

Małgorzata Robak, Tomasz Boruczowski, Wioletta Drożdż, Zbigniew Lazar,
Magdalena Baranowska, Dorota Prządo, Mieczysław Steininger

Zastosowanie drożdży *Yarrowia lipolytica* do bioremediacji gruntu zanieczyszczonego olejem kreozytowym

Drożdże *Yarrowia lipolytica* wykazują duże zdolności asymilacyjne w stosunku do węglowodorów i były już wykorzystywane w procesie bioremediacji gruntów zanieczyszczonych tymi substancjami [1–3]. Z uwagi na właściwości lipolityczne, były też stosowane do utylizacji odpadów rybnych i olejowych [4,5]. Mikroorganizmy te wykorzystują zanieczyszczenia węglowodorowe w charakterze źródła węgla i energii, a powstająca biomasa komórkowa oraz produkty metabolizmu (głównie kwasy organiczne, enzymy hydrolityczne i oksydoreduktazy) poprawiają strukturę gleby oraz umożliwiają rozwój innych organizmów. Wykazano, że wprowadzenie drożdży *Y. lipolytica* sprzyja ukorzenieniu roślin [6] oraz stymuluje proces kiełkowania ziaren zbóż w zanieczyszczonej glebie [7,8].

W pracy podjęto próbę zastosowania tego gatunku drożdży do wspomagania procesu oczyszczania gruntu skażonego olejem kreozytowym na terenie zakładu przetwórstwa drewna. Substancje zanieczyszczające teren zakładu pochodziły z jego podstawowej działalności, polegającej na wykorzystaniu oleju kreozytowego do impregnacji drewna. Kreozyt jest substancją płynną, otrzymywaną na bazie smoły węglowej. W jego skład wchodzi związek o charakterze węglowodorów i ich pochodnych, głównie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) [9]. Niektóre z nich charakteryzują się właściwościami mutagennymi i rakotwórczymi [10]. Dlatego też eliminacja tego typu zanieczyszczeń z gruntu jest niezwykle ważna, z uwagi na zagrożenia wynikające z ich oddziaływania na człowieka i inne organizmy żywe.

Materiały i metody

Proces oczyszczania gruntu skażonego olejem kreozytowym przeprowadzono w warunkach terenowych, stosując tzw. metodę rolniczą (landforming). Działalność degradacyjną mikroorganizmów glebowych wspomagano poprzez spulchnianie gruntu zwiększające dostępność tlenu,

a także przez jego bioaugmentację biopreparatem zawierającym drożdże z gatunku *Yarrowia lipolytica* (A-101). Wstępne badania wykazały, że mikroorganizmy te skutecznie rozkładają olej kreozytowy [11]. Doświadczenia przeprowadzono na terenie wybranego zakładu przetwórstwa drewna. Pole A (pow. ok. 0,12 ha) objęte bioremediacją zostało wybrane na podstawie analizy zawartości zanieczyszczeń węglowodorowych w sześciu próbkach gruntu pobranych na jego terenie.

Szczep *Y. lipolytica* (A-101), użyty do bioaugmentacji gruntu, pochodził z kolekcji kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Hodowlę mikroorganizmów oraz ich namnażanie w bioreaktorze przeprowadzono metodą opisaną w pracy [8]. Biopreparat przygotowano w postaci zawiesiny lub unieruchomionych komórek. Całość hodowli (płyn po hodowli i biomase) wykorzystano w postaci zawiesiny rozprowadzonej na powierzchni gruntu. Do unieruchomienia komórek drożdży zastosowano alginian sodu i skrobię. W pierwszym przypadku przygotowano 10 dm³ granulek i nitek alginianowych (GA), a w drugim 10 dm³ granulek skrobiowych (GS) (rys. 1). Szczegóły dotyczące sposobu otrzymywania biopreparatu GA opisano w pracy [8], a biopreparat GS otrzymano wg procedury dotyczącej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* opisanej w pracy [12].

Pole A poddano mechanicznemu spulchnieniu, a następnie podzielono na 24 bruzdy o głębokości 30÷50 cm. Do bruzd o numerach 1–9 wprowadzono preparat drożdży unieruchomionych przy pomocy alginianu sodu (GA), a do bruzd o numerach 13–22 preparat drożdży unieruchomionych przy pomocy skrobi (GS). Bruzdy o numerach 10–12 stanowiły próbkę kontrolną I, a bruzdy o numerach 23 i 24 – próbkę kontrolną II. Do bruzd kontrolnych nie wprowadzono preparatów drożdżowych. Po 10 d od wprowadzenia preparatów unieruchomionych komórek drożdży na pole A, powierzchniowo wprowadzono dodatkowo zawiesiny drożdży. Łącznie na pole A wprowadzono 2·10¹² komórek drożdży (238 g w przeliczeniu na suchą masę – tab. 1).

Z uwagi na brak norm dotyczących zasad pobierania próbek gruntu do badań chemicznych i mikrobiologicznych (w normie [13] jest jedynie rozdział o kategoryzacji próbek gruntu, a w normie [14] są podane zasady badania próbek gruntów budowlanych), w celu ujednoczenia próbek z pola A z każdej bruzdy na głębokości 30÷50 cm co 1,5 m pobrano glebę 6÷7-krotnie, starannie wymieszano i następnie pobrano próbkę reprezentatywną o objętości 0,75 dm³. Próbkę oznaczono numerami bruzd, a następnie przekazano do pracowni mikrobiologicznej w Katedrze Biotechnologii

Dr hab. M. Robak, mgr inż. Z. Lazar, mgr inż. M. Baranowska: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, ul. C.K. Norwida 25, 50–375 Wrocław malgorzata.robak@up.wroc.pl

Dr inż. T. Boruczowski, dr inż. W. Drożdż: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Technologii Rolnej i Przechowywania, ul. C.K. Norwida 25, 50–375 Wrocław

Dr inż. D. Prządo: Laboratorium Analiz Środowiskowych DM, ul. Polna 8a, 55–011 Siechnice

Dr inż. M. Steininger: Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Zakład Chemii i Technologii Paliw, Wybrzeże S. Wyspiańskiego 27, 50–370 Wrocław

Tabela 1. Charakterystyka drożdży *Y. lipolytica*
Table 1. Characteristics of the yeasts *Y. lipolytica*

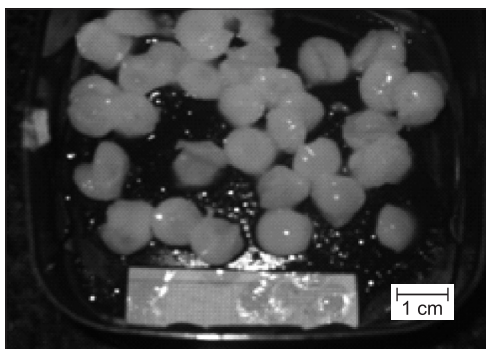
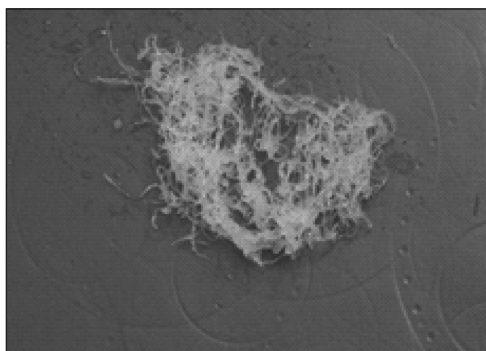
Bruzda	Drożdże unieruchomione			Zawiesiny drożdży		
	objętość dm ³	liczba komórek	biomasa g	objętość dm ³	liczba komórek	biomasa g
1–9	10 (GA)	10 ¹²	87	2,5	2,45·10 ¹⁰	32
13–22	10 (GS)	10 ¹²	87	2,5	2,45·10 ¹⁰	32
10–12 (próbka kontrolna I)	0	0	0	0	0	0
23–24 (próbka kontrolna II)	0	0	0	0	0	0

GA – granulki i nitki alginianowe, GS – granulki skrobiowe

Tabela 2. Liczba drobnoustrojów w gruncie
Table 2. Number of microorganisms in the soil samples

Bruzda (biopreparat)	Ogólna liczba bakterii jtk/g·10 ⁶			Liczba drożdży i pleśni jtk/g·10 ⁴		
	VII 2008	X 2008	IV 2009	VII 2008	X 2008	IV 2009
1–9 (GA)	7,48	4,12	2,24	4,46	4,96	16,6
10–12 (próbka kontrolna I)	8,12	4,13	1,50	4,02	2,33	17,9
13–22 (GS)	8,96	9,86	4,15	4,59	3,46	22,12
23–24 (próbka kontrolna II)	12,75	4,46	1,48	2,40	4,15	14,58

GA – granulki i nitki alginianowe, GS – granulki skrobiowe



Rys. 1. Preparaty immobilizowanych drożdży
Fig. 1. Preparations of immobilized yeasts

i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Próbkę do analiz chemicznych, w stanie powietrzno-suchym (po 2÷3 tyg.), zostały przekazane do Laboratorium Analiz Środowiskowych DM w Siechnicach.

Ogólną liczbę drobnoustrojów oznaczono metodą posiewu powierzchniowego na agar odżywczy, a drożdży i pleśni – na agar ziemniaczany z oksytetracykliną [15]. Liczbę drobnoustrojów w 1 g gruntu podano jako jednostki tworzące kolonie (jtk). Do izolacji i identyfikacji drożdży zastosowano odpowiednie podłoża hodowlane (YPG, MMT z heksadekanem i podłożo do produkcji cytrynianu) [16]. Oznaczenia przynależności taksonomicznej autochtonicznych szczepów drożdży dokonano testem API 32C, zgodnie z procedurą podaną przez producenta (bioMérieux, Francja).

Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w gruncie oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC FD) wg polskiej i europejskiej normy [19]. Sumaryczną zawartość węglowodorów ropopochodnych (TPH) w glebie oznaczano metodą chromatografii gazowej wg norm [19, 20]. Przed przystąpieniem do oznaczeń, 10 g gruntu powietrzno-suchego ekstrahowano 10 cm³ pentanu, ekstrakt przefiltrowano, 1 cm³ klarownego ekstraktu wysuszonego i następnie rozpuszczono w 1 cm³ acetonitrylu.

Wyniki badań

Początkowa liczba mikroorganizmów zasiedlających zanieczyszczony grunt była zróżnicowana w poszczególnych brzdach (tab. 2). Najwięcej bakterii wykryto w brzdach kontrolnych (12,75·10⁶ jtk/g). Liczba grzybów była zbliżona (brzdy 1–22), wyjątek stanowiła próbka kontrolna II (brzdy 22–24), gdzie była ona prawie dwukrotnie mniejsza niż w pozostałych. Przed wprowadzeniem biopreparatów dokonano oznaczenia przynależności taksonomicznej szczepów drożdży wchodzących w skład mikroflory autochtonicznej gleby. Z siedmiu izolatów pozyskanych z badanego terenu, w pięciu przypadkach zidentyfikowano drożdże z gatunku *Yarrowia lipolytica*/*Candida lipolytica* (tab. 3).

Tabela 3. Drożdże naturalnie występujące w gruncie
Table 3. Yeast species naturally occurring in the soil samples

Oznaczenie szczepu	Gatunek	Identyfikacja API 32C
2	<i>Cryptococcus albidus</i>	doskonała
21/I	<i>Candida lipolytica</i> *	doskonała
21/II	<i>Candida lipolytica</i> *	doskonała
24/I	<i>Rhodotorula glutinis</i>	małe rozróżnienie
24/II	<i>Candida lipolytica</i> *	doskonała
24/III	<i>Candida lipolytica</i> *	doskonała
24/IV	<i>Candida lipolytica</i> *	doskonała

*Nazwa gatunkowa amorficznej postaci drożdży *Y. lipolytica* [17, 18]

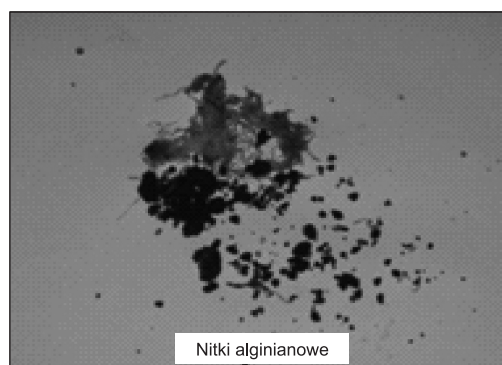
Po trzech miesiącach bioremediacji (w październiku 2008 r.), zanotowano 2÷3-krotne zmniejszenie liczby bakterii w gruncie, z wyjątkiem próbek pochodzących z bruzd zaszczerpionych drożdżami unieruchomionymi za pomocą skrobi (GS), które zawierały większą liczbę bakterii niż przed wprowadzeniem biopreparatów. Przyczyny namnażania bakterii autochtonicznych gruntu należy upatrywać w wykorzystaniu przez nie skrobi w charakterze substratu pokarmowego. Najmniejszą liczbę bakterii wykryto w gruncie zaszczerpionym drożdżami unieruchomionymi za pomocą alginianu sodu (GA) oraz w bruzdach kontrolnych. Po zakończeniu procesu bioremediacji zaobserwowano wyraźną zmianę liczby bakterii i grzybów w oczyszczonym gruncie. W próbkach pobranych po 9 miesiącach (w kwietniu 2009 r.), stwierdzono mniejszą (2÷9-krotnie) liczbę bakterii oraz większą (4÷6-krotnie) liczbę drożdży i pleśni, w porównaniu do liczby bakterii, wzrosła nawet 10÷35-krotnie. Zwiększyła się też proporcja liczby drożdży do bakterii (tab. 4), co może świadczyć o poprawie struktury gleby.

Tabela 4. Stosunek liczby drożdży do liczby bakterii w gruncie
Table 4. Proportion between the number of yeasts and the number of bacteria in the soil

Bruzda (biopreparat)	Liczba drożdży:liczba bakterii		
	VII 2008	X 2008	IV 2009
1–9 (GA)	1:190	1:80	1:13
10–12 (pr. kontrolna I)	1:200	1:200	1:8
13–22 (GS)	1:180	1:330	1:18
23–24 (pr. kontrolna II)	1:640	1:110	1:10

W toku procesu oczyszczania dokonano także oznaczenia trwałości biopreparatów w gruncie oraz żywotności zawartych w nich drożdży. Badania polegały na separacji granulek z gruntu i ich posiewie na standardowe podłoża mikrobiologiczne. Odszukano granulki biopreparatu GA zawierające drożdże *Y. lipolytica* unieruchomione za pomocą alginianu sodu i wykazano ich żywotność (rys. 2). Pomimo zdecydowanie większych rozmiarów nie udało się ich odszukać w żadnej z bruzd biopreparatu GS zawierającego drożdże unieruchomione za pomocą skrobi (rys. 1), która została najprawdopodobniej zdegradowana na drodze hydrolizy.

Przebieg procesu oczyszczania gruntu monitorowano w oparciu o analizę całkowitej zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (TPH) oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). Wyniki analiz przed i po



Rys. 2. Żywe unieruchomione drożdże *Y. lipolytica* w bruzdzie 1 po 10 d od ich wprowadzenia

Fig. 2. Living immobilized *Y. lipolytica* yeasts in furrow No. 1 after 10 days following their introduction into the soil

bioremediacji podano odpowiednio w tabelach 5 i 6. Początkowa zawartość zanieczyszczeń ropopochodnych w gruncie (w przeliczeniu na suchą masę) była zbliżona we wszystkich bruzdach i mieściła się w zakresie 400÷484 mg/kg. Problematyczne okazały się wyniki analiz gruntu dokonanych po bioremediacji. Mimo zastosowania ujednoliconej metody poboru próbek do analizy chromatograficznej, wyniki badań były bardzo zróżnicowane. Dotyczyło to zarówno bruzd kontrolnych, jak i zaszczerpionych biopreparatem drożdżowym. W porównaniu do próbek pobranych w lipcu 2008 r., zawartość zanieczyszczeń zmalała we wszystkich bruzdach. W bruzdach kontrolnych zanotowano bardzo różny ubytek, w zależności od położenia bruzd – w bruzdach 10–12 o początkowym mniejszym zanieczyszczeniu ubytek wyniósł 41,5%, natomiast bardziej zanieczyszczone

Tabela 5. Zawartość węglowodorów ropopochodnych (TPH) w gruncie

Table 5. Total petroleum hydrocarbon content of the soil samples

Bruzda (biopreparat)	THP, mg/kg		
	VII 2008	X 2008	IV 2009
1–9 (GA)	476,1 ±159,2	948,7 ±862,9	299,5 ±244,0
6–9 (GA)	400,1 ±5,69	322,7 ±158,1	199,7 ±232,04
7–9 (GA)	400,0 ±6,97	249,3 ±72,3	117 ±199,45
10–12 (pr. kontrolna I)	424,6 ±77,43	288,6 ±55,4	248,2 ±213,73
13–22 (GS)	484,3 ±48,0	291,0 ±87,8	414,4 ±70,73
23–24 (pr. kontrolna II)	481,5 ±6,78	241,8 ±32,3	428,5 ±34,29
Cały obszar (średnia)	461,0	522,2	351,5

GA – granulki i nitki alginianowe, GS – granulki skrobiowe

Tabela 6. Zawartość WWA w gruncie
Table 6. PAH content of the soil samples

WWA	Miesiąc rok	WWA, mg/kg															
		próbką kontrolna I															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	średnia			
Naftalen	X 2008	571,6	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	47,70
	IV 2009	<0,005	<0,005	2,12	2,42	<0,005	1,70	0,86	1	1,23	1,03	0,54	1,32	1,02			
Acenaftylen	X 2008	1112,1	23,65	0,63	3,02	6,21	0,87	0,66	0,52	0,56	0,70	0,77	0,58	95,86			
	IV 2009	3,27	3,99	2,48	4,3	3,04	1,61	1,22	1,32	1,6	1,3	0,94	1,87	2,25			
Acenaftalen	X 2008	1694,6	93,36	3,89	21,98	18,74	6,46	3,85	2,42	4,02	7,56	7,60	5,92	155,87			
	IV 2009	8,83	7,28	4,22	11,23	6,35	3,01	2,72	3,26	<0,005	2,13	1,07	3,64	4,48			
Fluoren	X 2008	424,4	12,98	0,48	2,25	2,01	0,71	0,27	0,001	0,20	0,75	0,72	0,53	37,11			
	IV 2009	0,29	1,06	0,13	0,5	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,22	<0,001	<0,001	0,18			
Fenantren	X 2008	15,6	10,64	0,70	1,90	1,32	0,77	0,47	0,28	0,38	0,17	0,11	0,66	2,75			
	IV 2009	1,27	2,61	0,75	1,52	0,87	0,48	0,35	0,26	0,47	0,61	0,28	0,79	0,86			
Antracen	X 2008	0,008	0,04	0,003	0,011	0,005	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003	0,001	0,007			
	IV 2009	43,54	53,74	9,51	40,59	18,61	7,65	3,4	2,45	5,34	7,09	2,4	5,74	16,67			
Fluoranten	X 2008	315,3	300,9	21,53	78,29	44,13	20,20	11,90	11,14	11,34	21,49	32,72	16,84	73,82			
	IV 2009	15,02	20,66	8,49	15,18	11,63	4,41	3,67	3,12	4,63	2,98	3,35	6,35	8,29			
Benzo(a)antracen	X 2008	9,27	106,2	12,50	42,58	26,68	13,51	6,56	6,13	4,71	11,12	11,77	8,49	21,63			
	IV 2009	38,62	41,06	22,88	34,20	35,29	13,66	8,96	8,78	13,74	8,59	7,01	14,1	17,40			
Chryzen	X 2008	4,05	0,03	22,97	72,80	47,69	23,15	10,61	6,80	8,58	16,32	14,81	12,13	20,00			
	IV 2009	107,73	121,91	43,23	95,22	82,35	33,09	15,56	13,13	21,91	14,99	10,69	19,31	48,26			
Benzo(k)fluoranten	X 2008	6,14	51,02	8,65	27,35	19,49	10,64	2,98	5,47	3,64	9,76	8,18	7,38	13,39			
	IV 2009	16,40	18,41	13,70	21,71	20,64	10,21	5,91	5,25	7,7	6,45	6,85	9,40	11,89			
Benzo(a)piren	X 2008	9,79	119,92	21,14	66,14	47,35	25,53	8,80	13,59	9,95	24,25	20,01	17,86	32,03			
	IV 2009	36,59	40,48	30,12	46,36	45,15	20,06	12,96	10,89	16,67	13,33	11,98	16,16	25,06			
Benzo(g,h,i)perylene	X 2008	6,80	37,95	0,001	20,45	17,20	10,37	4,43	6,07	5,22	10,43	8,60	8,37	11,32			
	IV 2009	<0,001	10,47	7,08	11,37	10,74	6,08	4,71	4,14	6,35	6,53	8,75	8,94	7,10			
Indeno(1,2,3-c,d)piren	X 2008	1,57	7,32	1,52	3,48	0,34	2,03	0,43	1,23	0,48	2,12	1,80	1,64	2,00			
	IV 2009	6,41	7,57	5,92	8,84	8,69	4,35	3,12	2,74	3,97	4,13	6,49	6,65	5,74			
Suma WWA	X 2008	4220,5	1041,8	131,1	460,3	314,0	158,0	71,3	76,9	68,6	146,3	148,8	111,2	579,07			
	IV 2009	352,3	407,6	204,4	370,6	320,3	142,4	88,2	78,2	116,45	95,4	88,6	122,1	198,08			

bruzdy zostały oczyszczone w mniejszym stopniu – uzyskano ubytek zaledwie 11% zanieczyszczeń. Zastosowanie biopreparatu GS w pobliskich bruzdach o znacznym początkowym zanieczyszczeniu praktycznie nie przyniosło pożądanych skutków, ubytek wyniósł 14% i był tylko o 4 punkty procentowe lepszy niż w sąsiadującej bruzdzie kontrolnej. Rezultaty uzyskane w przypadku bruzd wspomnianych biopreparatem GA były zróżnicowane. Skuteczność rozkładu zanieczyszczeń była niewielka w bruzdach 1–6, gdzie ubytek był zbliżony do bruzd kontrolnych (śr. 43,6%), jedynie w bruzdach 7–9 zanotowano znaczący ubytek zanieczyszczeń ropopochodnych, który wyniósł aż 70,8%.

Podobne problemy wystąpiły także przy ocenie ubytku WWA w poszczególnych bruzdach. Wyraźny ubytek WWA zanotowano jedynie w bruzdach 1 i 2 zaszczepionych preparatem GA, gdzie początkowe zanieczyszczenie gruntu było wielokrotnie większe niż po bioremediacji. W pozostałych bruzdach ubytek był niewielki (bruzdy 4 i 6), a w niektórych oznaczona zawartość WWA po bioremediacji była większa niż początkowa (bruzdy 3 i 5). Dotyczyło to bruzd, w których ubytek zanieczyszczeń ropopochodnych był największy, co może oznaczać, że obecne w gruncie węglowodory bardziej podatne na rozkład mikrobiologiczny niż WWA w pierwszej kolejności uległy degradacji. Analiza zawartości poszczególnych WWA w gruncie wykazała, że w próbkach pobranych przed wprowadzeniem drożdży (lipiec 2008 r.) w podwyższonej ilości występowały antracen, fluoranten, chryzen, benzo(a)antracen i benzo(g,h,i)perylen. W październiku 2008 r., w ilości ponad 50 mg/kg, występowały naftalen, acenaftylen, acenaftalen, fluoren, fluoranten, benzo(a)antracen, chryzen, benzo(k)fluoranten i benzo(a)piren. Sumaryczne zanieczyszczenie gruntu WWA przekroczyło 250 mg/kg w bruzdach 1–5. W kwietniu 2009 r., w ilości powyżej 50 mg/kg, wykryto w gruncie jedynie dwa związki – antracen (bruzda 2) i chryzen (bruzdy 1, 2, 4 i 5), a suma WWA przekroczyła 250 mg/kg w bruzdach 1, 2, 4 i 5 (tab. 6).

Dyskusja wyników

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie drożdży do wspomaganie procesu bioremediacji gruntu zanieczyszczonego olejem kreozotowym może zwiększyć skuteczność oczyszczania. Na terenie badanego zakładu w czasie 9 miesięcy (od lipca 2008 r. do kwietnia 2009 r.) doszło do zmniejszenia ilości zanieczyszczeń w gruncie (mierzonych jako TPH) w 19 z 24 bruzd. Zmniejszenie ilości zanieczyszczeń wynosiło od 11% do 70%. Największy ubytek odnotowano w bruzdach zaszczepionych biopreparatem zawierającym drożdże unieruchomione za pomocą alginianu sodu. Zastosowanie skrobi do tego celu okazało się mało przydatne. W bruzdach zaszczepionych biopreparatem GS ubytek zanieczyszczeń wyniósł 14% (o 4 pkt. proc. lepszy niż w sąsiadującej bruzdzie kontrolnej). Należałoby się jednak zastanowić, czy początkowa zawartość oleju kreozotowego w gruncie nie była zbyt duża i toksyczna dla drożdży. Sugestię tę może potwierdzać mała skuteczność oczyszczania uzyskana w sąsiadujących bruzdach kontrolnych (23–24), gdzie początkowe zanieczyszczenie było także duże. Celowe wydaje się powtórzenie eksperymentu na gruncie o mniejszej zawartości zanieczyszczeń.

Widoczne zmniejszenie stopnia zanieczyszczenia bruzd kontrolnych 10–12 było wynikiem zabiegów agrotechnicznych, które wpłynęły na poprawę natlenienia gruntu

i stymulowały rozwój mikroorganizmów. Ubytek oleju kreozotowego we wszystkich bruzdach nastąpił nie tylko z uwagi na działalność mikroorganizmów, ale także innych czynników natury fizyczno-chemicznej. Wiele toksycznych substancji znajdujących się w powierzchniowej warstwie gruntu, ekspozowanej na działanie światła, podlegało rozkładowi fotochemicznemu. Stwierdzono, że fotodegradacja w głównej mierze przyczynia się do rozpadu DDT (dichlorodifenylotrichloroetan) [21]. Na ubytek niektórych substancji w gruncie mogły wpłynąć także zabiegi agrotechniczne uwalniające lotne składniki zanieczyszczeń.

Profil rozdziału chromatograficznego obserwowany podczas analizy węglowodorów ropopochodnych wskazuje, że zanieczyszczenie badanego gruntu stanowiły głównie WWA. Dopuszczalna sumaryczna zawartość tych związków w gruncie tej grupy wynosi 250 mg/kg, a ilość poszczególnych związków nie może przekraczać 50 mg/kg [22]. Przed bioremediacją wykazano podwyższoną zawartość pięciu WWA, a w trakcie jej trwania – nawet dziewięciu. Dziewięć miesięcy później (kwiecień 2009 r.) jedynie dwa związki – antracen (bruzda 2) oraz chryzen (bruzdy 1, 2, 4 i 5) wykryto w ilości większej niż dopuszczalna. Sumaryczna dopuszczalna zawartość WWA została przekroczona w czterech bruzdach (1, 2, 4 i 5), chociaż ogólnie stwierdzono ponad 200-krotny ubytek fluorenu, 40-krotny ubytek naftalenu, acenaftylenu i acenaftalenu, prawie 10-krotny fluorantenu oraz kilkukrotny fenantrenu i benzo(g,h,i)perylen. Prawdopodobnie właśnie te WWA były metabolizowane przez mikroorganizmy w pierwszej kolejności [23]. Bez zmian pozostała ilość benzo(a)antracenu, benzo(k)fluorantenu oraz benzo(a)pirenu. Wszystkie te związki należą do mutagennych i kancerogennych, a ostatni – benzo(a)piren jest podstawowym wskaźnikiem kancerogenności i toksyczności gruntu [24]. Dwu- a nawet trzykrotnie zwiększyła się ilość chryzenu i indeno(1,2,3-c,d)pirenu w gruncie po bioremediacji, co mogło być wynikiem miejscowej desorpcji. Zdecydowanie natomiast przybyło antracenu (ponad 2000-krotnie), co było trudne do wyjaśnienia. Antracen stanowił 20÷40% składu WWA [10], a pod wpływem promieni nadfioletowych ulega dimeryzacji do trudniej rozkładanej postaci. Związki z grupy WWA są trudno rozpuszczalne w wodzie i w glebie podlegają adsorpcji, głównie przez kwasy huminowe [22]. Czas półtrwania cztero- i pięciopierścieniowych związków WWA wynosi ponad 6 miesięcy, a szybkość rozkładu zanieczyszczeń w gruncie zależy od wielu czynników [21, 25]. Ogólnie można przyjąć, że szybkość biodegradacji zależy od obecności organizmów zdolnych do rozkładu danych substancji, temperatury, wilgotności gleby, stanu jej natlenienia, podaży niezbędnych składników pokarmowych oraz obecności antymetabolitów w gruncie. Największe znaczenie mają mikroorganizmy, których ilość w gruncie jest zmienna i zależy od pory roku, temperatury, ilości opadów oraz struktury gruntu [26]. Po opadach atmosferycznych liczba drobnoustrojów może zmienić się nawet 10÷100-krotnie. Efekt taki zanotowano w przypadku badań prowadzonych w Bornym Sulnowie [27].

Analiza mikrobiologiczna gruntu po procesie bioremediacji wspomaganie drożdżami wykazała, że wprowadzenie unieruchomionej biomasy drożdży *Y. lipolytica* wzbogaciło mikroflorę gruntu oraz spowodowało wzrost ilości drożdży i pleśni. Poprawiła się proporcja pomiędzy liczbą drożdży i pleśni a liczbą bakterii (wzrosła 10÷35-krotnie). Najbardziej niekorzystne proporcje pomiędzy tymi drobnoustrojami zaobserwowano w bruzdach przed bioremediacją

(1:200÷1:640), a najlepsze po bioremediacji (1:8÷1:18). W poziomie akumulacyjnym gleb uprawnych (poza strefą korzeni) drożdże i grzyby strzępkowe stanowią około połowy mikroflory [26]. Zatem w gruncie z badanego terenu, pomimo zdecydowanej poprawy proporcji pomiędzy tymi drobnoustrojami, było jeszcze zbyt mało drobnoustrojów eukariotycznych (drożdży i pleśni). Szczepionki bakteryjne stosowane do wspomagania oczyszczania gruntu [27–35] nie poprawiają tych proporcji. Szanse takie dają jedynie biopreparaty zawierające drobnoustroje eukariotyczne. Zastosowanie gatunku *Y. lipolytica* jest bezpieczne dla człowieka i środowiska. Gatunek ten nie jest patogenny dla człowieka [36]. Ponadto w składzie jakościowym mikroflory badanego terenu wykryto obecność autochtonicznych szczepów należących do tego gatunku. Obok szczepów gatunku *Y. lipolytica* wyizolowano i zidentyfikowano także drożdże *Rhodotorula glutinis* oraz *Cryptococcus albidus*. Bioremediacja z udziałem drożdży jest metodą innowacyjną [37], a biopreparaty drożdżowe mogą być wprowadzane do gleby w postaci zawiesiny albo immobilizowane na różnych nośnikach [8, 37]. Takie unieruchomienie sprzyja dłuższemu utrzymywaniu się komórek w miejscu wprowadzenia oraz zmniejsza podatność na wyflukiwanie i przemieszczanie komórek drożdży. Wcześniej wykazano, że granulki alginianowe zawierające drożdże nie zmieniają kształtu i swoich właściwości nawet po pięciu miesiącach przebywania w gruncie [8]. Badania wykazały, że zastosowanie skrobi do unieruchomienia drożdży nie dało pożądanego skutku z uwagi na rozwój mikroorganizmów, głównie bakterii, wykorzystujących skrobię w charakterze substratu pokarmowego.

Należy stwierdzić, że możliwe jest zastosowanie metod biologicznych do usuwania oleju kreozytowego z gruntu. Skuteczność rozkładu zanieczyszczeń była zróżnicowana i zależała od bardzo wielu czynników fizyczno-chemicznych i biologicznych. Zbyt duża początkowa zawartość zanieczyszczeń w gruncie może okazać się toksyczna dla mikroorganizmów i hamować proces rozkładu. Wprowadzenie biopreparatów na bazie drożdży może przyspieszyć proces oczyszczania gruntu. Wydaje się, że celowe jest zastosowanie do tego komórek drożdży unieruchomionych za pomocą alginianu sodu. Wprawdzie wyniki uzyskane w bruzdach wspomaganych biopreparatem alginianowym były zróżnicowane, ale w większości przypadków lepsze w porównaniu do próbek kontrolnych. Preparat ten chronił drożdże przed toksycznym oddziaływaniem zanieczyszczeń, jednocześnie umożliwiając ich wykorzystanie w charakterze substratu pokarmowego. Zastosowanie biopreparatu skrobiowego praktycznie nie przyniosło pożądanego skutku. Brak jednoznaczności uzyskanych wyników badań zachęca do ich kontynuacji w celu wyjaśnienia powstałych wątpliwości.

Wnioski

♦ Wykazano, że możliwe jest zastosowanie metod biologicznych do usuwania oleju kreozytowego z gruntu. Proces bioremediacji prowadzony przez 9 miesięcy przyczynił się do znacznego zmniejszenia ilości węglowodorów ropopochodnych w zanieczyszczonym gruncie.

♦ Biopreparaty zawierające drożdże *Y. lipolytica* mogą przyspieszyć proces oczyszczania gruntu zawierającego olej kreozytowy. Dobrą skuteczność uzyskano stosując do tego celu komórki drożdży unieruchomione za pomocą alginianu sodu, przy czym drożdże unieruchomione za pomocą skrobi nie stymulowały procesu oczyszczania.

♦ Skuteczność procesu oczyszczania gruntu była bardzo zróżnicowana w poszczególnych bruzdach, lecz uzyskane wyniki nie były jednoznaczne.

♦ Wprowadzenie unieruchomionej biomasy drożdży *Y. lipolytica* wzbogaciło eukariotyczną mikroflorę gruntu, poprawiając stosunek liczby bakterii do liczby drożdży i pleśni.

♦ Z gruntu poddanego procesowi oczyszczania, obok szczepów gatunku *Y. lipolytica*, wyizolowano i zidentyfikowano także drożdże *Rhodotorula glutinis* oraz *Cryptococcus albidus*.

Badania zostały sfinansowane przez wybrany zakład przetwórstwa drewna (um. 27/6-T/2008).

LITERATURA

1. B. ŻOGAŁA, M. ROBAK, R. DUBIEL, M.W. ZUBEREK, M. STEININGER, K. WZIENTEK: Geoelectrical methods for detection of oil contaminations in soils and bioremediation process monitoring. Conf. proc. "Expanding Horizons for Near-Surface Geophysics", SAGEEP, Worthington (USA) 2009, pp. 348–362.
2. E. BOGUSŁAWSKA-WAŚ, K. CZESZEJKO, A. BARTKOWIAK, W. DĄBROWSKI, A. MICHNIEWICZ, K. SZAMETO: Degradation of petroleum-derived hydrocarbons by alginate-immobilized cells of *Candida lipolytica*. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Biotechnology* 2005, Vol. 8, No. 3, # 31.
3. Ł. CHRZANOWSKI, K. BIELICKA-DASZKIEWICZ, M. OWSIANIAK, A. AURACH, E. KACZOREK, A. OLSZANOWSKI: Phenol and n-alkanes (C12 and C16) utilization: influence on yeast cell surface hydrophobicity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2008, Vol. 24, pp. 1943–1949.
4. Y. YANO, H. OIKAWA, M. SATORI: Reduction of lipids in fish meal prepared from fish waste by a yeast *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Food Microbiology* 2008, Vol. 121, pp. 302–307.
5. C. GONÇALVES, M. LOPES, J.P. FERREIRA, I. BELO: Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology* 2009, Vol. 100, pp. 3759–3763.
6. N. VASSILEV, M. VASSILEVA, R. AZCON, A. MEDINA: Interactions of an arbuscular mycorrhizal fungus with free or co-encapsulated cells of *Rhizobium trifoli* and *Yarrowia lipolytica* inoculated into soil-plant system. *Biotechnology Letters* 2001(a), Vol. 23, pp. 149–151.
7. N. VASSILEV, M. VASSILEVA, R. AZCON, A. MEDINA: Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in soil-plant system. *Journal of Biotechnology* 2001(b), Vol. 91, pp. 237–242.
8. A. KOWALCZYK, M. MICHNIEWICZ, M. ROBAK: Bioremediacja z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica*: trwałość unieruchomionych komórek oraz ich wpływ na autochtoniczną mikroflorę gleby i kiełkowanie owsa. *Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia* 2009, vol. 8, nr 3, ss. 15–23.
9. Karta charakterystyki preparatu niebezpiecznego: Olej napędowy wg PN-EN 590.
10. F.J.C. ROE, D. BOSCH, R.K. BOUTWELL: The carcinogenicity of creosote oil: The induction of lung tumors in mice. *Cancer Research* 1958, Vol. 18, pp. 1176–1178.
11. M. ROBAK: Sposób bioremediacji gruntu i prewencji rozprzestrzeniania się skażeń substancjami ropopochodnymi. Mat. sem. „Rolnictwo przyjazne przyrodzie”, XXXIV Wrocławskie Dni Nauki i Techniki, SITR–NOT, Wrocław 2008.
12. E. TOMASZEWSKA-CIOSK, W. DROŹDŹ, H. BORUCKOWSKA, T. BORUCKOWSKI: *Biuletyn Urzędu Patentowego* 2009, nr 3, zgłoszenie patentowe nr 385839, s. 12.
13. PN-B-04452.
14. PN-88-B-04481.

15. M. WOJTATOWICZ, R. STEMPNIEWICZ, B. ŻAROWSKA, W. RYMOWICZ, M. ROBAK: Mikrobiologia Ogólna. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław 2008.
16. M. ROBAK: Studia nad wykorzystaniem octanu i wydzieleniem cytrynianu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej, Rozpr. hab. 442, Wrocław 2002.
17. J.A. BARNETT, R.W. PAYNE, D. YARROW: Yeast: Characteristics and Identification. Cambridge University Press, Cambridge 1983.
18. C.P. KURTZMANN, J.W. FELL: The Yeasts. A Taxonomic Study. 2000, pp. 420–421.
19. PN-EN ISO 17993: 2005.
20. PN-C-04643; EN ISO 9377-2:2003.
21. A. KARCZEWSKA: Ochrona gleb i rekultywacja terenów zdegradowanych. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław 2008.
22. Rozporządzenia Ministra Środowiska z 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi. Dz. U. nr 165, poz. 1359.
23. R.A. KANALY, S. HARAYAMA: Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* 2000, Vol. 182, No. 8, pp. 2059–2067.
24. A. SAPOTA: Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 2002, vol. 18, nr 2, ss.179–208.
25. P. OLESZCZUK: Zanieczyszczenia organiczne w glebach użyźnianych osadami ściekowymi. Część II. Losy zanieczyszczeń w glebie. *Ecological Chemistry and Engineering* 2007, vol. 14, nr S2, ss.185–196.
26. E. WOJTKOWIAK-GĘBAROWSKA, S.J. PIETR, M. STANKIEWICZ, J. KUCIŃSKA: Wybrane zagadnienia i materiały do ćwiczeń z mikrobiologii. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław 2009.
27. B. ŻOGAŁA, M. ROBAK, W. RYMOWICZ, K. WZIENTEK, M. RUSIN, J. MARUSZCZAK: Geoelectrical observation of *Yarrowia lipolytica* bioremediation of petrol-contaminated soil. *Polish Journal of Environmental Studies* 2005, Vol.14, No. 5, pp. 665–669.
28. I.M.A. AL-MAGHRABI, A.O.B. AQIL, M.R. ISLAM, O. CHAALAL: Use of thermophilic bacteria for bioremediation of petroleum contaminants. *Energy Source* 1999, Vol. 21, No. 1, pp. 17–29.
29. R.M. ATLAS: Bacteria and bioremediation of marine oil spills. *Oceanus* 2008, Vol. 36, No. 2, pp. 71–73.
30. E. KLIMIUK, M. ŁEBKOWSKA: Biotechnologia w ochronie środowiska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
31. A. MROZIK, Z. PIOTROWSKA-SEGET, S. ŁABUŻEK: Bacteria in bioremediation of hydrocarbon-contaminated environments. *Postępy Mikrobiologii* 2005, vol. 44, nr 3, ss. 227–230.
32. K. LISOWSKA, J. DŁUGOŃSKI: Biodegradacja związków ropopochodnych przez grzyby strzępkowe. *Biotechnologia* 2003, vol. 4, ss. 92–100.
33. B. KOŁWZAN: Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi. *Ochrona Środowiska* 2008, vol. 30, nr 4, ss. 3–14.
34. B. KOŁWZAN: Effect of bioremediation on genotoxicity of soil contaminated with diesel oil. *Environment Protection Engineering* 2009, Vol. 35, No. 1, pp. 95–103.
35. B. KOŁWZAN: Usuwanie zanieczyszczeń naftowych z gruntu metodą pryzmowania. *Ochrona Środowiska* 2009, vol. 31, nr 2, ss. 3–10.
36. M. YOSHIDA, K. HASHIMOTO: Assessment of the pathogenicity of yeast used in the production of single cell protein. *Agricultural and Biological Chemistry* 1986, Vol. 50, No. 8, pp. 2117–2118.
37. M. ROBAK, B. ŻOGAŁA, W. RYMOWICZ, M. WOJTATOWICZ: Sposób bioremediacji gruntu i prewencji rozprzestrzeniania się skażeń substancjami organicznymi. Zgłoszenie patentowe P380007. Biuletyn UP, Warszawa 2006.

Robak, M., Boruckowski, T., Drozd, W., Lazar, Z., Baranowska, M., Przado, D., Steininger M. Application of the Yeasts *Yarrowia lipolytica* for *in-situ* Bioremediation of Soil Contaminated with Creosote Oil – A Case Study. *Ochrona Środowiska* 2011, Vol. 33, No. 2, pp. 27–33.

Abstract: Creosote-contaminated soil samples collected within the premises of a timber processing plant were made the subject to microbiological and chemical analysis. An area of approximately 0.12 ha was chosen for *in-situ* bioremediation involving an autochthonous *Yarrowia lipolytica* yeast species. Use was made of three yeast preparations: cells immobilized in sodium alginate or starch, and yeast suspensions. The number of yeast cells introduced into the soil approached $2 \cdot 10^{12}$ (238 g). The results obtained have revealed substantial improvement in the soil structure and noticeable reduction in the concentrations of the particular

contaminants detected in this area. During nine months of bioremediation, the total content of polycyclic aromatic hydrocarbons decreased threefold, but a significant increase was observed in the concentration of anthracene. Contamination with creosote oil, expressed as the level of total petroleum hydrocarbons, was reduced by about 70% in the area treated with sodium-alginate-immobilized yeasts, and by more than 33% over the entire area examined. The introduction of immobilized *Y. lipolytica* biomass enriched the eukaryotic microflora of the soil, improving the proportion of bacterial counts to the counts of yeasts and those of mould. Apart from the strains of *Y. lipolytica*, another two yeast species were isolated from and identified in the soil being bioremediated – *Rhodotorula glutinis* and *Cryptococcus albidus*.

Keywords: Bioremediation, *in situ*, yeast, *Yarrowia lipolytica*.