

## STYMULACJA ROZKŁADU SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH W SKAŻONEJ GLEBIE Z WYKORZYSTANIEM NADTLENKU WODORU I SZCZEPIONKI YARROWIA LIPOLYTICA A 101

Teresa Krzyśko-Łupicka<sup>1</sup>, Magdalena Kręcidło<sup>1</sup>, Łukasz Kręcidło<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. Kardynała Bolesława Kominka 6a/6, 45-032 Opole, e-mail: teresak@uni.opole.pl

### STRESZCZENIE

Skażenia substancjami ropopochodnymi stanowią ogromny problem, nie tylko w rolnictwie, ponieważ negatywnie wpływają na właściwości fizyko-chemiczne i aktywność biologiczną gleb. Związki te mogą się również akumulować w roślinach lub wraz z pyłem osiadać na ich zielonych częściach. Większość z nich to substancje karce-nogenne, dlatego ich usuwanie ze środowiska wymaga zastosowania efektywnych, tanich i bezpiecznych metod. W warunkach laboratoryjnych oceniono przydatność łącznego wykorzystania techniki stymulacji nadtlaniem wodoru i bioaugmentacji szczepionką drożdżową *Yarrowia lipolytica* A101 do oczyszczania gleby z substancji ropopochodnych oraz wpływ na dynamikę zmian mikrobioty gleby. Wykorzystanie tych technik nie spowodowało istotnej redukcji ogólnej zawartości związków ropopochodnych w skażonej glebie. Najbardziej efektywnym układ ten okazał się w przypadku degradacji WWA, powodując prawie czterokrotnie obniżenie ich stężenia (z 204 mg·kg<sup>-1</sup> do 54 mg·kg<sup>-1</sup>), ale tylko w początkowym okresie procesu. W przypadku pozostałych grup węglowodorów nie zaobserwowano istotnej redukcji ich zawartości, ponieważ równocześnie w różnym stopniu następowała ich desorpcja z kompleksu glebowego. Bioremediacja wspomagana szczepionką *Y. lipolytica* A101 w połączeniu z nadtlaniem wodoru stymulowała rozwój mikroorganizmów prokariotycznych.

**Słowa kluczowe:** gleba, bioremediacja, substancje ropopochodne, *Yarrowia lipolytica*, nadtlenek wodoru.

### STIMULATION OF DECOMPOSITION OF PETROLEUM IN CONTAMINATED SOIL WITH USING HYDROGEN PEROXIDE AND YARROWIA LIPOLYTICA A 101

#### ABSTRACT

The contamination of soil by petroleum substances pose a huge environmental problem because of negative impact on the physical and chemical properties and biological activity of soil. Contamination may also accumulate in plants, or together with dust, deposited on green parts of plants. Most of them are carcinogenic substances, so their removal from the environment requires the use of efficient, cheap and safe methods. The usefulness of bioaugmentation by *Y. lipolytica* A101 with stimulation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for purification of hydrocarbon-contaminated soil was investigated under laboratory conditions. Paralelly, its influence on the dynamics of soil microflora has been tested. The use of combined techniques bioaugmentation and stimulation did not result in a significant reduction of the total content of petroleum compounds in contaminated soil. The tested method was most effective in case of degradation of PAHs; causing almost fourfold content decrease in their concentration (from 204 mg·kg<sup>-1</sup> to 54 mg·kg<sup>-1</sup>). In the case of other hydrocarbons, there was no significant reduction in content. This was probably the result of their desorption from the soil complex. Bioremediation supported by *Y. lipolytica* A101 in combination with hydrogen peroxide stimulate the development of procaryotic microorganisms.

**Keywords:** soil, remediation, petrochemicals, *Yarrowia lipolytica*, hydrogen peroxide,

#### WSTĘP

Głównym założeniem bioremediacji jest zwiększenie efektywności działania procesów

usuwania skażeń ze środowiska [Scow i Hicks 2005]. Ponieważ biodegradacja węglowodorów ropopochodnych może być ograniczana przez wiele czynników takich, jak mikrobiota, dostęp-

ność związków biogennych, odczyn środowiska, temperatura, wilgotność, dostępność tlenu, właściwości fizykochemiczne gleby i stężenie skażenia [Pala i wsp. 2006] można stosować stymulację i/lub bioaugmentację [Jeon i wsp. 2013].

Technika stymulacji polega na dostarczeniu do skażonego środowiska substancji biogennych takich, jak azot czy fosfor [Calvo i wsp. 2009, Dellagnezze i wsp. 2014], a także natlenienia, bądź zastosowanie środków emulgujących lub powierzchniowo czynnych, które zwiększają rozpuszczalność substancji hydrofobowych. Substancje te są wówczas łatwiej dostępne dla mikroorganizmów [Calvo i wsp. 2009, Suja i wsp. 2014], co stymuluje wzrost drobnoustrojów autochtonicznych, w tym szczepów zdolnych do biodegradacji skażenia.

Bioaugmentacja polega na wprowadzeniu do skażonego środowiska szczepów lub konsorcjów mikroorganizmów o udokumentowanych właściwościach degradujących. Technika ta jest zależna od wielu czynników biotycznych i abiotycznych, takich jak budowa chemiczna zanieczyszczenia, jego dostępność i stężenie, odczyn środowiska, temperatura otoczenia, wilgotność oraz dostępność tlenu. W związku z tym istotny jest odpowiedni dobór mikroorganizmów do procesu oczyszczania.

Szczepy wykorzystywane w bioaugmentacji muszą charakteryzować się nie tylko zdolnością do degradacji danego skażenia, ale również do szybkiego namnażania się w tym środowisku oraz konkurencyjnością do mikroflory autochtonicznej i zdolnością do zdominowania skażonego obszaru [Dellagnezze i wsp. 2014, Suja i wsp. 2014]. Do takich mikroorganizmów należą bezwzględnie tlenowe drożdże *Yarrowia lipolytica*, które wykazują zdolności do degradacji substancji hydrofobowych, takich jak: substancje ropopochodne, tłuszcze, oleje i kwasy tłuszczowe [Ferreira i wsp. 2009, Krzyśko-Łupicka 2009, Krzyśko-Łupicka i Robak 2011]. Szerokie uzdolnienia enzymatyczne (lipazy, esterazy, reduktazy, proteazy, RNazy, fosfatazy, oksigenazy,  $\beta$ -oksydazy) oraz zdolności do biosyntezy biosurfaktanów i kwasów organicznych sprzyjają akumulacji i degradacji skażeń [Papanikolaou i wsp. 2009, Zinjarde i wsp. 2014] w różnych warunkach środowiskowych [Vatsal i wsp. 2011, Zinjarde i wsp. 2014]. Wszystkie szczepy *Y. lipolytica* są uznawane za bezpieczne, łatwe do namnażania na surowcach odpadowych, co jest atutem w ochronie środowiska [Rywińska i wsp. 2013, Zinjarde i wsp. 2014].

Natlenienie ma ścisły wpływ na postać morfologiczną drożdży *Y. lipolytica*. W przypadku małej ilości tlenu lub jego braku drożdże przybierają formę pseudogrzebni lub prawdziwej grzebni, natomiast w przypadku dużego natlenienia rosną w postaci pojedynczych komórek. Jeszcze nie wiadomo jaki ma to wpływ na rozkład węglowodorów ropopochodnych, jednak niektórzy badacze uważają, że rozkład przebiega szybciej w obecności pojedynczych okrągłych komórek drożdżowych. Pewne jest, że gdy *Y. lipolytica* przybiera morfologię grzebni zmniejszają się jej uzdolnienia enzymatyczne i maleje ilość wydzielanych kwasów organicznych oraz zmniejsza się ilość zakumulowanych lipidów [Bellou i wsp. 2014].

Celem badań była ocena przydatności łącznego wykorzystania techniki stymulacji nadtlaniem wodoru i bioaugmentacji szczepionką drożdżową *Yarrowia lipolytica* A101 do oczyszczania gleby z substancji ropopochodnych, w warunkach laboratoryjnych oraz ocena wpływu tych zabiegów na dynamikę zmian mikrobioty gleby.

## MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy stanowiła gleba gliniasta skażona substancjami ropopochodnymi, pobrana z miejsca skażenia i składowana przez 2 lata w warunkach naturalnych. Miała ona postać zatłuszczonej masy barwy czarnej o specyficznym zapachu i pH 8, w której zawartość substancji ropopochodnych wynosiła ok. 17 000 [mg·kg<sup>-1</sup> s. m.]. Glebę tę wykorzystano do założenia doświadczeń wazonowych. Próby badawcze (YLO) stanowiły wazon, do których wprowadzano po 1 kg gleby, a następnie dodano nadtlenek wodoru w przeliczeniu na 1 mg O<sub>2</sub>·g<sup>-1</sup> s.m., dokładnie wymieszano i po 10 minutach wprowadzono 10% (v/v) inoculum *Yarrowia lipolytica* o gęstości 2·10<sup>7</sup> jtk·cm<sup>-3</sup>. Kontrolę (K) stanowił obiekt bez dodatków. Wilgotność utrzymywano na poziomie 60% i co 2 dni uzupełniano ubytki wody, kontrolując masę wazonów za pomocą wagi. Doświadczenia wazonowe założono w 3 powtórzeniach. Tak przygotowaną glebę w nieosłoniętych wazonach inkubowano w temperaturze pokojowej 22°C (±2°C) przez 60 dni.

Proces usuwania skażeń z badanej gleby kontrolowano pobierając z wazonów każdorazowo po 10 g gleby do oznaczeń chemicznych i mikrobiologicznych. Próby pobierano na początku do-

świadczenia (czas 0) po 6 godzinach oraz po 30 i 60 dniach. Skuteczność bioremediacji określano w stosunku do kontroli (gleba bez dodatków).

Oznaczenie składu ilościowego bakterii, promieniowców, drożdży, grzybów strzępkowych i mikroorganizmów metabolizujących heksadekan prowadzono standardową metodą hodowlaną w typowych dla poszczególnych mikroorganizmów podłożach [Krzyśko i wsp. 2013]. Wyniki opracowano, wyznaczając odchylenie standardowe od średniej liczebności mikroorganizmów.

Przeprowadzono również badania fizykochemiczne [Krzyśko-Łupicka i wsp. 2013] w celu oznaczanie kwasowości gleby, suchej masy oraz analizy ilościowej i jakościowej ekstraktów substancji ropochodnych.

Oznaczenie kwasowości odpadu w roztworze KCl ( $\text{pH}_{\text{KCl}}$ ) wykonano metodą potencjometryczną, przy użyciu pH – metru typu N-512 firmy ELPO, a suchej masy metodą wagową po suszeniu gleby w temperaturze pokojowej.

Oznaczenie węglowodorów n-alifatycznych o długości łańcucha węglowego od C8 do C40, węglowodorów aromatyczne (BTEX) oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) oznaczano metodą chromatografii gazowej.

Próbki do oznaczeń chromatograficznych uśredniano ważono i suszono w temperaturze pokojowej bezwodnym siarczanem sodowym (POCH).

Ekstrakcję badanych związków przeprowadzono w automatycznym ekstraktorze fexIKA® firmy IKA – Werke. Do ekstrakcji BTEX oraz WWA zastosowano dichlorometan (POCH GC grade), a n-alkanów – n-heksan (POCH GC grade). Ekstrakty do analiz WWA oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej za pomocą aktywowanego tlenku glinu (Aldrich).

Analizę ilościową i jakościową otrzymanych ekstraktów prowadzono metodą chromatografii gazowej, przy zastosowaniu chromatografu gazowego VARIAN CP – 3800 z detektorem FID. Warunki prowadzenia analizy chromatograficznej przedstawiono w tabeli 1.

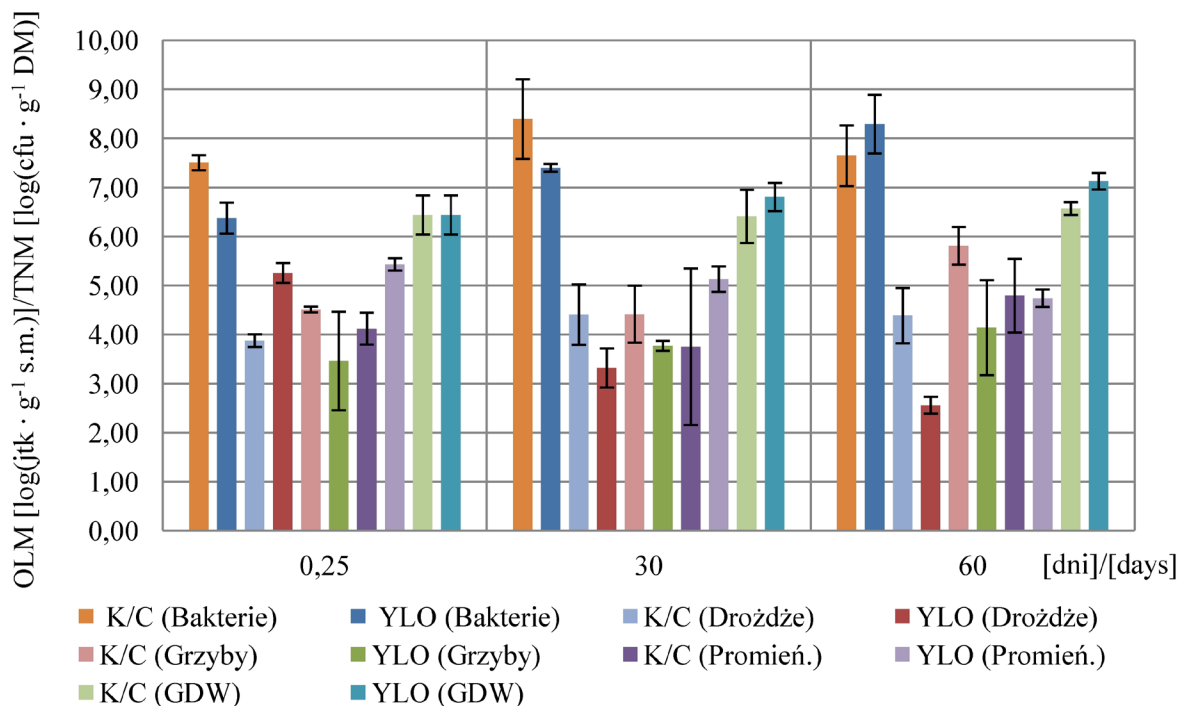
## WYNIKI

Stymulacja  $\text{H}_2\text{O}_2$  i inokulacja szczepionką *Y. lipolytica* 101 gleby skażonej substancjami ropochodnymi w różnym stopniu wpływała na rozwój mikroorganizmów. Liczba bakterii do 30 dnia doświadczenia była 10 – krotnie mniejsza niż w kontroli, natomiast w 60 dniu 10 – krotnie większa. Liczba promieniowców wzrosła 100 – krotnie w 30 dniu doświadczenia w porównaniu do kontroli, a następnie uległa obniżeniu do jej poziomu. W przypadku grzybów strzępkowych ich liczba w trakcie całego doświadczenia była 10–100 razy mniejsza niż w kontroli. Natomiast liczebność drożdży początkowo wzrosła piętnastokrotnie w stosunku do kontroli, ale w następnych okresach badawczych obniżyła się 10–100 razy. Liczebność mikroorganizmów metabolizujących heksadekan w obiekcie poddanym bioremediacji wzrosła 10 – krotnie dopiero w 60 dniu doświadczenia (rys. 1)

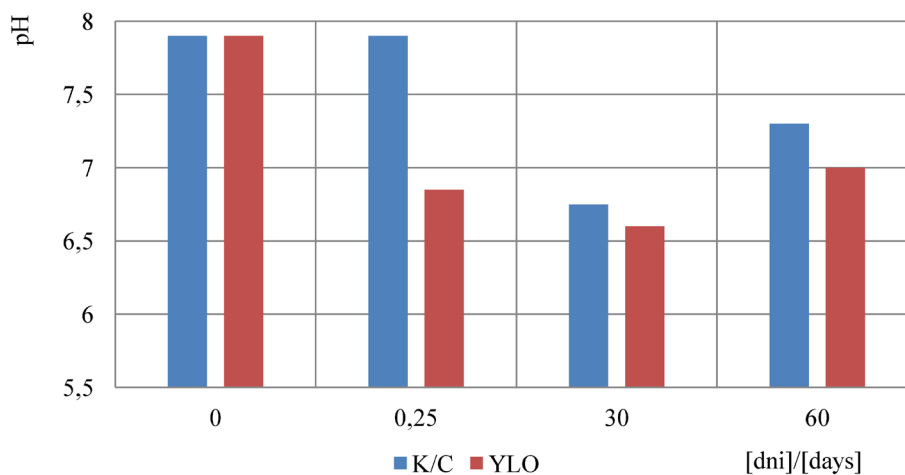
W procesie bioremediacji zaobserwowano także zmiany pH gleby oraz składu chemicznego badanych próbek. Łączne zastosowanie stymulacji gleby  $\text{H}_2\text{O}_2$  i inokulacji szczepionką *Y. lipolytica* 101 w porównaniu do kontroli spowodowało obniżenie pH do 6,6 po 30 dniach badań, a następnie jego wzrost do pH 7. W każdym przypadku było ono niższe niż w kontroli, co może być wskaźnikiem przemian substancji ropochodnych zachodzących w wyniku zastosowania połączonych technik (rys. 2).

**Tabela 1.** Warunki analizy chromatograficznej  
**Table 1.** The chromatographic analysis conditions

Warunki GC	Węglowodory zanieczyszczające glebę		
	BTEX	WWA	n-alifatyczne
Kolumna kapilarna	VF5 – ms, 30 m ID 0,25 mm if 0,25µm	VF5 – ms, 30 m ID 0,25 mm if 0,25µm	VF1 – ms, 30 m ID 0,53 mm if 1,50µm
Przepływ gazu nośnego (He)	1 cm <sup>3</sup> na minutę	1 cm <sup>3</sup> na minutę	3 cm <sup>3</sup> na minutę
Temperatura dozownika	250°C	300°C	300°C
Temperatura detektora	280°C	310°C	325°C
Program temperaturowy	30–2/4/50/5/150	105–2/4/300–10	100–1/12/320–12



**Rys. 1.** Zmiany liczebności mikroorganizmów glebowych po 6 godzinach oraz 30 i 60 dniach trwania doświadczenia; bakterie (a), promieniowce (b), drożdże (c), grzyby strzępkowe (d), mikroorganizmy metabolizujące heksadekan (GDW) (e). (K – kontrola; YLO – gleba stymulowana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i szczepionką *Y. lipolytica* A101)  
**Fig. 1.** The changes of soil microorganisms number after 6 hours and after 30 and 60 days of experiment: bacteria (a), actinomycetes (b), yeasts (c), fungi (d) and microorganisms using hexadecane as a sole carbon source (HGD)(e). (C – control; YLO – soil with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and inoculum *Y. lipolytica* A101)



**Rys. 2.** Zmiany pH gleby skażonej substancjami ropopochodnymi po zastosowaniu techniki bioremediacji (K – kontrola; YLO – gleba stymulowana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i szczepionką *Y. lipolytica* A101)  
**Fig. 2.** Changes of pH of soil samples polluted with crude oil products after use bioremediation techniques (C – control; YLO – soil with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and inoculum *Y. lipolytica* A101)

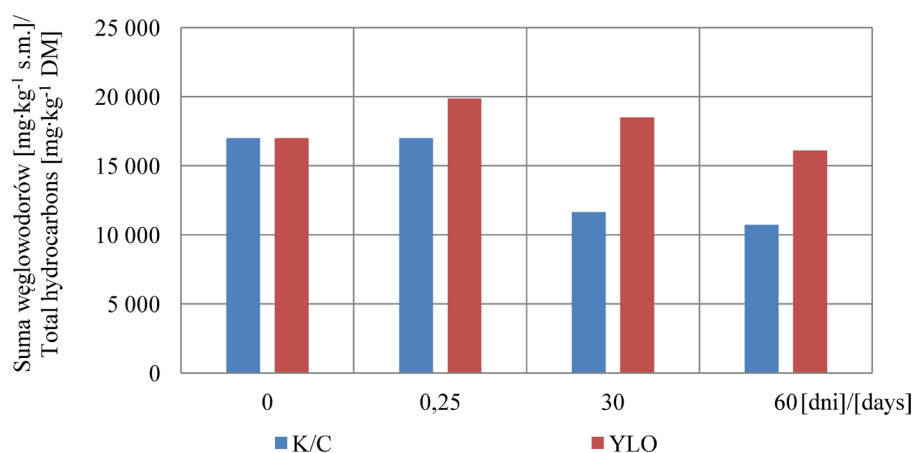
Efektem zastosowanych technik był wzrost ogólnej zawartości węglowodorów w porównaniu do stężenia wyjściowego, największy po 6 godzinach procesu. Zjawisko to może wskazywać na miejscową desorpcję i dyfuzję wę-

glowodorów z kompleksu glebowego, gdyż równolegle obserwowano wzrost zawartości węglowodorów n-alifatycznych i BTEX przy równoczesnym znacznym obniżeniu zawartości karcenogennych WWA.

Następnie odnotowano obniżenie ogólnej zawartości węglowodorów, ale w stopniu niższym niż w kontroli (rys. 3). Także ogólna zawartość węglowodorów n-alfatycznych (n-alkanów) w początkowym okresie procesu wzrosła o ok. 20%, a następnie obniżała się i w 60 dniu badań osiągnęła wartość 16004 mg·kg<sup>-1</sup>. Jednak efektywność bioremediacji była znacznie niższa niż procesów samorzutnych, gdyż w tym samym czasie w obiekcie kontrolnym obserwowano systematyczne obniżanie ogólnej zawartości tych węglowodorów z 16997 do 10719 mg·kg<sup>-1</sup> (rys. 4).

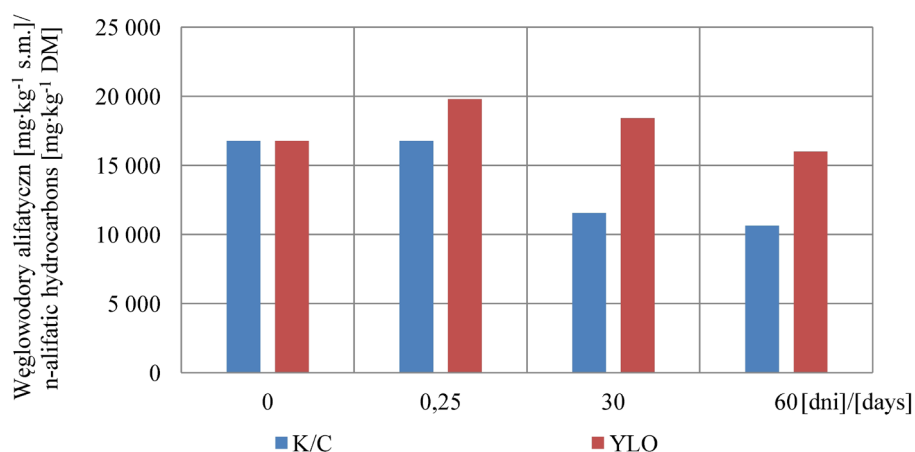
Analiza składu jakościowo-ilościowego węglowodorów alifatycznych nie pozwala jedno-

znacznie stwierdzić, które z nich łatwiej ulegają biodegradacji. Zarówno po 30 jak i 60 dniach bioremediacji w glebie poddanej modyfikacji zaobserwowano redukcję n-alkanów o długości łańcuchów od C30 do C40. Najwyższe różnice w zawartości n-alkanów pomiędzy glebą modyfikowaną a kontrolą odnotowano dla węglowodorów o długości łańcuchów od C12 do C24. Ich stężenie w układzie poddanym bioremediacji było średnio dwa razy wyższe niż w glebie kontrolnej. Wyjątek stanowiły węglowodory C14, których zawartość w układzie poddanym modyfikacji była dziesięciokrotnie wyższa w porównaniu do kontroli. Natomiast w procesie samorzut-



**Rys. 3.** Zmiany całkowitej zawartości substancji ropopochodnych [mg·kg<sup>-1</sup> s.m.] w glebie po procesie biodegradacji. (K – kontrola; YLO – gleba stymulowana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i szczepionką *Y. lipolytica* A101)

**Fig. 3.** The total content of petrochemicals [mg kg<sup>-1</sup> DM] in contaminated soil after biodegradation process. (C – control; YLO – soil with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and inoculum *Y. lipolytica* A101)



**Rys. 4.** Zmiany zawartości węglowodorów n-alfatycznych [mg·kg<sup>-1</sup>s.m.] w glebie po 0,25dnia (a), 30 dniach (b) i 60 dniach (c) procesu biodegradacji. (K – kontrola; YLO – gleba stymulowana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i szczepionką *Y. lipolytica* A101)

**Fig. 4.** The content changes of n-alfatic hydrocarbons [mg·kg<sup>-1</sup> DM] during experiment after 0,25 day (a), 30 days (b) and 60 days (c) after biodegradation process. (C – control; YLO – soil with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and inoculum *Y. lipolytica* A101)



nym przez cały czas trwania badań następowało systematyczne obniżenie stężenia tych węglowodorów (tab. 2).

W glebie modyfikowanej, w porównaniu do kontroli, odnotowano także wzrost stężenia BTEX, najwyższy w 30 dniu badań. Spowodowany był on wzrostem zawartości benzenu, co może sugerować oderwanie łańcuchów bocznych w związkach monoaromatycznych, tym bardziej, że równolegle zaobserwowano wzrost stężeń niższych węglowodorów n-alifatycznych w porównaniu do kontroli. Końcowe stężenie BTEX w obiektach bioremediowanych było dwukrotnie wyższe od stężenia wyjściowego i czterokrotnie wyższe niż w kontroli (tab. 3).

W przypadku WWA, z wyjątkiem pierwszego okresu bioremediacji gdy ich zawartość obniżyła się o ok. 75%, nie zaobserwowano szczególnych zmian ich zawartości w porównaniu do kontroli. W efekcie końcowym redukcja WWA w obiekcie kontrolnym wyniosła 69%, a w wariantcie modyfikowanym 64% w stosunku do wyjściowego stężenia WWA. Zastosowana

metoda bioremediacji cechowała się największą skutecznością w degradacji: acenaftyleny, fluoreny, fenantreny, antracenu, benzo(a)antracenu, benzo(b)fluoreny, benzo(a)pireny i dibenzo(a,h)antracenu (tab. 4).

Pomimo, że efektywność procesu mierzona zawartością WWA w glebie była na zbliżonym poziomie zarówno w kontroli, jak i glebie modyfikowanej, jednak kierunek biodegradacji był różny w obydwu wariantach. Potwierdzają to zmiany w stosunku zawartości węglowodorów 4–6 pierścieniowych (DMC) do zawartości węglowodorów 2–3 pierścieniowych (MMC). W glebie podanej bioremediacji stosunek ten jest mniejszy od jedności, co wskazuje na przyspieszony rozkład WWA o dużej masie cząsteczkowej w kierunku tworzenia związków niskocząsteczkowych (węglowodorów 2–3 pierścieniowych). Z kolei w kontroli przeważają węglowodory o dużej masie cząsteczkowej (4–6 pierścieniowe), co jest najprawdopodobniej efektem dimeryzacji związków 2 – 3 pierścieniowych z równoczesnym tworzeniem związków wielkocząsteczkowych (rys. 5).

**Tabela 2.** Zmiany zawartości poszczególnych węglowodorów n-alifatycznych [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{s.m.}$ ] w glebie podanej bioremediacji

**Table 2.** The content changes of n-aliphatic hydrocarbons in soil during experiment [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{DM}$ ]

Czas [dni]	0		0,25		30		60	
	K	YLO	K	YLO	K	YLO	K	YLO
Węglowodory n-alifatyczne [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{s.m.}$ ]								
C8	58	58	58	28	29	62	16	26
C9	23	23	23	60	12	43	3	15
C10	57	57	57	130	32	113	4	49
C11	157	157	157	318	87	280	6	129
C12	384	384	384	651	205	579	74	390
C13	404	404	404	649	207	580	102	371
C14	584	584	584	1100	299	1000	73	789
C15	1021	1021	1021	1488	513	1355	467	1119
C16	1097	1097	1097	1809	556	1669	302	1260
C17	1696	1696	1696	1801	856	1677	1162	1590
C18	1593	1593	1593	1718	813	1590	1157	1515
C19	1124	1124	1124	1376	564	1279	862	1339
C20	899	899	899	1165	481	1150	765	1109
C21	599	599	599	777	321	767	510	740
C22	566	566	566	644	932	614	387	585
C24	1126	1126	1126	1143	1040	1081	545	1087
C26	1575	1575	1575	1508	1130	1361	1085	1218
C28	1371	1371	1371	1245	882	1135	905	986
C30	972	972	972	1296	898	762	1041	694
C32	871	871	871	843	913	819	700	600
C40	603	603	603	49	789	505	486	393
<b>Suma</b>	<b>16780</b>	<b>16780</b>	<b>16780</b>	<b>19798</b>	<b>11559</b>	<b>18421</b>	<b>10652</b>	<b>16004</b>

K – kontrola; YLO – gleba stymulowana  $\text{H}_2\text{O}_2$  i szczepionką *Y. lipolytica* A101

**Tabela 3.** Średnia zawartość węglowodorów monoaromatycznych (BTEX) po 0,25, 30 i 60 dniach trwania procesu**Table 3.** The content of monoaromatic hydrocarbons ( BTEX) during experiment after 0,25, 30 and 60 days

Czas [dni]	0		0,25		30		60	
	K	YLO	K	YLO	K	YLO	K	YLO
BTEX [mg·kg <sup>-1</sup> s.m.]								
Benzen	0,6	0,6	0,6	0,8	37,1	28,4	3,9	18,0
Toluen	1,6	1,6	1,6	0,8	0,3	0,3	0,9	0,4
Etylobenzen	0,3	0,3	0,3	0,5	0,6	0,3	0,1	0,6
m+p-ksylen	1,2	1,2	1,2	1,4	0,3	0,6	0,2	1,1
o-ksylen	1,6	1,6	1,6	2,2	0,3	0,3	0,2	1,0
Styren	1,4	1,4	1,4	1,7	0,2	0,4	0,1	0,1
Izopropylobenzen	5,0	5,0	5,0	5,9	0,4	1,0	0,5	2,4
Suma	<b>11,6</b>	<b>11,6</b>	<b>11,6</b>	<b>13,2</b>	<b>39,1</b>	<b>31,2</b>	<b>6,0</b>	<b>23,6</b>

K – kontrola; YLO – gleba stymulowana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i szczepionką *Y. lipolytica* A101

**Tabela 4.** Średnia zawartość WWA glebie po 0,25, 30 i 60 dniach trwania procesu**Table 4.** The content of PAHs during experiment after 0,25, 30 and 60 days

Czas [dni]	0		0,25		30		60	
	K	YLO	K	YLO	K	YLO	K	YLO
<b>WWA</b> [mg·kg <sup>-1</sup> s.m.]								
Naftalen	24,0	24,0	24	21,7	3,7	9,6	3,6	12,2
Acenaftylen	13,8	13,8	13,8	3,8	2,2	4,7	2,9	9,7
Acenaften	42,9	42,9	42,9	11,7	4,9	12,2	12,1	1,3
Fluoren	5,2	5,2	5,2	1,0	0,9	1,9	1,1	0,6
Fenantren	10,2	10,2	10,2	2,2	1,3	2,2	2,8	0,6
Antracen	13,6	13,6	13,6	1,5	2,0	4,3	5,3	0,8
Fluoranten	23,5	23,5	23,5	1,1	1,3	1,7	4,7	15,5
Piren	1,3	1,3	1,3	0,2	0,5	0,7	0,6	4,4
Benzo(a)antracen	2,1	2,1	2,1	0,3	4,6	0,6	17,1	1,3
Chryzen	11,6	11,6	11,6	1,2	1,1	0,7	0,5	1,3
Benzo(b)fluoranten	15,6	15,6	15,6	2,2	2,4	0,9	6,5	6,3
Benzo(k)fluoranten	5,8	5,8	5,8	2,0	2,3	0,6	1,3	11,2
Benzo(a)piren	5,0	5,0	5,0	1,9	1,8	0,7	0,4	7,8
Indeno(1,2,3-cd)piren	27,8	27,8	27,8	0,8	4,0	3,8	1,2	1,7
Dibenzo(a,h)antracen	1,4	1,4	1,3	1,0	3,8	3,4	2,5	0,7
Benzo(g,h,i)perylene	1,8	1,8	1,8	1,6	0,5	1,8	0,4	0,4
<b>Suma</b>	<b>205,6</b>	<b>205,6</b>	<b>205,5</b>	<b>54,2</b>	<b>37,3</b>	<b>49,2</b>	<b>63</b>	<b>75,8</b>

(K – kontrola; YLO – gleba stymulowana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i szczepionką *Y. lipolytica* A101)

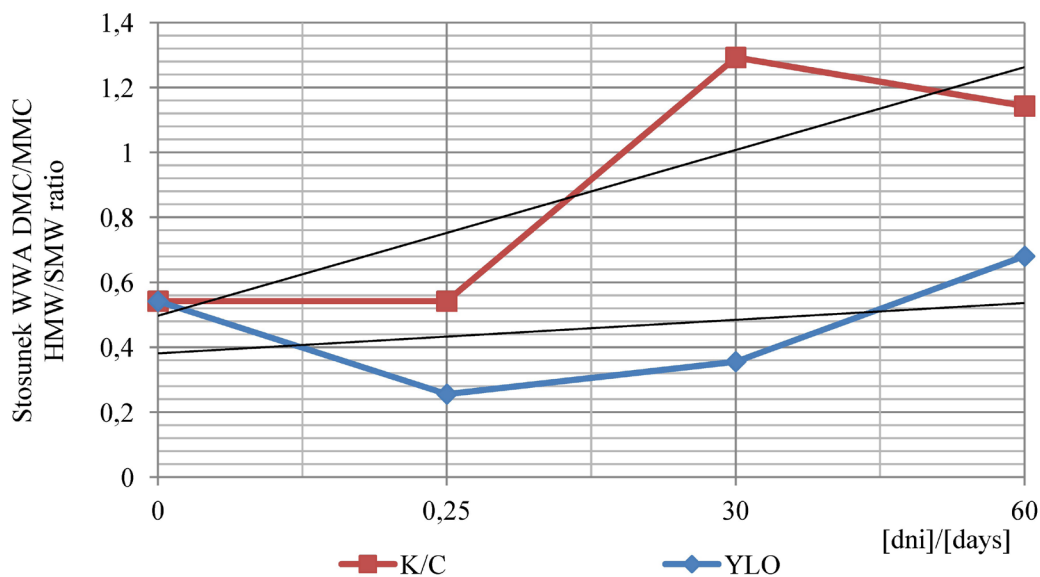
## DYSKUSJA

Substancje ropopochodne skażające glebę niekorzystnie wpływają na jej podstawowe funkcje ekologiczne [Jacques i wsp. 2008, Haritash i Kaushik 2009, Pawełczak i wsp. 2015]. W skład tych substancji wchodzi :

- wysoce toksyczne lekkie frakcje benzynowe (węglowodory alifatyczne C3-C11), które są mobilne, reaktywne i w dużych stężeniach,
- mniej toksyczne ciężkie frakcje olejowe (węglowodory alifatyczne, długołańcuchowe C12-C40), które zasklepiają pory glebowe, podlegają starzeniu i niszczą strukturę gleby, ale jednocześnie są najłatwiej degradowalne

- najbardziej niebezpieczne węglowodory monoaromatyczne (BTEX) i policykliczne WWA

Proces biodegradacji substancji ropopochodnych przyspieszają i aktywnie wspomagają szczepionki niepatogennych drożdży *Yarrowia lipolytica* [Vassiliev i wsp. 2001, Bankar i Kumar 2009, Robak i wsp. 2011, Pawełczak i wsp. 2015]. Produkowane przez nie biosurfaktanty (emulsan) zwiększają dostępność hydrofobowych substancji, a tym samym ułatwiają ich biodegradację. Ponadto szczepionki te sprzyjają ukorzenieniu roślin oraz wpływają na poprawę struktury jakościowej drobnoustrojów w glebie. Wykorzystanie szczepionki *Y. lipolytica* w usuwaniu skażeń sub-



**Rys. 5.** Stosunek WWA 4 – 6 pierścieniowych (DMC) do 2 – 3 pierścieniowych (MMC); YLO -gleba stymulowana  $H_2O_2$  i bioaugmentowana *Y. lipolytica* A101.; K- kontrol

**Fig. 5.** The ratio of 4 – 6 (HMW) and 2 – 3 ring (SMW) cyclic PHAs ; YLO – soil with  $H_2O_2$  and inoculum *Y. lipolytica* A101; C – control

stancjami ropopochodnymi zostało ocenione jako zadowalające [Margesin i Schinner 1997, Robak 2011, Krzysko-Łupicka przygotowana do druku], chociaż dotychczas nie poznano mechanizmów tych procesów [Beopoulos i wsp. 2010].

Stymulacja procesu biodegradacji substancji ropopochodnych nadtlaniem wodoru zwiększała o 35% efektywność zanikania węglowodorów n-alfatycznych (C8-C40) i o 50% WWA w porównaniu do obiektów niemodyfikowanych, ale nie wpłynęła na istotne zmiany zawartości węglowodorów monoaromatycznych (BTEX) w czasie. W efekcie końcowym całkowite stężenie BTEX obniżyło się o około 50% w stosunku do zawartości wyjściowych, ale po zakończeniu procesu nie zaobserwowano różnic pomiędzy obiektem modyfikowanym a kontrolnym [Rosik -Dulewska i wsp. 2015]

Natomiast łączne zastosowanie stymulacji  $H_2O_2$  i bioaugmentacji *Y. lipolytica* nie wpływało na obniżenie ogólnej zawartości węglowodorów w skażonej glebie, ale miało wpływ na kierunek przemian. W trakcie procesu, zwłaszcza w początkowym okresie, zaobserwowano gwałtowny wzrost zawartości substancji ropopochodnych, co mogło być związane z ich desorpcją z kompleksu glebowego [Haritash i Kaushik 2009, Robak i wsp. 2011, Krzysko-Łupicka i wsp. 2013, Rosik-Dulewska i wsp. 2015], degradacją związków cyklicznych których redukcja mogła zachodzić pod wpływem wolnych rodników po-

wstałych z rozpadu nadtlenu wodoru [Sirguy i wsp. 2008]. Zaobserwowane w naszych badaniach czterokrotne obniżenie zawartości WWA po 6 godzinach bioremediacji z wykorzystaniem stymulacji  $H_2O_2$  i bioaugmentacji *Y. lipolytica* mogło więc być związane z utleniającym działaniem  $H_2O_2$ . Wielu autorów wskazuje na wpływ natlenienia na wzrost biodostępności wiązań w węglowodorach [Zhang 2006, Jung i wsp. 2008, Ferreira i wsp. 2009, Menendez-Vega i wsp. 2010, Zinjarde i wsp. 2014]. Jonsson i wsp. (2007) wykazali, że antracen, benzo(a)pirenu i piren są bardziej podatne na utlenianie rodnikami hydroksylowymi niż inne WWA o podobnej strukturze. Jednakże w 60 dniu prowadzonej przez nas bioremediacji zaobserwowano wzrost zawartości benzo(a)pirenu, co mogło być spowodowane jego desorpcją z por glebowych [Haritash i Kaushik 2009], kumulacją przez glebowe szczepy *Bacillus megaterium* [Kwapisz 2006] a także kometa-bolizmem innych związków cyklicznych [Stringfellow i wsp. 1995, Dean-Ross i wsp. 2002].

Pomimo, że efektywność procesu mierzona zawartością WWA w glebie była na podobnym poziomie zarówno w kontroli, jak i glebie modyfikowanej, jednak kierunek biodegradacji był różny w obydwu wariantach. Niski stosunek WWA o liczbie pierścieni 4, 5 i 6 do WWA zawierających 2 i 3 pierścienie węglowe w glebie po modyfikacjach wskazuje, że użyta metoda powoduje przyspieszenie rozkładu WWA o dużej masie cząsteczkowej.



Towarzyszący procesowi bioremediacji wzrost kwasowości gleby może być związany z metabolizmem węglowodorów i powstaniem kwasów karboksylowych [Aitken i Long 2004].

## WNIOSKI

1. Zastosowanie połączonych technik stymulacji  $H_2O_2$  i bioaugmentacji *Y. lipolytica* A101 prowadziło do obniżenia odczynu gleby w porównaniu do kontroli, co może być wskaźnikiem przemian substancji ropopochodnych.
2. Zastosowanie połączonych technik nie wpłynęło zasadniczo na redukcję ogólnej zawartości n-alkanów, ale stymulowało redukcję związków o długości łańcuchów węglowych od C30 do C40.
3. Zawartość poszczególnych węglowodorów monoaromatycznych (BTEX) za wyjątkiem benzenu, ulegała obniżeniu w czasie trwania procesu bioremediacji
4. Biostymulacja połączona z bioaugmentacją zwiększała efektywność redukcji WWA w pierwszych godzinach trwania procesu biodegradacji.
5. Efektywność procesu mierzona zawartością WWA w glebie była na podobnym poziomie zarówno w kontroli, jak i glebie modyfikowanej, jednak kierunek biodegradacji był różny w obydwu wariantach w zależności od ilości pierścieni w cząsteczkach.
6. Zastosowana metoda bioremediacji cechowała się największą skutecznością w degradacji: acenaftyleny, fluoreny, fenantreny, antracenu, benzo(a)antracenu, benzo(b)fluoreny, benzo(a)pireny i dibenzo(a,h)antracenu.

## LITERATURA

1. Aitken M.D., Long T.C. 2004. Biotransformation, Biodegradation, and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biodegradation and Bioremediation* 2, 83–124.
2. Bankar A.V., Kumar A.R., Zinjarde S.S. 2009. Removal of chromium (VI) ions from aqueous solution by adsorption onto two marine isolates of *Yarrowia lipolytica*. *Journal Hazardous Materials* 170(1), 487–494.
3. Bellou S., Makri A., Triantaphyllidou I.E., Papanikolaou S., Aggelis G. 2014. Morphological and

metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology* 160(4), 807–817.

4. Beopoulos A., Desfougeres T., Sabirova J., Zinjarde S., Nicaud J.M. 2010. The hydrocarbon degrading oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* Chapter 35. In: *Handbook of hydrocarbons and lipid biology*. (K.N. Timmis Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19, 2111–2121.
5. Calvo C., Manzanera M., Silva-Castro G.A., Uad I., González-López J. 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. *Future prospects. Science of The Total Environment* 407(12), 3634–3640.
6. Dean-Ross D., Moody J., Cerniglia C.E. 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 41(1), 1–7.
7. Dellagnezze B.M., Sousa G.V., Martins L.L., Domingos D.F., Limache E.E.G., Vasconcellos S.P., Cruz G.F., Oliveira V.M. 2014. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Marine Pollution Bulletin* 89(1–2), 191–200.
8. Ferreira T., Azevedo D., Coelho M.A., Rocha-Leão M.H. 2009. The crude oil degrading potential of *Yarrowia lipolytica*. *New Biotechnology* 25, 223–228.
9. Haritash A.K., Kaushik C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials* 169: 1–15.
10. Jacques R.J., Okeke B.C., Bento F.M., Teixeira A.S., Peralba M.C., Camargo F.A. 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Biore-source Technology* 99(7), 2637–43.
11. Jeon J., Murugesan K., Nam I., Chang Y. 2013. Coupling microbial catabolic actions with abiotic redox processes: A new recipe for persistent organic pollutant (POP) removal. *Biotechnology Advances* 31(2), 246–256.
12. Jonsson S., Persson Y., Frankki S., van Bavel B., Lundstedt S., Haglund P., Tysklind M. 2007. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils by Fenton's reagent: a multivariate evaluation of the importance of soil characteristics and PAH properties. *Journal Hazardous Materials* 149(1), 86–96.
13. Jung H., Sohn K.D., Neppolian B., Choi H. 2008. Effect of soil organic matter (SOM) and soil texture on the fatality of indigenous microorganisms in intergrated ozonation and biodegradation. *Journal of Hazardous Materials* 150(3), 809–17.

14. Krzyśko-Łupicka T., 2009. Dynamika zmian mikrobiologicznych i przemian tłuszczu w zaolejonej ziemi bielącej w zależności od jej modyfikacji. Uniwersytet Opolski Studia i Monografie, 417. Wydawnictwo Uniwersytetu Opolskiego, Opole.
15. Krzyśko-Łupicka T., Robak M., 2011. Drożdże *Yarrowia lipolytica* w biodegradacji substancji tłuszczowych zaolejonej ziemi bielącej. *Acta Scientiarum Polonorum Biotechnologia* 10 (4), 29–38.
16. Krzyśko-Łupicka T., Ciesielczuk T., Chwałowska M., 2013. Stymulacja preparatem Fyre –Zyme procesu biodegradacji substancji ropopochodnych w skażonej glebie. *Acta Scientiarum Polonorum Biotechnologia* 12(1), 5–18.
17. Krzyśko-Łupicka T., Kręcidło Ł. Ocena wpływu bioaugmentacji szczepionką *Yarrowia lipolytica* A101 na biodegradację węglowodorów ropopochodnych w skażonej glebie. Publikacja w przygotowaniu do druku.
18. Kwapisz E., 2006. Szlaki tlenowej biodegradacji ropy naftowej. *Biotechnologia* 2(73), 166–188.
19. Margesin R., Schinner F. 1997. Effect of temperature on oil degradation by psychotrophic yeast In liquid culture and In soil. *FEMS Microbiology Ecology* 24, 243–249.
20. Menendez-Vega D., Gallego J.L., Pelaez A.I., Fernandez de Cordoba G., Moreno J., Munoz D., Sanchez J. 2010. Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology* 43(5–6): 310–321.
21. Pala D.M., Carvalho D.D., Pinto, J.C., Sant’Anna G.L. 2006. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58 (3–4), 254–260.
22. Pawełczak M., Dawidowska-Marynowicz B., Oszywa B., Koszałkowska M., Kręcidło Ł., Krzyśko-Łupicka T. 2015. Influence of bioremediation stimulators in soil on development of oat seedlings (*Avena sativa*) and their aminopeptidase activity. *Archives of Environmental Protection* 41(1), 24–28.
23. Papanikolaou S., Chatzifragkou A., Fakas S., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Nicaud J., Aggelis G. 2009. Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111(12), 1221–1232.
24. Robak M., Boruckowski T., Drożdż W., Lazar Z., Baranowska M., Prządło D., Steininger M. 2011. Zastosowanie drożdży *Yarrowia lipolytica* do bioremediacji gruntu zanieczyszczonego olejem kerozotowym. *Ochrona Środowiska* 33(2), 27–33.
25. Rosik-Dulewska C., Krzyśko-Łupicka T., Ciesielczuk T., Kręcidło Ł. 2015. Hydrogen peroxide as a biodegradation stimulator in remediation processes of soils heavily contaminated with petrochemicals. *Polish Journal of Chemical Technology* 17(2), 17–22.
26. Rywińska A., Juszczyk P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W. 2013. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and Bioenergy* 48, 148–166.
27. Scow K.M., Hicks K.A. 2005. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion Biotechnology* 16 (3), 246–253.
28. Sirguey C. de Souza e Silva T.P., Schwartz C., Simonnot M. (2008): Impact of chemical oxidation on soil quality. *Chemosphere* 72(2), 282–289.
29. Stringfellow W.T., Aitken M.D. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methyl-naphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology* 61(1), 357–362.
30. Suja F., Rahim F., Taha M.R., Hambali N., Rizal Razali M., Khalid A., Hamzah A. (2014): Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration and Biodegradation* 90, 115–122.
31. Vassiliev N., Vassilieva M., Azcon R., Medina A. 2001. Application of free and Co-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in soil-plant system. *Journal of Biotechnology* 91, 237–242.
32. Vatsal A., Zinjarde S.S., Kumar A.R. 2011. Growth of a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 on bromoalkanes: relevance of cell size and cell surface properties. *Yeast* 28(10), 721–732.
33. Zinjarde S., Apte M., Mohite P., Kumar A.R. 2014: *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. *Biotechnology Advances* 2 (5), 920–933.
34. Zhang X., Cheng S., Zhu C., Sun S. 2006. Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors. *Pedosphere*. 16(5), 555–565.