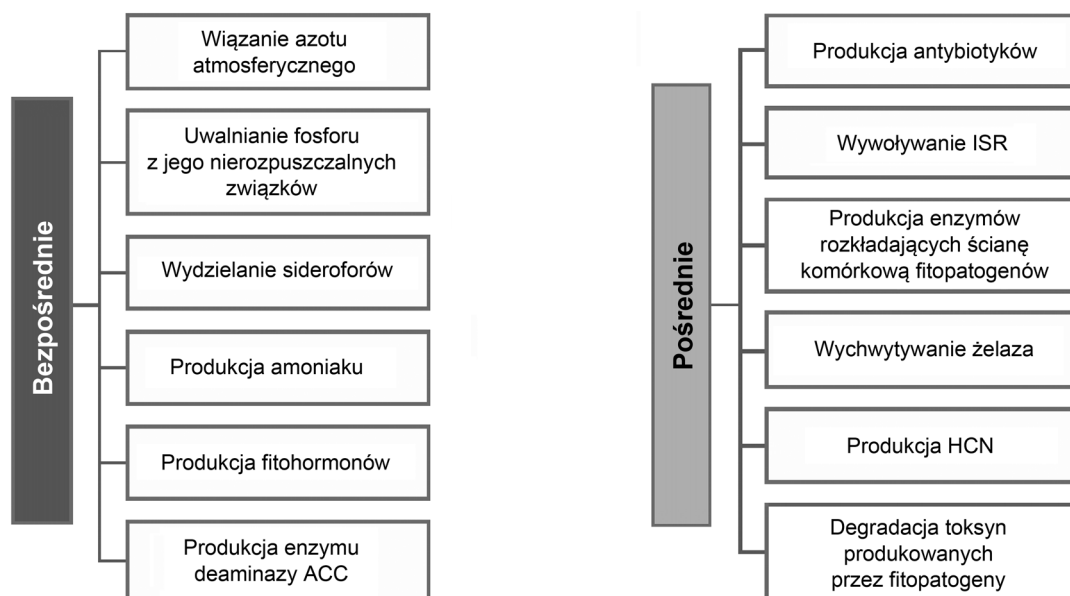
taksja oraz produkcja enzymów degradujących ściany komórek roślinnych (CWDE, Cell Wall Degrading Enzymes). Mikrobiologiczny rozkład polimerów wchodzących w skład ściany komórkowej jest złożony, a w ich degradacji uczestniczy kilka grup enzymów hydrolitycznych takich jak celulazy, glukanazy, celobiazazy, chitynazy, ksylanazy, pektynazy i poligalakturanazy [11]. Jak ważna dla endofitów jest aktywność tych enzymów potwierdzają badania Reinhold-Hurek i wsp., [37] w których wykazano, że bakterie *Azocarus* sp. BH72 z nieaktywnym genem kodującym endoglukanazy utraciły zdolność do kolonizacji roślinnego gospodarza. W odróżnieniu jednak od fitopatogenów, bakterie endofityczne wytwarzają znacznie mniej CWDE. Cechą wyróżniającą endofity jest posiadanie rzęsek, a w konsekwencji zdolność do ruchu. W badaniach nad mikroflorą pszenicy stwierdzono, że liczebność bakterii aktywnie poruszających się jest pięć razy większa wewnątrz korzeni niż w przyległej do nich ryzosferze [16, 18].

### 4. Endofity promujące wzrost roślin (PGPE)

Wśród bakterii endofitycznych od kilku lat szczególnym zainteresowaniem cieszą się tzw. endofity promujące wzrost roślin (PGPE, Plant Growth-Promoting Endophyte). Mikroorganizmy te poprzez szereg różnych mechanizmów stymulują wzrost swojego gospodarza, umożliwiają zwiększenie biomasy i poprawiają jego żywotność. Do najważniejszych mechanizmów zalicza się wiązanie azotu, produkcję fitohormonów (auksyn, giberelin, cytokinin, kwasu abscysynowego i jasmonowego), syntezę deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyowego (ACC) oraz zwiększanie biodostępności fosforu (Rys. 1). Mechanizmy potencjalnie odpowiedzialne za stymulację wzrostu roślin to również produkcja HCN, amoniaku, sideroforów kompleksujących żelazo, związków hamujących wzrost patogenów oraz biosurfaktantów [14, 25, 32, 46, 55].

Szczególne zainteresowanie skupiają na sobie bakterie produkujące fitohormony i deaminazę ACC. Auksyna (IAA) wpływa nie tylko na wzrost i rozwój rośliny, ale również na regulację odpowiedzi jej systemu odpornościowego. Co ciekawe, IAA może pełnić funkcję cząsteczki sygnałnej w procesie *quorum sensing* u bakterii uczestniczących w tworzeniu biofilmu. Fitopatogeny wytwarzają auksynę z indolilo-3-acetamidu (szlak IAM indole-3-acetamide), w odróżnieniu od bakterii symbiotycznych, u których IAA powstaje przez kwas indolilo-3-pirogronowy (szlak IPyA indole-3-pyruvate) [45, 46].

Etylen to hormon produkowany przez rośliny w warunkach narażenia jej na biotyczny i abiotyczny stres. Czynniki indukującymi jego syntezę są między



Rys. 1. Bakteryjne mechanizmy promujące wzrost roślin

innymi susza, zasolenie, powódź i/lub obecność fitopatogenów. Bakteryjna deaminaza ACC obniża u roślin stężenie prekursora etylenu, kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboxylowego, co prowadzi do zmniejszonego uwalniania samego etylenu [16, 25, 30].

## 5. Rola endofitów w fitodegradacji

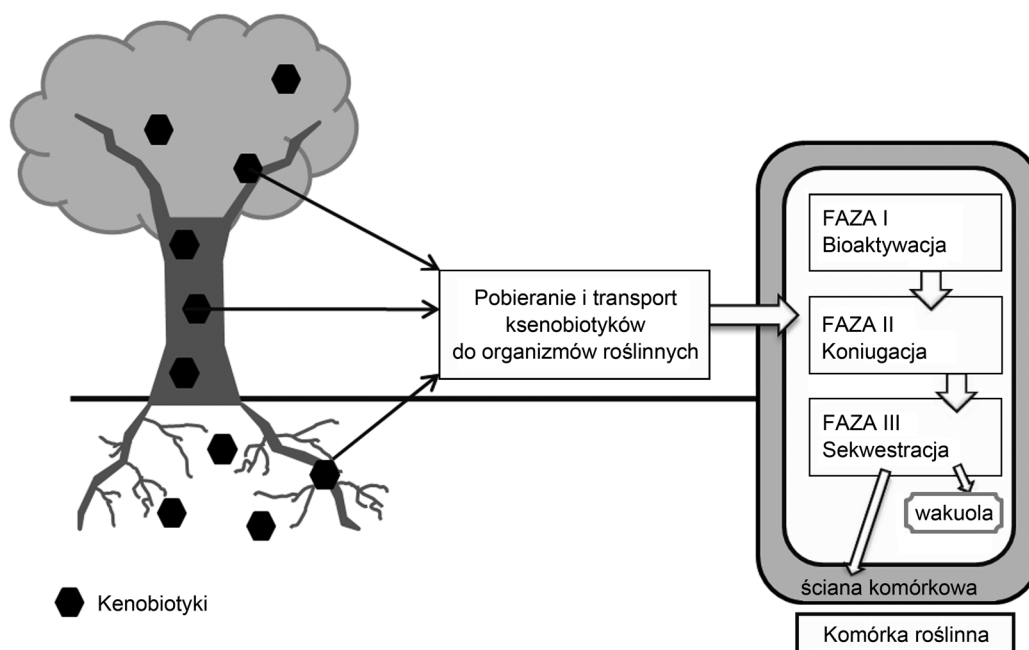
Jednym ze sposobów remediacji terenów skażonych związkami organicznymi jest fitodegradacja, która polega na wykorzystaniu roślin wyższych i towarzyszących im bakterii do degradacji szkodliwych substancji [49].

Endofity (podobnie jak bakterie ryzosferowe) uważane są za ważne narzędzia zwiększające efektywność fitodegradacji toksycznych związków organicznych. Wykorzystanie tych bakterii w procesach fitoremediacji wydaje się być szczególnie obiecujące, ponieważ wchodzi one w ścisłe interakcje ze swoim gospodarzem. Szereg właściwości bakterii endofitycznych powoduje, że w kooperacji z roślinami mogą istotnie zwiększać tempo usuwania toksycznych substancji aromatycznych ze środowiska. Zdolność endofitów do rozkładu tych związków wynika z ich ewolucyjnego przystosowania do rozkładu metabolitów roślinnych, z których wiele ma strukturę pierścieniową [21, 29, 53].

Rośliny, które są fotoautotrofami nie wykorzystują egzogennych zanieczyszczeń organicznych (ksenobiotyków) jako źródła węgla i energii, ponieważ węgiel asymilują na drodze fotosyntezy. Za pośrednictwem systemu korzeniowego roślina pobiera związki mineralne i wodę. Pobieranie ksenobiotyków przez rośliny jest koniecznym czynnikiem umożliwiającym fitodegradację i udział w tym procesie bakteryjnych endofitów. Niektóre z substancji organicznych jak

np. węglowodory to związki o dużej lipofilowości, co oznacza, że mogą łatwo absorbować na powierzchni korzeni, przenikać przez błony komórkowe i być transportowane do pozostałych części rośliny. Rośliny zazwyczaj przekształcają lipofilowe zanieczyszczenia organiczne do formy mniej toksycznej w celu ochrony wrażliwych układów enzymatycznych. Proces ten opisuje tak zwany model zielonej wątroby (ang. Green liver concept). Obejmuje on trzy podstawowe fazy: (1) bioaktywację czyli enzymatyczną modyfikację związku obniżającą jego toksyczność i/lub lipofilowość, (2) koniugację, połączenie z glutationem, cukrami lub aminokwasami w celu wytworzenia związku hydrofilowego i (3) sekwestrację/kompartmentalizację polegającą na odkładaniu zmodyfikowanego związku w wakuoli i/lub ścianie komórkowej (Rys. 2) [1]. Generalnie, model zielonej wątroby polega na włączeniu toksycznych związków organicznych w cykl przemian z wykorzystaniem szlaków podstawowego metabolizmu. W konsekwencji procesy te umożliwiają przekształcenie i zmagazynowanie w wakuoli i/lub ścianie komórkowej mniej toksycznych form tych związków. Bardzo rzadko dochodzi jednak do całkowitej mineralizacji zanieczyszczeń [21, 49, 56]. Znacząca rolę w metabolizowaniu tych ksenobiotyków mogą pełnić mikroorganizmy endofityczne, które m.in. rozkładają związki ropopochodne. Endofity zdolne do rozkładu węglowodorów wyizolowano z perzu (*Elymus angustus* oraz *Agropyron elongatum*), alternantery (*Alternanthera philoxeroides*), czosnku (*Allium macrostemon*), chryzantemy (*Dendranthema indicum*) oraz chwastnicy (*Echinochloa crusgalli*) [31, 41].

Tempo usuwania toksycznych związków organicznych z gleby można przyspieszyć poprzez inokulację roślin bakteriami endofitycznymi stymulującymi



Rys. 2. Model zielonej wątroby (Green liver concept) (objaśnienia w tekście) [1]

przyrost biomasy roślin i/lub zdolnymi do rozkładu tych związków. Ho i wsp. [17] wykazali, że inokulacja *Arabidopsis thaliana* zawieszoną endofitycznej bakterii *Achromobacter xylosoxidans* F3B umożliwiła roślinom wzrost w obecności wzrastającego stężenia związków aromatycznych. Natomiast zaszczepienie roślin endofitem *Burkholderia cepacia* FX2, poza przyrostem biomasy prowadziło także do obniżenia poziomu transpiracji toluenu, co było wynikiem biodegradacji tego związku przez szczep FX2 [48].

Niezwykle interesującym jest fakt, że rośliny terenów zanieczyszczonych posiadają zdolność do przyciągania bakterii endofitycznych degradujących toksyczne związki. Siciliano i wsp. [44] wykazali, że w tkankach korzeni kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea*) liczebność bakterii endofitycznych posiadających geny związane z rozkładem związków ropopochodnych *alkB* oraz *ndoB* była odpowiednio dwa i cztery razy większa niż w glebie pozakorzeniowej. Co więcej, liczebność bakterii endofitycznych była pozytywnie skorelowana z koncentracją węglowodorów w glebie.

## 6. Rola endofitów w fitoekstrakcji

Fitoekstrakcja polega na pobieraniu przez korzenie zanieczyszczeń metalicznych i magazynowaniu ich w częściach nadziemnych rośliny. Proces ten wykorzystuje się do oczyszczania gleb skażonych głównie metalami ciężkimi. Rośliny, które gromadzą w swoich tkankach metale w stężeniu wielokrotnie przekraczającym ich zawartość w glebie to hiperakumulatory. Niestety ich niewielkie rozmiary, powolny wzrost i nie-

wielka biomasa ogranicza możliwość ich wykorzystania w fitoekstrakcji. Dlatego obecnie poszukuje się bakterii endofitycznych, które zwiększają tolerancję roślin (niebędących hiperakumulatorami) na metale ciężkie, stymulują ich wzrost, przyrost biomasy, wpływają na pobieranie metali z gleby, ich transport oraz magazynowanie w częściach nadziemnych rośliny. Endofity izolowane z hiperakumulatorów (*Alyssum bertolonii*, *Thlaspi caerulescens*, *Thlaspi goesingense*, *Nicotiana tabacum*), ale także z roślin tolerujących wysokie stężenia metali ciężkich (metalofitów), często wykazują oporność na wysokie stężenia metali ciężkich i posiadają liczne mechanizmy promujące wzrost roślin. Wyniki niektórych badań wskazują, że endofity te redukują toksyczność metali i zmieniają ich dostępność dla roślin przez zakwaszanie środowiska, wydzielanie kwasów organicznych czy produkcję sideroforów chelatujących nie tylko żelazo, lecz także niektóre metale [34, 50].

Bakterie endofityczne ułatwiają uwalnianie metali ciężkich z niedostępnych kompleksów, zwiększając tym samym mobilizację, na przykład cynku, ołowiu lub kadmu. Wprowadzenie do gleby skażonej ołowiem metaloopornych endofitów *Pseudomonas fluorescens* G10 oraz *Microbacterium* sp. G16 spowodowało, że stężenie w glebie rozpuszczalnych form Pb zwiększyło się prawie sześciokrotnie. Co ważne, szczepy te istotnie wpływały na akumulację ołowiu w częściach nadziemnych rzepaku (*Brassica napus*), a całkowita zawartość zgromadzonego ołowiu w pędach wzrosła z 76% do 131% (*P. fluorescens* G10) i od 59% do 80% (*Microbacterium* sp. G16) w porównaniu z kontrolą traktowaną martwym inokulum [42]. *B. napus* może gromadzić w swoich tkankach także miedź. Inokulacja sadzonek

rzepaku szczepami *Ralstonia* sp. J1-22-2, *Pantoea agglomerans* Jp3-3 oraz *Pseudomonas thivervalensis* Y1-3-9, o wysokiej aktywności deaminazy ACC (213–370  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -ketomaślanu/mg·h) nie tylko zwiększała biomasę tej rośliny, ale powodowała również istotnie wyższą akumulację Cu w łodygach i liściach rzepaku w porównaniu z roślinami nieinokulowanymi [57]. Natomiast tytoń (*Nicotiana tabacum*) szczepiony kadmoopornym szczepem *Sanguibacter* sp. S\_d. zakumulował aż trzykrotnie więcej Cd w częściach nadziemnych w porównaniu z nietraktowaną kontrolą [27].

Wydajny proces fitoekstrakcji wspomagany przez endofityczne bakterie zależy nie tylko od gatunku samego mikroorganizmu, ale także od gatunku rośliny. Szczep *Bacillus* sp. SLS18 w różnym stopniu zwiększał akumulację manganu i kadmu w pędach *Sorghum bicolor* (Mn-65,2%, Cd-40%), *Phytolacca acinosa* (Mn-55,2%, Cd-31,1%), *Solanum nigrum* (Mn-16,6%, Cd-25,6%) w porównaniu do roślin nieinokulowanych [24].

Wysoka zawartość metali ciężkich w glebie jest czynnikiem stresowym dla roślin i często prowadzi do wzmożonej produkcji etylenu, co w konsekwencji skutkuje zahamowaniem wzrostu korzeni i procesu fotosyntezy. Metalotolerancyjne PGPE *Methylobacterium oryzae* CBMB20 i *Burkholderia* sp. CBMB40 zdolne do produkcji deaminazy ACC i IAA istotnie zmniejszały ilość uwalnianego przez pomidory (*Lycopersicon esculentum*) etylenu, zwiększały przyrost ich biomasy i jednocześnie redukowały toksyczny wpływ niklu i kadmu na sadzonki pomidora. Bakterie te ograniczały zdolność pomidorów do gromadzenia Ni i Cd w korzeniach i pędach. Obserwowane efekty inokulacji sadzonek pomidorów autorzy tłumaczą posiadaniem przez *M. oryzae* CBMB20 i *Burkholderia* sp. CBMB40 mechanizmów promujących wzrost roślin oraz zdolnością bakterii do akumulacji znacznych ilości jonów Ni i Cd [26].

## 7. Endofity w rolnictwie i ochronie roślin

Wraz ze zwiększającą się liczbą ludności rośnie zapotrzebowanie na produkty rolne na świecie. Sytuacja ta zmusza do poszukiwania metod zwiększających wydajność produkcji szczególnie ważnych upraw takich jak ryż, kukurydza, trzcina cukrowa, buraki cukrowe oraz pszenica. Azot jest tak zwanym pierwiastkiem plnotwórczym. Niestety, powszechnie stosowane nawożenie związkami azotowymi jest niewystarczające, gdyż aż 65% wprowadzanych do gleby mineralnych związków azotu jest tracona w wyniku parowania, wypłukiwania i/lub wiązania się z koloidami glebowymi [6].

Rozwiązaniem tego problemu wydaje się być zastosowanie szczepionek z bakterii endofitycznych zdolnych do wiązania azotu atmosferycznego i dostarczania go

roślinom uprawnym. Potwierdziły to badania Boddey i wsp. [7], którzy zaobserwowali ponad 60-procentowy wzrost zawartości azotu w roślinach inokulowanych bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny. Korzystne oddziaływanie bakterii z rodzaju *Herbaspirillum* oraz *Azospirillum*, endofitów wielu roślin, na plonowanie ważnych pod względem przemysłowym odmian ryżu basmati było opisane przez Mirza i wsp. [28]. Jednak ilość związanego i dostarczanego przez bakterie endofityczne azotu swoim roślinnym gospodarzom może się znacznie różnić. Na przykład w tkankach dzikiego ryżu (*Oryza officinalis*) inokulowanego *Herbaspirillum* sp. B501 zawartość związanego izotopu  $^{15}\text{N}$  zwiększyła się aż o 381% w stosunku do kontroli, która nie była traktowana bakteriami [13]. Natomiast kolonizacja tkanek ryżu przez *Burkholderia* sp. spowodowała zwiększenie zawartości azotu w tkankach tej rośliny o 31% [4]. Uważa się, że różnice te zależą od odmiany i stadium rozwojowego rośliny, szczepu bakterii endofitycznej, metody inokulacji i warunków środowiska.

Wyniki badań molekularnych udowadniają, że promowanie wzrostu roślin i zawartość azotu jest uzależniona od obecności u endofitów aparatu enzymatycznego warunkującego wiązanie  $\text{N}_2$ . U roślin inokulowanych dzikimi szczepami z rodzaju *Azocarus* zaobserwowano znaczący przyrost biomasy oraz wzrost zawartości azotu w tkankach w porównaniu do roślin inokulowanych mutantami z nieaktywnym genem *nif* [6].

Nie tylko endofity zdolne do wiązania azotu korzystnie wpływają na rośliny. Takie właściwości posiadają także bakterie produkujące fitohormony. Przykładowo, bakterie izolowane z korzeni buraków cukrowych (*Beta vulgaris*), zdolne do produkcji auksyny stymulowały wzrost sadzonek buraków, zwiększały ich biomasę oraz liczbę liści [43]. Khan i Doty [22] wykazali, że bakterie endofityczne izolowane ze słodkich buraków (*Ipomoea batatas*) były zdolne do kolonizacji i stymulacji wzrostu także innych gatunków roślin. Szczepy produkujące największą ilość IAA indukowały szybsze ukorzenianie się i wzrost sadzonek topoli. Inny endofit *Burkholderia phytotirmans* PsJN izolowany z cebuli jest także endofitem naturalnie występującym w tkankach ziemniaków, pomidorów oraz winorośli. U tej ostatniej rośliny obserwowano przenikanie tych bakterii przez elementy naczyń ksylemu do pozostałych tkanek [12, 39].

Występowanie bardzo ścisłego związku między endofitami a roślinami stało się podstawą ich potencjalnego wykorzystania jako środków ochrony roślin. Liczne bakterie endofityczne znane są z antagonistycznego działania wobec patogennych bakterii i grzybów. Konkuruje one o niszę ekologiczną oraz mikro i makroelementy, indukują ISR (Indukowana Odporność Systemiczna) u roślin, produkują antybiotyki lub inne związki hamujące wzrost patogenów. Ardanov i wsp. [3] wykorzystali dwa gatunki bakterii endofitycznych:

*Pseudomonas* sp. oraz *Methylobacterium* sp. jako środek ochronny w uprawie ziemniaków. Inokulacja roślin zawiesiną bakterii skutecznie chroniła uprawy przed patogenną bakterią *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* sup. *atroseptica*), która wywołuje chorobę zwaną czarną nóżką. Oba szczepy endofitów nie tylko indukowały odporność roślin, ale także promowały wzrost ich pędów. Z kolei, odporność przeciw grzybowym patogenom *Verticillium* sp. oraz *Botrytis cinerea* uzyskiwały pomidory oraz winorośl, które inokulowano endofitycznymi bakteriami *B. phytofirmans* PsJN [8, 12].

Ochronny wpływ bakterii endofitycznych *Paenibacillus xylanilyticus* YUPP-1, *Paenibacillus polymyxa* YUPP-8 oraz *Bacillus subtilis* YUPP-2 przeciwko fitopatogenom bawełny obserwowali także Yang i wsp. [51]. Wyniki doświadczeń polowych wykazały, że porażenie pleśniami było widoczne tylko u 5,2% roślin inokulowanych bakteriami endofitycznymi, podczas gdy w kontroli poziom ten wyniósł aż 33,5%.

## 8. Metabolity endofitów w medycynie

Prowadzone są także badania nad wykorzystaniem endofitów do produkcji metabolitów, które mogą być stosowane jako efektywne narzędzia do walki z chorobami ludzi, roślin i zwierząt. Szacuje się, że 51% nowo odkrytych substancji produkowanych jest przez endofity, natomiast tylko 38% przez mikroorganizmy glebowe [47]. Wśród endofitów poszukuje się bakterii, które są zdolne do produkcji nowych antybiotyków, związków przeciwnowotworowych, lotnych związków organicznych, związków przeciwgrzybiczych, antywirusowych, insektycydów oraz immunosupresantów [38].

Przykładem takiej bakterii jest *Pseudomonas viridiflava* izolowana z traw. Ten endofit ma zdolność do produkcji antygrzybiczych substancji, ekomycyn, reprezentujących nowo poznaną grupę związków należących do lipopeptydów. Hamują one rozwój patogenów człowieka takich jak *Candida albicans* oraz *Cryptococcus neoformans*. Ze względu na fakt, że aż 45% biologicznie aktywnych substancji produkowanych jest przez promieniowce, głównie *Streptomyces* sp., endofity należące do tego rodzaju są szczególnie poszukiwane. *Streptomyces* NRRL 30562, wyizolowany z czarnego pnącza (*Kennedia nigriscans*), produkuje munumbicyny A-D, peptydy o działaniu antybiotycznym oraz przeciwmalarycznym. Z kolei, 6-prenylindol produkowany przez *Streptomyces* sp. TP-A0595 wykazuje aktywność przeciwgrzybiczą, tak jak antymycyna 18 izolowana z innego szczepu *Streptomyces albidoflavus* [10, 33].

W ostatnich latach szczególnie intensywnie poszukuje się związków przeciwnowotworowych. Dobrze znany cytostatyk należący do diterpenów to taksol sto-

sowany w leczeniu nowotworów jajnika, sutka i płuc. Związek należący do tej samej grupy i o podobnych właściwościach, paklitaksol, wyizolowano z endofitycznych bakterii z rodzaju *Kitasatospora* sp. Pterocydy, naftomycina to kolejne substancje o działaniu przeciwnowotworowym produkowane przez *Streptomyces* sp.

Izolowane z roślin *Monstera* sp. endofityczne bakterie *Streptomyces* sp. MSU-2110 produkują koronamycynę, która działa przeciwmalarycznie, a w dodatku wykazuje wysoką aktywność przeciwko grzybowemu patogenowi *C. neoformans* [10, 33, 38, 47].

## 9. Produkcja bioplastiku

Poza typowo medycznym zastosowaniem substancji produkowanych przez endofity, poszukuje się także bakterii produkujących biopolimery, które mogą być wykorzystane jako bioplastiki. Lemoigne w 1926 opisał pierwszy bioplastik (poli-3-hydroksymaślan (PHB)) produkowany przez *Bacillus megaterium*. Jest to jeden z najczęściej wytwarzanych poliestrów pochodzenia bakteryjnego. Okazuje się, że w genomie wielu mikroorganizmów, w tym endofitów, można odnaleźć geny warunkujące syntezę PHB. Obecnie poszukuje się szczepów, które pozwolą zwiększyć wydajność produkcji PHB i usprawnić cały ten proces. Obiecujące badania w tym zakresie przeprowadził Catalan i wsp. [9]. Wykazały one, że *Herbaspirillum seropedicae*, diazotroficzny endofit, produkuje dużą ilość PHB podczas hodowli z wykorzystaniem różnych źródeł węgla. Badania te mogą przyczynić się do usprawnienia procesu produkcji biopolimerów i powstania nowych biomateriałów o szerokim zakresie zastosowań [38].

## 10. Podsumowanie

Mikroorganizmy endofityczne są niezwykle ważne w prawidłowym rozwoju rośliny. Bakterie te posiadają liczne mechanizmy wspomagające wzrost roślin oraz szlaki degradacyjne wielu metabolitów, często toksycznych dla roślinnych gospodarzy. Dlatego też duże nadzieje wiąże się z możliwością wykorzystania bakterii endofitycznych we wspomaganie fitoremediacji.

Opracowanie skutecznych metod wykorzystania bakterii endofitycznych i ryzosferowych w usuwaniu zanieczyszczeń jest obecnie jednym z ważniejszych nurtów badawczych w zakresie biotechnologii i mikrobiologii środowiskowej. Wydaje się, że wykorzystanie bakterii endofitycznych o określonych zdolnościach metabolicznych stwarza szansę na znaczne zwiększenie efektywności procesów fitodegradacji w usuwaniu węglowodorów z gleby. Nowo izolowane szczepy mogą stać się punktem wyjścia do dalszych badań nad endo-

fitami, ich potencjałem degradacyjnym, aktywnością w tkankach roślinnych oraz wspomaganiami remediacji zanieczyszczonego środowiska.

#### Podziękowania

Badania finansowane ze środków grantu MNiSW/NCN numer 2013/09/N/NZ9/01606.

Małgorzata Pawlik jest stypendystką w ramach projektu „DoktorIS – Program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska” współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

#### Piśmiennictwo

- Abhilash P.C., Jamil S., Singh N.: Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnol. Adv.* **27**, 474–488 (2009)
- Andreoli M., Lampis S., Poli M., Gullner G., Bir O.B., Vallini G.: Endophytic *Burkholderia fungorum* DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, **92**, 688–694 (2013)
- Ardanov P., Ovcharenko L., Zaets I., Kozyrovska N., Pirttila A.M.: Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biol. Control*, **56**, 43–49 (2011)
- Baldani V.L.D., Baldani J.L., Dobereiner J.: Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fert. Soils*, **30**, 485–491 (2000)
- Becerra-Castro C., Kidd P.S., Prieto-Fernández Á., Weyens N., Acea M.J., Vangronsveld J.: Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterization. *Plant Soil*, **340**, 413–433 (2011)
- Bhattacharjee R.B., Singh A., Mukhopadhyay S.N.: Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 199–209 (2008)
- Boddey R.M., Oliveira O.C.D., Urquiaga S., Reis V.M., Olivares F.L.D., Baldani V.L.D., Döbereiner J.: Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil*, **174**, 195–209 (1995)
- Bordiec S., Paquis S., Lacroix H., Dhondt S., AitBarka E., Kauffmann S., Jeandet P., Mazeyrat-Gourbeyre F., Clement Ch., Baillicul F., Dorey S.: Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. *J. Exp. Bot.* **62**, 595–603 (2011)
- Catalan A.I., Ferreira F., Gill P.R., Batista S.: Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZ lacY genes. *Enzyme Microb. Tech.* **40**, 1352–1367 (2007)
- Chandra S.: Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 47–59 (2012)
- Compant S., Clement Ch., Sessitsch A.: Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 669–678 (2010)
- Compant S., Kaplan H., Sessitsch A., Nowak J., AitBarka E., Clement C.: Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**, 84–93 (2008)
- Elbeltagy A.K., Sato N.T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Isawa T., Mitsui H., Minamisawa K.: Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5285–5293 (2001)
- Forchetti G., Masciarelli O., Alemanno S., Alvarez D., Abdala G.: Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 1145–1152 (2007)
- Hardoim P.R., Andreote F.D., Reinhold-Hurek B., Sessitsch A., van Overbeek L.S., van Elsas J.D.: Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**, 154–164 (2011)
- Hardoim P.R., Overbeek L.S., van Elsas J.D.: Properties of bacterial endophyte and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* **16**, 463–471 (2008)
- Ho Y.N., Mathew D.C., Hsiao Ch.H., Shih Ch.H., Chien M.F., Chiang H.M., Huang Ch.Ch.: Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. *J. Hazard. Mater.* **219–220**, 43–49, (2012)
- Hung P.Q., Kumar S.M., Govindsamy V., Annapurna K.: Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. *Biol. Fert. Soils*, **44**, 155–162 (2007)
- Hurek T., Reinhold-Hurek B., van Montagu M., Kellenberger E.: Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* **176**, 1913–1923 (1994)
- Janpen P., Kiwamu M., Kamonluck T., Nantakorn B., Neung T.: The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Appl. Soil Ecol.* **42**, 141–149 (2009)
- Khan S., Afzal M., Iqbal S., Khan Q.M.: Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, **90**, 1317–1332 (2013)
- Khan Z., Doty S.L.: Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant Soil*, **322**, 197–207 (2009)
- Kuklinsky-Sobral J., Araujo W.L., Rodrigo Mendes R., Pizzirani-Kleiner A.A., Azevedo J.L.: Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil*, **273**, 91–99 (2005)
- Luo S., Xu T., Chen L., Chen J., Rao Ch., Xiao X., Wan Y., Zeng G., Long F., Liu Ch., Liu Y.: Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1745–1753 (2012)
- 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)
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sa T.: Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*, **69**, 220–228 (2007)
- Mastretta C., Taghavi S., van der Lelie D., Mengoni A., Galardi F., Gonnelli C., Barac T., Boulet J., Weyens N., Vangronsveld J.: Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *Int. J. Phytoremediat.* **11**, 251–267 (2009)
- Mirza M.S., Rasul G., Mehnaz S., Ladha J.K., So R.B., Ali S., Malik K.A. Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice (w) The quest for nitrogen fixation in rice, red. J.K. Ladha, P.M. Reddy, International Rice Research Institute, Los Banos, 2000, s. 191–204
- Moore F.P., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C.D., Moore E.R.B.: Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 539–556 (2006)

30. Nikolic B., Schwab H., Sessitsch A.: Metagenomic analysis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene (*acdS*) operon of an uncultured bacterial endophyte colonizing *Solanum tuberosum* L. *Arch. Microbiol.* **193**, 665–676 (2011)
31. Phillips L.A., Germida J.J., Farrell R.E., Greer Ch.W.: Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 3054–3064 (2008)
32. Płociniczak T., Kukla M., Wątroba R., Piotrowska-Seget Z.: The effect of soil bioaugmentation with strains of *Pseudomonas* on Cd, Zn and Cu uptake by *Sinapis alba* L. *Chemosphere*, **9**, 1332–1337 (2013)
33. Qin S., Xing K., Jiang J.H., Xu L.H., Li W.J.: Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 457–473 (2011)
34. Rajkumar M., Ae N., Freitas H.: Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, **77**, 153–160 (2009)
35. Reinhold-Hurek B., Hurek T.: Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* **6**, 139–144 (1998)
36. Reinhold-Hurek B., Hurek T.: Living inside plants: bacterial endophyte. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 435–443 (2011)
37. Reinhold-Hurek B., Maes T., Gemmer S., van Montagu M., Hurek T.: An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 181–188 (2006)
38. Ryan R., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N.: Bacterial endophyte: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 1–9 (2008)
39. Sessitsch A., Coenye T., Sturz A.V., Vandamme P., AitBarka E., Salles J.F., van Elsas J.D., Faure D., Reiter B., Glick B.R., Wang-Pruski G., Nowak J.: *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1187–1192 (2005)
40. Sgroj V., Cassán F., Masciarelli O., Florencia M., Papa D., Lagares A., Luna V.: Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 371–381 (2009)
41. Sheng X., Chen X., He L.: Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **62**, 88–95 (2008a)
42. Sheng, X.F., Xia, J.J., Jiang, C.Y., He L.Y., Qian M.: Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ. Pollut.* **156**, 1164–1170 (2008b)
43. Shi Y., Lou K., Li Ch.: Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. *Biol. Fertil. Soils*, **45**, 645–653 (2009)
44. Siciliano S.D., Fortin N., Mihoc N., Wisse G., Labelle S., Beaumier D., Ouellette D., Roy R., Whyte L.G., Banks M.K., Schwab P., Lee K., Greer Ch.W.: Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2469–2475 (2001)
45. Spaepen A., Vanderleyden J., Remans R.: Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 425–448 (2007)
46. Taghavi S., Garafola C., Monchy S., Newman L., Hoffman A., Weyens N., Barac T., Vangronsveld J., van der Lelie D.: Genome survey and characterization of Endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 748–757 (2009)
47. Wang K., Dai Ch.Ch.: Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Ann. Microbiol.* **61**, 207–215 (2011)
48. Wang Y., Zhao W., He X., Chen J., Geng X., Xiao M.: Induction of toluene degradation and growth promotion in corn and wheat by horizontal gene transfer within endophytic bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 1051–1057 (2010)
49. Weyens N., van der Lelie D., Taghavi S., Vangronsveld J.: Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Curr. Opin. Biotech.* **20**, 248–254 (2009)
50. Xinxian L., Xuemei Ch., Yagang Ch., Woon-Chung W.J., Zebin W., Qitang W.: Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. *World J. Microbial Biotechnol.* **27**, 1197–1207. (2011)
51. Yang P., Sun Z., Liu S., Lu H., Zhou Y., Sun M.: Combining antagonistic endophytic bacteria in different growth stages of cotton for control of *Verticillium* wilt. *Crop Prot.* **47**, 17–23 (2013)
52. Ying X., Dongmei G., Judong L., Zhenyu W.: Plant-microbe interactions to improve crude oil degradation. *Energy Procedia*, **5**, 844–848 (2011)
53. Yousaf S., Afzal M., Reichenauer T.G., Brady C.L., Sessitsch A.: Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. *Environ. Pollut.* **159**, 2675–2683 (2011)
54. Yousaf S., Andria V., Reichenauer T.G., Smalla K., Sessitsch A.: Phylogenetic and functional diversity of alkane degrading bacteria associated with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and Birdfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) in a petroleum oil-contaminated environment. *J. Hazard. Mater.* **184**, 523–532 (2010)
55. Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savager K.N., Knapp R.M., McInerney M.J.: Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, **56**, 339–346 (2004)
56. Zhan X., Liang X., Xu G., Zhou L.: Influence of plant root morphology and tissue composition on phenanthrene uptake: Stepwise multiple linear regression analysis. *Environ. Pollut.* **179**, 294–300 (2013)
57. Zhang Y.F., He L.Y., Chen Z.J., Wang Q.Y., Qian M., Sheng X.F.: Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere*, **83**, 57–62 (2011)