

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRAS

Jonas Žvirgždas

Mielių paplitimas įvairiuose
antropogenizuotuose substratuose,
biologiniai ypatumai ir praktinis
panaudojimas

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Ekologija ir aplinkotyra (N 012)

VILNIUS 2026

Disertacija rengta 2019–2025 metais Gamtos tyrimų centre.

Mokslinis vadovas – dr. Algimantas Paškevičius (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra, N 012).

Gynimo taryba:

Pirmininkė - dr. Daiva Burokienė (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra, N 012).

Nariai:

dr. Dalia Čižeikienė (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005),

dr. Kristina Ložienė (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra, N 012)

dr. Svetlana Markovskaja (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, biologija, N 010)

habil. dr. Ewa Zalewska (Liublino gamtos mokslų universitetas, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra, N 012).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2026 m. birželio mėn. 19 d. 11:00 val. Gamtos tyrimų centro konferencijų salėje. Adresas: Akademijos g. 2, 101 kab., Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 272 9257; el. paštas sekretoriatas@gamtc.lt. Gynimo kalba: lietuvių.

VILNIUS UNIVERSITY
NATURE RESEARCH CENTRE

Jonas Žvirgždas

The Distribution of Yeasts in Various Anthropogenic Substrates, their Biological Characteristics, and Practical Applications

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Ecology and Environmental Sciences (N 012)

VILNIUS 2026

The dissertation was prepared between 2019 and 2025 at Nature Research Centre.

Academic Supervisor – Dr. Algimantas Paškevičius (Nature Research Centre, Natural Sciences, Ecology and Environmental Sciences, N 012).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chair – Dr. Daiva Burokienė (Nature Research Centre, Natural Sciences, Ecology and Environmental Sciences, N 012).

Members:

Dr. Dalia Čižeikienė (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005),

Dr. Kristina Ložienė (Nature Research Centre, Natural Sciences, Ecology and Environmental Sciences, N 012),

Dr. Svetlana Markovskaja (Nature Research Centre, Natural Sciences, Ecology and Environmental Sciences, N 012),

Habil. Dr. Ewa Zalewska (University of Life Sciences in Lublin, Natural Sciences, Ecology and Environmental Sciences, N 012).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 11:00 on 19 June 2026 in Room 101 of the Nature Research Centre. Address: Akademijos g. 2, Room 101, Vilnius, Lithuania, Tel. +370 5 272 9257; e-mail: sekretoriatas@gamtc.lt.

Language of the defence: Lithuanian.

SANTRUMPOS

AD	– aptinkamumo dažnis
DBB	– diazonio mėlynojo dažo reakcija, skirta mielių savybėms nustatyti
Eko danga	– ekologinė danga, apsauganti nuo teršalų išsiliejimo į aplinką
GA	– gliukozės – amonio agaras
KMC	– karboksimetilceliuliozės natrio druska
KSV/g	– kolonijas sudarantys vienetai 1 grame substrato
KSV/ml	– kolonijas sudarantys vienetai 1 mililitre substrato
KSV/l	– kolonijas sudarantys vienetai 1 litre substrato
LOJ	– lakieji organiniai junginiai
M	– mineralinis dirvožemio sluoksnis
MALDI-TOF MS	– Matricos pagalbinė lazerinė desorbcija / jonizacija su skrydžio laiko masių spektrometrija (angl. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>)
MD	– terpė mielėms su dyzelinu
OH	– organinis dirvožemio sluoksnis
P	– pietūs
RBA	– Rose Bengal CAF agaras
SDA	– Saburo dekstrozės agaras
SPM	– vieno taško priskyrimo sistema (angl. <i>Single Point Mooring</i>)
s.s.	– sausas svoris
ŠR	– šiaurės rytai
ŠV	– šiaurės vakarai

TURINYS

ĮVADAS.....	10
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	13
GINAMIEJI TEIGINIAI.....	14
DARBO NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ.....	15
1. LITERATŪROS APŽVALGA	16
1.1. Mielių paplitimas įvairiuose gamtiniuose substratuose	16
1.2. Mielių paplitimas, rūšių įvairovė ir vaidmuo dirvožemyje.....	17
1.3. Mielių paplitimas, rūšių įvairovė ir vaidmuo vandens telkiniuose	20
1.4. Mielių morfologinės, fiziologinės ir biocheminės savybės.....	22
1.4.1. Mielių morfologinės savybės	22
1.4.2. Mielių fiziologinės ir biocheminės savybės.....	23
1.4.3. Mielių išskiriami metabolitai	26
1.5. Mielių vaidmuo ir panaudojimas biodegradacijos ir bioremediacijos	
procesuose.....	28
1.5.1. Mielių vaidmuo ir panaudojimas natūralių ir antropogeninės	
kilmės medžiagų biodegradacijos procesuose	28
1.5.1.1. Mielių vaidmuo augalinės medžiagos skaidymo	
procesuose	29
1.5.1.2. Mielių vaidmuo sunkiųjų metalų biodegradacijos ir	
bioremediacijos procesuose.....	32
1.5.1.3. Mielių vaidmuo naftos angliavandenilių	
biodegradacijos ir bioremediacijos procesuose	36
1.5.1.4. Pagrindiniai žinomi naftos angliavandenilių	
skaidytojai ir jų paplitimą naftos angliavandeniliais	
užterštoje aplinkoje lemiantys veiksniai.....	38
2. Metodai ir medžiagos	44
2.1. Metodai	44
2.1.1. Mielių išskyrimas iš dirvožemio ėminių.....	45
2.1.1.1 dirvožemio ėminių paėmimo vietos.....	47
2.1.1.1.1. Miško dirvožemio ėminiai Lietuvos pasienyje su	
baltarusija galimo astravo elektrinės poveikio zonoje...47	
2.1.1.1.3. Dirvožemio ėminiai (Klaipėdos mieste) su	
padidėjusia chromo tarša.....	51
2.1.1.1.4. Naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio	
ėminiai.....	53
2.1.1.1.5. Dirvožemio ėminiai šalia judriausių Vilniaus miesto	
gatvių.....	54
2.1.2. Mielių išskyrimas iš vandens ėminių.....	56
2.1.2.1. Vandens ėminių paėmimo vietos.....	57
2.1.2.1.1. Neris upės vandens ėminiai.....	57
2.1.2.1.2. Alytaus miesto vandens ėminiai po padangų	
perdirbimo įmonės gaisro.....	58
2.1.2.1.3. Baltijos jūros vandens ėminiai būtingės naftos	
terminalo akvatorijoje	60

2.1.3. Mielių identifikavimo, morfologinių, fiziologinių ir biocheminių savybių nustatymo metodai.....	61
2.1.3.1. Mielių identifikavimas pagal jų morfologinių ir fiziologinių savybių tyrimų rezultatus.....	62
2.1.3.1.1. Morfologinių požymių nustatymas	62
2.1.3.1.2. Mielių fiziologinių savybių nustatymas	62
2.1.3.1.2.1. Mielių identifikavimas naudojant morfologinių, fiziologinių ir biocheminių testų rezultatus	64
2.1.3.2. Mielių fermentinio aktyvumo tyrimai.....	65
2.1.3.2.1. Kokybinis celiulazinio aktyvumo nustatymas.....	65
2.1.3.2.2. Kokybinis amilazinio aktyvumo nustatymas	65
2.1.3.3. Mielių identifikavimas naudojant chromogenines terpes	66
2.1.3.4. Mielių identifikavimas naudojant masių spektrometrijos metodus.....	66
2.1.3.5. Mielių identifikavimas naudojant sekoskaitos metodą	67
2.1.3.5.1. Mielių DNR išskyrimas.....	67
2.1.3.5.2. Kokybinė ir kiekybinė DNR analizė	68
2.1.3.6. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių kultūrų saugojimas	69
2.1.4. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių biodegradacinių savybių tyrimai	69
2.1.4.1. Mielių ir kitų mikroorganizmų atranka naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio biologiniam valymui laboratorinėmis sąlygomis.....	69
2.1.4.2. Mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio biologiniam valymui vertinimas lauko sąlygomis.....	72
2.1.4.3. Mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo žemės ūkio šalutinių produktų biodestrukcijai vertinimas	73
2.1.4.4. Mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo chromo bioakumuliacijai vertinimas	77
2.1.5. Statistinė duomenų analizė.....	79
2.2. Medžiagos	80
2.3. Įranga	82
3. REZULTATAI	83
3.1. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė antropogenizuotuose dirvožemiuose	83
3.1.1. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė miško dirvožemyje lietuvis pasienyje su baltarusija, galimo astravo atominės elektrinės poveikio zonoje	83
3.1.2. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė alytaus miesto ir rajono dirvožemyje po padangų perdirbimo įmonės gaisro.....	86

3.1.3. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė klaipėdos miesto teritorijų, kuriose buvo stebėta tarša chromu, dirvožemyje.....	92
3.1.4. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė naftos angliavandeniliais užterštuose kuro bazių dirvožemiuose.....	95
3.1.5. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė vilniaus miesto antropogenizuoto dirvožemio ėminiuose.....	99
3.2. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė antropogenizuotuose vandens telkiniuose.....	103
3.2.1. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė neries upės vandens ėminiuose.....	104
3.2.2. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė alytaus miesto vandens ėminiuose po padangų perdirbimo įmonės gaisro	107
3.2.3. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė baltijos jūros būtingės naftos terminalo akvatorijoje	110
3.3. Iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių taksonominė analizė	115
3.4. Iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių morfologinių savybių tyrimų rezultatai.....	120
3.5. Iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių fiziologinių ir biocheminių savybių tyrimų rezultatai.....	121
3.5.1. Iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių vykdoma angliavandenių fermentacija	121
3.5.2. Iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių vykdoma angliavandenių ir kitų anglies šaltinių asimiliacija.....	122
3.5.3. Aplinkos sąlygų įtaka iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių augimui	124
3.5.4. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių biocheminių savybių kokybinis įvertinimas	128
3.6. Iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo įvairių medžiagų biodegradacijos procesuose įvertinimas.....	132
3.6.1. Mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo biologiniam naftos produktais užteršto grunto valymui įvertinimas.....	132
3.6.1.1. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų atrankos ir panaudojimo biologiniam naftos produktais užteršto grunto valymui laboratorinėmis sąlygomis įvertinimas	132
3.6.1.2. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų panaudojimo biologiniam naftos produktais užteršto grunto valymui, lauko sąlygomis, įvertinimas	138
3.6.1.2.1. Aplinkos sąlygų kaita vykstant naftos angliavandenių biologiniam skaidymui lauko sąlygomis	139
3.6.1.2.2. Mikroorganizmų koncentracijos pokyčiai valomame grunte lauko sąlygomis	140

3.6.1.2.3. Naftos angliavandenilių kiekio pokyčiai valomame grunte lauko sąlygomis	142
3.6.2. Iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo žemės ūkio šalutinių produktų biodegradacijai įvertinimas.....	144
3.6.3. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo chromo bioakumuliacijai įvertinimas	147
4. REZULTATŲ APTARIMAS	149
IŠVADOS	162
LITERATŪROS SĄRAŠAS	163
PRIEDAI	180
SUMMARY	190
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	226
APIE AUTORIŲ	230

IVADAS

Mielės – tai grybų karalystei priskiriami vienaląsčiai eukariotiniai mikroorganizmai. Mielės yra priskiriamos *Ascomycota* ir *Basidiomycota* skyriams. Šiuo metu yra aprašyta apie 3500 mielių rūšių, tačiau nuolat tobulėjant molekuliniais biologiniams tyrimų metodams, šis skaičius nuosekliai didėja. Daugelyje pasaulio vietovių, įskaitant ir nykstančias buveines, iki šiol nėra ištirti mielių paplitimas ir rūšių įvairovė, arba yra ištirti mažai. Mielės aptinkamos įvairiose ekstremaliomis sąlygomis pasižyminčiose buveinėse – nuo geoterminių versmių ir ledynų iki nuolatinio įšalo dirvožemių ar druskingų ekosistemų. Kaip ir kitiems dirvožemio gyventojams, mielėms turi įtakos buveinių pokyčiai, sukeliama antropogeninės veiklos, tokios kaip žemės ūkio, miškų kirtimo, urbanizacijos, aplinkos taršos įvairiomis antropogeninėmis medžiagomis (Boekhout ir kt., 2022).

Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė priklauso nuo buveinės cheminių, fizinių ir biologinių savybių. Sėkmingas tam tikros buveinės kolonizavimas ir įsitvirtinimas joje priklauso nuo kitų mikroorganizmų buveinėje ir jų tarpusavio sąveikos. Kiekviena buveinėje įsitvirtinusi mikroorganizmų rūšis nuolat keičia aplinkos savybes savo aktyvumu, kuris paverčia buveinę dinamine sistema. Mielės yra neatsiejama mikroorganizmų bendrijų (mikrobiomo) dalis. Taip pat, jos yra vieni iš anksčiausiai maisto medžiagų turtingus substratus kolonizuojančių mikroorganizmų. Mielių vaidmuo ekosistemoje neapsiriboja vien tik įvairių mono- ir disacharidų suvartojimu. Jos taip pat dalyvauja įvairių sudėtingų organinių junginių biodegradacijos procesuose, sintetina, kaupia, išskiria į aplinką metabolitus. Mielės taip pat atlieka pirminių ir antrinių skaidytojų vaidmenį bei yra maisto medžiagų šaltinis kitiems mitybos grandinės mikroorganizmams ir makroorganizmams (Buzzini ir kt., 2017).

Mielės yra aptinkamos visose gamtinės aplinkos ekosistemose. Jų galima rasti vandenyje, dirvožemyje, atmosferoje, augaluose ir ant jų paviršių, gyvūnų organizmuose ir ant jų paviršiaus, žmonių sukurtoje aplinkoje. Dalis mielių yra laikomos patogeniškoms, ar sąlyginai patogeniškoms ir geba sukelti įvairias infekcijas žmonėms, gyvūnams bei augalams. Mielės taip pat gali dalyvauti įvairių antropogeninės ir natūralios kilmės medžiagų biodestrukcijoje. Jos geba prisitaikyti prie nepalankių aplinkos sąlygų, išgyventi padidėjusios taršos sąlygomis ir dalyvauti šių medžiagų biodestrukcijos procesuose. Mielių savybės leidžia jas panaudoti įvairiais teršalais užteršto dirvožemio, vandens, nuotekų biologiniam valymui. Jos geba iš nuotekų pašalinti organinius junginius ir sunkiuosius metalus, yra

puiki priemonė nuotekų ar užteršto vandens biologiniam valymui bei konvertuoja daugelį toksiškų organinių junginių į netoksiškus. Taip pat jos turi didelį pajėgumą kaupti sunkiuosius metalus. Sunkiųjų metalų šalinimas iš įvairių skysčių ir kitų substratų vyksta dėl aktyvios (kai naudojamos gyvos mielės) arba pasyvios (kai naudojama sausa mielių biomasė) jų adsorbcijos ant mielių ląstelių paviršiaus. Taip pat, mielės kaip ir bakterijos bei kiti grybai, geba produkuoti įvairias paviršinio aktyvumo medžiagas, kurios skirtingai nei sintetinės medžiagos, yra bioskaidžios. Šios medžiagos gali būti naudojamos kaip biokontrolės medžiagos žemės ūkyje, kosmetikos gamyboje ir farmacijos pramonėje, maisto konservavimui, pramoniniam valymui bei įvairių teršalų remediacijos procesuose (Walker, 2009; Nicula ir kt., 2023).

Lietuvoje, kaip ir kitose pasaulio šalyse, yra aktuali antropogeninės aplinkos taršos problema. Įvairių žmogaus veiklos sukurtų atliekų ir kitų teršalų kiekis kasmet sparčiai auga (Lietuvos statistikos departamentas, 2026; Lietuvos Respublikos aplinkos ministerija, 2022). Šiuo metu naudojami atliekų šalinimo, nukenksminimo ir sunaikinimo būdai nėra pakankamai efektyvūs, arba jų efektyvumą nustelbia neigiamas poveikis gamtai ir žmonių gyvenamajai aplinkai (Ferronato ir Torretta, 2019).

Naujų žmogaus veiklos generuojamų atliekų ir kitų teršalų skaidymo ir jais užterštos aplinkos valymo būdų paieška yra vienas iš didžiausių šio amžiaus iššūkių. Šiuo metu sparčiai auga susidomėjimas biologinio aplinkos valymo (bioremediacijos) mikroorganizmų pagalba būdais ir kuriamos įvairios technologijos, gebančios reikšmingai prisidėti prie aplinkos taršos problemos mažinimo (Raheema et al., 2026).

Mielės geba efektyviai dalyvauti užteršto dirvožemio ir vandens biologinio valymo procesuose bei įvairių antropogeninių atliekų skaidyme, nes jos asimiliuoja įvairius anglies šaltinius, biodegradoja naftos angliavandenilius ir augalinės kilmės medžiagas, akumuliuoja sunkiuosius metalus bei prisitaiko prie skirtingų aplinkos sąlygų. Jų pagalba galima skaidyti, neutralizuoti ir transformuoti įvairias žmogaus veiklos generuojamas atliekas, taip mažinant aplinkos taršą. Mielės efektyviai prisideda prie žemės ūkio, pramonės, namų ūkio atliekų skaidymo, nuotekų valymo bei kitų atliekų skaidymo ir nukenksminimo procesų. Jos geba toksiškas įvairių medžiagų formas transformuoti į mažiau, arba visai netoksiškas. Taip pat mielės gali būti panaudojamos kaip bioindikatoriai, padedantys išaiškinti aplinkos taršą tam tikromis medžiagomis (pvz. naftos angliavandeniliais, pramonės atliekomis). Jų kiekis, savybės ir rūšinė sudėtis gali padėti nuspėti taršos šaltinius (Medeiros ir kt., 2012).

Mielės yra plačiai tyrinėjamos įvairių Lietuvos ir pasaulio mokslininkų, atrandama naujų jų savybių pritaikymo sričių. Kadangi mielių gyvenimo

ciklas yra palyginti trumpas, o sandara paprasta, jos yra naudojamos kaip eukariotinės ląstelės modelis. Taip pat mielės turi plačias pritaikymo galimybes biotechnologiniuose procesuose (Servienė ir Serva, 2023; Vepškaitė-Mostavičė ir kt., 2025), vaistų gamyboje, įvairių žmogaus ir gyvūnų ligų gydyme (Novickij ir kt., 2017; Čekuolytė ir kt., 2024), žemės ūkio pramonėje (Dailidavičienė ir kt., 2018) ir kitose srityse.

Lietuvoje atliekami mielių moksliniai tyrimai dažniausiai yra susiję su jų metabolitais, žudančiuoju poveikiu, metalų kaupimu, patogeninių mielių reguliavimo priemonėmis, mielių fiziologiniais tyrimais, jų paplitimu žemės ūkio kultūrose, vaisiuose, uogose, bestuburiuose (Repečkienė ir kt., 2013; Sytar ir kt., 2016; Ložienė ir kt., 2018; Novickij ir kt., 2018; Novickij ir kt., 2019; Paškevičius ir kt., 2020; Mažeika ir kt., 2021; Švedienė ir kt., 2024). Mielių paplitimo tiek užterštame, tiek ir antropogeninės veiklos nepaveiktame dirvožemyje ir vandenyje, jų panaudojimo aplinkos valymui tyrimų atliekama labai mažai (Paškevičius A., 2001; Repečkienė ir kt., 2002; Šalomskienė ir kt., 2003; Paškevičius ir kt., 2010; Repečkienė ir kt., 2013).

Disertacijoje aprašomiems tyrimams buvo pasirinktos teritorijos, kurios buvo tiesiogiai paveiktos arba galėjo būti paveiktos antropogeninės veiklos, siekiant įvertinti mielių, kaip aplinkos pokyčiams jautrių ir bioremediaciniu potencialu pasižyminčių mikroorganizmų, paplitimą bei ekologinę reikšmę. Tirtos vietovės apėmė Lietuvos pasienio teritorijas netoli Astravo atominės elektrinės, Alytaus miesto ir rajono teritorijas po padangų perdirbimo įmonės gaisro, Klaipėdos miesto teritorijas, Vilniaus miesto teritorijas prie intensyvaus transporto gatvių bei kuro bazių zonas, kurios buvo pasirinktos dėl galimo skirtingo antropogeninio poveikio intensyvumo ir pobūdžio. Taip pat buvo tirti vandens ėminiai iš Neries upės, Alytaus miesto vandens telkinių po gaisro bei Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo teritorijoje, siekiant įvertinti mielių paplitimą ir rūšių įvairovę skirtingose vandens ekosistemose.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Šio darbo tikslas – ištirti mielių paplitimą ir rūšių įvairovę įvairiuose antropogenizuotuose substratuose, jų biologinius ir ekologinius ypatumus bei pritaikymo biologiniam aplinkos valymui galimybes. Šiam tikslui pasiekti iškelti uždaviniai:

1. Išskirti ir identifikuoti mieles iš įvairių antropogeninės veiklos paveiktų dirvožemio ir vandens substratų.
2. Nustatyti išskirtų mielių morfologinius, fiziologinius ir biocheminius savitumus.
3. Įvertinti išskirtų mielių gebėjimą skaidyti šalutinius žemės ūkio produktus: kviečių šiaudus ir kanapių stiebus.
4. Ištirti išskirtų mielių gebėjimą kaupti chromą ir skaidyti naftos angliavandenilius.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Antropogeninės veiklos paveiktuose dirvožemio ir vandens substratuose vyrauja *Basidiomycota* skyriui priklausančios mielės, dažniausia rūšis – *Rhodotorula mucilaginosa*.
2. Iš antropogenizuoto dirvožemio ir vandens ėminių išskirtos mielės dažniausiai nefermentuoja anglies šaltinių, tačiau geba asimiliuoti platų jų spektrą.
3. Išskirtos mielės auga 5,0–40,0 °C temperatūroje ir esant pH 3,0–8,0.
4. Mielių sinergijoje su kitais mikroskopiniais grybais ir bakterijomis sukurti biopreparatai gali užtikrinti efektyvią naftos angliavandenilių ir šalutinių žemės ūkio produktų biodegradaciją.
5. *Rhodotorula mucilaginosa* rūšies mielės gali akumuliuoti iki 10,0 mg/L trivalenčio chromo chlorido kiekius ir taip prisidėti prie jų sklaidos aplinkoje mažinimo.

DARBO NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Šiame darbe pirmą kartą Lietuvoje buvo atlikta ir pateikta tokia plati ir išsami mielių rūšinės sudėties analizė antropogenizuoto vandens ir dirvožemio ėminiuose, taršos naftos angliavandeniliais, sunkiaisiais metalais, padangų perdirbimo įmonės gaisro metu į aplinką patekusiais teršalais kontekste. Nustatytos dažniausių išskirtų mielių rūšių morfologinės, fiziologinės ir biocheminės savybės. Taip pat, pirmą kartą atlikta tokia išsami ir plati Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandens mielių rūšinės sudėties analizė. Iš viso šio darbo atlikimo metu iš įvairių antropogenizuotų substratų buvo išskirtos 109 mielių rūšys, kurios priklausė 53 gentims, 26 šeimoms, 14 eilių ir 9 klasėms. Tyrimų metu nustatyta, kad 40,39% išskirtų mielių rūšių priklausė *Ascomycota* skyriui, o 59,61% – *Basidiomycota* skyriui. Daugiausia išskirta *Rhodotorula* genties (24,62%) mielių, dominavo *Rhodotorula mucilaginosa* (19,36%).

Kartu su Biodestruktorių tyrimo laboratorijos kolegomis buvo sukurtas efektyvus biopreparatas, susidedantis iš mielių, bakterijų ir mikroskopinių grybų, skirtas naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio biologiniam valymui. Šis biopreparatas yra išskirtinis tuo, kad jo sudėtyje esantys mikroorganizmai geba išgyventi ir prisitaikyti prie toksinio naftos angliavandenilių kiekio valomame dirvožemyje ir efektyviai vykdyti jų biodegradaciją. Šis biopreparatas yra patentuotas (patentas Nr. 7087, išduotas 2024-09-10, registruotas LR patentų registre, 3 priedas).

Taip pat buvo atlikti mielių biodegradacinių ir bioakumuliacinių savybių tyrimai, kurių metu buvo atrinktos mielės, gebančios skaidyti žemės ūkio šalutinius produktus (kviečių šiaudus ir pluoštinių kanapių stiebus) bei kaupti nedidelės koncentracijos trivalenčio chromo junginius. Gauti tyrimų rezultatai, turintys praktinio panaudojimo potencialą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mielių paplitimas įvairiuose gamtiniuose substratuose

Walker G. M. (2009) išskiria šešis mielių buveinių tipus: dirvožemį, vandenį, atmosferą, augalus, gyvūnus ir ekstremalių sąlygų buveinės. Autorius teigia, jog dirvožemis greičiausiai yra vienintelė buveinė labiau tinkama ilgalaikiam mielių išlikimui, nei jų dauginimuisi. Mielių aptinkama ūkinės paskirties dirvožemiuose (apie 10^4 – 10^5 KSV/g). Daugiausia jų aptinkama paviršiniuose dirvožemio sluoksniuose (10–15 cm nuo paviršiaus). Kai kurios mielių gentys (*Lipomyces* ir *Schwanniomyces*) aptinkamos tik dirvožemyje. Gėlo ir sūraus vandens telkiniuose vyrauja mielės, tačiau jų gausumas nėra didelis (apie 10^3 KSV/l) (1 lentelė).

1 lentelė. Mielių paplitimo gamtiniuose substratuose ir jų savybių apžvalga (Walker, 2009; Péter ir kt., 2017)

Buveinė	Mielių paplitimas ir jų savybės
Augalai	Augalai sudaro svarbią mielių buveinę, nes jų paviršiuje gausiu tirpių organinių medžiagų, ypač angliavandenių. Jie sudaro palankias sąlygas mielių kolonizacijai bei užtikrina sąsają tarp augalinių substratų ir mikroorganizmų ekosistemų (pvz., vynuogių uogų paviršius). Filosferoje mielės plinta vabzdžių pagalba (pvz. vaisinėmis muselėmis). Kai kurios mielės yra augalų patogenai (<i>Ashbya</i> , <i>Nematospora</i> spp. ir į mieles panaši <i>Ophiostoma ulmi</i> , sukelianti Olandų guobų ligą).
Gyvūnai	Keletas nepatogeninių mielių rūšių yra siejamos su šiltakraujų gyvūnų virškinamuoju traktu (<i>Candida pintolopesii</i> , <i>Candida slooffii</i> , <i>Cyniclomyces guttulatus</i>) ir oda (pvz. <i>Pityrosporum</i> spp.). Dalis mielių yra patogeniškos gyvūnams (<i>Blastomyces</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Histoplasma</i> sp., <i>Sporotrichum</i> sp. ir kt.). Didelė dalis mielių sudaro simbiozes su vabzdžiais (pvz. <i>Drosophila</i> spp, kinivarpomis ir kt.), kurie veikia kaip reikšmingas vektorius mielių plitimui aplinkoje.
Dirvožemis	Daugeliui mielių rūšių dirvožemis yra vienintelis rezervuaras, kuriame jos geba išgyventi ilgą laiką. <i>Lipomyces</i> ir <i>Schwanniomyces</i> genčių mielės yra tipinių dirvožemio mielių pavyzdžiai. Jos yra išskiriamos tik iš dirvožemio. Skurdžiuose dirvožemiuose (mažai maistinių medžiagų, humuso ir mineralų) mielių aptinkama labai mažais kiekiais, o turtingesniuose (derlingi, maistinių medžiagų ir humuso gausūs) dirvožemiuose jų randama iki 10^4 – 10^5 KSV/g.

Buveinė	Mielių paplitimas ir jų savybės
Vanduo	Mielės yra plačiai paplitusios tiek gėlame, tiek ir sūriame vandenyje (<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Rhodotorula</i> genčių mielės). Kai kurios mielių rūšys (<i>Bandonia marina</i> , <i>Candida oceani</i> , <i>Cystobasidium benthicum</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Metschnikowia zobellii</i>), prisitaikiusios gyventi sūriame vandenyje ir geba išgyventi esant -3,0 – +13,0 °C vandens temperatūrai, apie 35‰ druskingumui bei gyliui iki 11 000 m. Jūros vandenyje įprastai randama apie 10 ¹ – 10 ² KSV/l mielių, tačiau jų koncentracija gali būti reikšmingai didesnė ties įtekančių upių žiotimis bei arčiau pakrantės.
Atmosfera	Oro srovės prisideda prie dirvožemio paviršiniame sluoksnyje esančių mielių plitimo (<i>Cryptococcus</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Sporobolomyces</i>). Ore gali būti aptinkama mielių ląstelių, tačiau jų kiekis yra labai mažas – vos kelios mielių ląstelės kubiniame metre oro.
Ekstremalių sąlygų buveinės	Halotolerantiškos mielės (pvz. <i>Debaryomyces hansenii</i>) geba augti prisotintuose druskos tirpaluose. Osmofilinės mielės (pvz. <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>) geba augti 40-70% sacharozės tirpaluose.

Daugelis iš vandens išskiriamų mielių izoliatų priklauso pigmentuotų mielių gentims (*Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces* ir kt.) (Walker, 2009).

1.2. Mielių paplitimas, rūšių įvairovė ir vaidmuo dirvožemyje

Mielės yra aptinkamos įvairių tipų, taip pat ir rūgščiame, šarminiame, vulkaniniame, žemų temperatūrų dirvožemyje. Skirtingai nei įvairiuose antžeminiuose objektuose, mielių paplitimas dirvožemyje nėra toks gausus. Jų kiekiai retai viršija tūkstančius ląstelių viename grame dirvožemio, tačiau kartais aptinkami ir ląstelių kiekiai, siekiantys milijonus ląstelių viename grame dirvožemio. Organinių medžiagų turtinguose dirvožemiuose mielių koncentracija dažniausiai būna didesnė. Mielės gausiau aptinkamos tręšiamuose agrokultūriniuose dirvožemiuose ir netręštuose vidutinio klimato bei borealiniuose dirvožemiuose, kur organinių medžiagų irimas yra lėtas. Subtropinių ir atogrąžų dirvožemių ėminiai tirti nepakankamai, kad būtų galima padaryti bet kokius pagrįstus apibendrinimus. Mielių ląstelių koncentracija gilesniuose dirvožemio sluoksniuose didėjant gyliui mažėja. Ši tendencija yra aiškinama tuo, jog didėjant dirvožemio sluoksnio gyliui, jame mažėja prieinamų maistinių ir organinių medžiagų. Gyvybingos mielės (*Lipomyces tetrasporus*) buvo aptiktos 100 cm ir net 200 cm gylyje esančiuose

dirvožemio sluoksniuose, tačiau dažniausiai dirvožemio mielės yra labai retos gilesniuose nei 20-30 cm dirvožemio sluoksniuose (Buzzini ir kt., 2017).

Tokios mielių rūšys kaip *Saccharomyces cerevisiae*, dažniausiai siejamos su fermentuotais gėrimais, taip pat gali būti aptinkamos dirvožemio mikroorganizmų bendrijose. Kai kurios dirvožemyje aptinkamos mielių rūšys gali būti alochtoninės (nepastovios) rūšys, kurios yra trumpalaikės arba atsitiktinai į dirvožemį patekusios ir kilusios iš kitų buveinių, pavyzdžiui, augalinių atliekų ar gyvūnų. Nepaisant to, daugybė mielių rūšių yra laikomos autochtoninėmis (pastoviomis) ir priklauso tiek *Ascomycota*, tiek ir *Basidiomycota* skyriams. Dažniausiai mielių koncentracija ir rūšinė sudėtis dirvožemio sluoksniuose pasiskirsto netolygiai. Mielių koncentracija, kuri yra didžiausia dirvožemio paviršiniuose sluoksniuose (10-15 cm nuo paviršiaus), gali svyruoti nuo mažiau nei 10 iki 10⁶ KSV/g. Žinoma, kad daugiau mielių yra aptinkama dirvožemyje, esančiame šalia augalų, formuojančių vaisius, nes gendantys vaisiai patenka į dirvą ir gali tapti maistinių medžiagų turtinga terpe, reikalinga mielių augimui. Taip pat, įvairūs per augalų šaknis išskiriami organiniai junginiai yra asimiliuojami mielių. Dėl šių priežasčių didesnės mielių populiacijos yra aptinkamos rizosferoje. Mokslininkai, atlikę įvairių dirvožemio tipų tyrimus, pastebėjo teigiamą koreliaciją tarp dirvožemio mielių populiacijos dydžio ir organinės anglies bei organinio azoto kiekio dirvožemyje (Botha, 2011; Buzzini ir kt., 2017). Nustatyta, kad 25–40% mielių rūšių maistinių medžiagų turtingame drėgname dirvožemyje geba fermentuoti angliavandenius. Taip pat, toks dirvožemis pasižymi ir didesne mielių rūšių įvairove. Yra žinoma, kad dirvožemio mielės daro teigiamą įtaką dirvožemio struktūrai, maistinių medžiagų perdirbimui ir net augalų augimui. Mielės (ypač *Cryptococcus* ir *Lipomyces* genčių) geba išskirti ekstracelulinius polimerinius junginius, kurie prisideda prie dirvožemio struktūros formavimosi (Botha, 2011; Buzzini ir kt., 2017).

Autochtoninėms dirvožemio mielėms yra priskiriamos *Apiotrichum dulcitum*, *Apiotrichum porosum*, *Cyberlindnera saturnus*, *Lipomyces starkeyi*, *Schwanniomyces polymorphus*, *Vanrija humicola* ir kt. Ne visos iš dirvožemio išskiriamos mielių rūšys yra autochtoninės – dalis jų patenka į dirvožemį alochtoniškai iš kitų aplinkos šaltinių. Pigmentuotos mielės, tokios kaip *Cystobasidium*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridiobolus*, *Sporobolomyces* ir *Vishniacozyma* į dirvožemį patenka nuo filosferos. *Apiotrichum* ir *Cystofilobasidium* genčių mielės dažnai aptinkamos tiek dirvožemyje, tiek ir miško paklotėje bei paviršiniuose nuokritų sluoksniuose. Miško dirvožemiuose dažniau dominuoja *Basidiomycota* skyrius, o agrokultūriniuose dirvožemiuose – *Ascomycota* skyrius mielės. *Lipomyces* genties mielės yra laikomos tipinėmis dirvožemio mielėmis (Yurkov, 2018).

Mokslininkai (Groenewald ir kt., 2018) atliko išsamius dirvožemio mikrobiologinius tyrimus. Buvo ištirti 157 dirvožemio ėminiai iš įvairių Nyderlandų vietų, išskirti 386 mielių izoliatai ir nustatytos 67 mielių rūšys, iš kurių 15 buvo galimai naujos rūšys. Dominavo *Basidiomycota* skyriaus mielių rūšys: *Apiotrichum dulcitum*, *Apiotrichum porosum*, *Cystobasidium slooffiae*, *Holtermanniella wattica*, *Piskurozyma flicatus*, *Piskurozyma taiwanensis*, *Saitozyma podzolica*, *Solicoccozyma terricola* ir *Tausonia pullulans*. Dažniausios *Ascomycota* skyriaus mielių rūšys buvo: *Candida sake*, *Candida subhashii*, *Barnettozyma californica*, *Debaryomyces fabryi*, *Debaryomyces hansenii*, *Trichomonascus vanleeneni*.

Cogliati M. ir kt. (2023) ištyrė mikroskopinių grybų ir mielių paplitimą Europos jūrų pakrančių grunte ir pastebėjo, jog grybų ir mielių pasiskirstymas šiose vietose skiriasi. Tyrimo rezultatai parodė, kad mielės geba geriau toleruoti žemas žiemos laikotarpio temperatūras nei kiti mikroskopiniai grybai. Nustatyta, kad tiek mielių ir kitų mikroskopinių grybų paplitimą ir rūšių įvairovę lemia dirvožemio pH. Taip pat yra žinoma, kad dirvožemiai, pasižymintys didelėmis azoto koncentracijomis yra netinkami mielių augimui, priešingai nei augalų, kurie veši tokioje aplinkoje. Mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad mikroskopiniai grybai dažniau yra aptinkami dirvožemiuose turtinguose nikelio, o mielės – kadmio, o tai lemia jų paplitimą upių žiotyse ir lagūnose, kur šie metalai kaupiasi dugno nuosėdose.

Mielių vaidmuo dirvožemyje dar nėra iki galo suprantas ir ištirtas, žinoma, kad jos turi įtakos dirvožemio agregacijai, dalyvauja mitybos grandinėse, apsaugo augalus nuo patogenų ir dalyvauja mineralizacijos procesuose. Vis daugiau mokslininkų, tiriančių dirvožemio mieles, teigia, kad dirvožemio ir augalų sistemoms didelę įtaką turi dirvožemio mielės, tačiau dar yra atlikta per mažai mokslinių tyrimų šia tema, kurie patvirtintų šiuos teiginius. Neseniai publikuoti moksliniai tyrimai patvirtina mielių įtaką augalų augimui. Tokie tyrimai reikšmingai prisideda prie mielių vaidmens dirvožemyje gilesnio supratimo bei galimybių tokias mieles panaudoti žemės ūkio srityje augalų augimo skatinimui bei jų apsaugai nuo įvairių fitopatogenų (Segal-Kischinevzky ir kt., 2022). Mielės yra laisvai gyvenančios skaidytojos, kurios padeda pagreitinti keletą pagrindinių ekosistemų procesų, tokių kaip organinių medžiagų skilimas, biomasės, kaip maistinių medžiagų šaltinio kitiems organizmams, susidarymas, maistinių medžiagų mineralizacija ir dalyvavimas biogeocheminiuose cikluose. Mielės palaiko įvairaus tipo ekologinę sąveiką (mutualistinę, parazitinę, patogeninę ir kt.) su kitais organizmais (augalais, kitais grybais, gyvūnais, dumbliais ir kt.) (Segal-Kischinevzky ir kt., 2022).

Amprayn K. ir kt. (2012) atlikti tyrimai parodė, jog dirvožemio mielės *Candida tropicalis* geba reikšmingai paskatinti ryžių augimą ir azoto

įsisavinimą išskirdamos į aplinką fitohormonus ir kitas biologiškai aktyvias medžiagas. Jos gamina ir išskiria į aplinką lakiuosius organinius junginius (LOJ), konkuruoja dėl vietos ir maisto medžiagų, produkuoja lizinius fermentus (Kowalska ir kt., 2022). Mielės dažniausiai neprodukuoja toksiškų medžiagų, todėl yra biologiškai saugios ir tinkamos naudoti įvairių žemės ūkio kultūrų apsaugai bei augimo skatinimui, nes jos gali veikti kaip biokontrolės agentai prieš augalų patogeninius grybus, bakterijas ir kai kuriuos vabzdžius kenkėjus, taip pat didinti augalų atsparumą aplinkos stresui (Kowalska ir kt., 2022).

1.3. Mielių paplitimas, rūšių įvairovė ir vaidmuo vandens telkiniuose

Mielės yra dažnai aptinkamos vandens telkiniuose. Jų gausumas ir įvairovė priklauso nuo vandens kokybės (Pandi ir kt., 2019). Lyginant su dirvožemio tyrimais, mielių tyrimai vandens telkiniuose yra retesni. Daugelis mielių paplitimo ir rūšių įvairovės vandenyje tyrimų yra susiję su įvairios kilmės vandens tarša, antropogeninės kilmės įtakos vandens ekosistemoms vertinimu, nuotekų tyrimais. Vis dar trūksta platesnio mažiau žmogaus paveiktų vandens telkinių ištirimo bei mielių paplitimo ir rūšių įvairovės juose vertinimo (Medeiros ir kt., 2012; Monapathi ir kt., 2020).

Gėlame vandenyje dažniausiai yra aptinkamos *Candida*, *Cyberlindnera*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Yarrowia*, *Khuyveromyces*, *Meyerozyma*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* ir *Trichosporon* genčių mielės (Medeiros ir kt., 2012; Monapathi ir kt., 2020). Biedunkiewicz ir kt. (2013) nurodo, kad Lenkijos gėlo vandens telkiniuose dažniausiai buvo aptiktos *Candida* genties mielės, o kiek rečiau – *Kazachstania*, *Khuyveromyces* ir *Wickerhamomyces* genčių mielės. Visais metų laikais aptiktos mielių rūšys buvo *Candida albicans*, *Candida solanii*, *Debaryomyces hansenii*, *Khuyveromyces lactis* var. *lactis*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wanderwaltozyma polyspora*, *Wanderwaltozyma yarrowii* ir *Wickerhamomyces bisporus*.

Paviršiniame ir gruntiniame vandenyje, kurie dažnai yra naudojami kaip geriamojo vandens šaltiniai, taip pat yra aptinkama mielių. Dažniausiai tai *Candida*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Rhodotorula* ir *Trichosporon* genčių mielės. Dalis šių mielių rūšių yra oportunistiniai patogenai. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė gruntiniame vandenyje yra panašūs į paviršinio vandens. Dažniausiai gruntiniame vandenyje aptinkamos *Candida*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*,

Yarrowia, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* ir *Trichosporon* genčių mielės. Šių genčių mielės aptinkamos ir vandentiekio sistemose (Medeiros ir kt., 2012; Biedunkiewicz ir kt., 2013; Monapathi ir kt., 2020). Babič M. N. ir kt. (2016) nurodo, jog jų atliktų tyrimų metu, tiek gruntiniame, tiek ir geriamajame vandenyje dažniausiai aptiktos mielių rūšys buvo *Aureobasidium melanogenum*, *Candida parapsilosis*, *Exophiala dermatitidis* ir *Rhodotorula mucilaginosa*. Gadanho M. ir kt. (2004) nustatė, jog Tacho upės (Portugalija) vandenyje dažniausiai aptinkamos mielių rūšys buvo *Cryptococcus longus*, *Debaryomyces hansenii* ir *Rhodotorula mucilaginosa*.

Jūros ekosistemose yra stebimas buitinių, gamybinių ir paviršinių nuotekų poveikis. Dažniausiai jūros vandenyje yra aptinkamos *Bullera*, *Candida*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hanseniaspora*, *Yarrowia*, *Kluveromyces*, *Meyerozyma*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* ir *Wickerhamomyces* genčių mielės. Mielės sudaro svarbią jūrų mikrobiotos dalį ir dalyvauja mitybos grandinėse kaip organinių medžiagų skaidytojai bei potencialus maisto šaltinis kitiems mikroorganizmams. Jos yra įvairių jūros bestuburių ir zooplanktono mitybos šaltinis (Medeiros ir kt., 2012; Monapathi ir kt., 2020). Chang C. F. ir kt. (2015) nustatė, kad jūros vandens paviršiniame sluoksnyje dažniausiai yra aptinkamos *Ascomycota* skyriaus mielės, iš kurių dažniausios *Aureobasidium pullulans*, *Candida intermedia*, *Yarrowia lipolytica* ir *Pichia guilliermondii* mielių rūšys. Taip pat aptinkama ir *Basidiomycota* skyriaus mielių, iš kurių dažniausios yra *Rhodotorula mucilaginosa* rūšies mielės.

Jūros vandenyje aptinkamos mielės geba dalyvauti įvairiuose biodegradacijos procesuose. Jos dalyvauja daugybėje ekologiškai reikšmingų procesų, kurie aktyviausiai vyksta pakrantės ir priekrantės zonose, įskaitant organinės medžiagos skaidymą, maistinių medžiagų apykaitą, pirminės produkcijos palaikymą, bioremediaciją bei sąveikas su kitais mikroorganizmais, dumblių ir gyvūnų bendrijomis. Taip pat, gana didelės mielių koncentracijos (iki $2,0 \times 10^3$ KSV/g) yra aptinkamos jūrų ir vandenynų dugno nuosėdų sluoksnyje. Didžiausias jų kiekis aptinkamas iki kelių centimetrų nuo nuosėdų paviršiaus. Apie 99 mielių rūšys buvo išskirtos iš jūros dugno nuosėdų ir jose gyvenančių gyvūnų organizmų. Dažniausiai iš jūros dugno nuosėdų yra išskiriamos *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, ir *Trichosporon* genčių mielės. Dalis mielių aptinkama ypač giliose jūrų ir vandenynų vietose (11000 m), tačiau didžiausias jų kiekis stebimas šiek tiek seklesnėse (1000–6500 m) šių vandens telkinių dalyse (Webster, 1976).

1.4. Mielių morfologinės, fiziologinės ir biocheminės savybės

1.4.1. Mielių morfologinės savybės

Mielės yra eukariotiniai vienaląsčiai organizmai, priskiriami grybų karalystei. Jos išsivystė iš daugialąsčių protėvių keliuose nepriklausomuose taksonuose, o kai kurios jų rūšys geba atkartoti daugialąsčių organizmų ypatybes, formuodamos „siūlus“, žinomus kaip pseudohifai arba netikri hifai (Kurtzman ir kt., 2011; Maicas, 2020). Ši morfologinė transformacija suteikia joms didesnę paviršiaus plotą maisto medžiagų įsisavinimui, palengvina kolonizaciją kietuose substratuose bei padeda išvengti nepalankių aplinkos sąlygų. Kai kurios rūšys (pvz., *Candida albicans*) pseudohifų formavimą išnaudoja ir patogeniškumui, nes ši forma padeda prasiskverbti į šeimininko audinius bei apeiti imuninės sistemos gynybą. Mielių ląstelės turi tvirtą ląstelės sienelę sudarytą daugiausia iš gliukanų, mananų ir chitino, kurie užtikrina struktūrinį vientisumą ir apsaugą. Taip pat mielių ląstelės turi selektyvią plazminę membraną, kuri kontroliuoja medžiagų transportavimą į ląstelę ir iš jos (Garcia-Rubio ir kt., 2020; Maicas, 2020).

Mielių ląstelės dydis gali labai skirtis, priklausomai nuo rūšies ir aplinkos sąlygų. Mielių ląstelės gali būti nuo 2,0–3,0 µm iki 20,0–50,0 µm ilgio. Ląstelės plotis skiriasi mažiau ir svyruoja tarp 1,0 ir 10,0 µm. Viena iš geriausiai žinomų ir plačiai naudojamų įvairiose pramonės šakose mielių rūšių yra *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* ląstelės yra apvalios, kiaušinio formos. Jų skersmuo svyruoja nuo 2,5 iki 10,0 µm, o ilgis nuo 4,5 iki 21,0 µm. Tai pačiai padermei priklausančių ląstelių dydis ir forma skiriasi tam tikrose ribose, priklausomai nuo auginimo sąlygų (Spencer ir Spencer, 1997; Knop, 2011).

Walker G. (2009) išskiria devynias mielių ląstelių formas: elipsoidinę, cilindrinę, smailios (citrinos) formos, ogivalinę (Gotikinio skliauto formos), kolbos formos, pseudohifinę, hifinę, dimorfinę ir įvairialypę.

Mielių vegetatyvinio dauginimosi ir vegetatyvinių ląstelių charakteristikos gali padėti suklasifikuoti mieles. Vegetatyvinis dauginimasis vyksta ląstelei dalijantis arba pumpuruojant ar formuojant konidijas. Dauginimasis dalijantis yra tipinis *Endomycetaceae* ir *Schizosaccharomycoides* požymis. *Candida* ir *Saccharomyces* genčių mielės pasižymi dauginimusi pumpuruojant. Dauginimasis formuojant konidijas yra tipinis *Sterigmatomyces* genties mielių požymis (Spencer ir Spencer, 1997). Vegetatyvinių ląstelių požymis yra pseudomicelio arba tikrojo micelio formavimas. Jei mielės dauginasi esant nepalankioms aplinkos sąlygoms (mažas maisto medžiagų kiekis, žemas pH, aukšta temperatūra, deguonies

trūkumas ir kt.) tik pumpuruodama, tuomet ji sudaro pseudomicelį. Tokios mielės yra pavyzdžiui *Candida* sp. ir *Brettanomyces anomalus* (Spencer ir Spencer, 1997; Hohmann, 2002; Di Serio ir kt., 2003). Jei mielės, besidauginančios tik dalijantis suformuoja filamentines ląsteles, tuomet sakoma, kad jos sudaro tikrąjį micelį. Mielių morfologijos nustatymas jas auginant skystose ar agarizuotose terpėse yra pagrįstas ląstelės formos (sferinė, pusrutulio, kiaušinio, cilindrinė ir t.t.) nustatymu. Tipiniai pavyzdžiai galėtų būti citrinos vaisiaus formos *Nadsonia* genties mielių ląstelės, butelio formos *Pityrosporum* genties mielių ląstelės ir trikampio formos *Trigonopsis* genties mielių ląstelės (Spencer ir Spencer, 1997; Hohmann, 2002; Di Serio ir kt., 2003; Deak, 2006; Garcia Rubio ir kt. 2020; Maicas, 2020; Wang ir kt., 2024).

1.4.2. Mielių fiziologinės ir biocheminės savybės

Mielės geriausiai auga neutralioje arba silpnai rūgščioje terpėje, kurios pH yra pH 4,5-6,5, aerobinėmis sąlygomis, esant visų būtinų maisto ir augimui reikalingų medžiagų (anglies ir azoto šaltiniai, mineralinės medžiagos, vitaminai ir augimo faktoriai, pakankamas vandens kiekis) pakankamiems kiekiams ir optimaliai 28–30 °C temperatūrai. Dauguma mielių puikiai išgyvena šiltoje, cukringoje, rūgštinėje ir aerobinėje aplinkoje. Dauguma laboratorijoje ir pramonėje naudojamų mielių (pvz., *S. cerevisiae* padermės) geriausiai auga 20–30 °C temperatūroje, tačiau specifinėse buveinėse gali būti aptinkama mielių, kurios geba išgyventi ir augti neigiamoje (-2–0°C) ir aukštoje (45–50°C) aplinkos temperatūroje. Esant aukštesnei nei 55–60 °C aplinkos temperatūrai, mielės dažniausiai žūsta. Mielių augimui bei jų medžiagų apykaitai reikia didelio vandens kiekio. Dalis mielių, pavyzdžiui, *Zygosaccharomyces* spp., dalyvaujančios maisto produktų gedimo procesuose, gali išgyventi žemo vandens potencialo sąlygomis (t. y. esant didelėms cukraus ar druskos koncentracijoms). Tokios mielės yra vadinamos osmotolerantiškomis arba kserotolerantiškomis (Hohmann, 2002; Di Serio ir kt., 2003; Deak, 2006; Walker, 2009; Maicas, 2020).

Substratas, parūgštintas organinėmis rūgštimis (pvz., acto, pieno), labiau slopina mielių augimą nei terpė, parūgštinta mineralinėmis rūgštimis (pvz., druskos rūgštimi). Taip yra todėl, kad nedisocijuotos organinės rūgštys gali sumažinti tarpląstelinį pH po to, kai jos perkeliamos per mielių ląstelių membraną. Tokiu būdu, panaudojant organines rūgštis, slopinančias mielių augimą, sukuriama sąlyga maisto produktų gedimo stabdymui. Aktyviai augančios mielės rūgština augimo terpę. Tai vyksta dėl diferencinio jonų įsisavinimo, protonų sekrecijos maisto medžiagų transportavimo metu,

tiesioginės organinių rūgščių (pvz., gintaro ir acto) sekrecijos bei anglies dioksido išsiskyrimo iš ląstelės ir jo tirpimo aplinkoje (skystoje terpėje). Mielių ląstelėms augant, jos palaiko tarpląstelinį pH siaurose fiziologiškai optimalaus intervalo ribose, kurios būtinos normaliam metabolizmui ir dauginimuisi. Šis pH homeostazės palaikymas vyksta dalyvaujant plazminės membranos komponentams, ypač protonus pumpuojančiai H^+ -ATPazei, aktyviai išskiriančiai protonus į aplinką (Walker, 2009; Phale, 2018).

Mielės geba anaerobiniu būdu fermentuoti angliavandenius, juos paversdamos etanolu ir anglies dioksidu. Ši savybė yra itin svarbi įvairiems biotechnologiniams procesams. Esant deguonies, mielės atlieka aerobinę kvėpavimą, gamindamos anglies dioksidą ir vandenį. Šis procesas yra efektyvesnis nei fermentacija. Dauguma mielių yra fakultatyviniai anaerobai, tačiau optimaliai auga aerobinėje aplinkoje. Anaerobinėmis sąlygomis jų augimas ribotas, nes deguonis yra ne tik galutinis elektronų akceptorius kvėpavimo grandinėje, bet ir būtinas kaip kofaktorius membraninių nesočiųjų riebalų rūgščių (pvz., oleino rūgšties) ir sterolių (pvz., ergosterolio) biosintezėje. Pagrindinių maistinių medžiagų, tokių kaip angliavandeniai, aminorūgštys ir azoto junginiai, prieinamumas lemia mielių ląstelių vystymąsi ir augimo greitį. Mielių ląstelės geba panaudoti įvairius junginius kaip energijos šaltinį ir kaip anglies turinčius anabolinio metabolizmo ir biomasės kaupimo pirmtakus (Hohmann, 2002; Di Serio ir kt., 2003; Deak, 2006; Walker, 2009; Phale, 2018; Maicas, 2020; Meledina ir kt., 2021).

Mielių ląstelės pirmiausia naudoja lengviausiai prieinamus angliavandenius, tokius kaip gliukozė ar fruktozė, o ne kitus mono-, di- ar trisacharidus, pavyzdžiui, sacharozę, rafinozę ar trehalozę. Jos taip pat teikia pirmenybę bet kuriam fermentuojamam anglies šaltiniui, palyginti su sunkiau panaudojamais substratais, tokiais kaip glicerolis, etanolis ar acetatas, kurių katabolizmui būtinas oksidacinis fosforilinimas. Šis hierarchinis substratų vartojimo modelis yra nustatomas alosterinės pagrindinių glikolizės ir gliukoneogenezės fermentų reguliacijos bei plataus transkripcijos reguliavimo tinklo. Pastarajame gliukozė slopina genų, reikalingų mažiau prieinamų angliavandenių katabolizmui, taip pat genų, koduojančių elektronų pernašos grandinės komponentus ir kitus mitochondrijų baltymus, raišką. Toks reguliavimas užtikrina, kad esant gliukozei mielės neįsisavintų nefermentuojamų anglies šaltinių oksidacinio fosforilinimo būdu. (Phale, 2018; Meledina ir kt., 2021).

Mielių ląstelių augimui yra būtini įvairūs makroelementai (anglis, azotas, deguonis, siera, fosforas, kalis ir magnis) bei mikroelementai (pvz., kalcis, varis, geležis, manganas ir cinkas). Dauguma mielių gerai auga mitybos terpėse, į kurių sudėtį įeina būtini anglies ir azoto junginiai kartu su

neorganiniais jonais bei augimo faktoriais. Augimo faktoriai yra organiniai junginiai, kurie reikalingi mažomis koncentracijomis, atliekantys specifinius katalizinius ar struktūrinius vaidmenis mielių ląstelėse, tačiau nenaudojami kaip energijos šaltiniai. Mielių augimo faktoriai tai įvairūs vitaminai, kurie dalyvauja užtikrinant gyvybines funkcijas kaip kofermentų komponentai, purinai ir pirimidinai, nukleozidai ir nukleotidai, amino rūgštys, riebalų rūgštys, steroliai ir kiti įvairūs junginiai (pvz., poliaminai ir cholinai). Mielių augimui šie augimo faktoriai yra būtini, nes jos negali šių junginių pasigaminti savo ląstelėse. Šį teiginį įrodo faktas, jog į mitybinę terpę, skirtą mielių augimui, neįdėjus jų augimui būtinų medžiagų, mielės šioje terpėje neišaugs (Walker, 2009; Phale, 2018).

Mielės geba panaudoti įvairius angliavandenius, tokius kaip gliukozė, fruktozė ar sacharozė, bei kitus anglies šaltinius energijos gavimui ir biomasės sintezei. Jų mitybai būtini azoto šaltiniai – amonio druskos, aminorūgštys ir peptidai, kurie naudojami baltymų bei kitų azotinių junginių biosintezei. Be to, mielėms reikalingi B grupės vitaminai (pvz., biotinas, tiaminas) ir mikroelementai (pvz., magnis, cinkas), atliekantys esminį vaidmenį fermentų veikloje ir pagrindiniuose ląstelių metaboliniuose procesuose. Svarbu paminėti, kad mielės pasižymi savybėmis, kurios padeda joms išgyventi esant ekstremalioms aplinkos sąlygoms. Mielės gali išgyventi esant didelei cukraus ar druskos koncentracijai, kaupdamos tirpias medžiagas, tokias kaip glicerolis. Kai kurios mielių padermės, ypač naudojamos alaus ir bioetanolio gamyboje, gali toleruoti dideles etanolio koncentracijas. Mielių ląstelės gali gaminti šilumos šoko baltymus, kad išgyventų staigų temperatūros padidėjimą (Di Serio ir kt., 2003; Deak, 2006; Maicas, 2020).

Mielės geba įsisavinti (asimiliuoti) daugybę įvairių anglies šaltinių. Jos geba įsisavinti ir ląstelėje vykstantiems procesams panaudoti angliavandenius (heksozės ir pentozės), alkoholius, organines rūgštis, azoto junginius, aminorūgštis bei aminus. Šios mielių savybės yra panaudojamos ne tik fiziologinių ir biocheminių savybių tyrimams, bet ir identifikavimui. Šių savybių pagrindu yra sukurtos identifikacinės sistemos, kurios padeda nustatyti mielių gentį ir / arba rūšį 90 - 95% tikslumu (Broach, 2012; Phale, 2018).

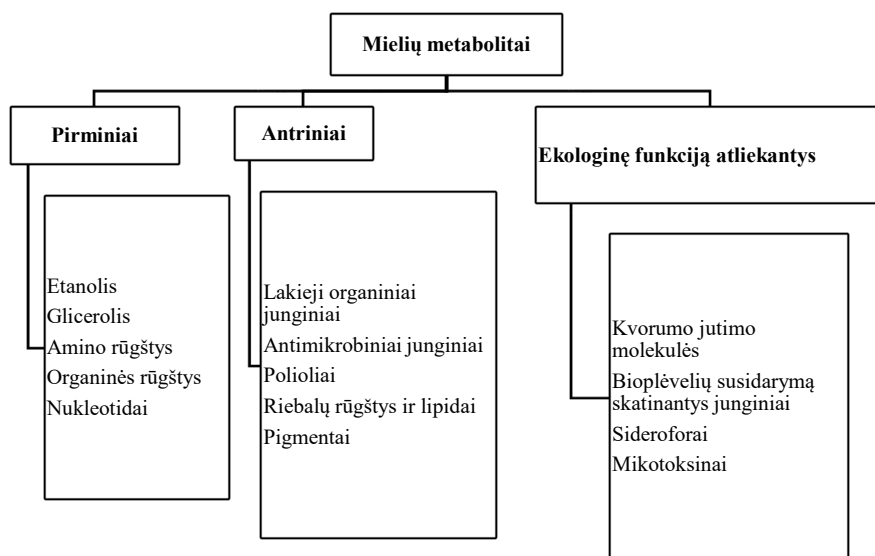
Mielės geba asimiliuoti heksozės pagrindu sudarytus angliavandenius (gliukozę, inuliną, sacharozę, melibiozę, galaktozę, laktozę, trehalozę, maltozę, melezitozę metil- α -D-gliukozidą, tirpųjį krakmolą, celobiozę, saliciną ir kt.), pentozes (L-sorbozę, L-ramnozę, D-ksilozę, L-arabinozę, D-arabinozę, D-ribozę ir kt.), alkoholius (etanolį, metanolį, glicerolį, eritritolį, ribitolį, galaktitolį, D-manitolį, D-gliucitolį, *myo*-inozitolį L-arabinitolį, 1,2-

propandiolį, 2,3-butandiolį ir kt.), organines rūgštis (pieno, gintaro, citrinų ir kt.), azoto junginius (šlapalą ir kt.) (Kurtzman ir kt., 2011).

Mielės taip pat geba vykdyti įvairių angliavandenių fermentaciją. Yra žinoma, kad jei mielės fermentuoja tam tikrą angliavandenį, tai geba jį ir asimiliuoti t. y. augti terpėje su šiuo angliavandeniu kaip pagrindiniu anglies šaltiniu. Ši taisyklė negalioja priešingai, t. y., jei mielės asimiliuoja angliavandenį, tai dar nereiškia, jog jį geba ir fermentuoti. Matuojant fermentacijos metu susidarančio anglies dioksido kiekį, nustatyta, kad mielių gebėjimas fermentuoti įvairius anglies šaltinius yra skirtingas. Nustatyta, kad *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* ir *Zygosaccharomyces* genčių mielės stipriai fermentuoja gliukozę ir kai kuriuos kitus angliavandenius, tačiau kitos mielių rūšys, gali šį anglies šaltinį fermentuoti silpnai, arba išvis nefermentuoti. Dažniausiai yra tiriamas mielių gebėjimas fermentuoti gliukozę, sacharozę, maltozę, laktozę, rafinozę ir trehalozę. Šios mielių savybės yra panaudojamos įvairiose pramonės šakose bei kaip identifikacinių testų sudėtinė dalis (Kurtzman ir kt., 2011; Broach, 2012; Phale, 2018).

1.4.3. Mielių išskiriami metabolitai

Įvairių pasaulio šalių mokslininkai pastebėjo, kad mielės gamina metabolitus, kurie leidžia joms prisitaikyti prie aplinkos sąlygų ir sąveikauti su kitais organizmais. Mielių metabolitai yra skirstomi į tris tipus: pirminius, antrinius metabolitus ir ekologinę funkciją atliekantys (1 pav.).



1 pav. Mielių išskiriami metabolitai.

Mokslininkai nustatė, kad mielės produkuoja pirminius metabolitus, kuriems yra priskiriami etanolis, glicerolis, amino rūgštys, organinės rūgštys bei nukleotidai (Bauer ir Pretorius, 2000; Hohmann, 2002; Di Serio ir kt., 2003; Deak, 2006). Etanolis yra gaminamas anaerobinėmis sąlygomis, etanolis gali būti energijos šaltinis ir turi antimikrobinių savybių, padedančių mielėms konkuruoti su kitais mikroorganizmais. Glicerolis padeda osmosiniam reguliavimui ir pagerina atsparumą stresui, ypač aplinkoje, kurioje drėgmės lygis svyruoja. Amino rūgštys yra būtinos baltymų sintezei ir ląstelių funkcijoms, jos gaminamos medžiagų apykaitos keliuose, pritaikytuose prie specifinių aplinkoje esančių maistinių medžiagų. Organinės rūgštys, tokios kaip citrinų rūgštis ir gintaro rūgštis, dalyvauja pH reguliavime ir kaip tarpinės medžiagos metabolizmo keliuose. Nukleotidai yra labai svarbūs DNR ir RNR sintezei, leidžiantys mielių ląstelėms augti ir daugintis (Bauer ir Pretorius, 2000; Hohmann, 2002; Di Serio ir kt., 2003; Deak, 2006; Nevoigt, 2008).

Mokslininkų teigimu, mielės produkuoja antrinius metabolitus, kuriems priskiriami lakieji organiniai junginiai, fungicidiniai ir antibakteriniai junginiai, polioliai, riebalų rūgštys ir lipidai bei pigmentai (Bauer ir Pretorius, 2000; Hohmann, 2002; Di Serio ir kt., 2003; Deak, 2006). LOJ yra esteriai, alkoholiai ir aldehydai, kurie gali pritraukti apdulintojus, arba atbaidyti plėšrūnus ir prisidėti prie dalyvavimo simbiotiniuose santykiuose su augalais. Mielės gali išskirti antimikrobinius junginius, turinčius fungicidinių ir antibakterinių savybių, kurie padeda joms konkuruoti su kitais mikroorganizmais bendroje buveinėje. Be to, jos sintetina poliolius, tokius kaip arabitolis ir manitolis, kurie veikia kaip apsauginės molekulės stresinėmis sąlygomis (pvz., osmosinio ar oksidacinio streso metu) bei tarnauja kaip anglies ir energijos kaupimo formos. Riebalų rūgštys ir lipidai yra svarbūs ląstelių membranos vientisumui ir energijos kaupimui, ypač esant ribotam maistinių medžiagų kiekiui. Pigmentai karotinoidai ir melaninas apsaugo nuo UV spindulių ir oksidacinio streso (Liu, 2015; Braga ir kt., 2016; Dzialo ir kt., 2017; Zawrotniak ir kt., 2019).

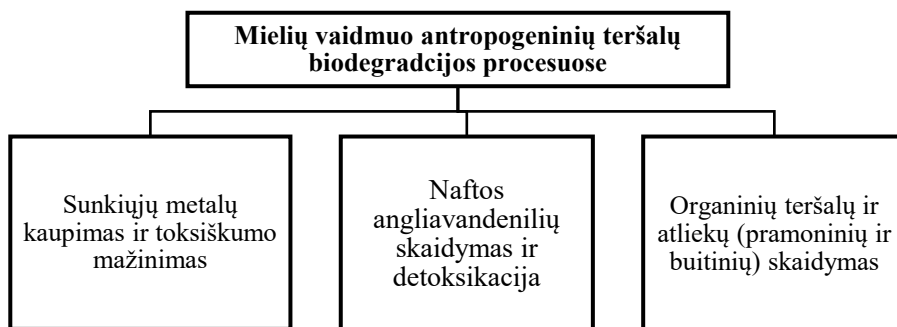
Moksliniai tyrimai rodo, kad mielės gali gaminti metabolitus, atliekančius svarbius ekologinius vaidmenis, tokius kaip kvorumo jutimą reguliuojančios molekulės, bioplėvelių formavimą skatinantys junginiai, geležies įsisavinimą užtikrinantys sideroforai bei kai kurie mikotoksinai (Zawrotniak ir kt., 2019; Celia ir Černáková, 2020). Kvorumo jutimo molekulės, tokios kaip farneзолis, padeda palaikyti ryšius tarp ląstelių ir koordinuoti jų grupių elgesį. Bioplėvelės formavimo molekulės yra polisacharidai ir baltymai, dalyvaujantys formuojant bioplėveles, kurie apsaugo mielių kolonijas nuo aplinkos streso ir plėšrūnų. Sideroforai yra junginiai, kurie suriša geležį iš

aplinkos ir padeda mielių ląstelėms įgyti šią svarbią medžiagą esant ribotam geležies kiekiui. Mikotoksinai yra toksiški junginiai, galintys atgrasyti nuo plėšrūnų ir slopinti konkuruojančių mikroorganizmų augimą (Zawrotniak ir kt., 2019; Celia ir Černáková, 2020; Garcia Rubio ir kt. 2020; Maicas, 2020; Wang ir kt., 2024).

1.5. Mielių vaidmuo ir panaudojimas biodegradacijos ir bioremediacijos procesuose

1.5.1. Mielių vaidmuo ir panaudojimas natūralių ir antropogeninės kilmės medžiagų biodegradacijos procesuose

Mielės vaidina svarbų vaidmenį antropogeninės kilmės medžiagų biologinio skaidymo procesuose. Šios medžiagos apima įvairius teršalus, tokius kaip angliavandeniai, sunkieji metalai ir sintetinės cheminės medžiagos. Mielės prisideda prie sunkiųjų metalų šalinimo iš įvairių substratų (dirvožemio, vandens, dumblo ir kt.), jų toksiškumo mažinimo, naftos angliavandenių biodegradacijos ir toksiškumo mažinimo, įvairių kitų organinės kilmės teršalų, pramonės ir buitinių atliekų biologinio skaidymo (Cadete et. al, 2017) (2 pav.).



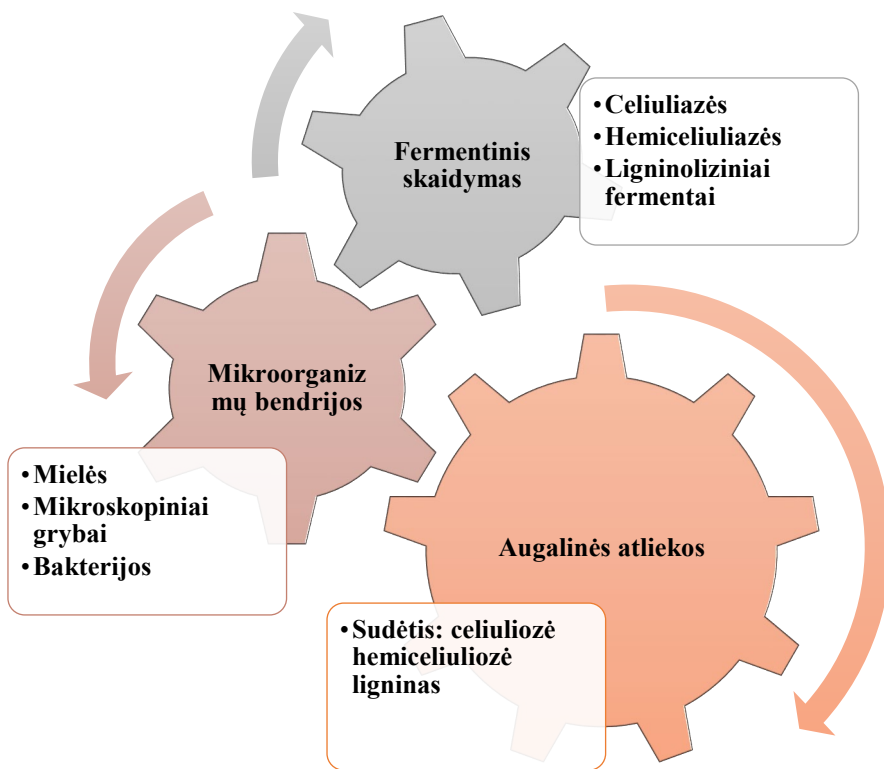
2 pav. Mielių vaidmuo antropogeninių teršalų biodegradacijos procesuose.

Wuczkowski M. ir Sterflinger K. (2005) bei Yurkov ir kt. (2012) tyrė dirvožemius, paveiktus skirtingo naudojimo intensyvumo (pvz., natūralūs miškai, pievos, ganyklos, ariami laukai). Tyrimai parodė, kad augalijos tipo pasikeitimas turėjo įtakos tiek mielių koncentracijai, tiek jų rūšių įvairovei dirvožemyje. Be to, nustatyta, kad dirvožemio naudojimo intensyvumas turėjo tik nedidelį poveikį mielių kiekiui ir rūšių gausai, tačiau reikšmingai pakeitė mielių bendrųjų sudėtį ir struktūrą. Šiame tyrime buvo atskleisti du reikšmingi

mielių bendrijų pokyčiai, siejami su dirvožemio naudojimo intensyvumu. Pirmasis svarbus pokytis yra susijęs su *Ascomycota* skyriaus mielių vyravimu ir jų dalies dirvožemyje didėjimu plataus ir intensyvaus naudojimo pievose. Antrasis svarbus pokytis buvo tai, kad mielių bendrijų tolygumas atitiko žemės naudojimo intensyvumą. Tolygumas didėjo intensyvėjant miško naudojimui, o natūraliuose bukų miškuose susiformavo netolygiausios struktūros bendrijos. Taip pat šis tyrimas parodė, kad mielių rūšinė sudėtis skirtinguose ėminių surinkimo regionuose stipriai skyrėsi net toje pačioje gamtinėje zonoje. Pastebėta, kad dirvožemio mielių bendrijos buvo gana skurdžios rūšine sudėtimi ir nevienalytės, lyginant regionus, biotipus bei dirvožemio naudojimo tipus.

1.5.1.1. Mielių vaidmuo augalinės medžiagos skaidymo procesuose

Augalų nuokritų irimas yra siejamas su daugybe fizikinių ir cheminių procesų, kurių metu šios atliekos yra suardomos iki jas sudarančių cheminių elementų. Šį procesą suaktyvina mikroorganizmai, kurie kolonizuoja nuokritas. Lapų detrito sluoksnio mikroorganizmų bendriją dažniausiai sudaro mikroskopiniai grybai, mielės ir bakterijos, kurie skaido makromolekules, tokias kaip celiuliozė, hemiceliuliozė, pektinas, baltymai ir ligninas. Mielės kaip ir kiti mikroskopiniai grybai yra svarbiausi lapų nuokritų ardytojai. Mielės geba skaidyti sunkiau skaidomas molekules, tokias kaip celiuliozė ir ligninas, kurios bakterijoms yra sunkiai prieinamos (3 pav). Mielių kiekis ir rūšių įvairovė augalų nuokritose labai priklauso nuo klimato, metų laiko, augalijos tipo, lokalizacijos ir nuokritų sluoksnio suirimo lygio, taip pat ir nuo to, ar nuokritų skaidymas vyksta vandenyje, ar sausumoje. Mielių nuokritose galima aptikti visų jų irimo stadijų metu ir jos dažniausiai priklauso *Basidiomycota* skyriui.



3 pav. Mielių vaidmuo augalinių atliekų skaidymo procesuose.

Dažniausiai irstančiose nuokritose yra aptinkamos *Cryptococcus terricola* ir *Trichosporon porosum* mielių rūšys, pasižyminčios dideliu celiuliaziniu aktyvumu (Varnaitė ir kt., 2008, Varnaitė ir kt., 2011). Taip pat dažnai aptinkamos, *Cystofilobasidium capitatum*, *Leucosporidium scottii*, *Naganishia albida*, *Papiliotrema laurentii*, *Rhodotorula fujisanensis*, *Saitozyma podzolica* ir *Tausonia pullulans* mielių rūšys, priklausančios *Basidiomycota* skyriui (Cadete ir kt., 2017).

Wuczkowski M. ir Sterflinger K. (2005) tyrė mielių paplitimą Austrijos natūralių miškų nuokritų sluoksnyje ir aptiko 82 mielių padermes, kurios priklausė 21 mielių rūšiai. Jie nustatė, kad didžiausią išskirtų mielių rūšių dalį sudarė *Basidiomycota* skyriaus mielės *Apiotrichum porosum*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Dioszegia hungarica*, *Goffeauzyma gastrica*, *Leucosporidium fellii*, *Papiliotrema laurentii*, *Pseudotremella moriformis*, *Rhodotorula bacarum*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Vishniacozyma carnescens*, ir *Visniacozyma victoriae*. Dažniausiai aptiktos, su augalinių atliekų skaidymu susijusios *Ascomycota* skyriaus mielių rūšys buvo *Aureobasidium pullulans* ir *Taphrina wiesneri*.

Ligninoceliuliozinės atliekos yra laikomos pagrindiniu atsinaujinančios biomasės komponentu. Šias atliekas sudaro trys pagrindinės sudedamosios dalys: celiuliozė (40–50%), hemiceliuliozė (25–30%) ir ligninas (15–20%). Celiuliozė yra sudaryta iš maždaug 8000 β -1,4-gliukozidinėmis jungtimis sujungtų D-gliukozės subvienetų, išsidėstančių nešakotomis linijinėmis grandinėmis. Šios struktūros yra vadinamos mikrofibrilėmis. Celiuliozės grandinės yra tarpusavyje sujungiamos į mikrofibriles vandenilinių jungčių ir van der Valso sąveikos pagalba. Ligninas taip pat yra vienas iš labiausiai gamtoje paplitusių sudėtingų biopolimerų. Jis pasižymi mažu bioskaidumu dėl savo sudėtingos cheminės struktūros. Ligninas yra sudarytas iš fenilpropano darinių, kurie susidaro polimerizuojantis guajacilo, siringilo ir p-hidroksifenilo vienetais. Šie vienetai yra gaunami iš atitinkamų pirtakų – koniferilo, sinapilo ir p-kumarino alkoholio. Ligniną sudaro didelės molekulinės masės aromatinis polimeras, kuriame gausu stabilų eterio (C–O–C) ir esterių (C–O–C=O) jungčių. Apžvelgiant visą ligninoceliuliozinių atliekų struktūrą, galima pasakyti, jog celiuliozės mikrofibrilės yra įterptos į sudėtingą matricą, kuri sudėtyje turi hemiceliuliozės ir lignino, o šie mažina jų prieinamumą celiuliazėms ir hemiceliuliazėms (Kumar ir Chandra, 2020). Ligniną skaidančių mielių pavyzdžiai galėtų būti *Candida tropicalis*, *Naganishia albida*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Cutaneotrichosporon oleaginosum* ir kitų rūšių mielės (Gluth ir kt., 2025; Bautista-Guerrero ir kt., 2022).

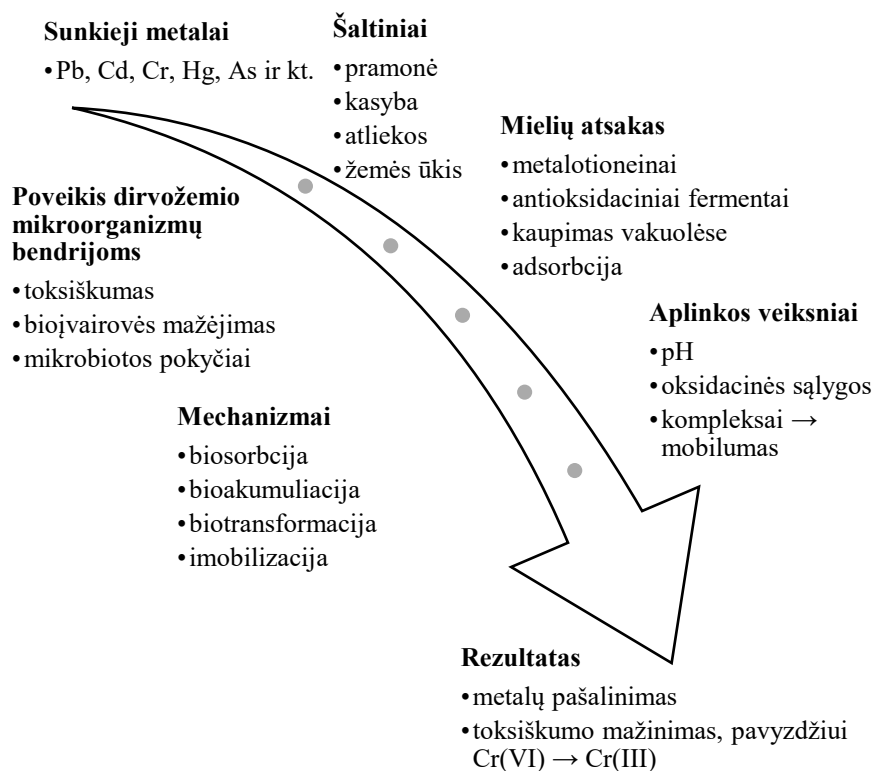
Celiuliozė yra vienas iš labiausiai Žemėje paplitusių polisacharidų. Ji yra pagrindinė augalinės kilmės medžiagų sudedamoji dalis. Celiuliozės hidrolizę katalizuoja fermentai celiuliazės. Celiuliazės – tai fermentų grupė, susidedanti daugiausia iš endogliukanazių, egzogliukanazių ir β -gliukozidazės. Šios grupės fermentus gamina ir mielių ląstelės (Sohail ir kt., 2022). Celiuliazės katalizuoja celiuliozės skaidymo reakciją nutraukdamos β -1,4-glikozidines jungtis. Egzogliukanazė sukelia gliukozės arba celobiozės vienetų susidarymą, atakuodama redukuojamą arba neredukuojamą celiuliozės grandinių galus. β -gliukozidazė hidrolizuoja neredukuojamų grandinės galų celobiozę iki gliukozės, tačiau yra neaktyvi prieš amorfinės ir kristalines celiuliozės formas (Jayasekara ir Ratnayake, 2019).

Hemiceliuliazės – tai glikozil hidrolazės arba angliavandenių esterazės. Pilnam ksilano biologiniam skaidymui yra reikalingi tokie fermentai kaip endo- β -1,4-ksilanazė, β -ksilozidazė ir keli papildomi fermentai. Šiuos fermentus gamina ir mielių ląstelės (Saha, 2014; Sohail ir kt., 2022).

1.5.1.2. Mielių vaidmuo sunkiųjų metalų biodegradacijos ir bioremediacijos procesuose

Mielių paplitimo sunkiaisiais metalais užterštoje aplinkoje bei jų savybių tyrimai yra labai svarbi mokslinių tyrimų sritis, leidžianti nustatyti mielių įtaką ekosistemų biologiniam atkūrimui bei sveikatai. Sunkieji metalai, tokie kaip švinas, kadmis, arsenas, gyvsidabris ir chromas, dažnai užteršia dirvą dėl pramoninės veiklos, kasybos, netinkamo atliekų šalinimo ir žemės ūkio praktikos. Šie metalai yra toksiški ir gali turėti neigiamą poveikį dirvožemio sveikatai, augalų augimui ir mikroorganizmų bendrijoms (Priya ir kt., 2023) (4 pav.).

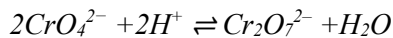
Užterštame dirvožemyje esančios mielės dažnai reaguoja į stresą, pavyzdžiui, gamina metalus surišančius baltymus (pvz., metalotioneinus) ir antioksidacinius fermentus. Kai kurios mielių rūšys gali toleruoti ir netgi klestėti sunkiaisiais metalais užterštuose dirvožemiuose, išskirdamos metalus į vakuoles arba adsorbuodamos juos ląstelių paviršiuje. Užterštumas sunkiaisiais metalais gali sumažinti bendrą dirvožemio mikroorganizmų, įskaitant mieles, įvairovę. Tam tikros šiems metalams atsparios mielių rūšys užterštoje dirvoje gali tapti labiau paplitusios. Šios rūšys gali būti tiriamos dėl jų potencialo bioremediacijos procesuose. Sunkiesiems metalams atsparios mielės gali būti naudojamos biologinio valymo procesams, siekiant išvalyti užterštą dirvožemį. Jos gali bioakumuliuoti sunkiuosius metalus arba paversti juos mažiau toksiškomis formomis. Labiausiai toksiška yra šešiavalentė chromo forma – Cr(VI), o mažiau toksiška – trivalentė Cr(III). Cr(VI) yra labai toksiškas ir judrus, o jo toksiškumas sumažėja redukcijos metu paverčiant į Cr(III), kuris yra mažiau tirpus ir mažiau biologiškai prieinamas (Avery, 2001; Singh ir kt., 2016; Pande ir kt., 2022) (4 pav.).



4 pav. Mielų vaidmuo sunkiųjų metallų biodegradacijos ir bioremediacijos procesuose.

Mokslinių tyrimų metu buvo nustatytos įvairios mielių rūšys, galinčios išgyventi sunkiaisiais metallais užterštame dirvožemyje, pavyzdžiui, *Candida*, *Pichia* ir *Rhodotorula* gentims priskiriamos mielių rūšys. Šioms gentims priklausančios mielių rūšys gali turėti unikalių savybių, leidžiančių joms išgyventi ir funkcionuoti aplinkoje su didele sunkiųjų metallų koncentracija (Avery, 2001; Singh ir kt., 2016). Mielų paplitimui užterštame dirvožemyje įtakos gali turėti tokie veiksniai kaip dirvožemio pH, organinių medžiagų kiekis ir kitų mikroorganizmų buvimas. Aplinkos sąlygos, skatinančios metallų tirpumą (pvz., žemas pH), gali padidinti sunkiųjų metallų toksiškumą ir turėti įtakos mielių išlikimui bei aktyvumui. Aplinkos sąlygos, didinančios sunkiųjų metallų tirpumą (pvz., žemas pH, oksidacinės sąlygos ir kompleksus sudarančios medžiagos), didina jų judrumą ir biologinį prieinamumą, todėl metallai lengviau patenka į organizmus ir sukelia stipresnę toksišką poveikį. Rūgščioje terpėje (žemas pH) metallai atsipalaiduoja iš dirvožemio ir pereina

į tirpią formą, todėl lengviau yra įsisavinami (Avery, 2001; Singh ir kt., 2016; Pande ir kt., 2022; Segal-Kischinevzky ir kt., 2022; Ashkanani ir kt. 2024). Šių aplinkos sąlygų pokyčiai lemia chromo junginių formų pokyčius, kurie gali būti apibūdinami tokia supaprastinta reakcijos lygtimi:



Oksidacinės sąlygos gali didinti toksiškumą keičiant oksidacijos būseną, pvz., Cr(III) → Cr(VI). Komplexus sudarančios medžiagos (pvz., organinės rūgštys) didina metalų mobilumą, sudarydamos tirpius kompleksus (Avery, 2001; Singh ir kt., 2016; Pande ir kt., 2022; Segal-Kischinevzky ir kt., 2022; Ashkanani ir kt. 2024). Chromo junginių formų kitimas vyksta oksidacijos–redukcijos reakcijų metu:

1. $Cr_2O_7^{2-} + 14H^+ + 6e^- \rightarrow 2Cr^{3+} + 7H_2O$ - šešiavalenčio chromo redukcija į trivalentį chromą.

2. $2Cr^{3+} + 7H_2O \rightarrow Cr_2O_7^{2-} + 14H^+ + 6e^-$ - trivalenčio chromo oksidacija į šešiavalentį chromą.

3. $CrO_4^{2-} + 8H^+ + 3e^- \rightarrow Cr^{3+} + 4H_2O$ - chromato redukcija į trivalentį chromą.

4. $Cr^{3+} + 4H_2O \rightarrow CrO_4^{2-} + 8H^+ + 3e^-$ - trivalenčio chromo oksidacija į chromatą.

Padidėjęs tirpumas lemia didesnę laisvų metalų jonų koncentraciją, kurie lengviau patenka į ląsteles, sutrikdo fermentų veiklą ir skatina oksidacinį stresą. Mielės, pasižyminčios didele sunkiųjų metalų tolerancija, yra tiriamos norint jas panaudoti biojutikliuose, biofiltruose ir kituose biotechnologiniuose įrenginiuose, skirtuose dirvožemio užterštumui stebėti ir sumažinti (Avery, 2001; Singh ir kt., 2016; Pande ir kt., 2022; Segal-Kischinevzky ir kt., 2022; Ashkanani ir kt. 2024).

Mielės gali efektyviai dalyvauti sunkiųjų metalų bioremediacijoje, pasitelkamos biosorbcijos, bioakumuliacijos, biotransformacijos, mobilizacijos ir imobilizacijos mechanizmus. Kai kurie metalai, kuriuos mielės biosorbuoja, yra šie: Ag, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, U, Th, Zn (Hlihor ir Gavrilescu, 2009).

Sunkiųjų metalų bioremediacijos procesai vyksta mielių ląstelėse, ant jų paviršiaus arba per įvairių metabolitų išskyrimą į aplinką. Įvairių mokslinių tyrimų metu buvo nustatyta, kad mielės ir kiti grybai, lyginant su kitais mikroorganizmais, geba išgyventi ir augti aplinkoje, kurioje yra didelė sunkiųjų metalų koncentracija. Mielės yra ne tik atsparios didelėms sunkiųjų

metalų koncentracijoms, bet ir geba pašalinti didelius šių teršalų kiekius. Be to, lyginant su bakterijomis, kurios naudojasi tik aktyviomis metabolizmo savybėmis, mielės turi savybę būti naudojamos šiems teršalams pašalinti, nepriklausomai nuo to, ar jos yra gyvos (metaboliškai aktyvios), ar tik sausos biomasės formos (Bahafid ir kt., 2017).

Mielių gebėjimas vykdyti biosorbciją gali reikšmingai skirtis priklausomai nuo rūšies savitumų ir aplinkos sąlygų. *Saccharomyces cerevisiae*, žinoma dėl savo gebėjimo dalyvauti metalų, tokių kaip chromas, kadmio, švinas ir cinkas biosorbcijoje (Igiri ir kt., 2018). *Candida* genties mielės veiksmingai dalyvauja metalų, tokių kaip kadmio, švinas ir gyvsidabris bioremediacijoje. Ištirtas ir patvirtintas *Pichia* genties mielių gebėjimas dalyvauti chromo ir kitų metalų biosorbcijos procesuose. *Rhodotorula* genties mielės žinomos dėl savo potencialo dalyvauti biosorbcijos procesuose ir biotransformuoti sunkiųjų metalų, tokių kaip uranas ir kobaltas junginius. Šie metalai yra adsorbuojami ant ląstelės paviršiaus arba paverčiami mažiau toksiškais formomis. *Yarrowia lipolytica* yra žinoma dėl savo gebėjimo dalyvauti sunkiųjų metalų, tokių kaip kadmio ir švinas biosorbcijos procesuose. Šios mielės naudoja tokius mechanizmus kaip sunkiųjų metalų surišimas ląstelių sienelėse, kaupimas ląstelėje ir fermentinė transformacija, todėl jos yra naudingos užterštos aplinkos bioremediacijai. Fermentai keičia metalų oksidacijos būseną arba juos suriša su biomolekulėmis, todėl metalai tampa mažiau toksiški ir lengviau pašalinami ar kaupiami ląstelėje. (Igiri ir kt., 2018; Rodríguez ir kt., 2018; Nicula ir kt. 2023).

Norint sukurti veiksmingas biologinio valymo strategijas, yra labai svarbu suprasti mielių paplitimą ir elgseną sunkiaisiais metalais užterštoje dirvoje. Šios srities tyrimų metu yra aptinkamos naujos mielių rūšys, pasižyminčios savybėmis, kurios parodo galimą šių mielių potencialą aplinkos valymo procesuose ir suteikia įžvalgų apie dirvožemio mikroorganizmų bendrųjų atsparumą bei prisitaikymą (Avery, 2001; Singh ir kt., 2016; Pande ir kt., 2022; Segal-Kischinevsky ir kt., 2022; Priya, 2023; Ashkanani ir kt. 2024).

Nustatyta, jog sunkiųjų metalų bioremediacijos procesuose aktyviausiai dalyvauja *Candida* ir *Hansenula* genčių mielės, tačiau aktyviai prisidėti prie šių procesų gali ir tokios mielės kaip *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez ir kt., 2018).

Aibeche ir kt. (2022) iš ežero vandens išskyrė septynis mielių izoliatus, pasižyminčius atsparumu didelėms švino ir kadmio koncentracijoms. Tai buvo *Clavispora lusitaniae* ir *Rhodotorula mucilaginosa* bei penkios *Wickerhamomyces anomalus* rūšies mielių padėrmės. Taip pat buvo ištirtas jų atsparumas septyniems sunkiesiems metalams (Hg, Cr, Cd, Pb, Cu, Zn ir Fe). Buvo nustatyta, kad šie septyni mielių izoliatai pasižymėjo didele

halotolerancija bei atsparumu keletui sunkių metalų (varui, cinkui, švinui, kadmui, chromui ir geležiai). *Rhodotorula mucilaginosa* ir dvi *W. anomalus* padermės pasižymėjo dideliu švino šalinimo aktyvumu. Šios mielių padermės potencialiai gali būti panaudojamos sunkiaisiais metalais užteršto vandens, nuotekų ir kitų skysčių biologiniam valymui.

Tarša sunkiaisiais metalais, tarp jų ir chromu, gali lemti dirvožemio mikroorganizmų bendrųjų sudėties pokyčius, mažinti rūšių įvairovę, sukeldama tam tikrų mikroorganizmų rūšių išnykimą. Taršos sukeltas poveikis dirvai gali paskatinti tam tikrų mikroorganizmų rūšių, išvysčiusių toleranciją ir atsparumą teršalams, augimą. Šie mikroorganizmai gali dalyvauti teršalų bioakumuliacijos ir biodegradacijos procesuose (Mejia ir kt., 2023).

Hu J. ir kt. (2018) atliktų tyrimų metu buvo nustatyta, kad dirvožemio tarša chromu keičia dirvožemio mikroskopinių grybų bendrijos sudėtį ir struktūrą. Užterštame dirvožemyje aptinkamos *Candida* genties mielės, toleruojančios chromą, todėl jos laikomos bioindikatoriais, pavyzdžiui, *Candida albicans*. Mikroskopinių grybų bendrijos pokyčiai įvyko dėl tiesioginio toksiško poveikio, kurį sukėlė didelė Cr koncentracija (25 124 mg/kg) ir reikšmingi dirvožemio savybių pokyčiai (pvz. organinių medžiagų pokyčiai, lydimi taršos chromu). Organinių medžiagų buvimas buvo svarbiausias faktorius, kuris darė įtaką mikroskopinių grybų bendrijai. Iš visų Cr frakcijų, didžiausią įtaką darė prie organinių medžiagų prisijungęs chromas ir nepastovios Cr formos.

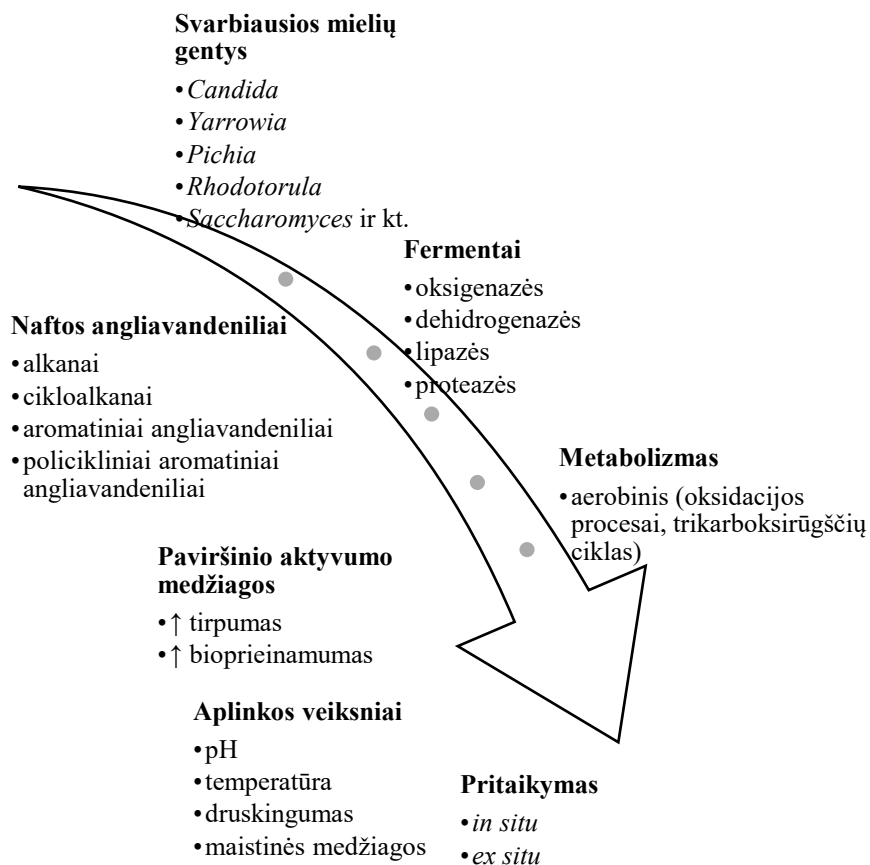
Literatūros duomenimis, chromu užterštuose dirvožemiuose aptinkamos *Candida*, *Cryptococcus*, *Guehomyces*, *Trichosporon* ir kt. genčių mielės (Al-Battashi ir kt., 2016). Al-Battashi H. ir kt. (2016) duomenimis *Candida* ir *Rhodospiridium* genčių mielės buvo atsparios chromo taršai. Bahafid ir kt. (2017) teigimu, tokios rūšys kaip *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica* ir *Saccharomyces cerevisiae* yra labai jautrios chromui, tačiau pačių autorių išskirtos nenustatytos rūšies *Candida* sp. mielės pasižymėjo atsparumu chromui ir gebėjo efektyviai dalyvauti chromo junginių redukcijoje.

1.5.1.3. Mielių vaidmuo naftos angliavandenilių biodegradacijos ir bioremediacijos procesuose

Mielės vaidina svarbų vaidmenį naftos angliavandenilių biologiniame skaidyme per įvairius metabolinius ir fermentinius procesus (Das ir kt., 2011; Gargouri ir kt., 2015). Angliavandenilius skaidantys fermentai reikšmingai prisideda prie šių junginių biodegradacijos. Mielės gamina fermentus, tokius

kaip dehidrogenazės, oksigenazės, lipazės ir proteazės, kurios gali suskaidyti sudėtingas angliavandenilių molekules į paprastesnius, mažiau toksiškus junginius. Kai kurios mielės sintetina paviršinio aktyvumo medžiagas (biosurfaktantus), kurios padidina hidrofobinių angliavandenilių biologinį prieinamumą, pagerindamos jų tirpumą ir taip darydamos įtaką vėlesniam jų skaidymui. Mielės angliavandenilius metabolizuoja aerobiniu būdu, o tai apima pradinį angliavandenilių aktyvavimą, po kurio jie suskaidomi į tarpinius produktus, kurie patenka į centrinįs metabolizmo kelius, pavyzdžiui, citrinų rūgšties ciklą. Mielės gali skaidyti angliavandenilius ir anaerobinėmis sąlygomis, nors šis procesas paprastai yra lėtesnis ir mažiau efektyvus nei aerobinis skaidymas. Jos dažnai turi išvystytus mechanizmus, leidžiančius toleruoti ir skaidyti angliavandenilius aplinkoje, kuri yra toksiška daugeliui bakterijų rūšių. Mielės gali išgyventi ir daugintis esant įvairioms aplinkos sąlygomis, pavyzdžiui, dideliame druskingumui, žemam pH ir ekstremaliai temperatūrai, todėl jos yra tinkamos biologiniam valymui atšiauriomis aplinkos sąlygomis. Daugeliu atvejų mielės veikia sinergiškai su bakterijomis ir kitais mikroorganizmais, padidindamos bendrą angliavandenilių skaidymo efektyvumą. Mielės biologinio valymo procesuose naudojamos dviem būdais. Vienas iš jų yra „*in situ*“ biologinis valymas, šiuo atveju mielės gali būti įnešamos tiesiai į užterštas vietas (dirvožemis, vanduo). Antrasis būdas yra „*ex situ*“ biologinis valymas, kai užterštos medžiagos gali būti apdorojamos kontroliuojamoje aplinkoje (pvz., bioreaktoriuose), kur mielės naudojamos angliavandeniliams skaidyti. Remiantis literatūros šaltinių duomenimis, galima teigti, kad mielės prisideda prie naftos angliavandenilių biologinio skaidymo dėl išvystyto fermentinio aktyvumo, prisitaikymo prie ekstremalių sąlygų ir simbiotinės sąveikos su kitais mikroorganizmais (Das ir kt., 2011; Gargouri ir kt. 2015) (5 pav.).

Žinoma gana daug mielių rūšių, kurios geba skaidyti naftos angliavandenilius. Šios rūšys yra tiriamos dėl jų unikalių savybių ir mechanizmų, palengvinančių sudėtingų angliavandenilių molekulių skaidymą.



5 pav. Mielių vaidmuo naftos angliavandenilių biodegradacijos ir bioremediacijos procesuose

1.5.1.4. Pagrindiniai žinomi naftos angliavandenilių skaidytojai ir jų paplitimą naftos angliavandeniliais užterštoje aplinkoje lemiantys veiksniai

Apie 80% visų atliktų mokslinių tyrimų didžiausią dėmesį skiria biodegradacijos ir bioremediacijos procesų, kuriuose dalyvauja bakterijos, tyrimams (Al-Dhabaan, 2021). Bakterijos yra viena iš labiausiai ištirtų mikroorganizmų grupių, tačiau biodegradacijos ir bioremediacijos procesuose aktyviai dalyvauja ir tokios mažiau ištirtos mikroorganizmų grupės kaip mikroskopiniai grybai ir mielės. Al-Dhabaan F. A. (2021) nustatė, kad aktyviai naftos angliavandenilių skaidymo procesuose dalyvauja tokios mielių rūšys kaip *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii* ir *Yarrowia lipolytica*. *Yarrowia lipolytica* labai efektyviai skaido hidrofobinius

substratus, tokius kaip trigliceridai, alkanai ir riebalų rūgštys. Tai viena iš alkanų degradacijai bei emulsiklių produkcijai naudojamų mielių rūšių.

Candida tropicalis (Margesin, 2013; Kalia ir kt., 2022; Hegazy ir kt., 2024)

Savybės: *C. tropicalis* pasižymi gebėjimu skaidyti daugybę angliavandenių, tokių kaip alkanai, aromatiniai ir policikliniai aromatiniai angliavandeniai. Ši mielių rūšis gali gaminti biosurfaktantus, kurie padidina hidrofobinių angliavandenių biologinį prieinamumą.

Taikymas: naudojama jūros aplinkos bioremediacijai po naftos išsiliejimo.

Yarrowia lipolytica (Kalia ir kt., 2022)

Savybės: žinoma dėl gebėjimo skaidyti ilgos grandinės alkanus ir riebalų rūgštis. Šios mielės gali gaminti įvairius ekstraląstelinius fermentus, tokius kaip lipazes ir proteazes, kurios padidina angliavandenių skaidymo aktyvumą.

Taikymas: veiksminga angliavandeniliais užterštam dirvožemiui ir vandeniui valyti. Taip pat naudojama bioreaktoriuose *ex situ* bioremediacijai.

Saccharomyces cerevisiae (Wang ir kt., 2017)

Savybės: nors natūraliai nėra pats efektyviausias angliavandenių skaidytojas, tačiau genų inžinerijos metodai leidžia padidinti *S. cerevisiae* genų, atsakingų už angliavandenių skaidymą, tokių kaip alkanų hidroksilazės genas, raišką. Ši modifikacija padidina mielės gebėjimą skaidyti angliavandenilius, tokius kaip heksadekanas.

Taikymas: naudojama laboratorijoje genetinėms modifikacijoms tirti ir angliavandenių skilimo mechanizmų optimizavimui.

Rhodotorula mucilaginosa (Kalia ir kt., 2022)

Savybės: šios mielės gali skaidyti tiek alifatinius, tiek aromatinius angliavandenilius. Jos gali išgyventi įvairiomis aplinkos sąlygomis, todėl puikiai tinka naudoti biologinio valymo procesuose.

Taikymas: veiksmingos nafta užterštose vietose, ypač dirvožemio ir vandens aplinkoje.

Pichia kudriavzevii (Margesin, 2013; Kalia ir kt., 2022)

Savybės: *P. kudriavzevii* toleruoja toksiškus angliavandenilius ir gali juos panaudoti kaip vienintelius anglies šaltinius. Ji gamina fermentus, kurie skaido angliavandenilius į paprastesnius junginius.

Taikymas: naudinga biologinio valymo procesuose, kuriuose yra didelės angliavandenilių koncentracijos, pvz., pramoninių atliekų apdorojimo procesuose.

Debaryomyces hansenii (Margesin, 2013; Kalia ir kt., 2022)

Savybės: šios mielės gali skaidyti įvairius angliavandenilius ir žinomos dėl atsparumo didelėms druskų koncentracijoms, todėl yra tinkamos bioremediacijai druskingoje aplinkoje.

Taikymas: naudojamas jūros ir pakrančių zonose, kur dažnai išsilieja nafta.

Trichosporon cutaneum (Margesin, 2013; Kalia ir kt., 2022)

Savybės: gali skaidyti įvairius angliavandenilius, tokius kaip dyzeliną ir žalią naftą. Gali gaminti ekstraląstelinius fermentus ir biosurfaktantus, kurie palengvina hidrofobinių junginių skaidymą.

Taikymas: naudojama nafta užterštų nuotekų ir dirvožemio valymui, ypač aplinkoje, kurioje yra didelė naftos angliavandenilių koncentracija.

Mielių rūšių paplitimas naftos angliavandeniliais užterštoje aplinkoje yra sudėtinga veiksnių, susijusių su jų gebėjimu toleruoti teršalus, įsisavinti maistines medžiagas, prisitaikyti prie aplinkos sąlygų, konkuruoti su kitomis mielių (ir kitų mikroorganizmų) rūšimis, dalyvauti bioremediacijos procese, visuma (Das ir Chandran, 2011; Kalia ir kt., 2022).

Kai kurios mielių rūšys lengviau toleruoja taršą naftos angliavandeniliais ir geba klestėti užterštoje aplinkoje, o dalis mielių rūšių, pasižyminčių žema tolerancija taršai, žūva, arba stipriai sumažėja jų kiekis (Das ir Chandran, 2011; Kalia ir kt., 2022).

Tam tikros mielių rūšys turi išvystytus mechanizmus, leidžiančius panaudoti naftos angliavandenilius kaip vienintelį anglies šaltinį. Šios mielių rūšys yra labiau paplitusios naftos angliavandeniliais užterštoje aplinkoje dėl gebėjimo prisitaikyti prie teršalų buvimo. Mielėms augti yra būtinos maistinės medžiagos, o šių medžiagų prieinamumas naftos angliavandeniliais užterštoje aplinkoje yra labai ribotas. Nuo gebėjimo įsisavinti reikalingas maistines medžiagas užterštoje aplinkoje gali priklausyti ir tam tikrų mielių rūšių paplitimas joje. Mielių rūšių paplitimui užterštoje aplinkoje gali turėti įtakos ir tokie veiksniai kaip pH, temperatūra, drėgmės lygis. Dalis mielių rūšių gali būti geriau prisitaikiusios prie konkrečių aplinkos sąlygų, esančių naftos angliavandeniliais užterštoje aplinkoje. Įvairios mielių rūšys gali konkuruoti dėl išteklių tarpusavyje, todėl tam tikros jų rūšys pradeda dominuoti užterštoje aplinkoje. Mielių rūšių paplitimui įtakos gali turėti ir jų sąveika su kitais dirvožemio mikroorganizmais. Laikui bėgant, naftos angliavandeniliais

užterštoje aplinkoje esančių mielių rūšių sudėtis gali kisti skirtingų biodegradacijos etapų metu. Ankstyvuojų biodegradacijos laikotarpiu aplinką kolonizuojančios mielės gali atverti kelią vėliau atsirasiančioms mielių ir kitų mikroorganizmų rūšims įsitvirtinti (Das ir Chandran, 2011; Kalia ir kt., 2022).

Al-Dhabaan F. A. (2021) nustatė, kad iš naftos telkinių išskirtų *Candida tropicalis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodosporidium toruloides* ir *Sporobolomyces lactosus* rūšių mielių biodegradacinis „žalios“ naftos efektyvumas siekė 33 - 61%. Autorius nurodo, jog iš aktyvaus dumblo, naftos ir naftos produktais užteršto dirvožemio išskyrė *Pichia kudriavzevii*, *Rhodotorula mucilaginosa* ir *Rhodosporidium diobovatum* degraduojančias naftaleną, fenantreną ir pireną, *Rhodotorula glutinis* ir *Saccharomyces cerevisiae* degraduojančias fenantreną, pireną ir naftą, *Candida parapsilosis*, *Candida sinolaborantium*, *Naganishia diffluens* ir *Rhodotorula mucilaginosa*, degraduojančias naftaleną, fenantreną, pireną ir naftą, *Naganishia albida* degraduojančią fenantreną ir naftą bei *Naganishia uzbekistanensis* degraduojančią naftaleną, pireną ir naftą. Šie tyrimai įrodo, kad mielės geba degraduoti platų naftos angliavandenilių spektrą ir gali efektyviai prisidėti prie biodegradacijos ir bioremediacijos procesų.

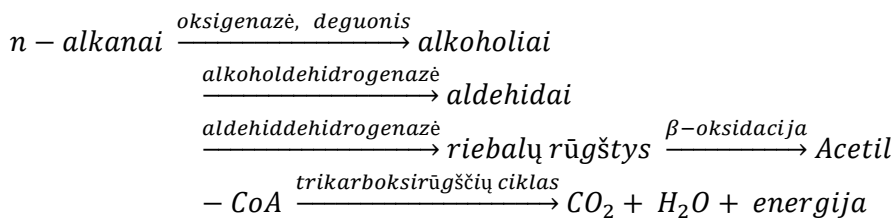
Daugelis mielių rūšių, dalyvaujančių biodegradacijos procesuose, yra mezofilinės. Tokios rūšys optimalų biodegradacinį aktyvumą pasiekia aukštesnėje nei aplinkos temperatūroje. Naftos teršalų biodegradacija esant žemesnei aplinkos temperatūrai yra ypač aktuali šalto klimato regionams, tokiems kaip poliariniai ir alpiniai regionai, taip pat daugelio paviršinio ir gruntinio vandens telkinių vidutinio klimato zonose biologiniam valymui. Tokiuose regionuose valomo substrato temperatūra dažniausiai siekia tik 8–10 °C. Tam, kad biodegradacijos procesai galėtų vykti esant žemai aplinkos temperatūrai, reikalingos prie tokios temperatūros prisitaikiusios mielių padermės. Nustatyta, kad mezofilinės mielės geba degraduoti fenolį ir tolueną. Taip pat pastebėta, jog tokių mielių metabolinis universalumas yra reikšmingai didesnis nei bakterijų, lyginant jų gebėjimą degraduoti įvairias naftos frakcijas. Tokios prie žemos aplinkos temperatūros prisitaikiusios, naftos angliavandenilius skaidančios mielių rūšys yra *Leucosporidium creatinivorum*, *Leucosporidium intermedium*, *Rhodosporidiobolus lusitaniae*, *Sampaiozyma ingeniosa*, *Solicoccozyma terrea*, *Solicoccozyma terricola* ir *Sporobolomyces roseus*. Šios mielių rūšys neskaido monoaromatinių junginių (benzeno, tolueno, etilbenzeno, nitrobenzeno, o-ksileno, m-ksileno ir p-ksileno) kaip vienintelio anglies šaltinio. Nelakūs arba mažai lakūs aromatiniai junginiai buvo skaidomi tokia seka fenolis – hidrokinonas – resorcinolis – benzoatas – katecholis – salicilatas – p-krezolis – m-krezolis – o-krezolis. Tokie junginiai kaip o-krezolis, gvajakolis, p-nitrofenolis ir p-

nitrotoluenas nesunaudojami mielių augimo metu. Ne visos mielių rūšys skaido visus minėtus junginius, vienos iš jų (*Leucosporidium creatinivorum*) juos degradavo iki septynių skirtingų junginių, kitos (*Solicoccozyma terricola* ir *Sporobolomyces roseus*) – tik iki dviejų (Boz ir kt., 2015). Tai rodo, jog norint pasiekti optimalias biodegradacijos apimtis, reikėtų naudoti ne vieną, o bent kelias naftos angliavandenilius skaidančias skirtingų mielių rūšių padermes.

Naftos angliavandenilius degraduojantys mikroorganizmai turi išvystytus mechanizmus, kurie padeda apdoroti šiuos mažai tirpius substratus. Dažniausiai tai biosurfaktantų produkavimas. Biosurfaktantai yra amfipatinės (turinčios tiek hidrofilinių, tiek hidrofobinių savybių) molekulės, įvairios cheminės prigimties ir molekulinio dydžio, pasižyminčios įvairiomis biologinėmis savybėmis. Šios molekulės išsklaido angliavandenilius ir padidina hidrofobinių substratų paviršiaus plotą, taip padidindamos jų biologinį prieinamumą bei ardymo greitį. Gebėjimu degraduoti naftos angliavandenilius gali pasižymėti tiek *Ascomycota*, tiek ir *Basidiomycota* skyriaus mielės. Dažniausiai iš *Ascomycota* skyriaus mielių šiuose procesuose dalyvauja *Saccharomycetoideae* pošeimiui priklausančios mielių rūšys *Candida tropicalis*, *Diutina rugosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia jadinii* ir *Torulopsis colliculosa*. Iš *Basidiomycota* skyriaus dažniausiai biodegradacijos procesuose dalyvauja *Rhodotorula* genties mielės (Kalia ir kt., 2022).

Benmessaoud S. ir kt. (2021) tyrinėdami naftos angliavandeniliais užterštą dirvožemį nustatė, kad šiuose dirvožemiuose buvo paplitusios *Candida*, *Exophiala*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* ir *Trichosporon* genčių mielės. Autoriai nustatė, kad mielių koncentracija naftos angliavandeniliais užterštuose dirvožemiuose svyravo nuo 5,2 iki $32,5 \times 10^4$ KSV/g. Stebėta koreliacija tarp organinės medžiagos, Ca^{2+} ir Na^{2+} kiekio dirvožemyje ir mielių rūšių įvairovės.

Mielės turi išvystytas fermentų sistemas, kurios geba aktyviai dalyvauti naftos angliavandenilių degradacijos procesuose ir juos panaudoti juos kaip anglies ir energijos šaltinį. Aerobinė degradacija dažniausiai prasideda fermentui oksigenazei įterpiant deguonį į anglies molekules. Pavyzdžiui, N-alkanai yra oksiduojami fermento oksigenazės. Šio proceso metu pasigamina pirminiai alkoholiai, kurie vėliau fermentų alkoholdehidrogenazės ir aldehiddehidrogenazės yra oksiduojami iki riebalų ir karboksirūgščių. Riebalų rūgštys yra paverčiamos pirminiais junginiais Acetil-CoA pavidalu, tuomet Acetil-CoA patenka į trikarboksirūgščių ciklą, kurio metu išskiriami anglies dioksidas, vanduo ir energija, kurią mikroorganizmai panaudoja augimo ir vystymosi procesų metu (Bergauer ir kt., 2005; Beopoulos ir kt., 2010; Alami ir kt., 2019). N-alkanų biodegradacija vyksta tokia tvarka (Ji et al. 2013):

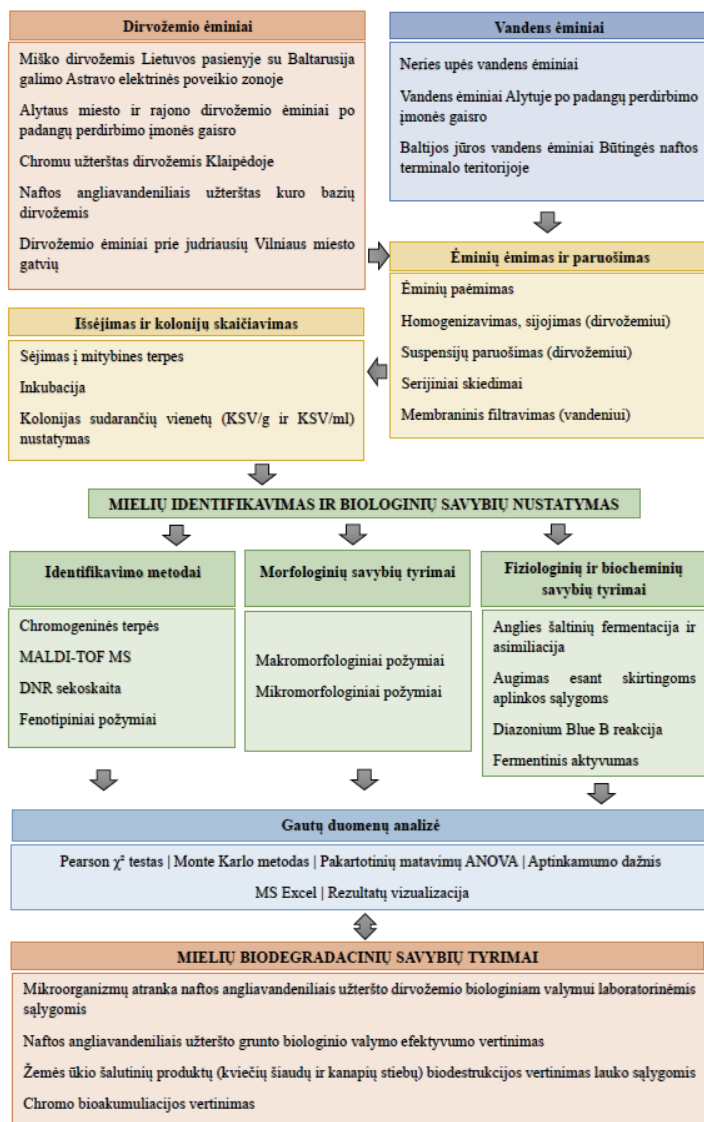


Apibendrinant įvairių pasaulio mokslininkų darbuose pateikiamą informaciją apie mielių paplitimą naftos angliavandeniliais užterštoje aplinkoje, galima daryti išvadą, kad dažniausiai naftos angliavandeniliais užterštoje aplinkoje yra aptinkamos šios mielės: *Candida tropicalis*, *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum* spp., *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Rhodotorula muciginosa*, ir *Trichosporon* spp. Šios mielės yra žinomos dėl gebėjimo metabolizuoti naftos angliavandenilius ir kitus naftos komponentus bei dalyvavimo užterštos aplinkos bioremediacijos procese. Jų buvimas ir veikla atlieka lemiamą vaidmenį skaidant kenksmingus junginius, esančius naftos angliavandenilių sudėtyje ir padedant atkurti ekologinę aplinkos pusiausvyrą (Das ir Chandran, 2011; Kalia ir kt., 2022).

2. METODAI IR MEDŽIAGOS

2.1. Metodai

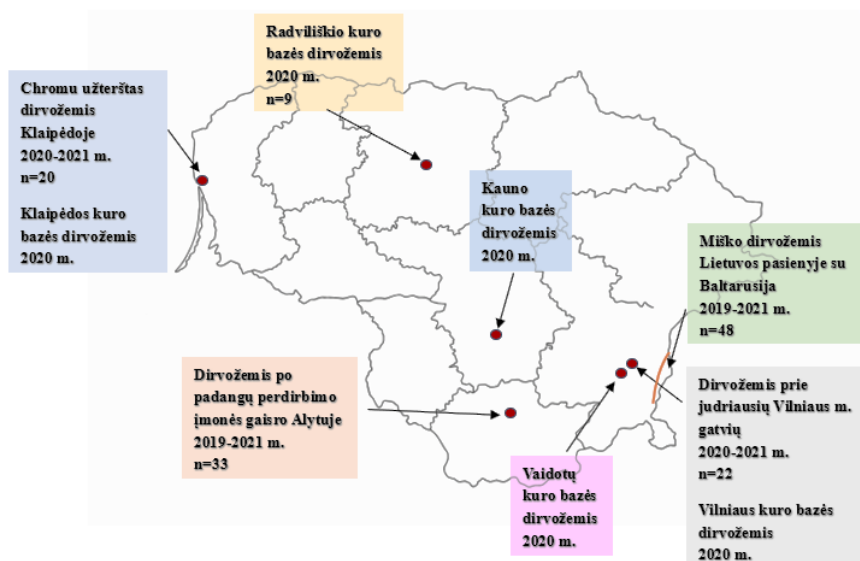
Toliau pateikiamoje schemoje apibendrinami tyrime taikyti metodai – nuo ėminių paėmimo ir paruošimo iki mielių identifikavimo, jų biologinių ir biodegradacinių savybių vertinimo bei statistinės duomenų analizės (6 pav.).



6 pav. Tyrime taikytų metodų schema

2.1.1. Mielių išskyrimas iš dirvožemio ėminių

Tyrimams atlikti pasirinktos teritorijos, kuriose buvo nustatyta įvairios kilmės žmogaus sukelta tarša arba yra tikimybė įvertinti galimą taršos poveikį ateityje (7 pav.).



7 pav. Dirvožemio ėminių paėmimo vietas (paveikslo fone esantis žemėlapis sugeneruotas naudojant dirbtinio intelekto modelį („ChatGPT“, OpenAI)).

Dirvožemio ėminiai buvo imami tyrimui pasirinktoje teritorijoje, kuri buvo suskirstyta į atskirus tiriamuosius plotus. Iš kiekvieno tiriamojo ploto buvo imama po ne mažiau kaip keturis ėminius, formuojant sudėtinį dirvožemio ėminį, iš visame tiriamame plote paimtų ėminių. Ėminiai imti iš 0–15 cm gylio paviršinio dirvožemio sluoksnio, pašalinus paviršines nuokritas, augalus bei jų šaknis, samanais, kitas augalų dalis ir dirvožemio fauną. Kiekvienas sudėtinis ėminys buvo surenkamas iš ne mažesnio kaip 5,0 m² ploto paimant ne mažiau 5-10 dirvožemio ėminių. Ėminiai buvo surenkami į plastikinį kibirėlį, kuriame buvo homogenizuojami. Vėliau ėminiai buvo dedami į vienkartinius, sterilius, plastikinius maišelius imant iš kelių skirtingų kibirėlyje surinkto dirvožemio vietų ir suformuojamas 150,0 g dirvožemio sudėtinis ėminys. Ėminiai buvo transportuojami į laboratoriją šaltkreipšyje, esant 5,0±1,0°C temperatūrai tolimesniems tyrimams. Dirvožemio ėminiai iki tyrimo atlikimo laikomi 5,0±1,0°C temperatūros šaldytuve (Lietuvos Geologijos tarnyba, 2008; ISO 18400, 2017; Čyžius ir Stankevičius, 2021).

Dirvožemio mielėms išskirti bei jų koncentracijai nustatyti buvo naudojamas suspensijos serijinių praskiedimų metodas. Šis metodas yra paremtas tam tikro praskiedimo dirvožemio suspensijos išsėjimu į agarizuotos mitybinės terpės lėkšteles ir išaugusių mielių kolonijų skaičiavimu (Reynolds, 2005; Al-Saadoon ir kt., 2022).

Dirvožemis apdorojamas per 24 valandas po ėminių paėmimo. Jis buvo sijoamas per 2–4 mm sietą. Sijojimas palengvina dujų apykaitą tarp dirvožemio dalelių, todėl yra rekomenduojamas aerobinėms sąlygoms palaikyti. Be to, taip yra pašalinami akmenukai, fauna bei augalų liekanos. Persijotas dirvožemis gerai sumaišomas ir 10,00 g jo pasveriamas, patalpinama į kolbutę su 90,00 ml sterilaus vandens. Kolbutės dedamos į rotacinę purtyklę IKA KS 4000 ir purtomos 1 valandą 180–200 rpm greičiu. Gauta dirvožemio suspensija (santykis 1:10) buvo skiedžiama, perkeltant 1 ml jos į mėgintuvėlį su 9,00 ml sterilaus vandens. Taip paruošiamas reikiamas kiekis praskiedimų: 1:100, 1:1000, 1:10000 (ir daugiau, pagal poreikį). Tinkamiausias suspensijos praskiedimas yra toks, kurį išsėjus į mitybinės terpės lėkštelę, išauga 40–100 mielių kolonijų. Dažniausiai mielių apskaitai buvo naudojamas 10^3 – 10^4 praskiedimas. Po 0,1 ml kiekvieno tiriamosios suspensijos praskiedimo buvo išsėjama trimis pakartojimais į mitybinės terpės lėkšteles (1 pav.). Užsėtos mitybinės terpės lėkštelės buvo inkubuojamos inkubatoriuje: RBA ir MD – $19,0 \pm 1,0$ °C temperatūroje inkubatoriuje, o SDA – $26,0 \pm 1,0$ °C temperatūroje inkubatoriuje. Inkubuojama 2–4 paras (1 pav.).

Sausas dirvožemio svoris buvo nustatomas pasveriant 1,0 g orasausio dirvožemio, kuris buvo patalpinamas į stiklinius indelius su kamšteliais ir džiovinamas $105,0$ °C temperatūroje, džiovinimo krosnyje ne mažiau kaip 4 valandas.

Po inkubacijos buvo suskaičiuotos mielių kolonijos. Skaičiavimui pasirenkamas toks praskiedimas, kurį išsėjus, mitybinės terpės lėkštelėje išauga 40–100 mielių kolonijų (Reynolds, 2005; Al-Saadoon ir kt., 2022; Anuradha, 2022).

Apskaičiuota mielių koncentracija 1,0 g sauso dirvožemio pagal formulę:

$$n = \frac{a \times b \times c}{d},$$

kur

n – mikroorganizmų koncentracija (KSV),

a – išaugusių kolonijų skaičius lėkštelėje,

b – suspensijos praskiedimas,

c – pasėtos suspensijos tūris (ml),

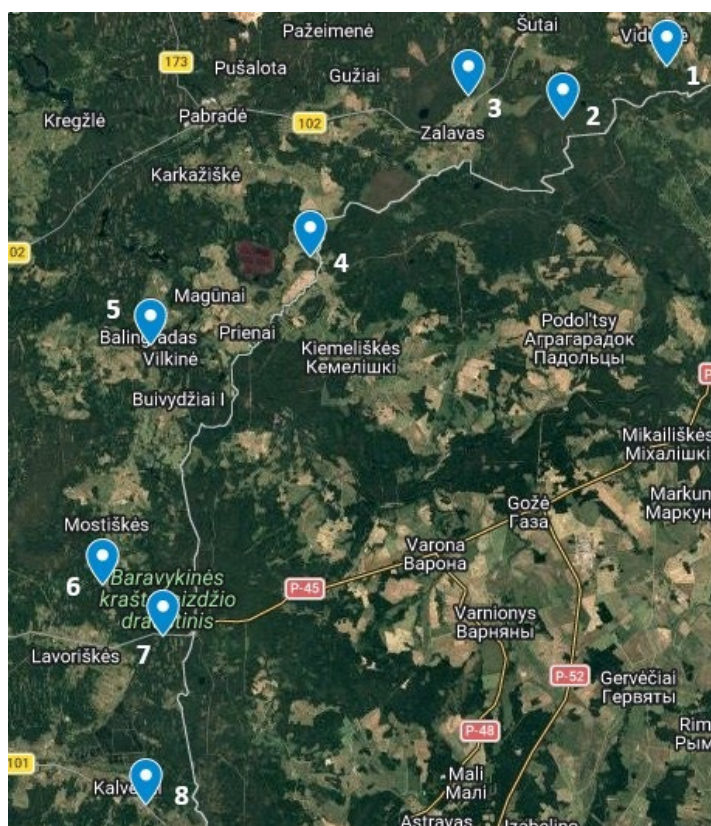
d – sauso dirvožemio svoris (g).

Rezultatai pateikti suskaičiavus vidurkį iš 3 ėminio pakartojimų (Reynolds, 2005; Anuradha, 2022).

2.1.1.1 Dirvožemio ėminių paėmimo vietos

2.1.1.1.1. Miško dirvožemio ėminiai Lietuvos pasienyje su Baltarusija galimo Astravo elektrinės poveikio zonoje

Pasirinktos aštuonios ėminių ėmimo vietos, kurios išsidėsto 60 km ilgio pusiau taisyklingu lanku, esančios Lietuvos teritorijoje, 30 kilometrų atstumu nuo Astravo atominės elektrinės, miško ekosistemose, (8 pav., 2 lentelė). Šios teritorijos laikytos santykinai nepaveiktomis antropogeninės taršos ir pasirinktos siekiant nustatyti foninę būklę, kuri ateityje galėtų būti naudojama kaip atskaitos taškas vertinant galimą Astravo atominės elektrinės poveikį, taip pat kaip atskaitos vietos lyginamajai analizei su kitų lokalizacijų dirvožemio ėminiais.



8 pav. Miško dirvožemio ėminių paėmimo vietų žemėlapis Lietuvos pasienyje su Baltarusija

Buvo tirti organinis (OH) (iki 10 cm nuo paviršiaus) ir mineralinis (M) (5-20 cm nuo paviršiaus) dirvožemio horizontai. Dirvožemio ėminiai (2 lentelė) buvo imami kartą per metus, vasaros pabaigoje, 2020–2022 m. laikotarpiu. Per visą minėtą laikotarpį buvo paimti 48 dirvožemio ėminiai. Ėminiai imti kartu su Branduolinės geofizikos ir radioekologijos laboratorijos mokslininkais (vadovas akademikas prof. habil. dr. J. Mažeika), vykdant programą „Kenksmingų medžiagų, patogenų ir nepalankių veiksnių sklaida besikeičiančioje aplinkoje rizikos vertinimo ir aplinkos kokybės gerinimo kontekste (tarša)“.

2 lentelė. Miško dirvožemio ėminių paėmimo vietų Baltarusijos pasienyje pavadinimai ir koordinatės, 2019-2021 m.

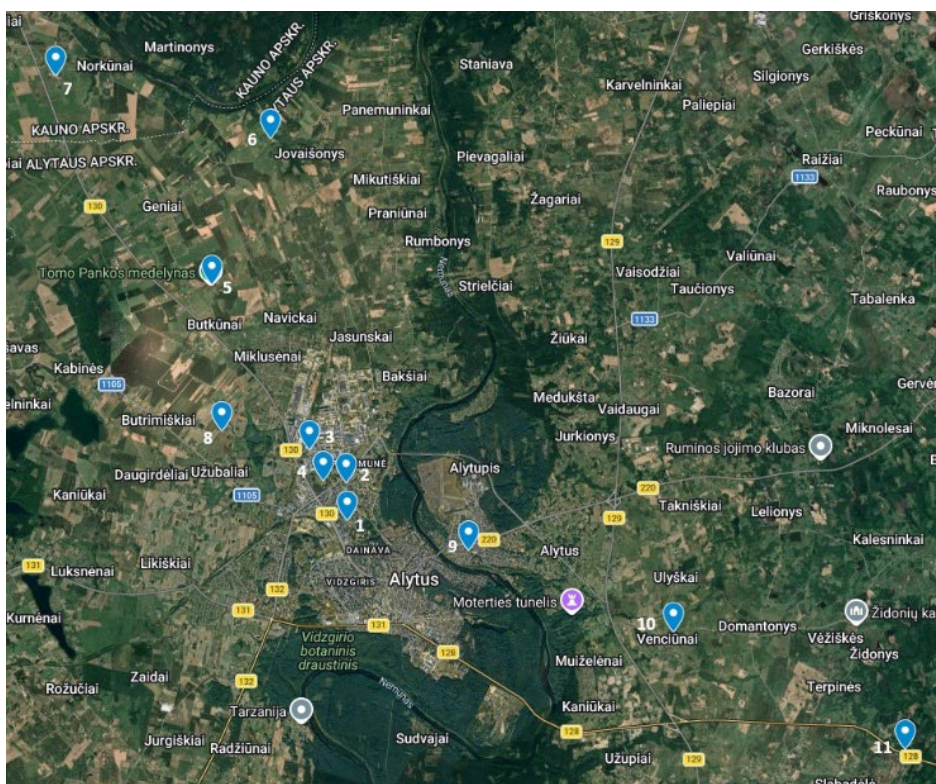
Ėminio Nr.	Ėminio pavadinimas	Ėminio paėmimo vietos adresas	Ėminio paėmimo vietos koordinatės
1	1OH	Kulbokiškės kaimas, Švenčionių raj.	55.023803, 26.167330
	1M		
2	2OH	Gelednės kaimas, Švenčionių raj.	54.996735, 26.063482
	2M		
3	3OH	Svirkiškės kaimas, Švenčionių raj.	55.017037, 25.978516
	3M		
4	4OH	Dalininkų kaimas, Švenčionių raj.	54.924917, 25.841627
	4M		
5	5OH	Balingrado kaimas, Švenčionių raj.	54.886923, 25.702377
	5M		
6	6OH	Bildžių kaimas, Švenčionių raj.	54.765920, 25.657534
	6M		
7	7OH	Lavoriškių pasienio kontrolės punktas, Vilniaus raj.	54.730503, 25.714178
	7M		
8	8OH	Kalvelių kaimas, Vilniaus raj.	54.645920, 25.704737
	8M		

OH – organinis dirvožemio sluoksnis, M – mineralinis dirvožemio sluoksnis.

Dirvožemio ėminiai buvo siunčiami į Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Agrocheminių tyrimų laboratoriją agrocheminiams tyrimams atlikti. Laboratorijoje buvo nustatomi tokie dirvožemio parametrai kaip pH (ISO 10390:2021), judrus fosforas, judrus kalis, organinė anglis (ISO 10694:1995), bendras azotas (ISO 11261:1995), judrus kalcis, judrus magnis (LVP D-13:2021), bendra siera (ISO 22036:2008), mainų rūgštingumas.

2.1.1.1.2. Dirvožemio ėminiai (Alytaus mieste ir rajone) po padangų perdirbimo įmonės gaisro

2019–2021 m. laikotarpiu, kartą per metus, spalio mėn. buvo imama po 11 dirvožemio ėminių iš Alytaus miesto ir rajono teritorijų (9 pav., 3 lentelė), galimai paveiktų 2019 m. spalio mėnesį kilusio padangų perdirbimo įmonės gaisro metu į aplinką patekusių kenksmingų teršalų. Ėminių paėmimo vietos buvo pasirinktos pagal Nacionalinio visuomenės sveikatos centro prie Sveikatos apsaugos ministerijos pateiktą informaciją (fiziškai parodytas ėminių paėmimo vietas). Ėminys Nr. 11 šiame tyrime naudotas kaip kontrolinis, nes buvo paimtas miško teritorijoje, laikomoje mažiausiai paveikta gaisro. Per minėtą tyrimo laikotarpį iš viso buvo paimti 33 ėminiai (3 lentelė).



9 pav. Dirvožemio ėminių paėmimo vietų žemėlapis Alytaus mieste ir rajone po padangų perdirbimo įmonės gaisro 2019 m.

3 lentelė. Ėminių paėmimo vietos Alytaus mieste ir rajone po padangų perdirbimo įmonės gaisro, ėminių tipai ir ėminių paėmimo vietų koordinatės

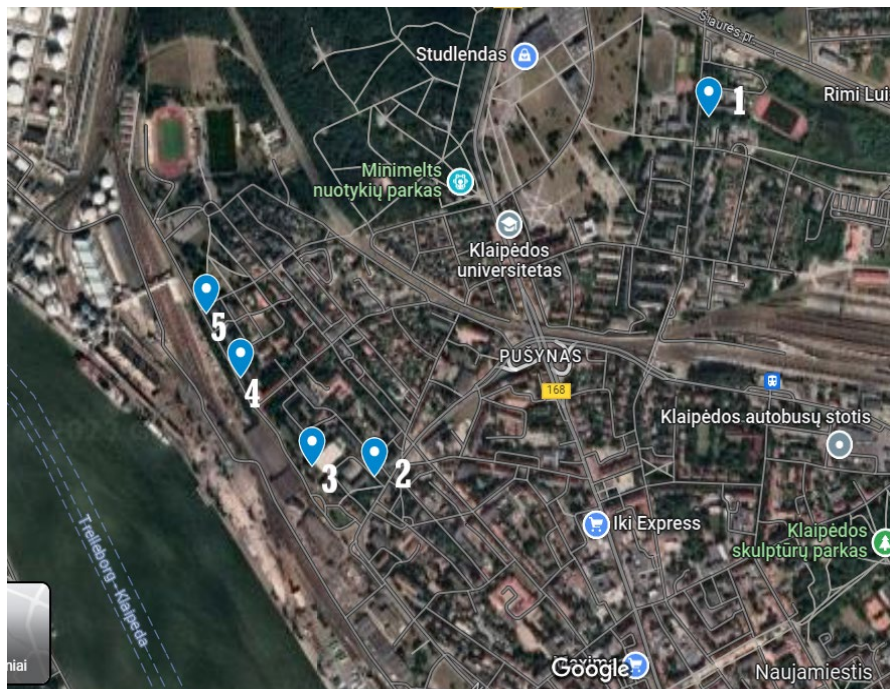
Ėminio Nr.	Ėminio paėmimo vieta ir adresas	Ėminio paėmimo vietos koordinatės	Ėminio tipas	Apytikslis atstumas nuo gaisro židinio, km
1	Alytaus miestas, Lopšelis-darželis "Obelėlė", Šaltinių g. 3, Alytus	54.408696, 24.021765	Miesto dirvožemis	0–1
2	Alytaus miestas, Lopšelis-darželis "Putinėlis", Kalnėnų g. 2, Alytus	54.415644, 24.021698		0–1
3	Alytaus medicininės reabilitacijos ir sporto centras, Pramonės g. 9, Alytus	54.421715, 24.009385		0–1
4	Privatus kiemas, Putinų g. 1, Alytus	54.415843, 24.014347	Ūkinės paskirties dirvožemis	0–1
5	Privatus medėlynas, Sodžiaus g., Raudonikių kaimas, Alytaus rajonas	54.454886, 23.976735		2–5
6	Privati sodyba, Taukotiškių g. 6, Taukotiškių kaimas, Alytaus rajonas	54.484511, 23.996358		>5
7	Privatus ūkis, Šaltinių g., Mardosų kaimas, Alytaus rajonas	54.497112, 23.922139		>5
8	Privati sodyba, Pavasario g., Užubalių kaimas, Alytaus rajonas	54.425951, 23.979384	Miesto dirvožemis	2–5
9	Lopšelis-darželis "Nykštukas", Studentų g. 4, Alytus	54.402114, 24.063791		2–5

Ėminio Nr.	Ėminio paėmimo vieta ir adresas	Ėminio paėmimo vietos koordinatės	Ėminio tipas	Apytikslis atstumas nuo gaisro židinio, km
10	Ikimokyklinio ugdymo skyrius, Alyvų g. 4, Venciūnų kaimas, Alytus rajonas	54.385507, 24.134704		>5
11	Miškas, Varsos g., Klausiškių kaimas, Alytaus rajonas	54.361864, 24.215388	Miško dirvožemis	>5

Dirvožemio ėminiai, paimti 2021 m., buvo siunčiami į Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Agrocheminių tyrimų laboratoriją agrocheminiams tyrimams atlikti. Laboratorijoje buvo nustatomi tokie dirvožemio parametrai kaip pH (ISO 10390:2021), judrus fosforas, judrus kalis, organinė anglis (ISO 10694:1995), bendras azotas (ISO 11261:1995), bendra siera (ISO 22036:2008). Gavus tyrimų rezultatus, buvo apskaičiuotas anglies – azoto santykis (C:N).

2.1.1.1.3. Dirvožemio ėminiai (Klaipėdos mieste) su padidėjusia chromo tarša

Dirvožemio ėminiai buvo imami 2020–2021 metų birželio ir rugsėjo mėnesiais. Ėminiai buvo imami iš 5 Klaipėdos miesto vietų, kuriose buvo stebėta padidėjusi tarša chromu, pagal Lietuvos geologijos tarnybos prie Aplinkos ministerijos pateiktas koordinatas (10 pav., 4 lentelė). Ėminys Nr. 1 laikytas kontroliniu ėminiu, nes buvo nutolęs nuo labiausiai užterštų ėminių paėmimo vietų ir jame nebuvo stebėta chromo tarša.



10 pav. Dirvožemio ėminių paėmimo vietų Klaipėdos mieste žemėlapis

Per visą minėtą tyrimo laikotarpį buvo paimta 20 dirvožemio ėminių (4 lentelė).

4 lentelė. Dirvožemio ėminių paėmimo vietų Klaipėdos miesto teritorijoje 2020-2021 m. aprašymas ir koordinatės

Ėminio Nr.	Ėminio paėmimo vieta	Ėminio paėmimo vietos adresas	Ėminio paėmimo vietos koordinatės
1	Klaipėdos „Verdenės“ progimnazija	Kretingos g. 22, Klaipėda	55.7272202, 21.1339948
2	Klaipėdos Vitės progimnazija	J. Janonio g. 32, Klaipėda	55.7186445, 21.1178091
3	Klaipėdos Vitės progimnazijos stadionas	J. Janonio g. 32, Klaipėda	55.7192573, 21.1159646
4	Klaipėda, Švyturio g., greta gyvenamojo namo Nr. 14	Švyturio g. 14, Klaipėda	55.7208069, 21.1126815
5	Klaipėda, Švyturio g., netoli gyvenamojo namo Nr. 18	Švyturio g. 18, Klaipėda	55.7224936, 21.1110283

Buvo gauti Lietuvos geologijos tarnybos 2019 m. atliktų dirvožemio tyrimų duomenys, kurie buvo įvertinti pagal higienos HN 60:2015 nurodytas ribines vertes. Chromo ribinė vertė pagal šią higienos normą yra 80 mg/kg.

Papildomiems tyrimams atlikti 2021 m. buvo pasirinkti tik trys tiriamojo dirvožemio ėminiai, labiau nutolę vienas nuo kito ir pasižymėję didžiausia tarša chromu. Ėminiai buvo siunčiami į Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Agrocheminių tyrimų laboratoriją agrocheminiams tyrimams atlikti. Laboratorijoje buvo nustatomi tokių sunkiųjų metalų kaip chromo, kadmio, švino, nikelio, geležies, vario ir cinko kiekiai (ISO 22036:2008, ISO 11047:1998). Nei vieno iš tirtų sunkiųjų metalų koncentracija neviršijo leistinų ribinių verčių.

2.1.1.1.4. Naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio ėminiai

Dirvožemio ėminiai buvo imami 2020 metų birželio mėnesį. Iš viso paimta 30 dirvožemio ėminių. Ėminiai buvo imami iš kuro bazių teritorijų, kuriose buvo labiausiai tikėtina tarša naftos angliavandeniliais (5 lentelė).

5 lentelė. Naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio ėminių paėmimo vietos ir jų aprašymai.

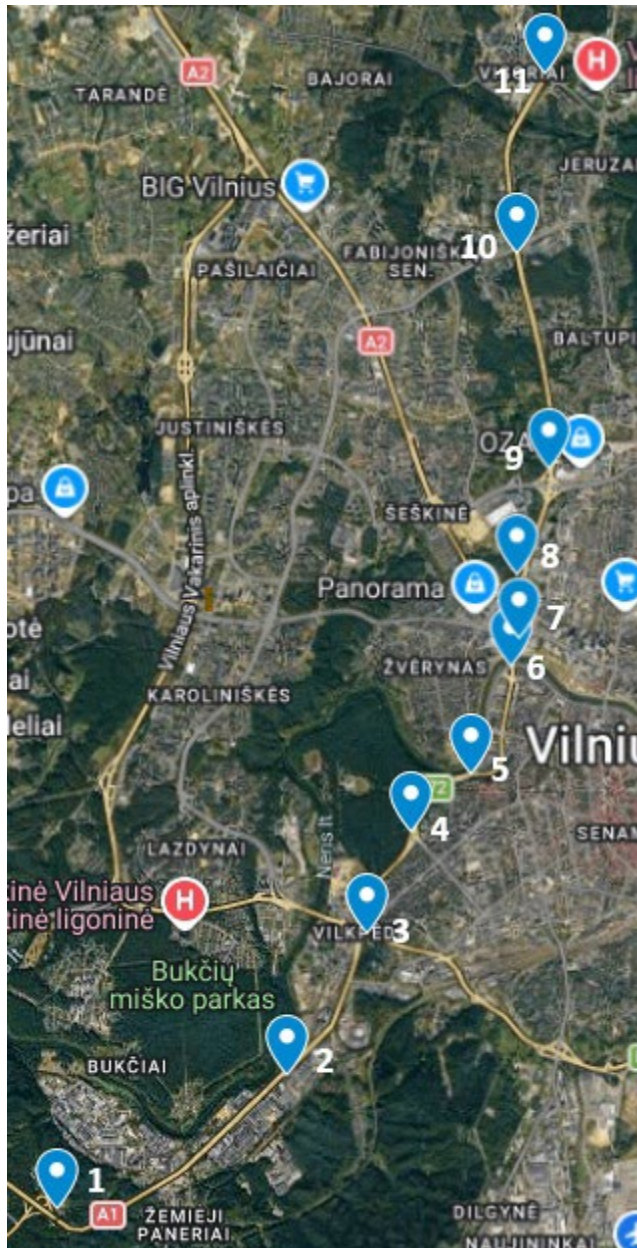
Ėminio Nr.	Ėminio paėmimo vieta*	Ėminio paėmimo vieta
1	Dirvožemis prie didelės dyzelino talpos laiptelių, kairė pusė	Kuro bazė, Klaipėda
2	Dirvožemis prie didelės dyzelino talpos laiptelių, dešinė pusė	
3	Dirvožemis prie dyzelino čiaupų, už pašiūrės	
4	Smėlingas dirvožemis, apie 5 m nuo bėgių	
5	Dirvožemis, apie 5 m nuo bėgių	
6	Dirvožemio ir kitų apnašų mišinys nuo bėgių ekologinės dangos	
7	Dirvožemis su yrančiais plastiko gabalėliais	
8	Dirvožemis prie dyzelino talpyklos, kairė pusė, prie laiptų, šalia vamzdžių	Kuro bazė, Radviliškis
9	Dirvožemis prie antros talpyklos (vidurinė), šalia laiptų	
10	Dirvožemis prie trečios talpyklos čiaupo, šalia sraigtinių laiptų	
11	Dirvožemis prie antros talpyklos čiaupo, priešingoje laiptams pusėje.	

Ėminio Nr.	Ėminio paėmimo vieta*	Ėminio paėmimo vieta
12	Dirvožemis prie pirmos talpyklos čiaupo, priešingoje laiptams pusėje.	
13	Dirvožemis iš pievos netoli talpyklų	
14	Dirvožemis iš valymo aikštelių Nr. 1 (atsiūstas)	
15	Dirvožemis iš valymo aikštelių Nr. 2 (atsiūstas)	
16	Dirvožemis iš valymo aikštelių Nr. 3 (atsiūstas)	
17	Dirvožemis šalia monitoringo gręžinio Nr. 53730	Kuro bazė, Kaunas
18	Dirvožemis tarp kuro talpyklų (požeminės), pirmos dvi kuro talpyklos šalia pastato	
19	Dirvožemis prie kuro kolonėlių, žolės kampas su šaligatviu (į kairę nuo eko dangos)	
20	Dirvožemis šalia monitoringo gręžinio Nr. 53731 (gėlynas)	
21	Dirvožemis šalia monitoringo gręžinio Nr. 53732, šalia tujų, prie išėjimo vartų	
22	Dirvožemio ir kitų apnašų sankaupos iš plyšių tarp betono plokščių	Kuro bazė, Vaidotai, Vilniaus rajonas
23	Dirvožemio ir kitų apnašų sankaupos iš plyšių tarp betono plokščių	
24	Dirvožemio ir kitos paviršinės apnašų sankaupos	
25	Dirvožemio ir kitos paviršinės apnašų sankaupos	
26	Dirvožemis prie kuro vagonų užpildymo vietos	
27	Mazutu užterštas dirvožemis, dešinėje pusėje, tarp bėgių, šalia obelų	Kuro bazė, Vilnius
28	Dirvožemis tarp dyzelino talpų dangčių	
29	Dirvožemis šalia vagonų užpildymo vietos (ženklas "lokomotyvo sustojimo vieta")	
30	Dirvožemis iš pievos priešais dyzelio talpas	

*tikslios ėminių paėmimo vietos autoriui žinomos, nenurodomos konfidencialumo tikslu.

2.1.1.1.5. Dirvožemio ėminiai šalia judriausių Vilniaus miesto gatvių

Dirvožemio ėminiai buvo imami 2020–2021 metų birželio mėnesį šalia Geležinio Vilko gatvės ir Savanorių prospekto esančiose žaliosiose zonose (11 pav., 6 lentelė).



11 pav. Dirvožemio ėminių paėmimo vietų Vilniaus mieste žemėlapis

Iš viso paimti 22 dirvožemio ėminiai. Ėminiai buvo imami iš judriausių gatvių atkarpų, kuriose buvo labiausiai tikėtina tarša naftos angliavandeniliais ir kitais teršalais (11 pav., 6 lentelė). Miško dirvožemio ėminiai, paimti Lietuvos pasienyje su Baltarusija, laikyti kontroliniais dėl minimalios antropogeninės įtakos.

6 lentelė. Dirvožemio ėminių paėmimo vietos Vilniaus mieste ir jų aprašymas

Ėminio Nr.	Ėminio paėmimo vieta	Ėminio paėmimo vietos adresas	Ėminio paėmimo vietos koordinatės
1	Dirvožemis prie EMSI degalinės	Savanorių pr., Vilnius	54.641080, 25.185291
2	Dirvožemis prie Pakalniškių stotelės	Savanorių pr., Vilnius	54.654823, 25.224655
3	Dirvožemis prie Gerosios vilties g. žiedo	Savanorių pr., Vilnius	54.668891, 25.238834
4	Dirvožemis prie gatvių išsišakojimo	Geležinio Vilko g., Vilnius	54.678686, 25.246752
5	Dirvožemis prie Goštauto ir Geležinio vilko g. sankirtos	Geležinio Vilko g., Vilnius	54.684501, 25.256536
6	Dirvožemis prie Geležinio vilko g. tilto	Goštauto g., Vilnius	54.695292, 25.263688
7	Dirvožemis prie žiedo, virš Geležinio Vilko g.	Geležinio Vilko g., Vilnius	54.697935, 25.264670
8	Dirvožemis prie Šeškinės bunkerio	Geležinio Vilko g., Vilnius	54.704346, 25.265823
9	Dirvožemis prie PC „Ozas“	Geležinio Vilko g., Vilnius	54.714824, 25.270371
10	Dirvožemis prie tilto, Ateities g.	Ateities g., Vilnius	54.736348, 25.264303
11	Dirvožemis prie Molėtų plento ir Mokslininkų g. sankryžos	Mokslininkų g., Vilnius	54.754161, 25.269453

Kadangi pagal 2020 m. Vilniaus miesto savivaldybės dirvožemio ir grunto monitoringo ataskaitoje pateiktų tyrimų rezultatus buvo žinoma, kad tirtose teritorijose tarša nebuvo nustatyta, papildomiems tyrimams 2021 m. buvo atrinkti tik keturi prie judriausių Vilniaus miesto gatvių paimti dirvožemio ėminiai. Jie buvo siunčiami į Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Agrocheminių tyrimų laboratoriją agrocheminiams sunkiųjų metalų tyrimams atlikti (ISO 22036:2008, ISO 11047:1998).

2.1.2. Mielų išskyrimas iš vandens ėminių

Vandens ėminiai iš paviršinio horizonto buvo imami steriliu borosilikatinio stiklo buteliu, o iš tarpinio ir priedugnio – steriliu nerūdijančio plieno batometru, iš kurio supilami į sterilius borosilikatinius butelius.

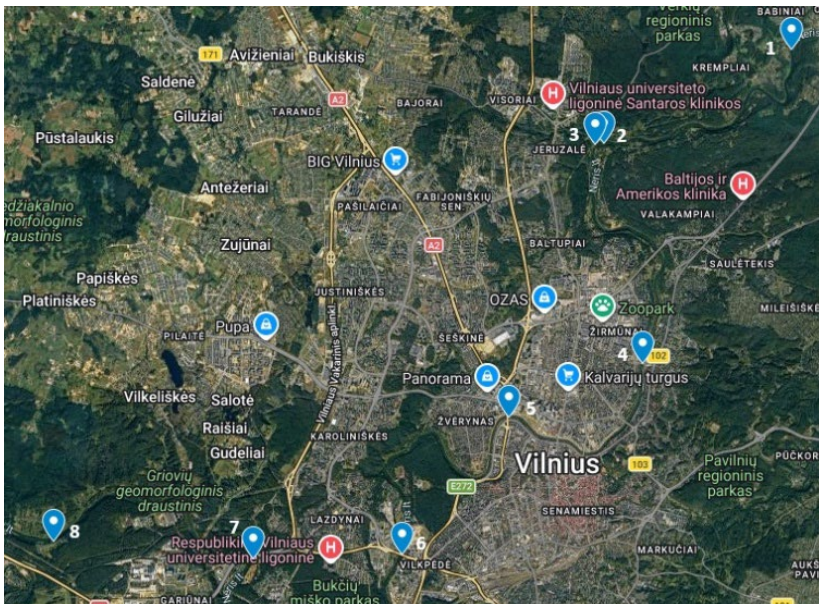
Ėminiai imti nesudrumsčiant vandens telkinio dugno nuosėdų sluoksnio. Upės vanduo imtas butelį nukreipiant priešinga upės tėkmei kryptimi. Imta mažiausiai 500 ml vandens. Ėminiai transportuoti šaltkreipšyje, esant $5,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ temperatūrai ir iki tyrimų atlikimo laikomi laboratoriniame šaldytuve, esant $5,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ temperatūrai (Lietuvos standartizacijos departamentas, 2001; ISO 19458, 2006; Decker ir Simons, 2013).

Visi vandens ėminiai buvo filtruojami, naudojant membraninio filtravimo metodiką (ISO 6222, 1999; ISO 8199, 2018). Naudoti sterilūs $0,45\ \mu\text{m}$ celiuliozės nitrato membraniniai filtrai. Filtruota po 30–100 ml vandens. Esant poreikiui, prieš tai atliekami tiriamojo vandens skiedimai fiziologiniu tirpalu ($45,0\ \text{ml}$ fiziologinio tirpalo + $5,0\ \text{ml}$ tiriamojo vandens arba $90,0\ \text{ml}$ fiziologinio tirpalo + $10,0\ \text{ml}$ tiriamojo vandens) iki 10^2 – 10^3 . Filtras, nufiltravus vandenį steriliu pincetu dedamas į tris RBA ir MD terpių lėkšteles. Lėkštelės inkubuojamos inkubatoriuje, esant $19,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ temperatūrai, 2–4 paras. Po inkubacijos buvo vykdoma mielių kolonijų apskaita, gryninimas bei persėjimas į SDA lėkšteles identifikuoti.

2.1.2.1. Vandens ėminių paėmimo vietos

2.1.2.1.1. Neries upės vandens ėminiai

Neries upės vandens ėminiai buvo imami 2020–2021 metų birželio mėnesį. Iš viso paimta 16 vandens ėminių (12 pav., 7 lentelė).



12 pav. Vandens ėminių paėmimo vietų Neries upėje žemėlapis

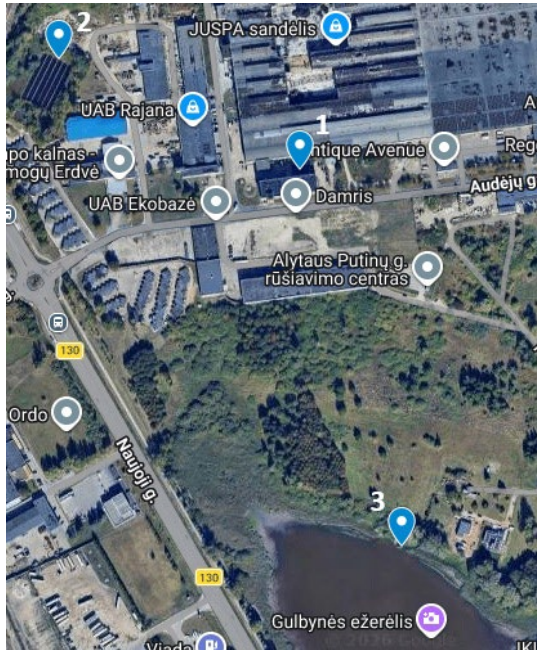
Ėminiai buvo imami upės atkarpose, esančiose prieš Vilniaus miestą, mieste ir už jo ribų (12 pav., 7 lentelė), 25-36 metrų atstumu nuo kranto, 1-1,5 m. gylyje. Labiausiai nuo miesto centro nutolęs ėminys (Nr. 1) buvo laikomas kontroliniu vandens ėminiu.

7 lentelė. Vandens ėminių paėmimo vietų Neries upėje aprašymai

Ėminio paėmimo vietos Nr.	Ėminio paėmimo vieta	Ėminio paėmimo vietos adresas	Ėminio paėmimo vietos koordinatės
1	Ožkinių gyvenvietė	Ožkinių g.28, Vilnius	54.765789, 25.356071
2	Verkių regioninis parkas	Verkių g. 100, Vilnius	54.745520, 25.291756
3	Verkių upelis	Verkių g. 100, Vilnius	54.745401, 25.291474
4	Šilo tiltas	Žirmūnai, Vilnius	54.705654, 25.306848
5	Geležinio vilko tiltas	Geležinio vilko gatvė, Vilnius	54.695685, 25.263614
6	Lazdynų tiltas	Lazdynai, Vilnius	54.670558, 25.230247
7	Gariūnų tiltas	Gariūnai, Vilnius	54.670284, 25.182980
8	Neravų gyvenvietė	Grigiškės, Vilnius	54.673538, 25.119208

2.1.2.1.2. Alytaus miesto vandens ėminiai po padangų perdirbimo įmonės gaisro

2019–2021 m. laikotarpiu, kartą per metus, spalio mėn. buvo imama po 3 vandens ėminius (iš viso 9 ėminiai) (13 pav., 8 lentelė).



13 pav. Vandens ėminių paėmimo vietų žemėlapis Alytaus mieste po padangų perdirbimo įmonės gaisro

Ėminiai imti iš Alytaus miesto teritorijų (13 pav., 8 lentelė), galimai paveiktų padangų perdirbimo įmonės gaisro metu į aplinką patekusių teršalų. Per minėtą tyrimo laikotarpį iš viso buvo paimti 9 ėminiai (po 3 kasmet) (8 lentelė).

8 lentelė. Vandens ėminių paėmimo vietų Alytaus mieste po padangų perdirbimo įmonės gaisro aprašymai

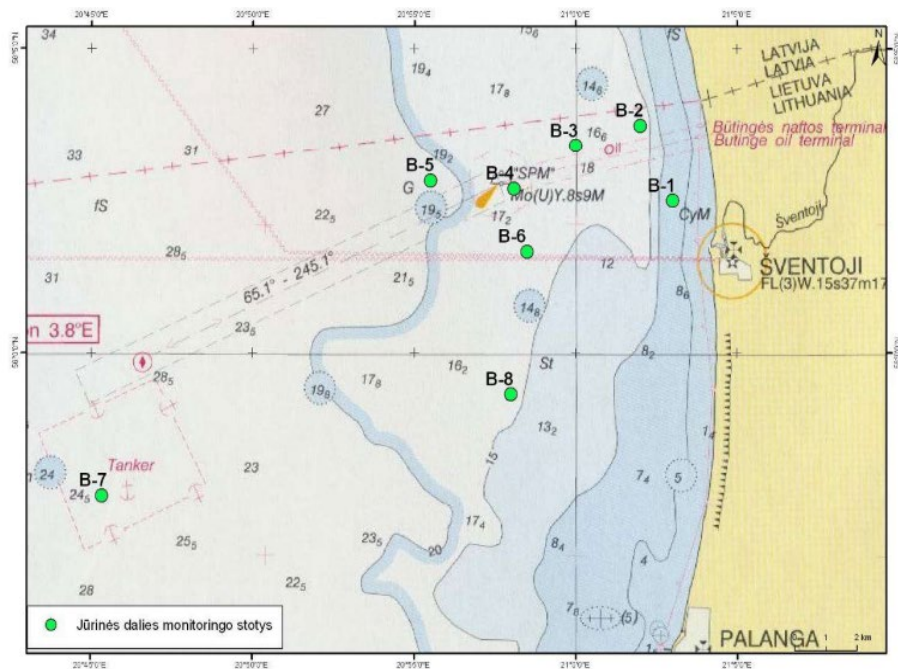
Ėminio paėmimo vietos Nr.	Ėminio paėmimo vieta	Ėminio paėmimo vietos adresas	Ėminio tipas ir aprašymas	Ėminio paėmimo vietos koordinatės
1	Oro paėmimo šachta gaisro vietoje	Pramonės g. 1, Alytus	Vanduo, naudotas gaisrui gesinti, gylis 30 cm.	54.418812, 24.011488
2	Tekstilės chemikalų valymo įrenginiai	Naujoji g. 114, Alytus	Vanduo iš neveikiančių tekstilės chemikalų valymo įrenginių, naudotas gaisrui gesinti, gylis 30 cm.	54.419887, 24.007460

Ėminio paėmimo vietos Nr.	Ėminio paėmimo vieta	Ėminio paėmimo vietos adresas	Ėminio tipas ir aprašymas	Ėminio paėmimo vietos koordinatės
3	Gulbrynės ežeras	Putinų g. 1, Alytus	Ežero vanduo, naudotas gaisrui gesinti, 1 m. nuo kranto, gylis 30 cm.	54.415157, 24.013166

Gaisro tiesiogiai nepaveikto Gulbrynės ežero vandens ėminys (Nr. 3) buvo laikomas kontroliniu ėminiu.

2.1.2.1.3. Baltijos jūros vandens ėminiai Būtingės naftos terminalo akvatorijoje

Tyrimams buvo paimta 80 Baltijos jūros vandens ėminių (po 8 ėminius kas ketvirtį). Ėminiai buvo imami iš 8 skirtingų vietų (14 pav., 9 lentelė) Būtingės naftos terminalo teritorijoje, kas ketvirtį pradedant nuo 2021 m. II ketvirčio ir baigiant 2023 m. III ketvirtį.



14 pav. Vandens ėminių paėmimo vietos Baltijos jūroje (Navickas, 2020).

Ēminiai žymėti B-1 – B-8 stoties numeriais. Ēminys B-7, labiausiai nutolęs nuo Būtingės naftos terminalo, laikytas kontroliniu dėl tikėtinai minimalios naftos produktų įtakos. Ēminiai imti iš paviršinio ir tarpinio sluoksnių, 12-28 metrų gylyje (14 pav., 9 lentelė).

9 lentelė. Vandens paėmimo vietų Baltijos jūroje koordinatės ir aprašymas (Navickas, 2020).

Stoties Nr.	Koordinatės	Gylis, m	Vietos apibūdinimas
B-1	56.041667, 21.050000	12	Jūros priekrantė, Šventosios upės poveikio zona
B-2	56.062500, 21.033333	16	Jūros priekrantė, prie Lietuvos–Latvijos sienos
B-3	56.056944, 21.000000	20	Į ŠR nuo SPM plūduro, prie Lietuvos–Latvijos sienos, ties Palangos m. nutekamųjų vandenų išleistuvu
B-4	56.045000, 20.968056	20	Prie SPM plūduro
B-5	56.047222, 20.925000	24	Į ŠV nuo SPM plūduro, prie Lietuvos–Latvijos sienos
B-6	56.027778, 20.975000	20	Į P nuo SPM plūduro
B-7	55.961111, 20.755556	28	Tanklaivių inkaravietė
B-8	55.988889, 20.966667	20	Foninė stotis, tarp Būtingės

Ēminiai imti vykdant projektą AB „ORLEN Lietuva“ Būtingės naftos terminalo 2021–2025 metų aplinkos monitoringo programos poveikio aplinkos kokybei (jūros ir kranto zonos) monitoringas (vadovas Geoaplinkos tyrimų laboratorijos vyr. mokslo darbuotojas dr. Kęstutis Jokšas).

2.1.3. Mielių identifikavimo, morfologinių, fiziologinių ir biocheminių savybių nustatymo metodai

Mielės buvo identifikuotos klasikiniiais ir molekulinės biologijos metodais. Nepavykus identifikavimui vienu iš nurodytų metodų arba esant netikslumams, gauti rezultatai buvo patvirtinti ir / arba papildyti taikant kitą metodą.

Taip pat toliau aprašytais metodais buvo nustatytos mielių morfologinės, fiziologinės ir biocheminės savybės.

2.1.3.1. Mielių identifikavimas pagal jų morfologinių ir fiziologinių savybių tyrimų rezultatus

Šiame moksliniame darbe mielės buvo identifikuotos laikantis Kurtzman ir kt. (2011) teikiamų metodinių rekomendacijų.

2.1.3.1.1. Morfologinių požymių nustatymas

Buvo atliktas išskirtų mielių kolonijų makromorfologinis vertinimas. Mielių kolonijos buvo apibūdintos jas auginant mielių morfologinio agarų lėkštelėse, nustatant jų struktūrą – gleivinga, klampi, skysta, plėvinė; spalvą – balta, raudona, geltona, oranžinė, juoda ir kt.; kolonijos paviršiaus ypatybės – blizgus, matinis, šiurkštus, suskirstytas sektoriais, sulankstytas, briaunotas, smailėjantis ir kt.; iškilumą – plokščia, įdubusi centre, iškilusi, kupolo formos, kūgio formos ir kt.; kolonijos krašto formą – vientisas, banguotas, skiltėtas, erozinis, apsuptas hifų ar pseudohifų.

Taip pat buvo nustatyti mielių izoliatų mikromorfologiniai požymiai, juos auginant mielių morfologiniu agaru užpildytoje objekcinio stiklelio su įduba įduboje. Stikleliai su inokuluota terpe buvo uždengti steriliu dengiamuoju stikleliu ir inkubuoti Petri lėkštelėse su drėgnu filtriniu popieriumi 48 valandas, inkubatoriuje, esant $28,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Po inkubacijos, paruošti preparatai buvo vertinti mikroskopu $400\times$ ir $1000\times$ padidiniu. Buvo aprašyta mielių ląstelių forma, dydis, pseudohifų ir hifų formavimas bei kitos mikromorfologinės savybės, galinčios padėti indentifikuoti mielių izolatus (Kurtzman ir kt., 2011).

2.1.3.1.2. Mielių fiziologinių savybių nustatymas

Atlikti mielių gebėjimo fermentuoti įvairius angliavandenius, kaip vienintelį anglies šaltinį tyrimai (Kurtzman ir kt., 2011).

Mielių gebėjimo fermentuoti anglies šaltinius testuose naudoti šie anglies šaltiniai: gliukozė, galaktozė, sacharozė, maltozė, laktozė, rafinozė, trehalozė. Mielių gebėjimas fermentuoti angliavandenius nustatytas mėgintuvėliuose su skysta mielių azotinio pagrindo terpe, į kurią yra pridėta 2,0% vieno iš minėtų angliavandenių kaip vienintelio anglies šaltinio. Į kiekvieną mėgintuvėlį įdėtas stiklinis vamzdelis, uždaru viršutiniu galu, kuris užsipildo terpe. Į kiekvieną mėgintuvėlį su anglies šaltiniu, įnešta tiriamosios mielių padermės ląstelių suspensija. Mėgintuvėliai inkubuoti iki 28 parų, inkubatoriuje, esant $28,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, stebint CO_2 dujų burbuliukų susidarymą į terpę įdėtuose stikliniuose vamzdeliuose. Kuo didesnis dujų kiekis susidarė per kuo

trumpesnį inkubacijos laiką, tuo didesnis buvo mielių padermės gebėjimas fermentuoti anglies šaltinius (Kurtzman ir kt., 2011).

Fermentacijos testo vertinimas:

Stipriai teigiamas – vamzdelis užsipildė dujomis per 7 dienas;

Uždelstas teigiamas – vamzdelis greitai užsipildė dujomis, bet po daugiau nei 7 dienų;

Lėtas teigiamas – vamzdelis lėtai užsipildė dujomis po daugiau nei 7 dienų;

Silpnai teigiamas – vamzdelis ne visiškai užsipildė dujomis (mažiau nei 2/3);

Neigiamas – vamzdelyje nematoma susikaupusių dujų;

Variabilus – tos pačios mielių skirtingos padermės gali turėti skirtingą fermentacijos aktyvumą.

Mielių gebėjimas asimiliuoti įvairius anglies šaltinius (gliukozė, inulinas, sacharozė, rafinozė, melibiozė, galaktozė, laktozė, trehalozė, maltozė, melezitozė, metil- α -D-gliukozidas, tirpusis krakmolas, celobiozė, salicinas, L-sorbozė, L-ramnozė, D-ksilozė, L-arabinozė, D-arabinozė, D-ribozė, DL-laktatas, sukcinatas, citratas, D-gliukonatas, N-acetil-D-gliukozaminas, hekadekanas, sacharatas, metanolis, etanolis, glicerolis, eritritolis, ribitolis, galaktitolis, D-manitolis, D-gliucitolis, myo-inozitolis, ksilitolis, L-arabinitolis, 1,2-propandiolis, 2,3-butandiolis) buvo nustatytas auginant jas azotinio pagrindo terpės su anglies šaltiniu lėkštelėse. Šiam tikslui buvo panaudotas sterilus daugiakanalis inokuliatorius (15 pav.), kuriuo vienu metu į mitybinės terpės su konkrečiu anglies šaltiniu lėkštelę lašelio ant terpės paviršiaus pavidalu buvo inokuliuotos 24 mielių padermių ląstelių suspensijos (koncentracija – 10^6 KSV/ml). Taip pat naudotos kontrolinės lėkštelės su gliukoze (teigiama kontrolė) ir be anglies šaltinio (neigiama kontrolė) (Kurtzman ir kt., 2011).



15 pav. Daugiakanalis inokuliatorius

Inokuliuotos lėkštelės buvo inkubuotos inkubatoriuje, esant $28,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ temperatūrai, 2–4 paras. Praėjus šiam laikui, atliktas rezultatų vertinimas.

Anglies šaltinių asimiliacijos testo rezultatų vertinimas: asimiliuoja, neasimiliuoja, silpnai asimiliuoja.

Taip pat buvo įvertintas mielių augimas esant skirtingai aplinkos temperatūrai: 19,0; 25,0; 30,0; 35,0; 37,0; 40,0 ir $45,0^\circ\text{C}$. Vertinimas: auga, neauga, auga silpnai. Tyrimams naudota SDA terpė, augimas vertinamas po 4 dienų. Augimo kontrolei naudotas mėginys, inkubuotas $25,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ temperatūroje (Kurtzman ir kt., 2011).

Buvo atliktas mielių gebėjimo augti esant skirtingam terpės pH vertinimas. Paruoštos skirtingo pH (3,0-8,0) skystos Saburo deksrozės terpės, kurios buvo išpilstytos po 1,0 ml į Eppendorf tipo mėgintuvėlius. Terpė buvo rūgštinta 30% druskos rūgšties tirpalu, šarminta 50% natrio hidroksido tirpalu. Šiuose mėgintuvėliuose buvo atliktas mielių suspensijos paruošimas. Naudota 10^6 KSV/ml mielių suspensija, kuri buvo paruošta matuojant optinį tankį esant 530 nm bangos ilgiui ($\text{OD} = 0,12-0,15$). Paruoštos mielių suspensijos buvo išpilstytos po 100 μl į mikroplokštelės šulinėlius, plokštelė uždengta dangteliu ir inkubuota esant $25,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ temperatūrai, inkubatoriuje. Mielių augimo vertinimas buvo atliktas po 2–4 parų inkubacijos, vizualiai stebint jų augimą skystoje terpėje ir lyginant su teigiama (pH 5,0) ir neigiama kontrole (atitinkamo pH terpė be mielių suspensijos). Po inkubacijos buvo įvertintas terpės drumstumas: jei terpė išliko skaidri – mielės neaugo, jei pastebėtas lengvas drumstumas – pažymėta, kad mielės silpnai augo, o jei terpė tampa intensyviai drumsta – registruojamas geras augimas.

2.1.3.1.2.1. Mielių identifikavimas naudojant morfologinių, fiziologinių ir biocheminių testų rezultatus

Panaudojant visų aukščiau paminėtų identifikacinių testų rezultatus, nustatytos mielių rūšys, naudojantis Kurtzman ir kt. (2011) pateiktu rūšių savybių raktu, arba elektroninėmis mielių identifikavimui skirtomis duomenų bazėmis. Viena iš tokių duomenų bazių, panaudota ir šiame darbe, yra *The.Yeasts* duomenų bazė (prieiga: <https://theyeasts.org/>).

Mielių identifikavimas, naudojantis šia duomenų baze yra pagrįstas jau anksčiau paminėtų fiziologinių ir biocheminių testų rezultatų analize. Įvedus visą reikalingą informaciją buvo atliktas įvestų duomenų palyginimas su duomenų bazėje esančių etaloninių mielių rūšių duomenimis ir pateikti mielių rūšių, su kuriomis buvo nustatytas didžiausias fiziologinių ir biocheminių savybių sutapimas, pavadinimai.

Buvo atlikta DBB reakcija (reakcija atlikta su mielių kultūromis, išaugintomis ant SDA terpės, ant jų užlašinant paruošto DBB reagento ir stebint kultūros spalvos pokytis į tamsiai raudoną). Ši reakcija buvo skirta *Ascomycota* ir *Basidiomycota* skyrių mielėms atskirti. Reakcijos vertinimas: teigiama reakcija – kolonijos nusidažo raudonai - būdinga *Basidiomycota* skyriaus mielėms, neigiama reakcija – spalvos pokyčio nėra - būdinga *Ascomycota* skyriaus mielėms.

2.1.3.2. Mielių fermentinio aktyvumo tyrimai

Toliau aprašomais metodais buvo nustatytas visų išskirtų mielių rūšių fermentinis aktyvumas.

2.1.3.2.1. Kokybinis celiuliazinio aktyvumo nustatymas

Mielių celiuliazinis aktyvumas buvo vertintas auginant jas terpėje su KMC. Mielės buvo sėtos mikrobiologine kilpele į KMC (kiekis 10 g/L) terpę Petri lėkštelėse. Inkubuota inkubatoriuje, esant $28,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, 4–5 paras.

Po inkubacijos, celiuliazinio aktyvumo nustatymui skirtos lėkštelės buvo užpiltos Kongo raudonojo (0,10 mg/ml) dažo tirpalu, kuris palaikius 15 min. buvo nupiltas ir lėkštelės užpiltos 5M NaCl tirpalu, palaikyta 15 min., nupilta ir atliktas vertinimas. Teigiamu celiuliaziniu aktyvumu laikytas geltonos zonos susidarymas aplink mielių kolonijas raudoname fone (Carrasco ir kt., 2016).

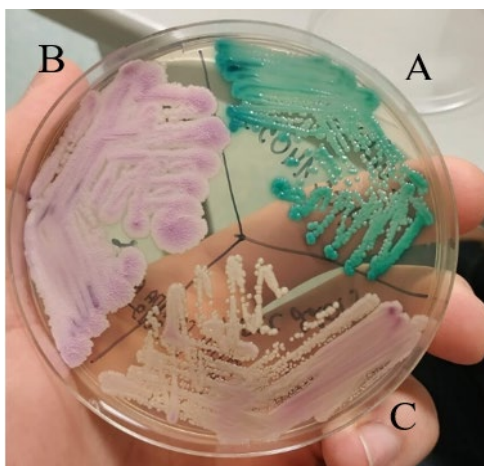
2.1.3.2.2. Kokybinis amilazinio aktyvumo nustatymas

Mielių amilazinis aktyvumas buvo vertintas auginant jas terpėje su tirpiuoju krakmolu ir mielių azotiniu pagrindu. Mielės buvo sėtos mikrobiologine kilpele į tirpiojo krakmolo terpę Petri lėkštelėse. Inkubuota inkubatoriuje, esant $28,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ temperatūrai 4–5 paras.

Po inkubacijos, amilazinio aktyvumo nustatymui skirtos lėkštelės buvo užpiltos Liugolio tirpalu. Vertinta iškart po tirpalo užpylimo. Teigiamu amilaziniu aktyvumu laikytas gelsvos skaidrios zonos susidarymas aplink mielių kolonijas tamsiai mėlyname fone (Carrasco ir kt., 2016).

2.1.3.3. Mielių identifikavimas naudojant chromogenines terpes

Candida chromogeninis agaras – tai selektyvi mikroorganizmų identifikavimui skirta, agarizuota terpė, į kurios sudėtį įeina specialūs chromogeniniai substratai. Chromogeninės terpės veikimo principas yra tas, kad augant mielėms chromogeninį substratą skaido jų fermentai, būdingi tam tikram tiksliniam organizmui. Chromogeninis substratas skyla į cukraus komponentą ir chromogeną. Esant deguoniui, chromogenas sudaro dimerą, kuris nuspalvina terpę ir / arba tipišką mikroorganizmo koloniją.



16 pav. Mielių kultūrų spalvos skirtumai joms augant chromogeninio agaro Petri lėkštelėje (A – *Candida albicans*, B – *Issatchenkia orientalis*, C – *Candida parapsilosis*)

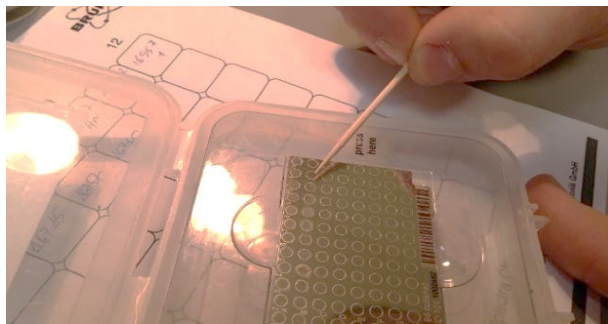
Chromogeniniai agarai yra dažniausiai naudojami laboratorinės medicinos srityje, tačiau tinka ir aplinkos ėminių tyrimams, kai yra ieškoma tam tikrų specifinių mielių rūšių aplinkos ore, dirvožemyje ar vandenyje. Naudojant chromogeninį agarą buvo nustatytos *Candida*, *Diutina*, *Issatchenkia*, *Meyerozyma*, *Wickerhamiella* ir kai kurios *Trichosporon* genties mielių rūšys (16 pav.) (Li ir kt., 2006).

2.1.3.4. Mielių identifikavimas naudojant masių spektrometrijos metodus

Mikroorganizmų identifikavimas naudojant Matricos pagalbinę lazerinę desorbciją / jonizaciją su skrydžio laiko masių spektrometriją (MALDI-TOF MS) atliktas lyginant nežinomo mikroorganizmo baltymų masių spektrą su duomenų bazėje esančiais etaloniniais mikroorganizmų masių spektrais, arba

suderinant nežinomo organizmo biožymenų mases su proteomikos duomenų bazėje esančiomis masėmis. Atliekant masių spektrų palyginimą, nežinomų mikroorganizmų baltymų masių spektrai buvo lyginti su duomenų bazėje esančiais žinomų mikroorganizmų masių spektrais. Mikroorganizmams identifikuoti iki rūšies buvo naudotas tipinis masės diapazonas m/z 2–20 kDa, kuris daugiausia atitinka ribosomų baltymus ir keletą baltymų rinkinių, dalyvaujančių pagrindinių ląstelės funkcijų užtikrinime, pavyzdžiui, fermentų, dalyvaujančių DNR, RNR, baltymų sintezėje ir apdorojime arba pagrindiniuose metabolizmo keliuose. Mikroorganizmams yra būdinga labai įvairi ribosomų baltymų struktūra, kuri sudaro apie 60–70 % ląstelės sausos masės, 2–20 kDa masės diapazone. Ši struktūra yra naudojama konkrečiam mikroorganizmui identifikuoti, sulyginant jo ribosominių baltymų masių spektrus su ribosomų baltymų masių spektrais, esančiais duomenų bazėje. Tai leidžia patikimai identifikuoti mikroorganizmus iki genties ir rūšies taksono (Singhal ir kt., 2015; Khot ir Farrance, 2017; Dura, 2020).

Buvo paruoštos 2–3 parų inkubacijos, SDA lėkštelėse išaugintos, grynos mielių kultūros. Identifikuotos visos iš dirvožemio ir vandens ėminių išskirtos mielių kultūros. Mėginiai identifikavimui buvo ruošti tiesioginio mėginio perkėlimo ir ekstrahavimo skruzdžių rūgštimi metodais (pagal gamintojo pateiktą metodiką) (17 pav.).



17 pav. Tiriamosios mielių kultūros užnešimas ant MALDI-TOF mėginių plokštelės.

2.1.3.5. Mielių identifikavimas naudojant sekoskaitos metodą

2.1.3.5.1. Mielių DNR išskyrimas

Mielių DNR išskyrimui buvo naudojamas „ZR-Fungal/Bacterial DNA MiniPrep“ rinkinys. DNR išskyrimas buvo atliekamas pagal gamintojo pateiktą metodiką su nedidelėmis modifikacijomis. Į mėgintuvėlį su stiklo

rutuliukais dedama 50,0-100,0 mg tiriamosios mielės ir įpilama 750,0 μ l lizuojančio buferio. Mėgintuvėlis gerai užsukamas ir homogenizuojamas ciklu: $5000 \times g - 2$ kartus, su 20 sekundžių pertrauka. Po homogenizavimo, mėgintuvėliai centrifuguojami esant $10\,000 \times g - 1$ minutę. Susidaręs lizatas (400,0 μ l) pilamas į specialų Zymo-Spin™ IV mėgintuvėlį su filtru, kuris yra patalpinamas į surinkimo mėgintuvėlį. Centrifuguojama esant $7\,000 \times g - 1$ minutę, į susidariusį filtratą pilama 1200,0 μ l surišimo buferio. 800,0 μ l šio mišinio perpilama į Zymo-Spin™ IIC kolonėlę, įdėtą į naują surinkimo mėgintuvėlį ir centrifuguojama esant $10\,000 \times g - 1$ minutę. Susidaręs skystis išpilamas ir procedūra pakartojama. Į Zymo-Spin™ IIC kolonėlę pilama 200,0 μ l pirminio plovimo buferio ir centrifuguojama esant $10\,000 \times g - 1$ minutę. Tuomet į $10\,000 \times g - 1$ minutę pilama 500,0 μ l plovimo buferio ir centrifuguojama esant $10\,000 \times g - 1$ minutę. Aukščiau minėti plovimo etapai kartojami du kartus. Kolonėlę Zymo-Spin™ IIC perkeliama į švarų 1,5 ml mėgintuvėlį. Tiesiogiai ant kolonėlės matricos užpilama 100,0 μ l išplovimo buferio, centrifuguojama esant $10\,000 \times g - 30$ sekundžių.

2.1.3.5.2. Kokybinė ir kiekybinė DNR analizė

Išgryninus DNR buvo tikrintas jos švarumas ir koncentracija. Išskirtos DNR koncentracija ir švarumas buvo nustatytas matuojant 260 nm ir 280 nm bangos ilgio UV spindulio sugertį tiriamuoju DNR tirpalu.

2.1.3.5.3. Taikinių DNR sekų pagausinimas PGR metodu ir analizė

Mielių genčiai ir (ar) rūšiai nustatyti buvo pasirinkta analizuoti didžiojo subvieneto (LSU) ribosominės DNR D1/D2 srities sekas, kurios yra pripažintos kaip standartinis mielių identifikavimo metodas (Shoch ir kt., 2012). Rūšinė mielių priklausomybė nustatyta taikant polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodą.

PGR buvo atlikta panaudojant NL1 ir NL4 pradmenis. Amplifikaciniame mėgintuvėlyje buvo paruoštas reakcijos mišinys (25,0 μ l): KAPATaq Ready-Mix mišinio 12,5 μ l, po 1,0 μ l kiekvieno NL1 ir NL4 pradmens, 9,5 μ l molekulinio lygio švarumo H₂O ir mielės DNR. PGR buvo vykdoma naudojant Techne TC-5000 termociklerį. Amplifikacija buvo atlikta pradiniu DNR denatūravimu 95°C temperatūroje 2 min. Po to sekė 35 padauginimo ciklai: denatūracija – 30 sekundžių 95,0°C temperatūroje; pradmenų prilydimas – 30 sekundžių 55,0°C temperatūroje; polimerizacija – 1 minutę 72,0°C temperatūroje. Galutinis sintezės etapas – 10 minučių 72,0°C temperatūroje.

PGR metu gauti produktai buvo analizuoti vykdant elektroforezę 0,7% agarozės gelyje, į kurią buvo pridėta 2,0 µl Midori Green Advance dažo. Specialiomis šukomis buvo suformuoti šulinėliai ir į juos supilta: DNR dydžio standartas – ZR 50 bp DNA amplifikacijos mišinys su DNR, teigiama ir neigiama kontrolės.

PGR produktų sekvenavimą atliktas BaceClear B.V. (Leidenas, Nyderlandai). Iš kiekvieno mėginio du skirtingi produktai buvo sekvenuoti abiem kryptimis (5' ir 3'), naudojant tuos pačius pradmenis, kurie buvo naudoti amplifikacijos reakcijose. Sekos buvo redaguojamos naudojant BioEdit programą. Tuomet gautos sekos buvo lygintos su <https://theyeasts.org/> duomenų bazėje esančiomis sekomis, naudojant *Pairwise alignment* įrankį.

2.1.3.6. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių kultūrų saugojimas

Išskirtos mielių kultūros saugomos Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Gamtos tyrimų centro Biodestruktorių tyrimo laboratorijos mikroorganizmų kolekcijoje, –80 °C temperatūroje gilaus šaldymo šaldiklyje.

2.1.4. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių biodegradacinių savybių tyrimai

2.1.4.1. Mielių ir kitų mikroorganizmų atranka naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio biologiniam valymui laboratorinėmis sąlygomis

Šiems bandymams buvo naudotos mielės (10 padermių) išskirtos iš naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio ant agarizuotos terpės mielėms ir mikroskopiniams grybams su dyzelinu ir kiti mikroorganizmai (bakterijos – 18 padermių, mikroskopiniai grybai – 8 padermės), paimti iš Biodestruktorių tyrimo laboratorijos mikroorganizmų kolekcijos. Buvo atlikta šių mikroorganizmų pirminė atranka pagal jų augimo gausumą skystose terpėse mielėms ir mikroskopiniams grybams bei bakterijoms su dyzelinu.

Remiantis mokslinių tyrimų duomenimis, dirvožemio biologiniame valyme nuo naftos angliavandenilių dalyvauja ne tik mielės, bet ir kitų taksonominių grupių mikroorganizmai – kiti mikroskopiniai grybai bei bakterijos (Das ir Chandran, 2011). Atsižvelgiant į tai, buvo nuspręsta atlikti bandymus ne tik su mielėmis (n=10), bet ir su minėtais mikroorganizmais (grybų n=9, bakterijų n=18), siekiant įvertinti jų biodegradacinį potencialą. Be to, buvo siekiama išsiaiškinti, ar mikroorganizmai naftos angliavandenilius efektyviau skaido veikdami atskirai, ar sudarydami mišrias bendrijas. Šiuo

tikslu iš Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Gamtos tyrimų centro Biodestruktorių tyrimo laboratorijos (VMTI GTC BTL) kolekcijos buvo paimti mikroskopinių grybų ir bakterijų izoliatai, atlikta jų atranka.

Pradinė mikroorganizmų koncentracija inokuliacijai į terpę metu buvo 10^5 KSV/ml. Mėgintuvėliai su inokuliuota terpe mielėms ir mikroskopiniams grybams bei bakterijoms su dyzelinu (terpės kiekis – 10,0 ml) buvo inkubuoti $26,0 \pm 1,0$ °C termopurtyklėje, juos purtant 150 rpm greičiu, 72 val. Mikroorganizmų gausumo apskaita buvo vykdyta serijinių praskiedimų metodu išsėjant į aukščiau paminėtas agarizuotas mitybines terpes. Lėkštelės inkubuotos inkubatorijoje, esant $26,0 \pm 1,0$ °C temperatūrai, 2–4 paras.

Atrinkti aktyviausiai augę mikroorganizmai (koncentracija ne mažiau 10^9 KSV/ml). Mikroorganizmai buvo auginti grupėmis (mielės, mikroskopiniai grybai, bakterijos) ir lygiomis dalimis buvo įnešti į dyzelinu (2,0%) užterštą dirvožemį suformuojant 12 bandymo variantų (10 lentelė). Dirvožemio kiekis eksikatoriuje buvo 1,3 kg. Bandymas buvo atliktas su priedais ir be jų. Naudoti priedai: „Azofoska NPK 15-15-15“ – 0,576 g/kg; NH_4NO_3 – 0,416 g/kg ir KCl – 0,065 g/kg. Bandymo trukmė – 28 paros. Kas savaitę buvo nustatyta mikroorganizmų koncentracija (KSV/g) iš kiekvieno bandymo varianto, išsėjant į bakterijoms, grybams ir mielėms skirtas agarizuotas mitybines terpes su dyzelinu. Kas 2 savaites UAB „GVT LT“ (dabar - UAB „Toksika“) laboratorijoje buvo nustatytas naftos produktų kiekis (g/kg) dirvožemio mėginiuose pagal LST EN ISO 16703 (LAND 89-2010). Praėjus mėnesiui nuo bandymo pradžios, į kiekvieną bandymo variantą (išskyrus kontrolinį) buvo papildomai įnešta po 10^9 KSV/ml mikroorganizmų suspensijos (10 lentelė).

10 lentelė. Mielių ir kitų mikroorganizmų išskirtų iš naftos angliavandenilių užteršto dirvožemio bandymo laboratorinėmis sąlygomis variantai

Bandymo varianto Nr.	Bandymo variantai	Įnešti mikroorganizmai
1	Kontrolė be priedų	-
2	Kontrolė su priedais (trąšos)	-
3	Mielių biopreparatas be priedų	<i>Yarrowia lipolytica</i> GTC BTL <i>RDV 1</i> (M) <i>Rhodospiridium diobovatum</i> GTC BTL KLP 3 (M)
4	Mielių biopreparatas su priedais	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> GTC BTL KL 2 (M)

Bandymo varianto Nr.	Bandymo variantai	Įnešti mikroorganizmai
		<i>Sporobolomyces roseus</i> (2 padermės: GTC BTL VDT 124 ir GTC BTL RD 169) (M)
5	Mikroskopinių grybų biopreparatas be priedų	<i>Penicillium dierckxii</i> GTC BTL VDT 18 (G)
6	Mikroskopinių grybų biopreparatas su priedais	<i>Sarocladium kiliense</i> GTC BTL KLP 14 (G) <i>Trichoderma longibrachiatum</i> GTC BTL RDV 12 (G)
7	Bakterijų biopreparatas be priedų	<i>Acinetobacter baumannii</i> GTC BTL RDV 7 (B) <i>Klebsiella oxytoca</i> GTC BTL RDV 1 (B)
8	Bakterijų biopreparatas su priedais	<i>Micrococcus luteus</i> GTC BTL KLP 10 (B) <i>Pseudomonas brassicacearum</i> GTC BTL VDT 22 (B) <i>Pseudomonas koreensis</i> GTC BTL VLN 14 (B) <i>Rhodococcus fascians</i> GTC BTL KLP 11 (B)
9	Mielių, bakterijų ir grybų biopreparatas MIX(M+B+G) be priedų	<i>Acinetobacter baumannii</i> GTC BTL RDV 7 (B) <i>Yarrowia lipolytica</i> GTC BTL RDV 1 (M) <i>Klebsiella oxytoca</i> GTC BTL RDV 1 (B)
10	Mielių, bakterijų ir grybų biopreparatas MIX(M+B+G) su priedais	<i>Micrococcus luteus</i> GTC BTL KLP 10 (B) <i>Penicillium dierckxii</i> GTC BTL VDT 18 (G) <i>Pseudomonas brassicacearum</i> GTC BTL VDT 22 (B) <i>Pseudomonas koreensis</i> GTC BTL VLN 14 (B) <i>Rhodococcus fascians</i> GTC BTL KLP 11 (B) <i>Rhodospiridium diobovatum</i> GTC BTL KLP 3 (B) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> GTC BTL KL 2 (M)

Bandymo varianto Nr.	Bandymo variantai	Įnešti mikroorganizmai
		<i>Sarocladium kiliense</i> GTC BTL KLP 14 (G) <i>Sporobolomyces roseus</i> (2 padermės: GTC BTL VDT 124 ir GTC BTL RD 169) (M) <i>Trichoderma longibrachiatum</i> GTC BTL RDV 12 (G)
11	Mielių ir bakterijų biopreparatas MIX (M+B) be priedų	<i>Acinetobacter baumannii</i> GTC BTL RDV 7 (B) <i>Yarrowia lipolytica</i> GTC BTL RDV 1 (M) <i>Klebsiella oxytoca</i> GTC BTL RDV 1 (B)
12	Mielių ir bakterijų biopreparatas MIX (M+B) su priedais	<i>Micrococcus luteus</i> GTC BTL KLP 10 (B) <i>Pseudomonas brassicacearum</i> GTC BTL VDT 22 (B) <i>Pseudomonas koreensis</i> GTC BTL VLN 14 (B) <i>Rhodococcus fascians</i> GTC BTL KLP 11 (B) <i>Rhodospiridium diobovatum</i> GTC BTL KLP 3 (M) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> GTC BTL KL 2 (M) <i>Sporobolomyces roseus</i> (2 padermės: GTC BTL VDT 124 ir GTC BTL RD 169) (M)

(M) – mielės, (G) – mikroskopiniai grybai, (B) – bakterijos.

2.1.4.2. Mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio biologiniam valymui vertinimas lauko sąlygomis

Atrinktas biopreparatas (MIX(M+B+G), pradinė mikroorganizmų koncentracija 10^6 KSV/ml) buvo 3 paras sužadintas 30,0 litrų talpos fermentatoriuje iki 10^9 KSV/ml mikroorganizmų koncentracijos. Sužadintas biopreparatas buvo perkeltas į 3,0 m³ tūrio fermentatorių ir 3 paras gausintas iki 10^9 KSV/ml mikroorganizmų koncentracijos. Buvo naudota sužadinimo ir gausinimo terpė naftos angliavandenilius oksiduojantiems

mikroorganizmams. Suformuoti 2 bandymo variantai: Nr. 1, kuriame pradinis naftos angliavandenilių kiekis buvo 50,0 g/kg, Nr. 2, kuriame pradinis naftos angliavandenilių kiekis buvo 48,0 g/kg ir 2 kontroliniai variantai (kontrolė Nr. 1 – naftos angliavandenilių kiekis 50,0 g/kg ir Nr. 2 – naftos angliavandenilių kiekis 48,0 g/kg). Biopreparatu (mikroorganizmų koncentracija ne mažiau 10^9 KSV/ml) buvo išpurkštas naftos angliavandeniliais užterštas dirvožemis (VšĮ Grunto valymo technologijos (dabar UAB „Toksika“) lauko bazė, Kiškėnų km., Klaipėdos raj.). Bandymo ir kontroliniai variantai buvo suformuoti iš įvairios lokalizacijos Klaipėdos rajone surinktų, naftos angliavandeniliais užterštų dirvožemių mišinio. Kas 2 savaites dirvožemis buvo aeruotas dirvožemio vartytuvu, 2 tyrimo savaitę ir 1–3 mėnesį nustatyta mikroorganizmų koncentracija (KSV/g), sėjant į bakterijoms, grybams ir mielėms skirtas agarizuotas mitybines terpes su dyzelinu. Kas mėnesį buvo nustatytas dirvožemio pH, drėgmė, temperatūra ir aplinkos temperatūra. Po 2 savaičių ir kas mėnesį iki 3 mėnesių nuo bandymo pradžios buvo nustatytas likutinis naftos angliavandenilių kiekis (g/kg) pagal LST EN ISO 16703 (LAND 89-2010).

2.1.4.3. Mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo žemės ūkio šalutinių produktų biodestrukcijai vertinimas

Mielių biodestrukcinis aktyvumas buvo vertinamas panaudojant žemės ūkio šalutinius produktus: paprastųjų kviečių (*Triticum aestivum*) šiaudus ir pluoštinių kanapių (*Cannabis sativa*) stiebus. Į apvaliadugnes kolbas buvo atsveriami 1,0 g smulkintų (2-3 mm dydžio) kviečių šiaudų ir pluoštinių kanapių stiebų.

Augalinė medžiaga buvo inokuliuojama mikroorganizmais: mielių rinkiniu (*Candida glabrata*, *Cystofilobasidium macerans*, *Dipodascus armillariae*, *Geotrichum silvicola*, *Guehomyces pullulans*, *Komagataella pastoris*), mikroskopiniu grybu *Trichoderma rossicum* ir mielių bei *Trichoderma rossicum* mišiniu (11 lentelė). Mikroorganizmų suspensijos koncentracija – 10^6 KSV/ml, į bandymo variantus įneštas suspensijos kiekis – 2,0 ml. Mėginiai buvo inkubuojami inkubatoriuje, esant $28,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ temperatūrai. Buvo analizuojamas lignino ir celiuliozės kiekio pasikeitimas po 15 ir 30 bandymo parų.

Pridedant įvairius priedus buvo suformuoti 26 bandymo variantai (11 lentelė). Kolbos su žemės ūkio šalutiniais produktais buvo autoklavuojamos $121,0^\circ\text{C}$ temperatūroje, 15 min.

Bandymas atliktas suformuojant po tris kiekvieno bandymo varianto pakartojimus ir išvedant jų rezultatų vidurkį.

11 lentelė. Milių ir kitų mikroskopinių grybų panaudojimo žemės ūkio šalutinių produktų biodestrukcijai bandymo variantai ir jų aprašymai

Bandymo varianto Nr.	Substrato pavadinimas	Priedai (tirpalo kiekis, ml ir koncentracija, ,%, kur tinka)	Naudoti mikroorganizmai
1	Smulkinti kviečių šiaudai	3,0 ml 0,1% gliukozės tirpalo	<i>Candida glabrata</i> <i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i> <i>Cystofilobasidium</i> <i>macerans</i> <i>Dipodascus</i> <i>armillariae</i> <i>Geotrichum silvicola</i> <i>Guehomyces</i> <i>pullulans</i> <i>Komagataella</i> <i>pastoris</i>
2		3,0 ml sterilaus distiliuoto vandens	
3		3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄)	
4		3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄) su 0,1% gliukozės	
5	Smulkinti kanapių stiebai	3,0 ml 0,1% gliukozės tirpalo	<i>Trichoderma</i> <i>rossicum</i>
6		3,0 ml sterilaus distiliuoto vandens	
7		3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄)	
8		3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄) su 0,1% gliukozės	
9	Smulkinti kviečių šiaudai	3,0 ml 0,1% gliukozės tirpalo	<i>Candida glabrata</i> <i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i> , <i>Cystofilobasidium</i> <i>macerans</i> <i>Dipodascus</i> <i>armillaria</i> , <i>Geotrichum silvicola</i>
10		3,0 ml sterilaus distiliuoto vandens	
11		3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3%	

Bandymo varianto Nr.	Substrato pavadinimas	Priedai (tirpalo kiekis, ml ir koncentracija, ,%, kur tinka)	Naudoti mikroorganizmai
		NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄)	<i>Guehomyces pullulans</i>
12		3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄) su 0,1% gliukozės	<i>Komagataella pastoris Trichoderma rossicum</i>
13		3,0 ml 0,1% gliukozės tirpalo	
14		3,0 ml sterilaus distiliuoto vandens	<i>Candida glabrata Colletotrichum gloeosporioides</i>
15	Smulkinti kanapių stiebai	3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄)	<i>Cystofilobasidium macerans Dipodascus armillariae Geotrichum silvicola</i>
16		3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄) su 0,1% gliukozės	<i>Guehomyces pullulans Komagataella pastoris</i>
17		3,0 ml 0,1% gliukozės tirpalo	
18		3,0 ml sterilaus distiliuoto vandens	
19	Smulkinti kviečių šiaudai	3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄)	<i>Trichoderma rossicum</i>
20		3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄) su 0,1% gliukozės	
21	Smulkinti kanapių stiebai	3,0 ml 0,1% gliukozės tirpalo	<i>Candida glabrata</i>

Bandymo varianto Nr.	Substrato pavadinimas	Priedai (tirpalo kiekis, ml ir koncentracija, ,%, kur tinka)	Naudoti mikroorganizmai
22		3,0 ml sterilaus distiliuoto vandens	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
23		3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄)	<i>Cystofilobasidium macerans Dipodascus armillariae Geotrichum silvicola Guehomyces</i>
24		3,0 ml skysto mineralinių medžiagų mišinio (0,3% NH ₄ NO ₃ ir 0,1% KH ₂ PO ₄) su 0,1% gliukozės	<i>pullulans, Komagataella pastoris Trichoderma rossicum</i>
Kontrolė Nr. 1	Smulkinti kviečių šiaudai	5,0 ml sterilaus distiliuoto vandens	Nenaudota
Kontrolė Nr. 2	Smulkinti kanapių stiebai	5,0 ml sterilaus distiliuoto vandens	Nenaudota

Celiuliozės kiekio pokyčiui nustatyti, 250,0 ml tūrio kolbas su šlifu dedamas tiriamas kanapių stiebų arba kviečių šiaudų mėginys, įpilama 30,0 ml etanolio ir azoto rūgšties mišinio (4:1) ir virinama 1 valandą naudojant elektrinę viryklę, prijungus prie kolbų grįžtamąjį kondensatorių. Po valandos reakcijos mišinys nufiltruojamas stiklo pluošto filtrais, praplaunama 95,0% etanolio tirpalu. Filtre likusi medžiaga perkeliama į kolbą su šlifu, įpilama 40,0 ml 0,3 M NaOH ištirpinto etanolyje (95,0%). Prie kolbos pritvirtinamas grįžtamas kondensatorius ir verdama 1 valandą. Kolbos turinys vėl filtruojamas stiklo filtrais, plaunama 20,0 ml etanolio (95,0%). Nufiltravus filtras džiovinamas džiovinimo krosnyje 105,0 °C temperatūroje iki pastovios masės. Celiuliozės kiekis (%) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{m_1 - m}{n} \cdot 100 \%,$$

kur m₁ – nustatyta mėginio masė su filtru, g; m – filtro svoris, g; n – pradinė žaliavos masė, g. (Jermakov ir kt., 1987).

Lignino kiekio pokyčiui nustatyti, į 250,0 ml kolbas su šlifu dedamas tiriamas kanapių stiebų arba kviečių šiaudų mėginys, įpilama 60,0 ml 2,0% druskos rūgšties tirpalo. Ant kolbų pritvirtinamas grįžtamas kondensatorius, virinama 2 valandas. Kolbos turinys filtruojamas per popierinį filtrą. Keletą kartų praplaunama vandeniu, vėliau acetonu kol filtratas tampa bespalvis.

Popierinio filtro turinys perkeliamas į kolbą su šlifu. Į kolbas pilama 7,0 ml 72,0 % sieros rūgšties tirpalo ir paliekama 2,5 valandos 20,0–23,0 °C temperatūroje. Po 2,5 valandos į kolbas įpilama 93,0 ml distiliuoto vandens, pritvirtinamas grįžtamasis kondensatorius ir virinama 1 valandą. Po valandos turinys filtruojamas per popierinius filtrus ir plaunama 0,5 g/l NaCl tirpalu.

Filtrai džiovinami džiovinimo krosnyje 105,0 °C temperatūroje iki pastovios masės. Lignino kiekis (%) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\frac{m_1 - m}{n} \cdot 100 \%,$$

kur m_1 – nustatyta mėginio masė su filtru, g; m – filtro svoris, g; n – pradinė žaliavos masė (Chudiakova, 1984).

2.1.4.4. Mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo chromo bioakumuliacijai vertinimas

Mikroorganizmų gebėjimas kaupti chromą buvo tirtas panaudojant 10,0 mg/l ir 100,0 mg/l CrCl_3 tirpalus. Tirpalai buvo sterilizuojami filtruojant juos per 0,22 μm celiuliozės nitrato filtrus. Bandymui naudotos mikroorganizmų kultūros, išskirtos iš trivalenčiu chromu užteršto Klaipėdos miesto dirvožemio. Siekiant ištirti ir palyginti skirtingų taksonominių grupių mikroorganizmų gebėjimą kaupti chromą, buvo pasirinkta atlikti bandymą su mielių, kitų mikroskopinių grybų ir bakterijų padermėmis. Naudoti 5 mikroorganizmai: *Bacillus subtilis*, *Cyberlindnera jadinii*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhodotorula mucilaginosa* ir *Solicoccozyma terrea*, išskirti iš chromu užteršto Klaipėdos miesto dirvožemio ėminių ir parinkti, remiantis literatūros šaltinių duomenimis (Al-Battashi ir kt., 2016; Rodriguez ir kt., 2019; Nicula ir kt., 2023). Buvo paruoštos 10^9 KSV/ml šių mikroorganizmų suspensijos (mielių ir mikroskopinių grybų – $\text{OD}_{530 \text{ nm}}$, bakterijų – OD_{625}). Bandymui atlikti naudotos sterilios 100,0 ml tūrio kolbos, į kurias buvo įpilama po 50,0 ml 10,0 mg/l ir 100,0 mg/l chromo tirpalų ir 50 ml paruoštų mikroorganizmų suspensijų. Kolbos inkubuotos $22,0 \pm 1,0$ °C inkubatoriuje. Bandymo rezultatai buvo vertinami po 2 val. ir 24 val. Šiam tikslui buvo suformuoti 23 bandymo variantai (po 3 pakartojimus) (12 lentelė).

12 lentelė. Mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo chromo bioakumuliacijai bandymo variantai ir jų aprašymai.

Bandymo var. Nr.	CrCl ₃ koncentracija mg/l	Mikroorganizmas	Ekspozicijos trukmė, val.
1 (K1)	100,0	Kontrolė Nr. 1 (be mikroorganizmų)	-
2		<i>Cyberlindnera jadinii</i> (M)	2
3			24
4		<i>Solicoccozyma terrea</i> (M)	2
5			24
6		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (M)	2
7			24
8		<i>Bacillus subtilis</i> (B)	2
9			24
10		<i>Penicillium chrysogenum</i> (G)	2
11			24
12 (K2)	10,0	Kontrolė Nr. 2 (be mikroorganizmų)	-
13		<i>Cyberlindnera jadinii</i> (M)	2
14			24
15		<i>Solicoccozyma terrea</i> (M)	2
16			24
17		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (M)	2
18			24
19		<i>Bacillus subtilis</i> (B)	2
20			24
21		<i>Penicillium chrysogenum</i> (G)	2
22			24
23 (K3)		Kontrolė Nr. 3 (be mikroorganizmų ir chromo)	-

(M) – mielės, (G) – mikroskopiniai grybai, (B) – bakterijos.

Kolbų turinys centrifugoje Sigma 2-16 KL buvo centrifuguotas 10 min. 2500 rpm greičiu, supernatantas nupiltas į sterilius, 100,0 ml tūrio PET plastiko butelius ir vėliau naudotas tyrimams atlikti. Paruošti mėginiai buvo siunčiami į Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Agrocheminių tyrimų laboratoriją, kur buvo atliktas chromo kiekio nustatymas pagal LST EN ISO 11885:2009.

2.1.5. Statistinė duomenų analizė

Duomenų analizė buvo atlikta naudojant IBM SPSS Statistics 27 programinę įrangą. Rezultatai laikyti statistiškai reikšmingais, kai reikšmingumo lygmuo buvo $p < 0,05$.

Kategorinių kintamųjų tarpusavio priklausomybė vertinta taikant Pearson χ^2 (chi kvadrato) testą. Kadangi dalyje atsitiktinumo lentelės langelių tikėtinų dažnių reikšmės buvo mažesnės nei 5 ir daugiau nei 20 % langelių neatitiko χ^2 testo prielaidų, p reikšmėms apskaičiuoti taikytas Monte Karlo metodas, leidžiantis gauti tikslesnį empirinį reikšmingumo įvertį esant mažoms imtims ar retoms kategorijoms.

Laiko dinamikos ir eksperimentinių bei kontrolinių variantų poveikio vertinimui taikyta dviejų veiksnių pakartotinių matavimų dispersinė analizė (two-way repeated measures ANOVA), kur veiksniai buvo sąlyga (bandymo variantas ir kontrolė) ir laikas. Vertinti pagrindiniai efektai bei jų sąveika (Laikas $\times$ Sąlyga). Efekto dydis apskaičiuotas naudojant dalinį eta kvadratą (η^2).

NOM panaudojimo naftos dyzelinu užteršto dirvožemio biologiniam valymui laboratorinėmis sąlygomis efektyvumo statistinei analizei taikyta vienfaktorė dispersinė analizė (ANOVA), o reikšmingiems skirtumams tarp grupių nustatyti naudotas Tukey post hoc testas.

Aptinkamumo dažnis (AD) buvo apskaičiuotas pagal formulę (Stankevičienė, 2012):

$$AD = \frac{B}{C} \cdot 100\%,$$

kur

AD – aptinkamumo dažnis (AD, %),

B – ėminių, kuriuose buvo aptikta rūšis, skaičius,

C – bendras ėminių skaičius.

Gautų rezultatų skaitinių reikšmių analizė, įskaitant minimalių (MIN), maksimalių (MAX), vidutinių (VID) reikšmių ir standartinio nuokrypio (SD) skaičiavimą, atlikta naudojant Microsoft Excel programinę įrangą.

Venn diagramos parengtos naudojant Piktochart infografikų kūrimo įrankį.

2.2. Medžiagos

1. Amonio nitratas ($\text{NH}_4(\text{NO}_3)$) (Sigma-Aldrich, JAV).
2. Amonio sulfatas ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma-Aldrich, JAV).
3. Acetonas ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) (Merck KGaA, Vokietija).
4. Agaras (BD Difco, JAV).
5. Agarozė (Sigma-Aldrich, JAV).
6. Alaus misa (11°Blg, UAB Vilniaus alus, Lietuva).
7. Amonio nitratas (NH_4NO_3) (Merck KGaA, Vokietija).
8. Amonio sulfatas (Merck KGaA, Vokietija).
9. Anglies šaltiniai, naudoti fermentacijos ir asimiliacijos tyrimams: gliukozė, inulinas, sacharozė, rafinozė, melibiozė, galaktozė, laktozė, trehalozė, maltozė, melezitozė, metil- α -D-gliukozidas, tirpusis krakmolai, celobiozė, salicinas, L-sorbozė, L-ramnozė, D-ksilozė, L-arabinozė, D-arabinozė, D-ribozė, DL-laktatas, sukcinatas, citratas, D-gliukonatas, N-acetil-D-gliukozaminas, hekadekanas, sacharatas, metanolis, etanolis, glicerolis, eritritolis, ribitolis, galaktitolis, D-manitolis, D-gliucitolis, myo-inozitolis, ksilitolis, L-arabinitolis, 1,2-propandiolis, 2,3-butandiolis (Merck KGaA, Vokietija).
10. Azofoska NPK 15-15-15 (UAB Emolus, Lietuva).
11. Azofoska NPK (S) 15-15-15 (11) (UAB Emolus, Lietuva).
12. *Candida* chromogeninis agaras (Liofilchem, Italija).
13. Celiuliozės nitrato filtrai 0,22 μm ir 0,45 μm (Merck KGaA, Vokietija).
14. Chromo (III) chloridas (CrCl_3) (Sigma-Aldrich, JAV).
15. DBB reagentas (Sigma-Aldrich, JAV).
16. Dengiamieji stikleliai (KALTEK, Italija).
17. Dyzelinas (AB ORLEN Lietuva).
18. DNR dydžio standartas – ZR 50 bp DNA (Zymo-Research, JAV).
19. Druskos rūgštis 30% tirpalas (HCl) (Merck KGaA, Vokietija)
20. Etanolis 95,0% (UAB Vilniaus degtinė, Lietuva)
21. Filtrinis popierius (Merck KGaA, Vokietija).
22. Gliukozės-amonio agaras (GA), sudėtis (g/L): gliukozė – 20,00 g (Merck KGaA, Vokietija), mielių ekstraktas – 2,00 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,00 g, K_2HPO_4 – 0,15 g, MgSO_4 – 0,50 g, NaCl – 0,10 g, CaCl_2 – 0,10 g (Sigma-Aldrich, JAV), agaras – 20,00 g (BD Difco, JAV), distiliuotas H_2O – 1,00 L, chloramfenikolis (Sigma-Aldrich, JAV) – 0,01 g – terpė naudojama mielių išskyrimui ir apskaitai.
23. Kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4) (Merck KGaA, Vokietija)
24. Kanapių stiebai (*Cannabis sativa* L., Lietuva)
25. Karboksimetilceliuliozės (KMC) natrio druska (Merck KGaA, Vokietija).

26. Terpė su KMC (g/L): KMC – 10,00, amonio sulfatas – 0,50, agaras – 20,00.
27. Kalio chloridas (KCl) (Sigma-Aldrich, JAV).
28. Kongo raudonasis dažas (Sigma-Aldrich, JAV).
29. Kviečių stiebai (*Triticum aestivum* L., Lietuva)
30. Liugolio tirpalas (Sigma-Aldrich, JAV).
31. Midori Green Advance dažas (Nippon Genetics, Vokietija).
32. Mielių morfologinis agaras (BD Difco, JAV).
33. Natrio chloridas (NaCl) (Sigma-Aldrich, JAV).
34. Natrio hidroksidas (NaOH) (Sigma-Aldrich, JAV).
35. Objektiniai stikleliai su įduba (BRAND, Vokietija).
36. Petri lėkštelės (Noex, Lenkija).
37. Polisorbata 80 (Sigma-Aldrich, JAV).
38. Rose Bengal CAF agaras (RBA) (Liofilchem, Italija).
39. Saburo deksrozės agaras (SDA) (Liofilchem, Italija).
40. Skysta mielių azotinio pagrindo terpė (BD Difco, JAV).
41. Skysta Saburo deksrozės terpė (Liofilchem, Italija).
42. Sužadavimo ir gausinimo terpė naftos angliavandenilius oksiduojantiems mikroorganizmams: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma-Aldrich, JAV) – 1,50 g/L, Azotofoska NPK (S) 15-15-15 (11) (UAB Emolus, Lietuva) – 0,50 g/L, KCl (Sigma-Aldrich, JAV) – 0,25 g/L, dyzelinas – 3,00 ml/L, alaus misa (11^oBlg, UAB Vilniaus alus, Lietuva) – 20,00 ml/L, krano vanduo – 1000,00 ml, Polisorbata 80 (Sigma-Aldrich, JAV) – 0,10 g/L.
43. Terpė bakterijoms su dyzelinu (g/L): NH_4Cl – 2,00, NaCl – 5,00, Na_2HPO_4 – 3,00, KH_2PO_4 – 0,10, MgSO_4 – 2,00, CaCl_2 – 0,01, MnSO_4 – 0,02, FeSO_4 – 0,01 (Sigma-Aldrich, JAV), dyzelinas – 10,00, terpės pH 7,0.
44. Terpė mielėms ir mikroskopiniams grybams su dyzelinu (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 3,50; K_2HPO_4 – 0,50, KH_2PO_4 – 0,50; MgSO_4 – 0,50, NaCl – 0,50, distiliuotas vanduo – 1000,00 ml, dyzelinas – 3,00 ml/L, Polisorbata 80 – 0,10 ml/L (Sigma-Aldrich, JAV), terpės pH 7,0.
45. Terpė mielėms su dyzelinu (MD), sudėtis (g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,00, K_2HPO_4 – 0,15, KH_2PO_4 – 0,85, MgSO_4 – 0,50, NaCl – 0,10, CaCl_2 – 0,10 (Sigma-Aldrich, JAV), dyzelinas – 10,0 g, terpės pH 7,0.
46. Terpė su tirpumu krakmolu (g/L): tirpusis krakmolas – 10,00, amonio sulfatas – 0,50, agaras – 20,00.
47. Tirpusis krakmolas (Merck KGaA, Vokietija).
48. ZR-Fungal/Bacterial DNA MiniPrep rinkinys (Zymo-Research, JAV).
49. α -ciano-4-hidroksicinamono rūgštis (HCCA) (Bruker, JAV).

2.3. Įranga

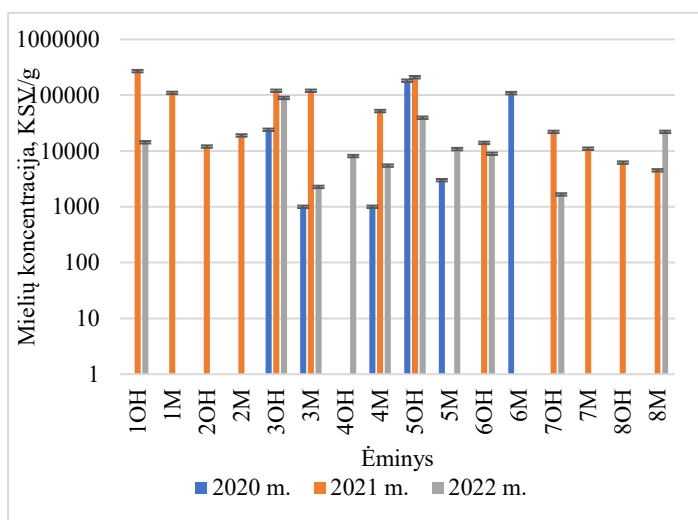
1. Autoklavas 5075EL (Tuttnauer, Nyderlandai).
2. BioEdit programa (7.0.5.3 versija) (Tom Hall, Ibis Biosciences, JAV).
3. Centrifuga Sigma 2-16PK (Sigma, Vokietija).
4. Daugiakanalis inokuliatorius (gamintojas nežinomas, Rusija).
5. Džiovinimo krosnis (Memmert GmbH + Co.KG, Vokietija).
6. Fermentatorius (3,0 m³ talpos) (UAB Toksika, Lietuva).
7. Fermentatorius (30,0 L talpos) (UAB Toksika, Lietuva).
8. Homogenizatorius Precellys-24 (Bertin Technologies SAS, Prancūzija).
9. IBM SPSS Statistics 27 programinė įranga (IBM Corporation, JAV).
10. Inkubatorius Memmert (Memmert GmbH + Co.KG, Vokietija).
11. Inkubatorius (šaldantis) Memmert (Memmert GmbH + Co.KG, Vokietija).
12. Laboratorinis šaldytuvas (AB Snaigė, Lietuva).
13. MALDI-TOF daugkartinė plokštelė (Bruker, JAV).
14. MALDI-TOF masių spektrometras (Bruker, JAV).
15. Microsoft Excel (Microsoft Corporation, JAV).
16. Mikroskopas Leica DM5000B (Leica Microsystems GmbH, Vokietija).
17. Nerūdijančio plieno batometras (gamintojas nežinomas, Lietuva).
18. Piktochart infografikų kūrimo įrankis (Piktochart Sdn. Bhd., Malaizija).
19. Purtyklė IKA KS 4000 (IKA Works GmbH & Co. KG, Vokietija).
20. Spektrofotometras (Implen, Vokietija).
21. Termocikleris TC-5000 (Bibby Scientific Ltd, JK).
22. Termopurtyklė KS 4000 control (IKA, Vokietija).
23. The Yeasts duomenų bazė (prieiga: <https://theyeasts.org/>) (The Yeasts Trust, Nyderlandai).

3. REZULTATAI

3.1. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė antropogenizuotuose dirvožemiuose

3.1.1. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė miško dirvožemyje Lietuvos pasienyje su Baltarusija, galimo Astravo atominės elektrinės poveikio zonoje

Tirtuose miško (pušyno) dirvožemio Lietuvos pasienyje su Baltarusija ($n=48$), galimo Astravo atominės elektrinės poveikio zonos (KSV/g) ėminiuose viso tyrimo metu buvo nuo 0,00 iki $2,70 \times 10^5$ KSV/g. Vidutinė mielių koncentracija viso tyrimo laikotarpiu buvo $3,11 \times 10^4$ KSV/g. Didžiausiai mielių koncentracija buvo nustatyta 2021 metais 1OH dirvožemio ėminyje ($2,70 \times 10^5$ KSV/g) (18 pav.). Vidutinė mielių koncentracija organiniame (OH) dirvožemio sluoksnyje 2020 m. buvo $2,60 \times 10^4$ KSV/g, 2021 m. $8,20 \times 10^4$ KSV/g, 2022 m. $2,00 \times 10^4$ KSV/g, o mineraliniame sluoksnyje, atitinkamai $1,30 \times 10^4$ KSV/g, $3,50 \times 10^4$ KSV/g ir $4,50 \times 10^3$ KSV/g (18 pav.).



18 pav. Mielų koncentracijos kitimas miško dirvožemyje Lietuvos pasienyje su Baltarusija, galimo Astravo atominės elektrinės poveikio zonoje 2020–2022 m ($n=48$) (1OH–8OH – dirvožemio

organinio sluoksnio ėminiai, 1M–8M – dirvožemio mineralinio sluoksnio ėminiai, 1 - Kulbokiškės kaimas, Švenčionių raj., 2 - Gelednės kaimas, Švenčionių raj., 3 - Svirkiskės kaimas, Švenčionių raj., 4 - Dalininkų kaimas, Švenčionių raj., 5 - Balingrado kaimas, Švenčionių raj., 6 - Bildžių kaimas, Švenčionių raj., 7 - Lavoriškių pasienio kontrolės punktas, Vilniaus raj., 8 - Kalvelių kaimas, Vilniaus raj.).

Agrocheminių tyrimų rezultatai parodė, kad visi tirti dirvožemio ėminiai pasižymėjo rūgščia reakcija (pH 3,0–3,8) ir dideliu mainų rūgštingumu. Organinės anglies kiekis svyravo nuo 3,49 iki 16,68 %, bendro azoto – nuo 0,13 iki 1,26 %. Judrių makroelementų (P_2O_5 , K_2O , Ca, Mg, S) koncentracijos tarp ėminių reikšmingai skyrėsi (13 lentelė).

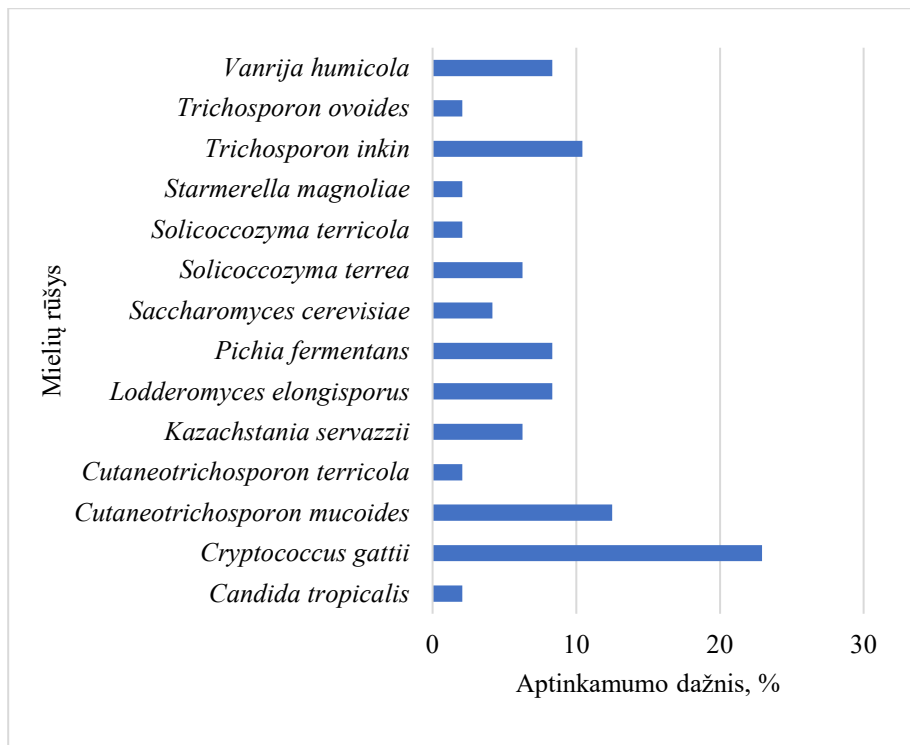
13 lentelė. Dirvožemio ėminių Lietuvos pasienyje su Baltarusija agrocheminių tyrimų rezultatai (n=8)

Ėminio Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	3,4	3,2	3,3	3,0	3,0	3,0	3,1	3,8
Judrus fosforas (P_2O_5) mg/kg	108,0	26,0	58,0	48,0	23,0	35,0	94,0	72,0
Judrus kalis (K_2O) mg/kg	175,0	50,0	189,0	161,0	37,0	60,0	184,0	45,0
Judrus natris (Na) mg/kg	47,0	15,0	41,0	23,0	17,0	21,0	39,0	26,0
Organinė anglis (C) %	7,85	5,14	16,68	7,15	5,12	4,82	5,76	3,49
Bendras azotas %	0,577	0,263	1,260	0,247	0,330	0,160	0,378	0,130
Judrus kalcis (Ca) mg/kg	805,0	344,0	925,0	471,0	252,0	240,0	863,0	537,0
Judrus magnis (Mg) mg/kg	183,0	54,8	108,0	82,4	67,0	63,0	125,0	73,2
Bendra siera (S) mg/kg	580,0	137,0	1039,0	210,0	215,0	175,0	296,0	236,0
Mainų rūgštingumas mekv/kg	37,57	13,95	71,91	21,01	16,97	12,04	17,53	16,64

Didžiausia mielių koncentracija viso tyrimo laikotarpiu buvo nustatyta 1-ajame ėminyje – iki $2,70 \times 10^5$ KSV/g. Šiam ėminiui buvo būdingi palyginti dideli judraus fosforo (108,0 mg/kg), kalio (175,0 mg/kg), organinės anglies (7,85 %) ir bendro azoto (0,577 %) kiekiai. Aukštos organinės anglies ir bendro azoto reikšmės taip pat nustatytos 3-ajame ėminyje (atitinkamai 16,68 % ir 1,26 %), taip pat stebėtos aukščiausios S, Ca, K_2O reikšmės.

Mažesnėmis organinės anglies (4,82–5,14 %) ir bendro azoto (0,16–0,33 %) koncentracijomis pasižymėję 5–6 ėminiai buvo siejami su mažesnėmis mielių koncentracijomis.

Iš aukščiau paminėtų dirvožemio ėminių buvo išskirti 46 mielių izoliatai ir nustatyta 14 mielių rūšių.



19 pav. Miško dirvožemyje Lietuvos pasienyje su Baltarusija, galimo Astravo atominės elektrinės poveikio zonoje 2020–2022 m aptiktos mielių rūšys ir jų aptinkamumo dažnis (%) (n=46)

Ascomycota skyriaus mielės sudarė 42,9%, o *Basidiomycota* – 57,1% išskirtų mielių rūšių. Dažniausiai aptiktos mielių rūšys buvo *Cryptococcus gattii* (23,99%), *Cutaneotrichosporon mucoides* (13,0%) ir *Trichosporon inkin* (10,9%). Statistiškai reikšmingų mielių rūšių įvairovės skirtumų tirtuose Lietuvos pasienio su Baltarusija dirvožemio ėminiuose nebuvo stebėta ($p>0,05$) (19 pav.).

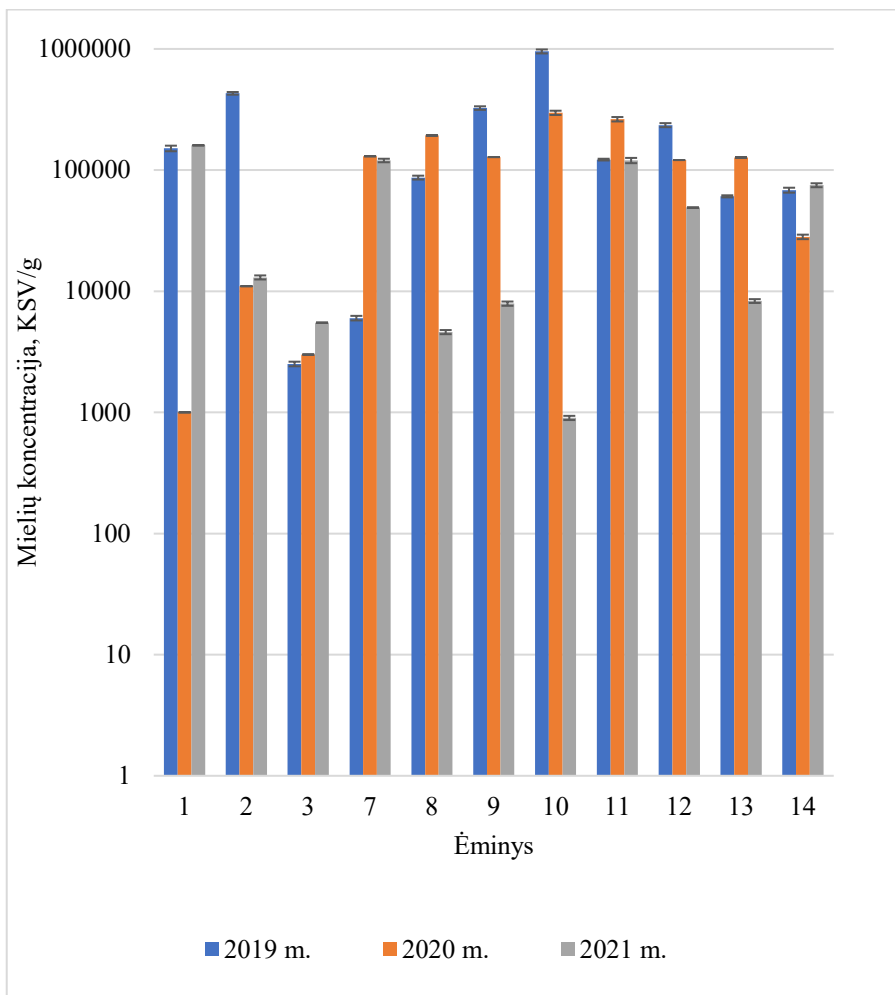
Tirtuose ėminiuose stebėti mielių populiacijų skirtumai, susiję su aplinkos cheminėmis savybėmis (13 lentelė). Maisto medžiagomis turtinguose ėminiuose (Nr. 1 ir 3) dominavo *Ascomycota* skyriaus (*Lodderomyces elongisporus*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*) mielės, o

skurdesniame dirvožemyje vyravo *Basidiomycota* atstovai (*Cutaneotrichosporon mucoides*, *Cryptococcus gattii*, *Trichosporon inkin*).

3.1.2. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė Alytaus miesto ir rajono dirvožemyje po padangų perdirbimo įmonės gaisro

Buvo tiriamas dirvožemis Alytaus rajono teritorijose (n=33), link kurių 2019 m. spalio mėnesį įvykusio padangų perdirbimo įmonės gaisro metu judėjo susidaręs kenksmingų dūmų srautas. Šių tyrimų metu buvo vykdomas mielių koncentracijos nustatymas ir išskirtų mielių izoliatų identifikavimas, siekiant įvertinti gaisro poveikį dirvožemio mielių populiacijos pusiausvyrai.

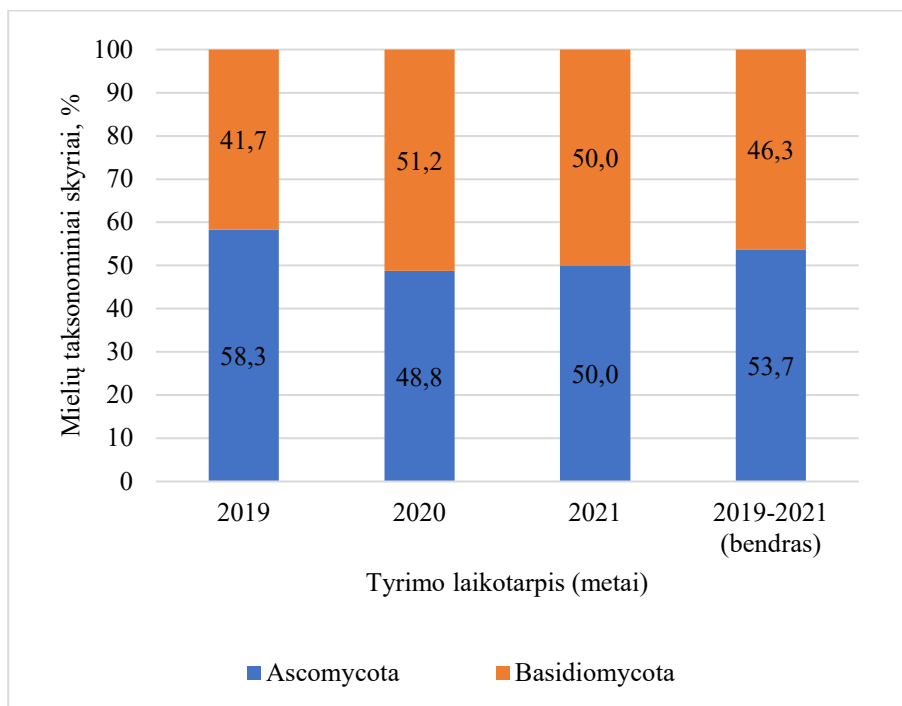
Mielių koncentracija (KSV/g) dirvožemio ėminiuose viso tyrimo laikotarpio metu svyravo nuo 10^2 iki 10^5 KSV/g. Didžiausia mielių koncentracija 2019 metais buvo nustatyta ėminiuose Nr. 2 (atstumo nuo gaisro židinio zona – 0-1 km, mielių koncentracija - $4,80 \times 10^5$ KSV/g) ir Nr. 10 (>5 km, $9,54 \times 10^5$ KSV/g), 2020 metais – ėminyje Nr. 10 (>5 km, $2,97 \times 10^5$ KSV/g) ir Nr. 11 (2-5 km, $2,63 \times 10^5$ KSV/g), o 2021 metais – ėminyje Nr. 1 (0-1 km, $1,60 \times 10^5$ KSV/g). Mažiausia mielių koncentracija 2019 metais nustatyta ėminyje Nr. 3 (0-1 km, $2,51 \times 10^3$ KSV/g), 2020 metais – ėminyje Nr. 1 (0-1 km, $1,00 \times 10^3$ KSV/g), 2021 metais – ėminyje Nr. 10 (>5 km, $9,00 \times 10^2$ KSV/g) (20 pav.). Nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp dirvožemio ėminių ėmimo vietos atstumo iki gaisro epicentro ir mielių koncentracijos.



20 pav. Mielių koncentracijos pokyčiai 2019 – 2021 m. Alytaus miesto ir rajono dirvožemio ėminiuose po padangų perdirbimo įmonės gaisro (n=33) (1 – Lopšelis–darželis „Obelėlė“ (atstumo nuo gaisro židinio zona 0-1 km), 2 – Lopšelis darželis „Putinėlis“ (0-1 km), 3 – Alytaus medicininės rehabilitacijos ir sporto centras (0-1 km), 7 – privatus kiemas, Putinų g. 1 (0-1 km), 8 – privatus medelynas, Sodžiaus g. (2-5 km), 9 – privati sodyba, Taukotiškų g. 6 (>5 km), 10 – privatus ūkis, Šaltinių g. (>5 km), 11 – privati sodyba, Pavasario g. (2-5 km), 12 – Lopšelis–darželis „Nykštukas“ (2-5 km), 13 – Ikimokyklinio ugdymo skyrius, Alyvų g. 4 (>5 km), 14 – miškas, Varsos g. (>5 km))

Iš dirvožemio ėminių Alytaus mieste ir rajone iš viso buvo išskirti 142 mielių izoliatai ir identifikuota 50 mielių rūšių. Tyrimo rezultatai parodė, kad 2019 metais didžioji dalis iš dirvožemio išskirtų mielių rūšių priklausė *Ascomycota* skyriui, 2020 metais – *Basidiomycota* skyriui, o 2021 metais

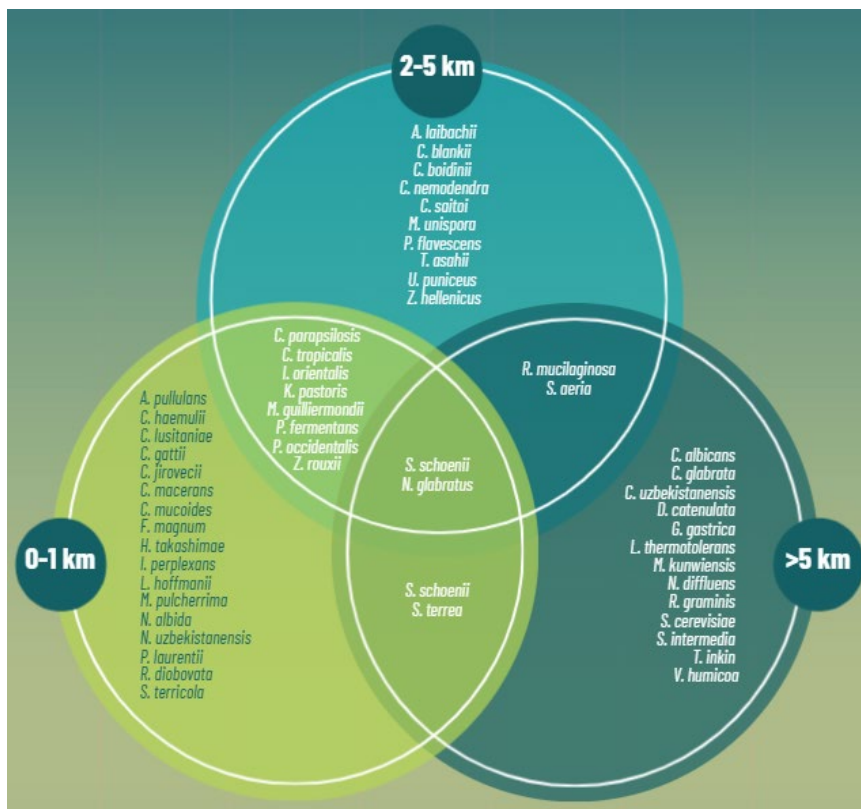
rūšys buvo tolygiai pasiskirsčiusios abiejuose skyriuose (17 pav.). Bendri viso tyrimo laikotarpio duomenys parodė, kad dauguma išskirtų mielių rūšių priklausė *Ascomycota* skyriui. Mielių rūšių skaičiaus padidėjimas *Ascomycota* skyriaus naudai, galėtų reikšti, kad buvo tiriamas organinių medžiagų gausus dirvožemis, o *Basidiomycota* skyriaus naudai - antropogenizuotas, sausas, maistinių medžiagų skurdus dirvožemis (Botha, 2011; Yurkov, 2018). Šio tyrimo kontekste, rūšių gausumo pokyčius galėjo lemti tai, kad buvo tirtas miesto ir ūkinės paskirties (tręšiamas, dirbamas, kultūriniais augalais apsodintas) dirvožemis (Botha, 2011; Yurkov, 2018). Tai patvirtina ir mielių rūšių, priskiriamų *Ascomycota* skyriui dominavimas miesto ir ūkinės paskirties dirvožemyje (55-65%), lyginant su miško dirvožemiu, kuriame dominavo *Basidiomycota* skyriaus mielės (65-75%) (21 pav.). Statistiškai reikšmingų *Ascomycota* ir *Basidiomycota* skyriams priklausančių mielių rūšių pokyčių skirtingais tyrimo laikotarpiais nebuvo stebėta ($p>0,05$).



21 pav. Iš Alytaus miesto ir rajono dirvožemio ėminių po padangų perdirbimo įmonės gaisro išskirtų mielių rūšių pasiskirstymas pagal skyrius (n=142)

Atlikta išskirtų mielių rūšių analizė parodė, kad 0–1 km nuo gaisro židinio zonoje buvo aptikta 28 mielių rūšys, 2–5 km zonoje – 22 mielių rūšys, o >5 km zonoje – 18 mielių rūšių. 0–1 ir 2–5 km zonose aptiktos 10 sutampančių

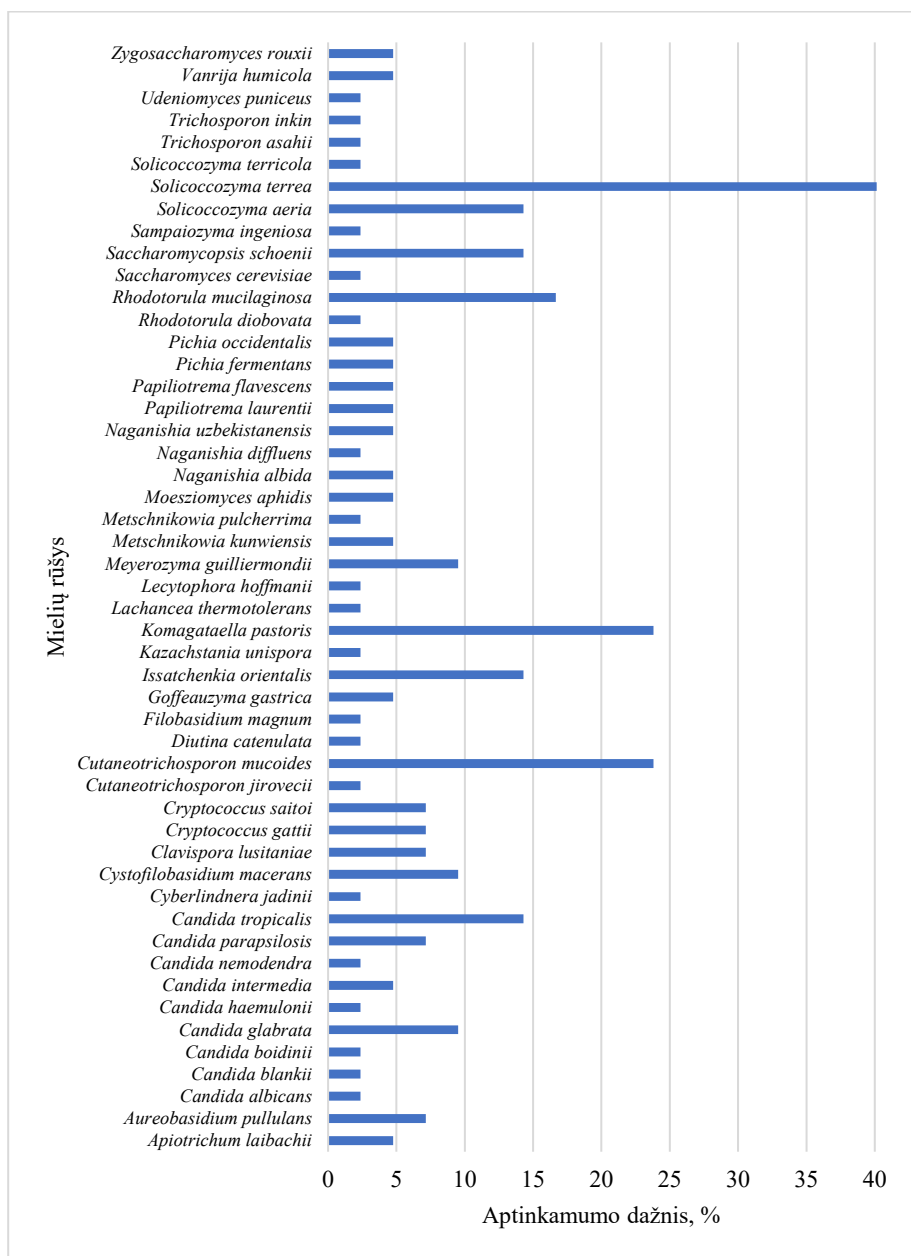
mielių rūšių, 2–5 ir >5 km zonose – 4 sutampančios mielių rūšys, o 0–1 ir >5 km zonose – 3 sutampančios rūšys. Visose minėtose zonose buvo aptiktos dvi mielių rūšys – *N. grabratus* ir *S. schoenii* (22 pav.).



22 pav. Iš Alytaus miesto ir rajono dirvožemio ėminių po padangų perdirbimo įmonės gaisro išskirtų mielių rūšių pasiskirstymo Venn diagrama (n=142)

Vertinant tyrimų rezultatus pastebėta, kad tostant nuo gaisro židinio didėjo mielių rūšių skaičius *Ascomycota* skyriaus naudai (55-70%) ir atvirkščiai – artėjant link gaisro židinio – *Basidiomycota* skyriaus naudai (65-70%).

Nustatyta, kad dažniausiai aptinkamos mielių rūšys buvo *Solicoccozyma terreus* (40,5%), *Cutaneotrichosporon mucoides* (23,8%), *Komagataella pastoris* (21,8%), *Rhodotorula mucilaginosa* (16,7%), *Candida tropicalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Saccharomycopsis schoenii* (po 14,3%) ir *Candida glabrata* (9,5%) mielių rūšys (23 pav.). Nebuvo stebėta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp dirvožemio ėminių ėmimo vietos atstumo iki gaisro epicentro ir mielių rūšinės sudėties ($p > 0,05$).



23 pav. Po gaisro padangų perdirbimo įmonėje Alytaus miesto ir rajono dirvožemyje aptiktos mielių rūšys ir jų aptikimo dažnis (%) (n=142)

Remiantis Alytaus miesto ir rajono dirvožemio ėminių agrocheminių tyrimų duomenimis, tirtų dirvožemio mėginių pH svyravo nuo 4,4 iki 7,6. Judraus fosforo kiekiai svyravo nuo 50,0 mg/kg iki 1525,0 mg/kg, o judraus kalio – nuo 68,0 mg/kg iki 1050,0 mg/kg (14 lentelė).

14 lentelė. Alytaus miesto ir rajono dirvožemio ėminių po padangų perdirbimo įmonės gaisro agrocheminių tyrimų rezultatai (n=11)

Ėminio Nr.	pH	Judrus fosforas (P ₂ O ₅) mg/kg	Judrus kalis (K ₂ O) mg/kg	Organinė anglis (C) mg/kg	Bendras azotas (N) %	Bendra siera (S) mg/kg	C:N santykis
1	6,4	184,0	121,0	4,60	0,476	767,0	10:1
2	6,8	254,0	56,0	0,86	0,080	136,0	11:1
3	6,8	445,0	112,0	6,55	0,360	580,0	18:1
7	6,8	855,0	126,0	1,98	0,181	229,0	11:1
8	7,6	353,0	630,0	2,78	0,208	279,0	13:1
9	6,8	1525,0	1050,0	3,37	0,343	441,0	10:1
10	6,6	905,0	141,0	2,00	0,193	224,0	10:1
11	7,1	270,0	310,0	1,64	0,178	197,0	9:1
12	7,2	491,0	229,0	2,25	0,214	322,0	10:1
13	6,8	608,0	145,0	4,32	0,300	512,0	14:1
14	4,4	50,0	68,0	1,84	0,140	141,0	13:1

Anglies ir azoto santykis (C:N) šio tyrimo metu svyravo nuo 9:1 iki 18:1. Didžiausias C:N santykis nustatytas ėminiuose Nr. 3, 8, 13 ir 14. Kadangi šie dirvožemio ėminiai buvo paimti gėlynų teritorijose arba dirbamo dirvožemio laukuose, didesnę C:N santykį galėjo lemti didesnis organinių medžiagų kiekis dirvožemyje dėl organinių medžiagų, komposto ir durpių, naudojimo tręšimui ir dirvožemio gerinimo tikslams. Mielų koncentracija dirvožemio ėminyje Nr. 3 buvo apie 10³ KSV/g visais tyrimo laikotarpiais ir buvo šiek tiek mažesnis nei kituose tirtuose dirvožemio mėginiuose (nuo 10³ KSV/g iki 10⁵ KSV/g skirtingais tyrimo laikotarpiais). Mielų koncentracija ėminiuose Nr. 8, 13 ir 14 buvo panaši į kitų tirtų dirvožemio ėminių mielių skaičių ir skirtingais tyrimo laikotarpiais svyravo nuo 10³ KSV/g iki 10⁵ KSV/g.

Nustatyta, kad didesnis organinės anglies (pvz., 4,32–6,55 %) ir azoto (0,30–0,48 %) kiekis dirvožemyje gali būti siejamas su *Ascomycota* skyriaus mielių dominavimu, kurios tokiomis sąlygomis sudarė 60–70 % visų nustatytų rūšių. Tuo tarpu mažesnio derlingumo rūgščiuose dirvožemiuose (pH 4,4), dažniau aptinkamos *Basidiomycota* skyriaus mielės, kurių dalis gali siekti iki 50–60 %. Detalesnė informacija apie mielių rūšių paplitimo priklausomybę nuo dirvožemio agrocheminių parametrų pateikta 1 priede. Statistiškai

reikšmingų mielių koncentracijos ir jų rūšių įvairovės skirtumų, tirtuose Alytaus miesto ir rajono dirvožemio ėminiuose nebuvo stebėta ($p>0,05$).

3.1.3. Mielų paplitimas ir rūšių įvairovė Klaipėdos miesto teritorijū, kuriose buvo stebėta tarša chromu, dirvožemyje

Buvo tiriamas dirvožemis Klaipėdos miesto teritorijose, kuriose buvo nustatyta tarša chromo junginiais. Šių tyrimų metu buvo vykdomas mielių koncentracijos ir rūšinės sudėties nustatymas, siekiant įvertinti chromo poveikį dirvožemio mielių bendrijos biologinei pusiausvyrai.

Lietuvos geologijos tarnybos prie Aplinkos ministerijos (LGT) duomenimis (ėminiai paimti 2019 m. rugpjūčio mėn., o rezultatai gauti lapkričio mėn.) chromo kiekis dirvožemyje svyravo nuo 52,0 iki 1350,0 mg/kg (15 lentelė). Maksimalus leistinas chromo kiekis dirvožemyje pagal sveikatos apsaugos ministro įsakymą Nr. V-114 (Lietuvos Respublikos Sveikatos apsaugos ministerija, 2004) yra 80,0 mg/kg. LGT tirtuose dirvožemio ėminiuose chromo kiekis nuo 6,1 iki 13,5 karto viršijo maksimalų leistiną kiekį. 2021 m. atlikus pakartotinius sunkiųjų metalų (Cr, Cd, Pb, Ni, Fe, Cu, Zn) nustatymo dirvožemio ėminiuose tyrimus, nei vieno iš tirtų sunkiųjų metalų kiekiai neviršijo ribinių verčių nurodytų sveikatos apsaugos ministro įsakyme Nr. V-114 (Lietuvos Respublikos Sveikatos apsaugos ministerija, 2004) (16 lentelė).

15 lentelė. Chromo kiekis Klaipėdos miesto dirvožemio ėminiuose 2019 m. (Lietuvos geologijos tarnybos pateikta informacija*) (n=5)

Ėminio Nr.	Chromas (mg/kg)	Viršija maksimalų leistiną kiekį (kartais)
1	52,0	Neviršija
2	730,0	9,1
3	1350,0	16,9
4	700,0	8,8
5	610,0	7,6

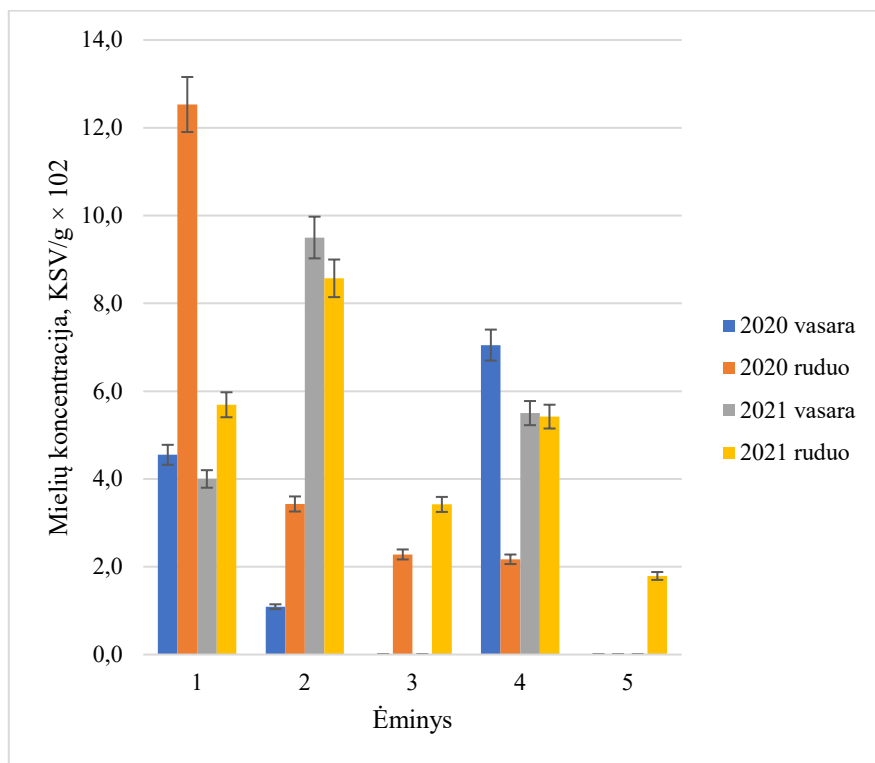
* Konfidencialus, nepublikuotas dokumentas. Gautas leidimas naudoti pateiktus duomenis mokslinio darbo tikslais.

16 lentelė. Chromo ir kitų metalų kiekis Klaipėdos miesto dirvožemio ėminiuose 2021 m. (mg/kg) (n=3)

Ėminio Nr.	Chromas	Kadmis	Švinas	Nikelis	Geležis	Varis	Cinkas
1	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta
2	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta	Netirta
3	52,2	0,073	8,03	13,70	5240,0	10,80	48,80

4	44,0	0,180	27,10	15,90	7977,0	18,80	113,00
5	28,9	0,190	34,80	8,50	7607,0	17,40	167,00

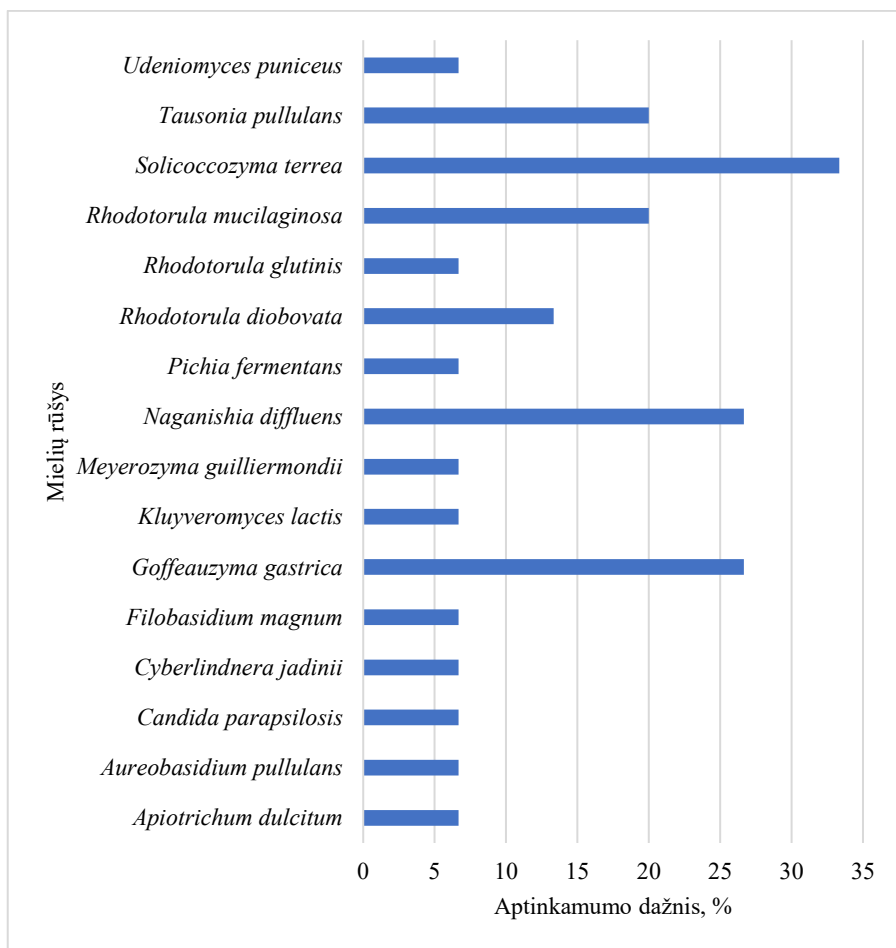
Tyrimo laikotarpiu reikšmingų mielių skaičiaus svyravimų Klaipėdos miesto dirvožemio, užteršto chromu, ėminiuose nebuvo stebėta. 2020 metų vasarą paimtuose dirvožemio ėminiuose mielių koncentracija buvo nuo 0,00 iki $7,05 \times 10^2$ KSV/g ir vidutiniškai sudarė $2,54 \times 10^2$ KSV/g, o didžiausias mielių koncentracija nustatyta ėminyje Nr. 4. 2020 rudenį paimtuose dirvožemio ėminiuose mielių koncentracija buvo nuo 0,00 iki $12,53 \times 10^2$ KSV/g, vidutinis mielių koncentracija buvo $4,08 \times 10^2$ KSV/g, didžiausia mielių koncentracija stebėta ėminyje Nr. 1. 2021 vasarą paimtuose dirvožemio ėminiuose mielių koncentracija buvo nuo 0,00 iki $9,50 \times 10^2$ KSV/g, vidutinė mielių koncentracija buvo $4,00 \times 10^2$ KSV/g, o didžiausia koncentracija nustatyta ėminyje Nr. 2. 2021 rudenį tirtuose dirvožemio ėminiuose mielių koncentracija buvo nuo $1,79 \times 10^2$ iki $8,57 \times 10^2$ KSV/g, o didžiausia mielių koncentracija aptikta ėminyje Nr. 2 ($8,57 \times 10^2$ KSV/g) (24 pav.).



24 pav. Mielų koncentracijos kitimas Klaipėdos miesto dirvožemio ėminiuose (n=20), užterštuose chromu, tyrimo laikotarpiu 2020–2021 m. (1 - Klaipėdos „Verdenės“ progimnazija, 2 - Klaipėdos Vitės progimnazija,

3 - Klaipėdos Vitės progimnazijos stadionas, 4 - Klaipėda, Švyturio g., greta gyvenamojo namo Nr. 14, 5 - Klaipėda, Švyturio g., netoli gyvenamojo namo Nr. 18)

Tyrimo metu buvo išskirti 39 mielių izoliatai ir nustatyta 16 mielių rūšių. Dažniausiai išskirtos mielių rūšys buvo *Solicoccozyma terrea* (33,3%), *Goffeauzyma gastrica* ir *Naganishia diffluens* (po 26,7%), *Rhodotorula mucilaginosa* ir *Tausonia pullulans* (po 20,0%) (25 pav.).



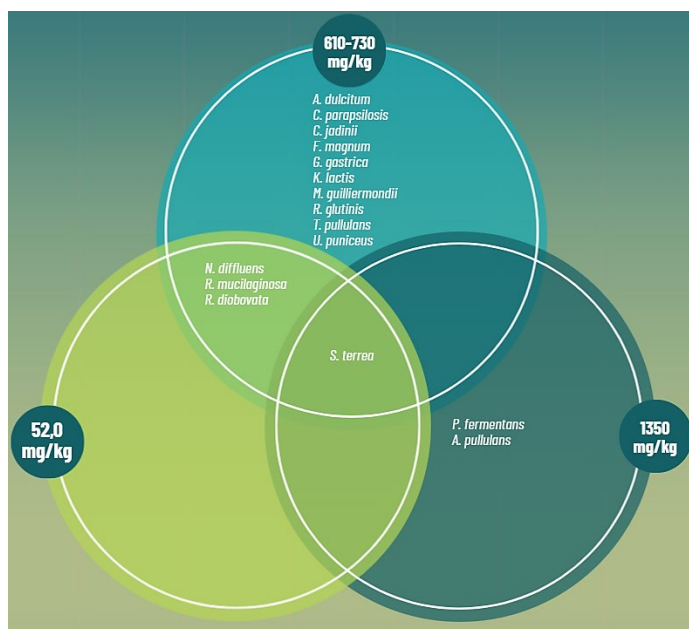
25 pav. Iš chromu užteršto Klaipėdos miesto dirvožemio išskirtų mielių rūšių pasiskirstymas pagal jų aptinkamumo dažnį (%) (n=39)

2020 metų vasarą paimtuose dirvožemio ėminiuose dažniausiai buvo aptiktos *Goffeauzyma gastrica*, *Naganishia diffluens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Solicoccozyma terrea* ir *Tausonia pullulans* mielių rūšys (visos 40,0%), 2020 metų rudenį – *Rhodotorula diobovata* (40,0%), 2021 metų

vasarą – *Goffeauzyma gastrica* ir *Solicoccozyma terrea* (po 33,3%), o 2021 metų rudenį – *Solicoccozyma terrea* (60,0%). Statistiškai reikšmingų mielių rūšių įvairovės skirtumų chromu užteršto dirvožemio ėminiuose nebuvo stebėta ($p>0,05$).

Labiausiai chromu užterštame dirvožemyje (Nr. 3 – 1350,0 mg/kg) buvo aptiktos *Aureobasidium pullulans*, *Pichia fermentans* ir *Solicoccozyma terrea* mielių rūšys. *Solicoccozyma terrea* buvo aptikta ir kituose dirvožemio ėminiuose su mažesne tarša chromu, o *Aureobasidium pullulans* ir *Pichia fermentans* – tik labiausiai užterštame dirvožemyje.

Atlikta išskirtų mielių rūšių analizė parodė, kad didžiausia mielių rūšių įvairovė (14 rūšių) nustatyta esant 610–730 mg/kg chromo koncentracijai. Esant 52 mg/kg koncentracijai unikalių rūšių nenustatyta – visos jos sutampa su 610–730 mg/kg chromo taršos dirvožemio ėminiuose aptiktomis rūšimis. Tuo tarpu esant 1350 mg/kg chromo taršai, aptinkamos tik kelios mielių rūšys. Vienintelė rūšis, nustatyta visų taršos lygių dirvožemyje buvo *Solicoccozyma terrea* (26 pav.).



26 pav. Iš chromu užteršto Klaipėdos miesto dirvožemio išskirtų mielių rūšių pasiskirstymo pagal chromo koncentraciją Venn diagrama (n=39)

3.1.4. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė naftos angliavandeniliais užterštuose kuro bazių dirvožemiuose

Buvo tiriamas dirvožemis kuro bazių teritorijose, kurios dėl neatsakingo naftos produktų naudojimo ir sandėliavimo sovietmečiu buvo stipriai užteršto įvairiais naftos angliavandeniliais. Sovietmečiu į aplinką patekę naftos produktai smarkiai paveikė dirvožemio kokybę, o šių teritorijų atkūrimui pririekė daugelio metų ir didelių finansinių išteklių. Šių tyrimų metu buvo vykdomas mielių koncentracijos ir rūšinės sudėties nustatymas, siekiant įvertinti taršos poveikį tirtu dirvožemio mielių populiacijos pusiausvyrai. Ypatingas dėmesys skirtas mielių tyrimams, nes jos geba augti angliavandenilių turinčiose terpėse, skaido naftos produktus ir pasižymi bioremediacinėmis savybėmis, padedančiomis natūraliai atkurti užterštų dirvožemių ekologinę pusiausvyrą (Gargouri et al., 2015).

Ištirta 30 dirvožemio ėminių ir nustatyta, kad mielių aptikta 90,0% ėminių, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių – 6,7% ėminių.

Nustatyta, kad dirvožemio ėminiuose bendra mielių koncentracija vidutiniškai sudarė $1,67 \times 10^5$ KSV/g ir svyravo nuo 0,00 iki $4,09 \times 10^6$ KSV/g. Didžiausias bendra mielių koncentracija buvo ėminyje Nr. 6 ($4,09 \times 10^6$ KSV/g), kuriame buvo aptikta ir didžiausia naftos angliavandenilius degraduojančių mielių koncentracija ($2,05 \times 10^4$ KSV/g). Mielų nebuvo aptikta ėminiuose Nr. 13, Nr. 26 ir Nr. 27 (17 lentelė).

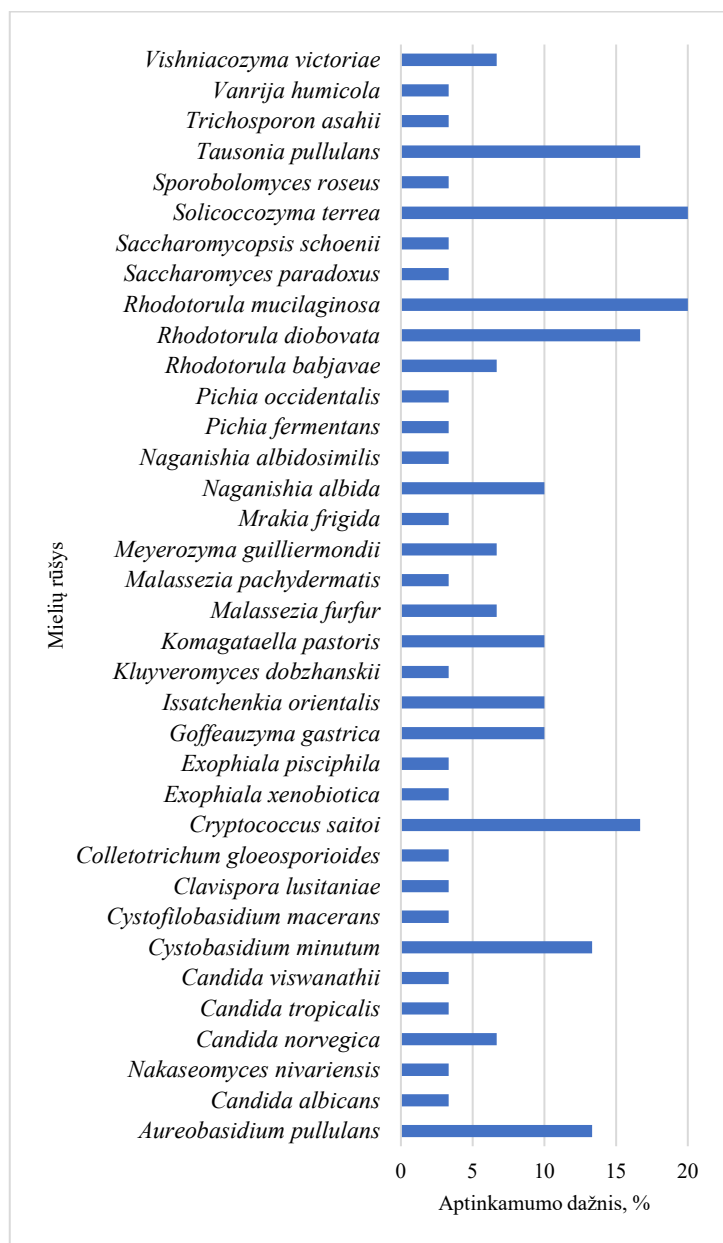
17 lentelė. Iš naftos angliavandeniliais užteršto kuro bazių dirvožemio ėminių (n=30) išskirtų mielių koncentracija.

Ėminio Nr.	Kuro bazės pavadinimas	Mielų koncentracija (KSV/g) $\times 10^4$	Naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija (KSV/g) $\times 10^4$
1	Klaipėdos kuro bazė	7,71 $\pm$ 0,32	0,00
2		0,50 $\pm$ 0,21	0,00
3		3,20 $\pm$ 0,12	0,00
4		8,80 $\pm$ 0,37	0,00
5		4,11 $\pm$ 0,18	0,00
6		409,00 $\pm$ 16,00	2,05 $\pm$ 0,08
7		0,10 $\pm$ 0,00	0,00
8	Radviliškio kuro bazė	4,41 $\pm$ 0,21	0,00
9		5,54 $\pm$ 0,17	0,00
10		0,58 $\pm$ 0,03	0,00
11		1,20 $\pm$ 0,04	0,00
12		7,41 $\pm$ 0,54	0,00
13		0,00	0,00
14		0,1 $\pm$ 0,00	0,00
15		0,46 $\pm$ 0,02	0,00

Ėminio Nr.	Kuro bazės pavadinimas	Mielų koncentracija (KSV/g) $\times 10^4$	Naftos angliavandenilių oksiduojančių mielų koncentracija (KSV/g) $\times 10^4$
16		0,52 $\pm$ 0,02	0,00
17	Kauno kuro bazė	0,30 $\pm$ 0,01	0,00
18		5,54 $\pm$ 0,15	0,00
19		9,86 $\pm$ 0,44	0,00
20		1,00 $\pm$ 0,00	0,00
21		2,09 $\pm$ 0,06	0,00
22	Vaidotų kuro bazė	1,53 $\pm$ 0,06	0,02 $\pm$ 0,00
23		3,47 $\pm$ 0,12	0,00
24		0,46 $\pm$ 0,02	0,00
25		0,86 $\pm$ 0,04	0,00
26		0,00	0,00
27	Vilniaus kuro bazė	0,00	0,00
28		3,27 $\pm$ 0,12	0,00
29		1,52 $\pm$ 0,04	0,00
30		0,05 $\pm$ 0,00	0,00

1 – Dirvožemis prie didelės dyzelino talpos laiptelių, kairė pusė, 2 – Dirvožemis prie didelės dyzelino talpos laiptelių, dešinė pusė, 3 – Dirvožemis prie dyzelino čiaupų, už pašiūrės, 4 – Smėlingas dirvožemis, apie 5 m nuo bėgių, 5 – Dirvožemis, apie 5 m nuo bėgių, 6 – Dirvožemio ir kitų apnašų mišinys nuo bėgių ekologinės dangos, 7 – Dirvožemis su yrančiais plastiko gabalėliais, 8 – Dirvožemis prie dyzelino talpyklos, kairė pusė, prie laiptų, šalia vamzdžių, 9 – Dirvožemis prie antros talpyklos (vidurinė), šalia laiptų, 10 – Dirvožemis prie trečios talpyklos čiaupo, šalia sraigtinių laiptų, 11 – Dirvožemis prie antros talpyklos čiaupo, priešingoje laiptams pusėje, 12 – Dirvožemis prie pirmos talpyklos čiaupo, priešingoje laiptams pusėje, 13 – Dirvožemis iš pievos netoli talpyklų, 14 – Dirvožemis iš valymo aikštelių Nr. 1 (atsiūstas), 15 – Dirvožemis iš valymo aikštelių Nr. 2 (atsiūstas), 16 – Dirvožemis iš valymo aikštelių Nr. 3 (atsiūstas), 17 – Dirvožemis šalia monitoringo gręžinio Nr. 53730, 18 – Dirvožemis tarp kuro talpyklų (požeminės), pirmos dvi kuro talpyklos šalia pastato, 19 – Dirvožemis prie kuro kolonėlių, žolės kampas su šaligatviu (į kairę nuo eko dangos), 20 – Dirvožemis šalia monitoringo gręžinio Nr. 53731 (gėlynas), 21 – Dirvožemis šalia monitoringo gręžinio Nr. 53732, šalia tujų, prie išėjimo vartų, 22 – Dirvožemio ir kitų apnašų sankaupos iš plyšių tarp betono plokščių, 23 – Dirvožemio ir kitų apnašų sankaupos iš plyšių tarp betono plokščių, 24 – Dirvožemio ir kitos paviršinės apnašų sankaupos, 25 – Dirvožemio ir kitos paviršinės apnašų sankaupos, 26 – Dirvožemis prie kuro vagonų užpildymo vietos, 27 – Mazutu užterštas dirvožemis, dešinėje pusėje, tarp bėgių, šalia obelų, 28 – Dirvožemis tarp dyzelino talpų dangčių, 29 – Dirvožemis šalia vagonų užpildymo vietos (ženklas „lokomotyvo sustojimo vieta“), 30 – Dirvožemis iš pievos priešais dyzelio talpas.

Iš dirvožemio ėminių buvo išskirti 75 mielių izoliatai, nustatytos 34 mielių rūšys. Dažniausiai išskirtos mielių rūšys priklausė *Rhodotorula mucilaginosa* (20,0%), *Solicoccozyma terrea* (20,0%), *Cryptococcus saitoi*, *Rhodotorula diobovata* ir *Tausonia pullulans* (po 16,7%) bei *Aureobasidium pullulans* ir *Cystobasidium minutum* (po 13,3%) (27 pav.). Statistiškai reikšmingų mielių rūšių įvairovės skirtumų tirtuose kuro bazių dirvožemio ėminiuose nebuvo stebėta ($p>0,05$).



27 pav. Iš naftos angliavandeniliais užteršto kuro bazių dirvožemio ėminių išskirtos mielių rūšys ir jų aptinkamumo dažnis (%) (n=75)

Taip pat buvo išskirtos 2 naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšys: *Rhodotorula mucilaginosa* ir *Sporobolomyces roseus*, kurios buvo aptiktos tik Klaipėdos ir Vaidotų kuro bazėse.

3.1.5. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė Vilniaus miesto antropogenuoto dirvožemio ėminiuose

Buvo tiriamas dirvožemis (n=22) šalia judriausių Vilniaus miesto gatvių (Savanorių pr., Geležinio Vilko g.), siekiant įvertinti galimą taršos sunkiaisiais metalais ir naftos angliavandeniliais poveikį tirtų dirvožemio mielių bendrijoms. Dirvožemio ėminiai buvo imti prie pagrindinių transporto arterijų, kur dėl intensyvaus eismo ilgą laiką galėjo kauptis teršalai. Tyrimų metu buvo vykdomas mielių koncentracijos ir rūšinės sudėties nustatymas, siekiant įvertinti, kaip transporto tarša veikia dirvožemio mielių populiacijos struktūrą ir įvairovę.

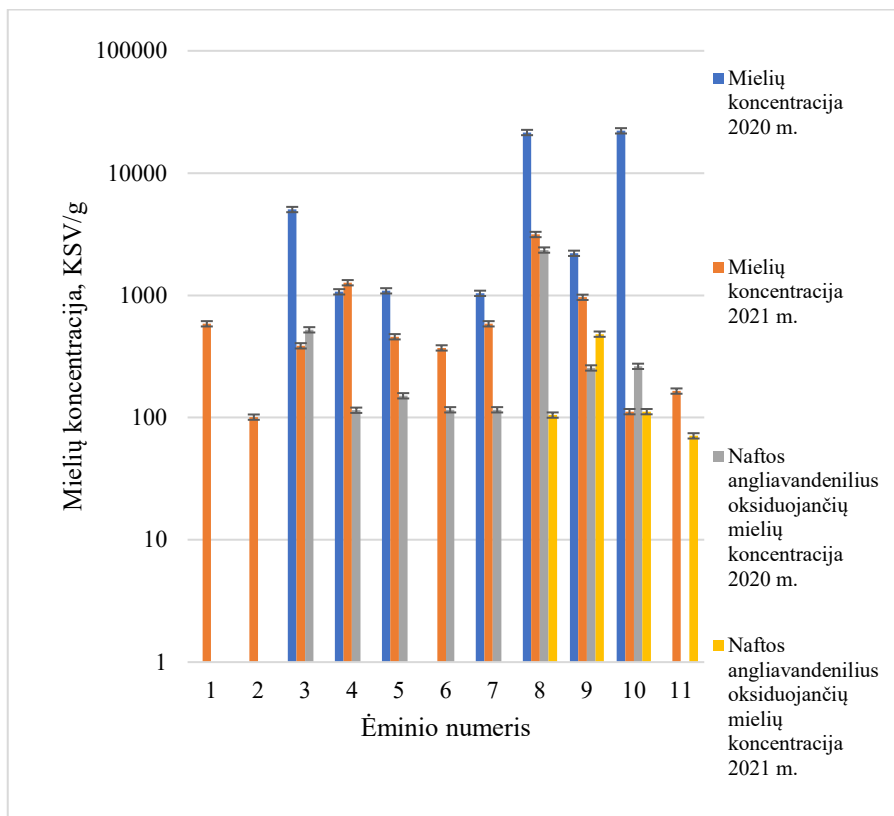
2020 m. ištirta 11 dirvožemio ėminių. Mielų buvo aptikta 63,6% ėminių, kuriuose taip pat rasta ir naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių. 2021 metais ištirta 11 dirvožemio ėminių. Mielų aptikta visuose dirvožemio ėminiuose, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių – 36,4% ėminių.

Atlikus sunkiųjų metalų (Cr, Cd, Pb, Ni, Fe, Cu, Zn) nustatymo pasirinktuose dirvožemio ėminiuose tyrimus, nei vieno iš tirtų sunkiųjų metalų kiekiai neviršijo ribinių verčių nurodytų sveikatos apsaugos ministro įsakyme Nr. V-114 (Lietuvos Respublikos Sveikatos apsaugos ministerija, 2004) (18 lentelė).

18 lentelė. Sunkiųjų metalų kiekis Vilniaus miesto dirvožemio ėminiuose 2021 m. (mg/kg) (n=4)

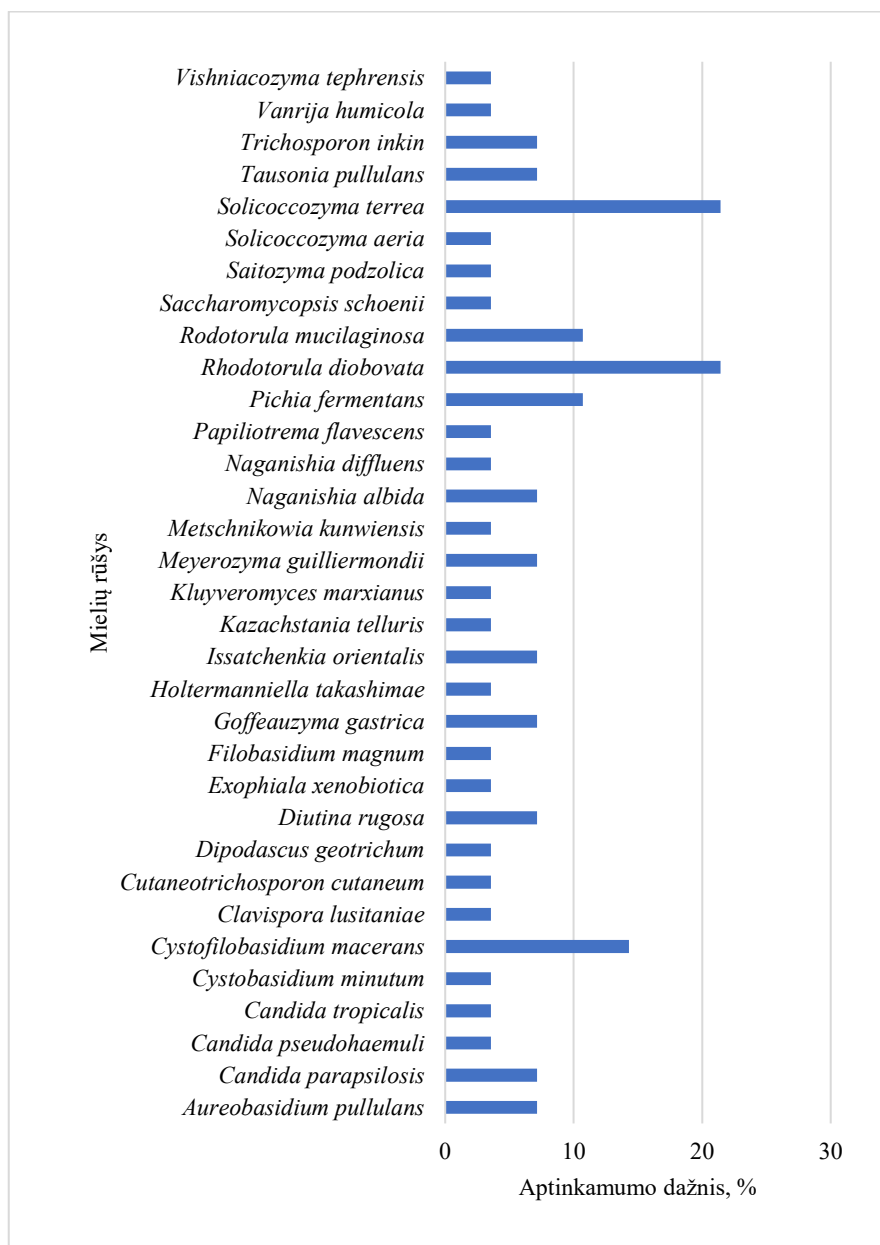
Ėminio Nr.	Chromas	Kadmis	Švinas	Nikelis	Geležis	Varis	Cinkas
1	12,8	0,12	17,70	8,95	5600,0	26,20	126,0
3	11,0	0,061	8,93	7,67	5700,0	7,33	34,2
7	9,73	0,078	13,10	5,80	5653,0	18,90	54,3
10	16,7	0,11	13,20	10,30	7839,0	21,90	109,0

2020 m. bendra mielių koncentracija vidutiniškai sudarė $3,73 \times 10^3$ KSV/g ir svyravo nuo 0,00 iki $2,22 \times 10^4$ KSV/g, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių vidutinė koncentracija – $3,43 \times 10^2$ KSV/g ir svyravo nuo 0,00 iki $2,35 \pm 0,06 \times 10^3$ KSV/g. Didžiausia bendra mielių koncentracija nustatyta ėminyje Nr. 10, o didžiausia naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija – ėminyje Nr. 8. 2021 m. bendra mielių koncentracija vidutiniškai sudarė $7,41 \times 10^2$ KSV/g ir svyravo nuo 0,00 iki $3,15 \times 10^3$ KSV/g, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių vidutinė koncentracija – $7,00 \times 10^1$ KSV/g ir svyravo nuo 0,00 iki $4,82 \times 10^2$ KSV/g. Didžiausia bendra mielių koncentracija nustatyta ėminyje Nr. 8, o didžiausia naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija – ėminyje Nr. 9 (28 pav.).



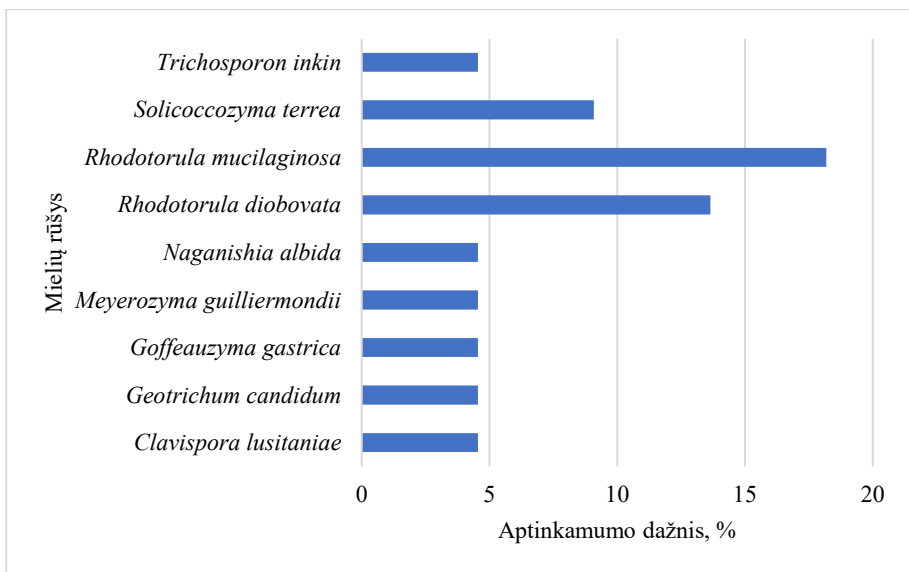
28 pav. Iš Vilniaus miesto antropogenizuoto dirvožemio ėminių (n=22) išskirtų mielių koncentracijos kitimas 2020-2021 m. (1 – Dirvožemis prie EMSI degalinės, 2 – Dirvožemis prie Pakalniškių stotelės, 3 – Dirvožemis prie Gerosios Vilties g. žiedo, 4 – Dirvožemis prie gatvių išsišakojimo, 5 – Dirvožemis prie Goštauto ir Geležinio vilko g. sankirtos, 6 – Dirvožemis prie Geležinio vilko g. tilto, 7 – Dirvožemis prie žiedo, virš Geležinio Vilko g., 8 – Dirvožemis prie Šeškinės bunkerio, 9 – Dirvožemis prie PC „Ozas“, 10 – Dirvožemis prie tilto, Ateities g., 11 – Dirvožemis prie Molėtų plento ir Mokslininkų g. sankryžos)

Iš dirvožemio buvo išskirti 59 mielių izoliatai ir nustatytos 33 mielių rūšys. Dažniausiai išskirtos mielių rūšys buvo *Solicocozyma terrea* ir *Rhodotorula diobovata* (po 21,4%), *Cystofilobasidium macerans* (14,3%), *Pichia fermentans* ir *Rhodotorula mucilaginosa* (po 10,7%) (29 pav.).



29 pav. Iš Vilniaus miesto antropogenizuoto dirvožemio ėminių išskirtos mielių rūšys ir jų aptinkamumo dažnis (n=59)

Taip pat buvo išskirta 15 naftos angliavandenilius skaidančių mielių izoliatų ir nustatytos 9 mielių rūšys. Dažniausiai išskirtos naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšys buvo *Rhodotorula diobovata* (13,6%) ir *Rhodotorula mucilaginosa* (18,2%) (30 pav., 19 lentelė).



30 pav. Iš Vilniaus miesto antropogenizuoto dirvožemio ėminių išskirtos naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšys ir jų aptinkamumo dažnis (n=15)

19 lentelė. Iš Vilniaus miesto antropogenizuoto dirvožemio ėminių išskirtos naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšys

Ėminio Nr.	Tyrimo laikotarpis (metais)	
	2020	2021
1	<i>Solicoccozyma terrea</i>	Neaptikta
2	Neaptikta	Neaptikta
3	<i>Geotrichum candidum</i>	Neaptikta
4	<i>Naganishia albida</i>	<i>Rhodotorula diobovata</i>
5	<i>Solicoccozyma terrea</i>	<i>Goffeauzyma gastrica</i>
6	<i>Trichosporon inkin</i>	Neaptikta
7	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula diobovata</i>
8	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula diobovata</i>
9	Neaptikta	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
10	Neaptikta	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
11	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>

Statistiškai reikšmingų mielių rūšių įvairovės skirtumų tirtuose Vilniaus m. antropogenizuoto dirvožemio ėminiuose nebuvo stebėta ($p > 0,05$).

3.2. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė antropogenizuotuose vandens telkiniuose

3.2.1. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė Neries upės vandens ėminiuose

Buvo tiriamas Neries upės vanduo ($n=16$), siekiant nustatyti bendrą bei naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentraciją. Bendros mielių koncentracijos nustatymas leidžia įvertinti mielių rūšių įvairovės lygį, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių nustatymas suteikia informacijos bioremediacijos potencialą.

2020 metais mielių buvo aptikta 37,5% Neries vandens ėminių. Bendra mielių koncentracija svyravo nuo $5,00 \pm 0,00$ KSV/ml iki $25,00 \pm 2,10$ KSV/ml, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija – nuo $0,21 \pm 0,01$ KSV/ml iki $0,58 \pm 0,03$ KSV/ml. 2021 metais mielių buvo aptikta visuose tirtuose vandens ėminiuose, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių neaptikta tik 12,5% ėminių. Bendra mielių koncentracija svyravo nuo $2,10 \pm 0,20$ KSV/ml iki $49,30 \pm 0,20$ KSV/ml, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija – nuo $0,06 \pm 0,01$ KSV/ml iki $2,40 \pm 0,13$ KSV/ml (20 lentelė).

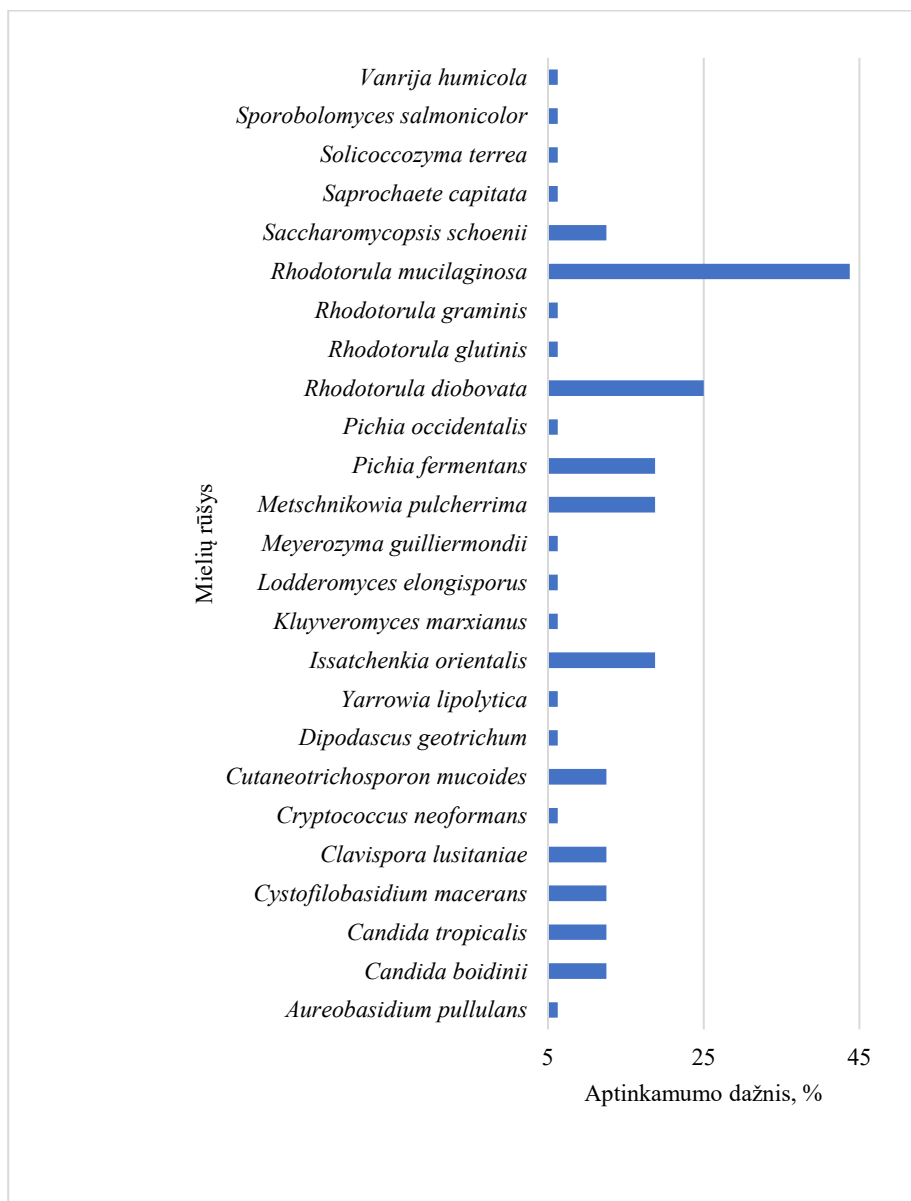
20 lentelė. Mielių koncentracijos (KSV/ml) kitimas Neries upės vandens ėminiuose 2020–2021 metais ($n=16$)

Ėminio Nr.	Mielių koncentracija 2020 m.	Naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija 2020 m.	Mielių koncentracija 2021 m.	Naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija 2021 m.
1	$5,00 \pm 0,00$	$0,21 \pm 0,01$	$48,0 \pm 3,00$	$2,40 \pm 0,13$
2	0,00	0,00	$9,00 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,01$
3	$10,00 \pm 0,10$	$0,58 \pm 0,03$	$12,7 \pm 0,70$	$0,16 \pm 0,04$
4	0,00	0,00	$7,33 \pm 0,08$	$0,48 \pm 0,00$
5	0,00	0,00	$12,7 \pm 0,00$	$0,40 \pm 0,05$
6	0,00	0,00	$2,10 \pm 0,20$	0,00
7	0,00	0,00	$49,3 \pm 0,20$	$0,42 \pm 0,12$
8	$25,00 \pm 2,10$	$0,22 \pm 0,03$	$20,70 \pm 0,80$	$0,10 \pm 0,02$

1 – Ožkinių gyvenvietė, 2 – Verkių regioninis parkas, 3 – Verkių upelis, 4 – Šilo tiltas, 5 – Geležinio Vilko tiltas, 6 – Lazdynų tiltas, 7 – Gariūnų tiltas, 8 – Neravų gyvenvietė.

Tyrimų metu buvo išskirti 46 mielių izoliatai ir nustatytos 25 mielių rūšys. Dažniausiai aptiktos mielių rūšys buvo *Rhodotorula mucilaginosa* (43,8%),

Rhodotorula diobovata (25,0%), *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima* ir *Pichia fermentans* (po 18,8%) (31 pav., 21 lentelė).



31 pav. Iš Neries upės vandens išskirtų mielių rūšys ir jų aptinkamumo dažnis (%) (n=46)

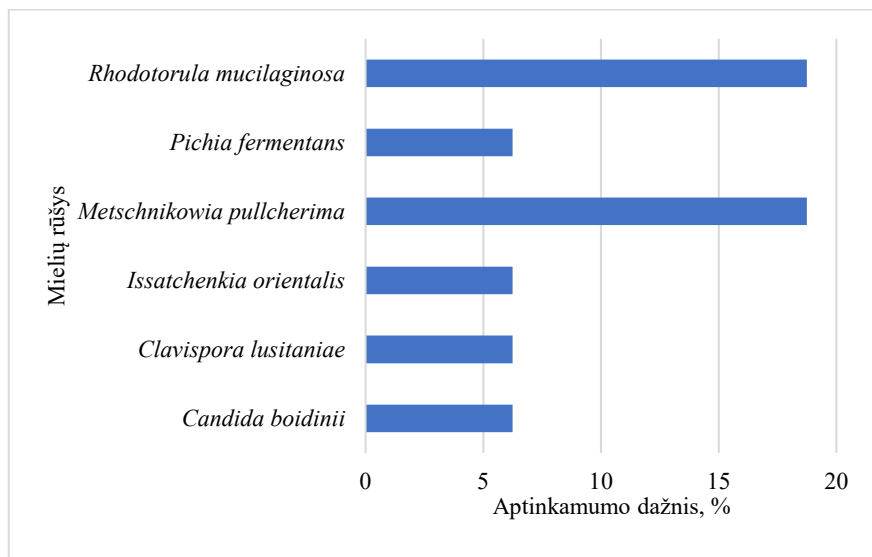
21 lentelė. Mielių rūšių paplitimas Neries upės vandens ėminiuose 2021-2021 m. (n=46)

Ėminio Nr.	Tyrimo laikotarpis (metai)
------------	----------------------------

	2020	2021
1	<i>Candida tropicalis</i> <i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Saccharomycopsis schoenii</i>	<i>Cystofilobasidium macerans</i> <i>Pichia fermentans</i>
2	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Lodderomyces elongisporus</i> <i>Rhodotorula glutinis</i>
3	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Pichia occidentalis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Rhodotorula diobovata</i>
4	<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>Dipodascus geotrichum</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Rhodotorula graminis</i>
5	<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Candida boidinii</i> <i>Cutaneotrichosporon mucoides</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
6	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Cystofilobasidium macerans</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Vanrija humicola</i>
7	<i>Candida boidinii</i> <i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Candida tropicalis</i> <i>Rhodotorula diobovata</i>
8	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Saccharomycopsis schoenii</i> <i>Saprochaete capitata</i> <i>Solicoccozyma terrea</i>	<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Sporobolomyces salmonicolor</i>

Analizuojant mielių rūšių paplitimą Neries upės vandens ėminiuose, pastebėta, kad 2020 m. paimtuose ėminiuose nustatyta didesnė rūšių įvairovė, o 2021 m. stebimi bendrijos pokyčiai – atsiranda naujų rūšių, tokių kaip *Pichia fermentans*, *Cystofilobasidium macerans*, *Kluyveromyces marxianus* ir *Cutaneotrichosporon mucoides*, o kai kurių anksčiau aptiktų rūšių nebelieka arba jų aptinkamumas sumažėja (21 lentelė).

Taip pat buvo išskirta 10 naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių izoliatų ir nustatytos 6 mielių rūšys. Dažniausiai išskirtos naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšys buvo *Metschnikowia pulcherrima* ir *Rhodotorula mucilaginosa* (po 18,8%) (32 pav.).



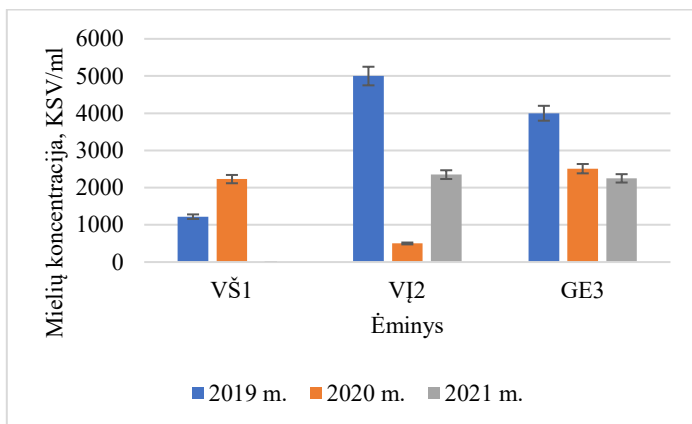
32 pav. Iš Neries upės vandens ėminių išskirtų naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšys ir jų aptinkamumo dažnis (%) (n=10)

Statistiškai reikšmingų mielių rūšių įvairovės skirtumų tirtuose Neries upės vandens ėminiuose nebuvo stebėta ($p > 0,05$).

3.2.2. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė Alytaus miesto vandens ėminiuose po padangų perdirbimo įmonės gaisro

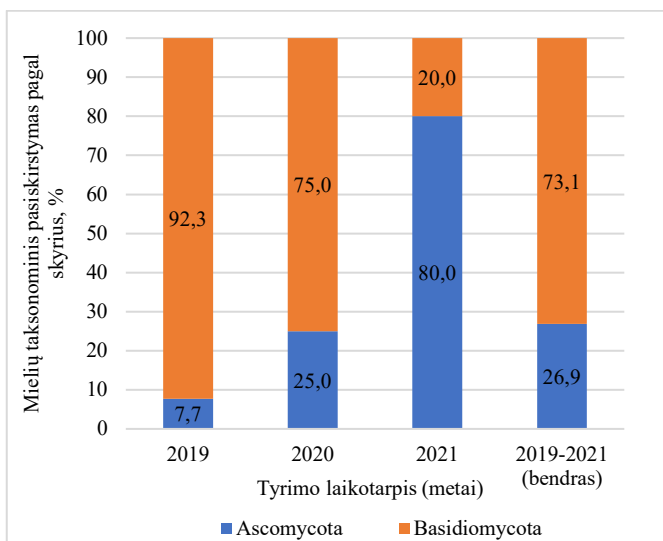
Buvo tiriamas vanduo (n=9) iš oro paėmimo šachtos, tekstilės chemikalų valymo įrenginių ir Gulbrynės ežero po padangų perdirbimo įmonės gaisro Alytuje. Iš oro paėmimo šachtos ir chemikalų valymo įrenginių buvo imami gaisro gesinimui naudoto vandens, kuris galėjo būti prisotintas įvairių teršalų, ėminiai. Šiose vietose tyrimai buvo vykdomi siekiant nustatyti bendrą mielių koncentraciją ir identifikuoti galimai taršai atsparias mielių rūšis. Tokios rūšys gali turėti biotechnologinį potencialą, nes geba išgyventi ekstremaliomis sąlygomis ir dalyvauti teršalų skaidymo procesuose. Gulbrynės ežero vanduo taip pat buvo tiriamas, nes jis buvo naudojamas gaisro gesinimui ir galėjo būti paveiktas į aplinką patekusių cheminių junginių bei degimo produktų.

Vandens ėminiuose (VŠ1, VĮ2, GE3) mielių koncentracija svyravo tarp 0,00– 10^3 KSV/g. Mielių koncentracija buvo panaši visuose tirtuose ėminiuose, išskyrus ėminį VŠ1, kuriame mielių nebuvo aptikta 2021 m. (33 pav.)



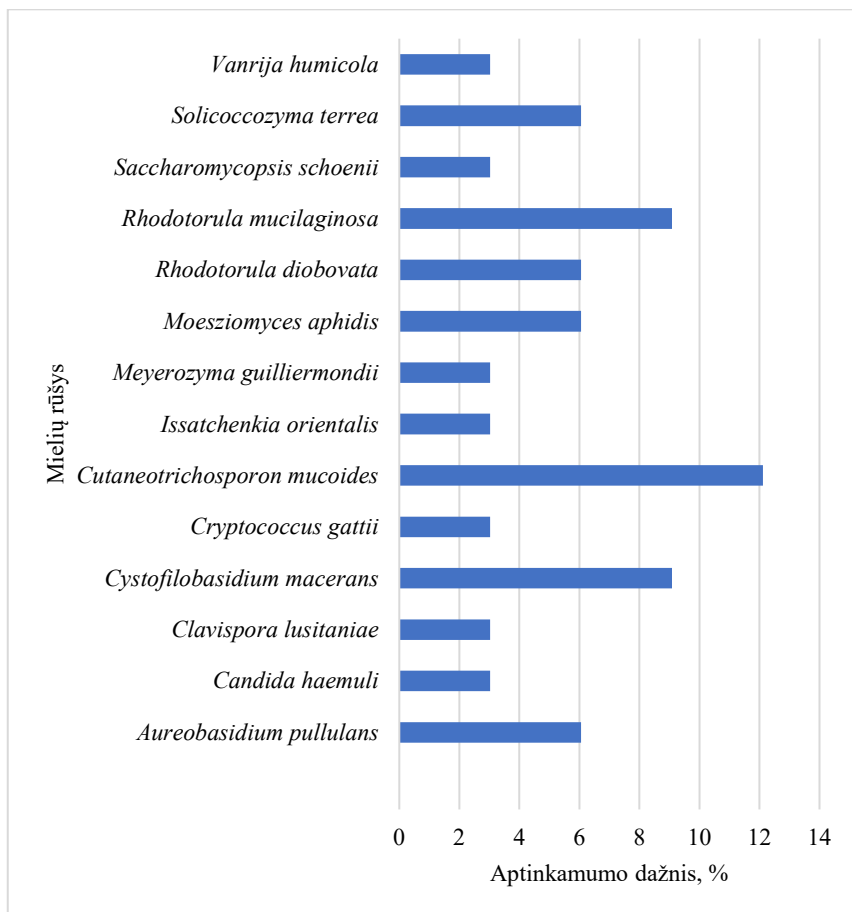
33 pav. Iš Alytaus miesto vandens ėminių po padangų perdirbimo įmonės gaisro išskirtų mielių koncentracija (KSV/ml) (n=9) (VŠ1 – oro paėmimo šachta gaisro vietoje, VĮ2 – tekstilės chemikalų valymo įrenginiai, GE3 – Gulbynės ežeras)

Iš vandens ėminių iš viso buvo išskirti 27 mielių izoliatai ir nustatyta 14 mielių rūšių. Skirtingais tyrimo laikotarpiais buvo stebėti iš vandens išskirtų mielių rūšių pasiskirstymo pagal skyrius skirtumai. 2019 ir 2020 metais didžiausią išskirtų mielių rūšių dalį sudarė *Basidiomycota* skyriaus mielės (atitinkamai 92,3% ir 75,0%), o 2021 metais - *Ascomycota* skyriaus mielės (80,0%) (34 pav.). Statistiškai reikšmingų mielių rūšių pasiskirstymo pagal skyrius pokyčių skirtingais tyrimo laikotarpiais nebuvo stebėta ($p>0,05$).



34 pav. Iš vandens ėminių po padangų perdirbimo įmonės gaisro išskirtų mielių rūšių pasiskirstymas pagal skyrius (%) (n=25)

Nagrinėjant bendrą mielių rūšių pasiskirstymą pagal skyrius visais tyrimo laikotarpiais, pastebėta, kad dauguma mielių rūšių priklausė *Basidiomycota* skyriui (73,1%).



35 pav. Iš Alytaus miesto vandens ėminių po padangų perdirbimo įmonės gaisro išskirtų mielių rūšys ir jų aptinkamumo dažnis (%) (n=27)

Nustatyta, kad didžiausią dalį išskirtų mielių rūšių sudarė *Cutaneotrichosporon mucoides* (12,12%), *Cystofilobasidium macerans* (9,09%) ir *Rhodotorula mucilaginosa* (9,09%) (35 pav., 22 lentelė).

22 lentelė. Mielių rūšių paplitimas Alytaus miesto vandens ėminiuose po padangų perdirbimo įmonės gaisro 2019-2021 m. (n=27)

Ėminio Nr.	Tyrimo laikotarpis (metai)		
	2019	2020	2021
VŠ1	<i>Cutaneorichosporon mucoides</i>	<i>Cutaneorichosporon mucoides</i>	Neaptikta
VĮ2	<i>Moesziomyces aphidis</i> <i>Vanrija humicola</i> <i>Rhodotolula diobovata</i> <i>Cutaneorichosporon mucoides</i>	<i>Cystofilobasidium macerans</i> <i>Moesziomyces aphidis</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Saccharomycopsis schoenii</i> <i>Aureobasidium pullulans</i>
GE3	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Cutaneorichosporon mucoides</i> <i>Cystofilobasidium macerans</i> <i>Cryptococcus gattii</i> <i>Solicoccozyma terrea</i> <i>Rhodotolula diobovata</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Solicoccozyma terrea</i> <i>Cystofilobasidium macerans</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Candida haemuli</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

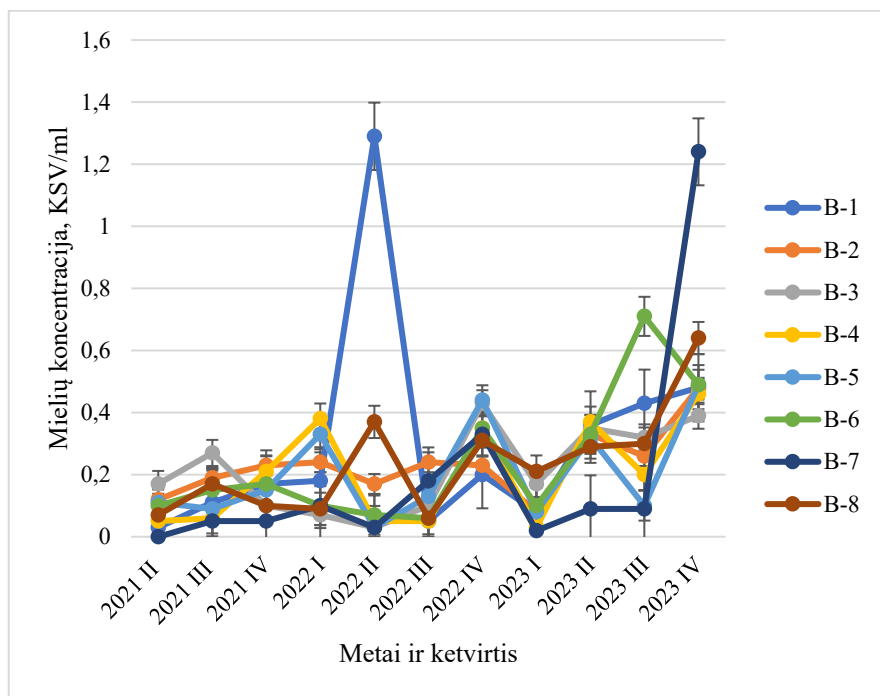
Analizuojant mielių rūšių paplitimą skirtingais tyrimo laikotarpiais pastebėta, kad 2019 m. visuose ėminiuose stebima didžiausia mielių įvairovė (12 rūšių). 2020 m. rūšių sudėtis keičiasi – mažėja įvairovė (8 rūšys), kai kurios rūšys išnyksta, atsiranda naujų. 2021 m. daugelyje ėminių rūšių dar mažiau, kai kur (VŠ1) mielės visai neaptiktos (22 lentelė).

3.2.3. Mielių paplitimas ir rūšių įvairovė Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijoje

Buvo tiriamas Baltijos jūros vanduo (n=80) aplink AB „ORLEN Lietuva“ Būtingės naftos terminalą – jūrų akvatorijoje ir Baltijos jūros kranto zonoje – pagal 2021–2025 m. terminalo poveikio aplinkos kokybei monitoringo programą. Tyrimų metu nustatyta bendra mielių koncentracija ir naftos

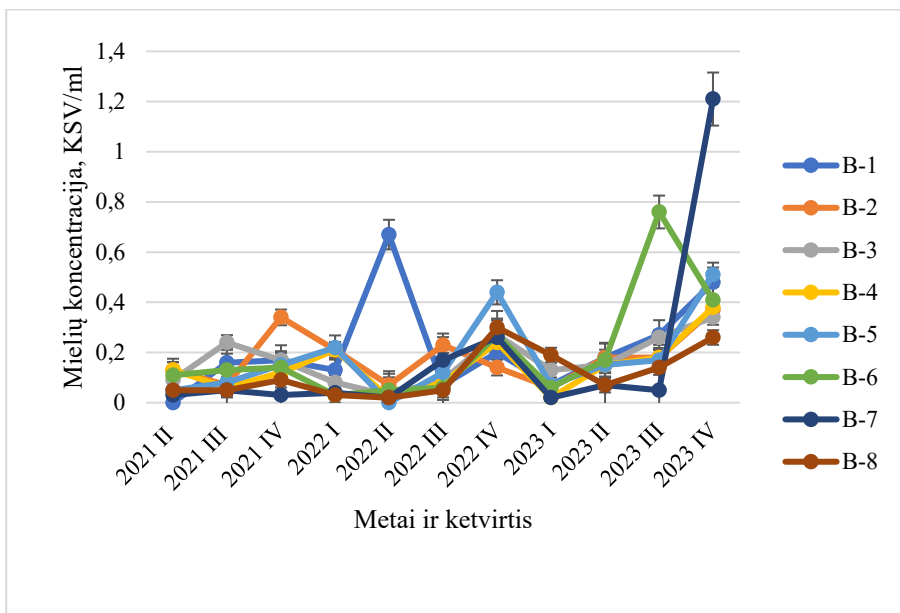
angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija, siekiant įvertinti mielių bendrijos būklę galimo naftos produktų poveikio sąlygomis.

Nustatyta, kad bendra mielių koncentracija Baltijos jūros vandens ėminiuose per visą tyrimo laikotarpį svyravo nuo 0,00 iki 1,29 KSV/ml. Didžiausia mielių koncentracija per visą tyrimo laikotarpį buvo nustatyta 2022 m. II ketvirtį ėminyje B-1 (1,29 KSV/ml) (36 pav.).



36 pav. Bendros mielių koncentracijos kitimas Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandens ėminiuose (B1–B8) 2021–2023 m. (n=80) (B1 – jūros priekrantė, Šventosios upės poveikio zona, B-2 – jūros priekrantė prie Lietuvos–Latvijos sienos, B-3 – į ŠR nuo SPM plūduri, prie Lietuvos–Latvijos sienos, ties Palangos m. nutekamųjų vandenų išleistuvu, B-4 – prie SPM plūduri, B-5 – į ŠV nuo SPM plūduri, prie Lietuvos–Latvijos sienos, B-6 – į P nuo SPM plūduri, B-7 – tanklaivių inkaravietė, B8 – foninė stotis tarp Palangos ir Būtingės)

Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandens ėminiuose taip pat buvo aptikta ir naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių. Jų koncentracija viso tyrimo laikotarpio metu svyravo nuo 0 iki 1,21 KSV/ml (37 pav.).



37 pav. Naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracijos kitimas Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandens ėminiuose (B1–B8) 2021–2023 m. (n=80) (B1 – jūros priekrantė, Šventosios upės poveikio zona, B-2 – jūros priekrantė prie Lietuvos–Latvijos sienos, B-3 – į ŠR nuo SPM plūdūro, prie Lietuvos–Latvijos sienos, ties Palangos m. nutekamųjų vandenų išleistuvu, B-4 – prie SPM plūdūro, B-5 – į ŠV nuo SPM plūdūro, prie Lietuvos–Latvijos sienos, B-6 – į P nuo SPM plūdūro, B-7 – tanklaivių inkaravietė, B-8 – foninė stotis tarp Palangos ir Būtingės)

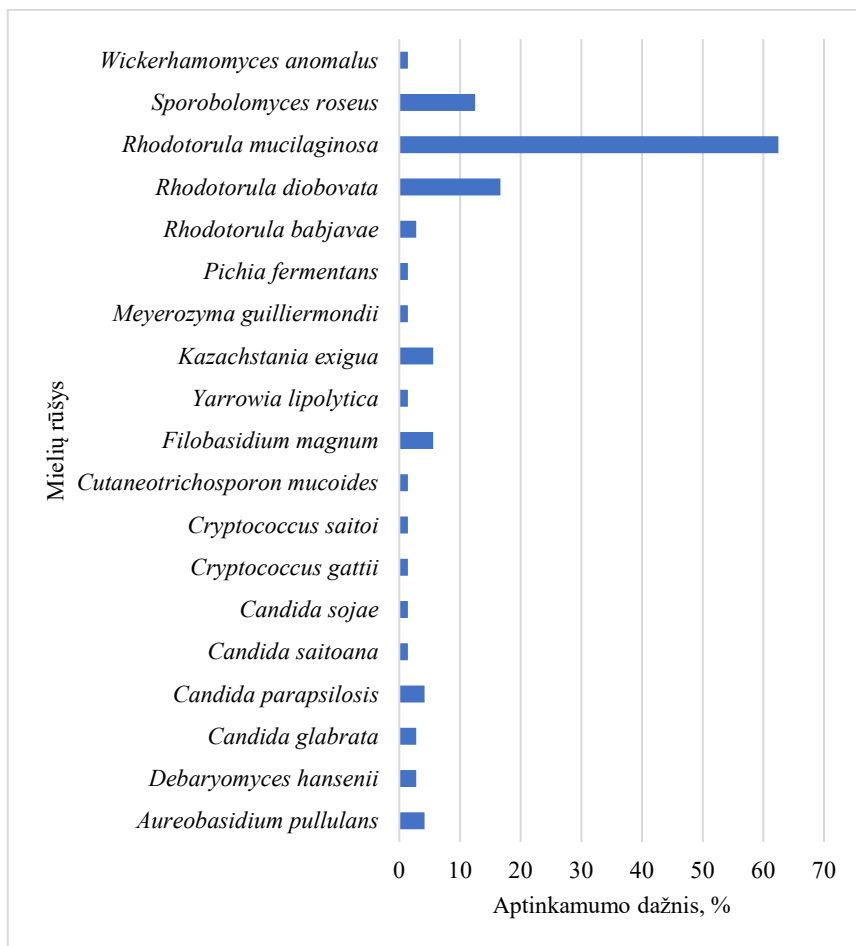
Didžiausia mielių koncentracija per visą tyrimo laikotarpį buvo nustatyta 2023 m. IV ketvirtį ėminyje B-1 (1,21 KSV/ml) (32 pav.).

Per visą tyrimo laikotarpį buvo išskirta 115 mielių izoliatų ir nustatytos 36 mielių rūšys. Dažniausiai nustatyta mielių rūšis buvo *Rhodotorula mucilaginosa* (54,2%), o antra pagal dažnumą – *Rhodotorula diobovata* (12,5%) (38 pav.).



38 pav. Iš Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandens ėminių išskirtos mielių rūšys ir jų aptinkamumo dažnis (%) (n=115)

Taip pat buvo išskirti 95 naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių izoliatai ir nustatytos 19 mielių rūšių (39 pav.).



39 pav. Iš Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandens ėminių išskirtos naftos angliavandenilius oksiduojančios mielių rūšys ir jų aptinkamumo dažnis (%) (n=95)

Dažniausiai aptiktos naftos angliavandenilius degraduojančių mielių rūšys buvo *Rhodotorula mucilaginosa* (62,50%), *Rhodotorula diobovata* (16,67%) ir *Sporobolomyces roseus* (12,50%) (39 pav.).

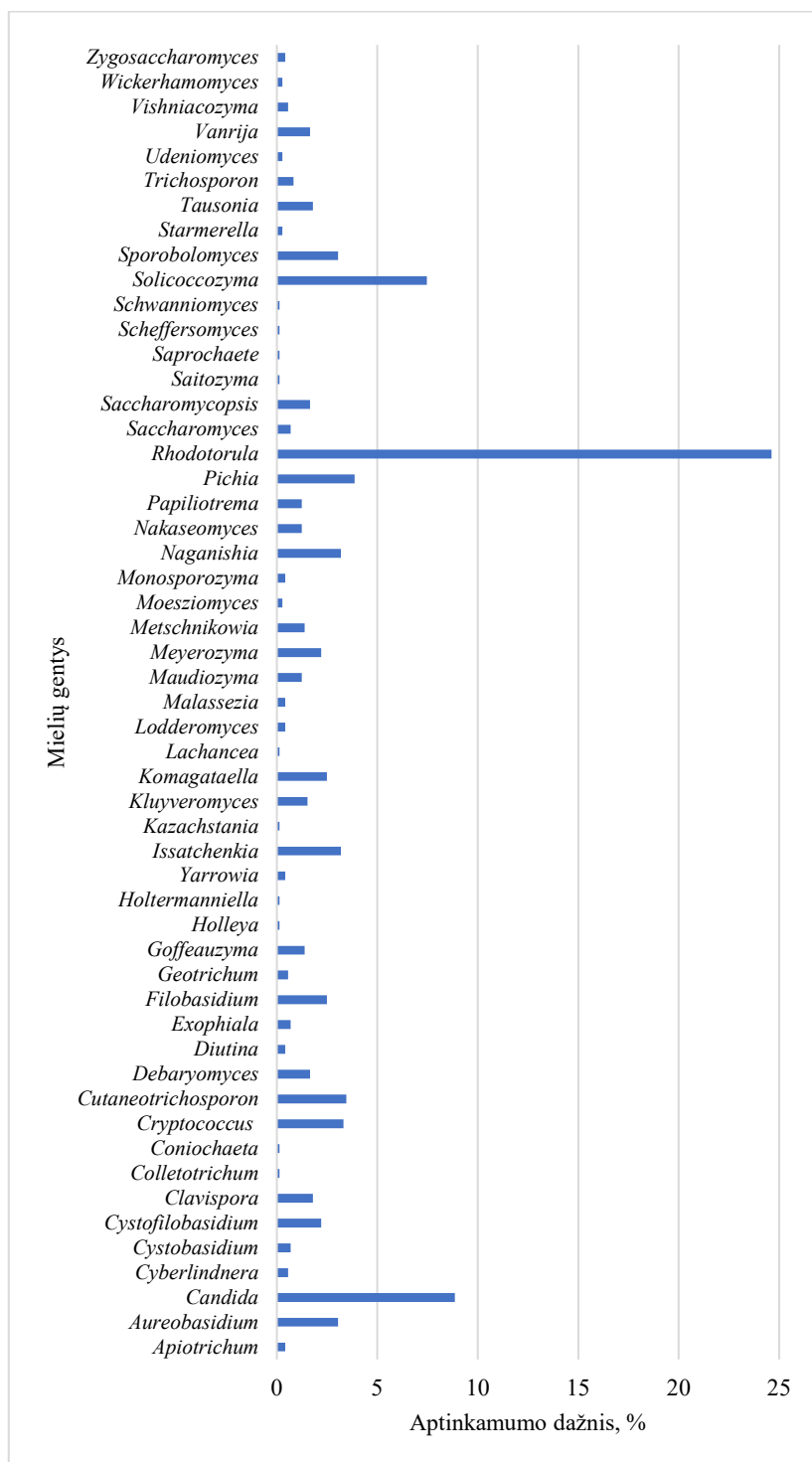
Statistiškai reikšmingų mielių rūšių įvairovės skirtumų tirtuose Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandens ėminiuose nebuvo stebėta ($p > 0,05$).

3.3. Iš įvairių antropogenuotų substratų išskirtų mielių taksonominė analizė

Apibendrinant visų tirtų antropogenuotų substratų (dirvožemio ir vandens ėminių (n=258)) tyrimų duomenis, galima teigti, kad šiose vietovėse nustatyta didelė mielių rūšinės sudėties įvairovė, atspindinti tiek natūralias aplinkos sąlygas, tiek galimą antropogeninės veiklos poveikį. Tyrimai apėmė įvairius taršos šaltinius – nuo pramoninės taršos (chromo tarša Klaipėdoje, naftos angliavandeniliai kuro bazių teritorijose) ir transporto poveikio (judriausios Vilniaus miesto gatvės) iki avarinių situacijų, tokių kaip gaisras Alytuje ir jų galimai sukelta antrinė tarša vandens bei dirvožemio aplinkoje.

Nustatyta, kad *Ascomycota* skyriaus mielės sudarė 40,4% visų išskirtų mielių rūšių, o *Basidiomycota* skyriaus mielės – 59,6% (n=109).

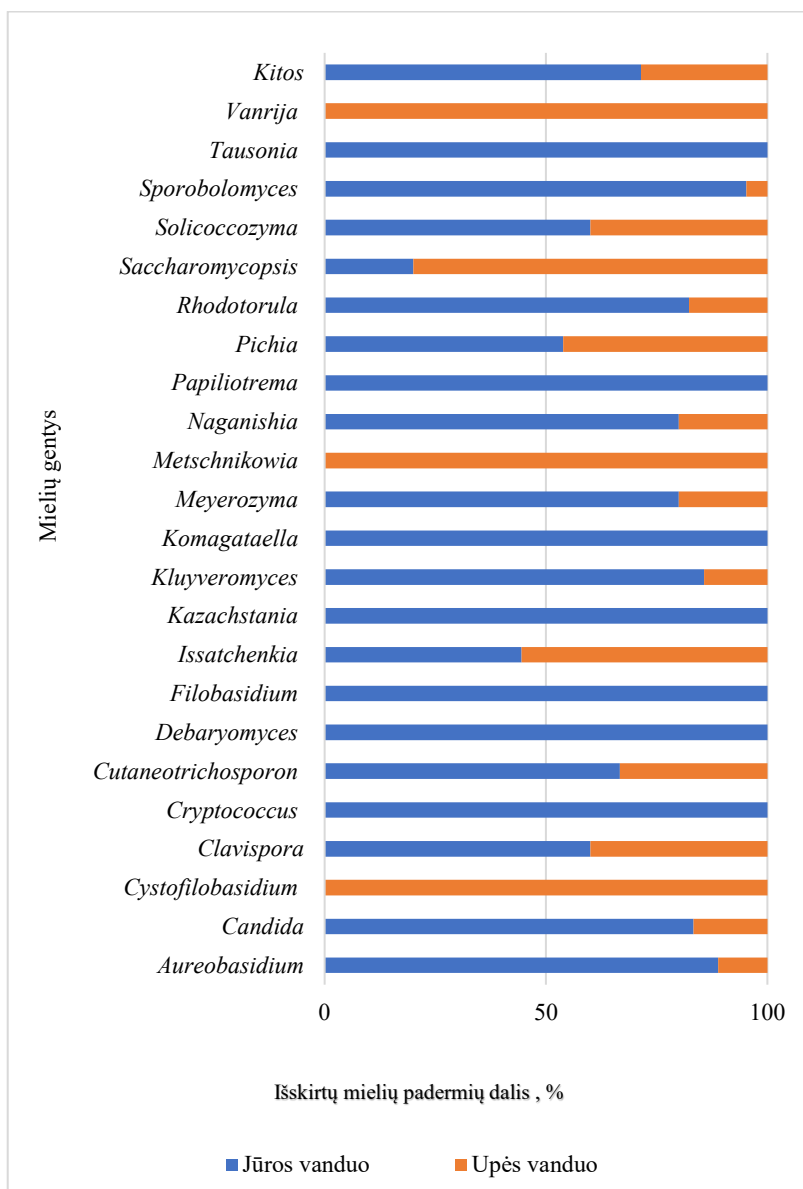
Skaitlingiausios mielių klasės buvo *Saccharomycetes* (36,4%), *Microbotryomycetes* (27,7%) ir *Tremellomycetes* (30,6%). Daugiausia buvo išskirta *Saccharomycetales* (36,4%), *Sporidiobolales* (27,7%) ir *Filobasidiales* (14,5%) eilėms priklausančių mielių. Didžiausia mielių rūšių dalis priklausė *Saccharomycetaceae* (17,9%), *Sporidiobolaceae* (27,7%), *Filobasidiaceae* (7,1%), *Piskurozymaceae* (7,5%) ir *Trichosporonaceae* (6,4%) mielių šeimoms. Daugiausia buvo išskirta *Rhodotorula* (24,6%), *Candida* (8,9%) ir *Solicoccozyma* (7,5%) gentims priklausančių mielių rūšių (40 pav.).



40 pav. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių genčių aptinkamumo dažnis (%) (n=723)

Nagrinėjant mielių rūšinę sudėtį nustatyta, kad daugiausia buvo išskirta *Rhodotorula mucilaginosa* (19,4%), *Solicoccozyma terrea* (6,2%), *Aureobasidium pullulans* (3,0%), *Issatchenkia orientalis* (3,2%), *Cutaneotrichosporon mucoides* (2,8%), *Sporobolomyces roseus* (2,8%), *Pichia fermentans* (2,6%), *Filobasidium magnum* (2,5%), *Komagataella pastoris* (2,5%), *Candida parapsilosis* (2,4%), *Meyerozyma guilliermondii* (2,2%), *Cystofilobasidium macerans* (2,2%), *Cryptococcus gattii* (2,1%) rūšių mielių (2 priedas).

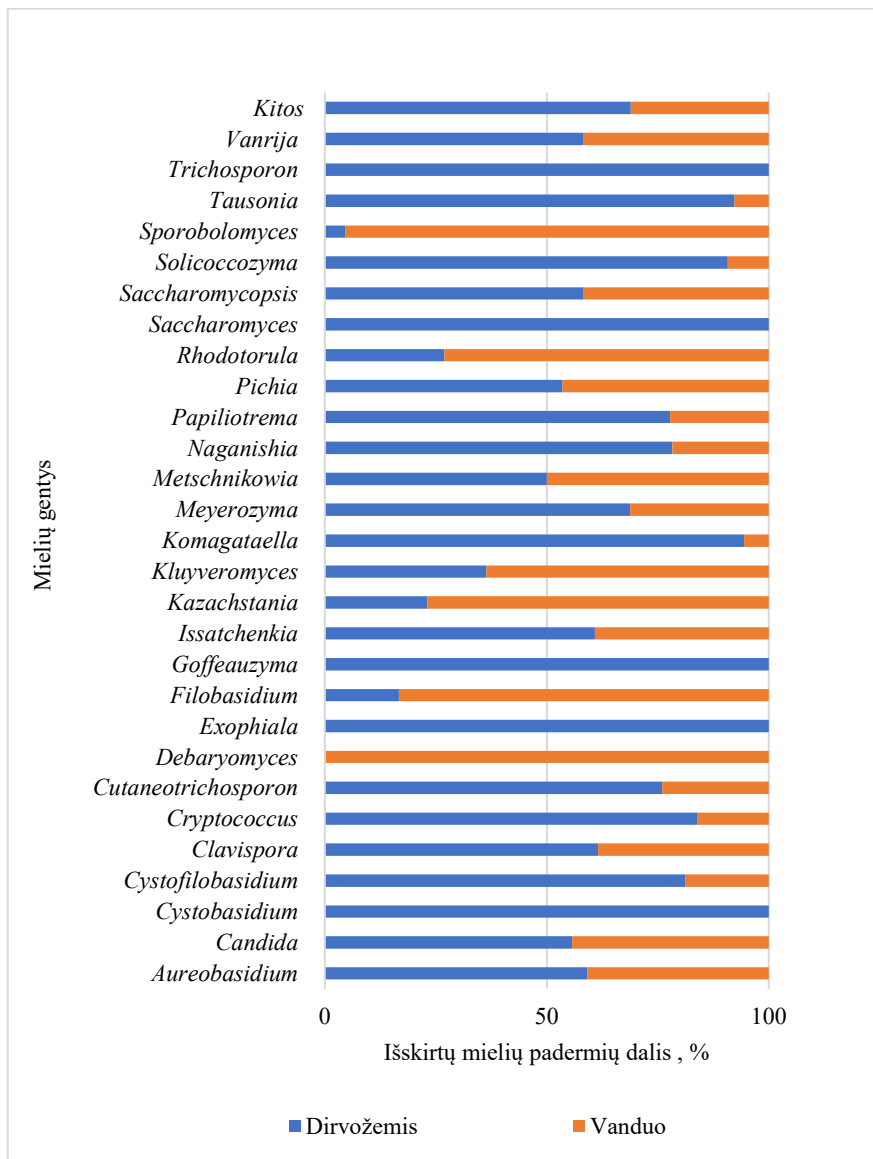
Nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp mielių paplitimo jūros ir upės vandenyje ($p < 0,001$) bei stiprus buveinės tipo ir genčių paplitimo ryšys (Cramér's $V = 0,585$). Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandenyje aptikta daugiausia *Filobasidium*, *Debaryomyces* ir *Kazachstania* (100%), *Sporobolomyces* (95,2%), *Aureobasidium* (88,9%), *Rhodotorula* (82,3%), *Candida* (80,7%), *Pichia* (53,9%) gentims priklausančių mielių rūšių. Neries upės vandenyje aptikta daugiausia *Cystofilobasidium* (100%), *Metschnikowia* (100%), *Saccharomycopsis* (80,0%), *Issatchenkia* (55,6%) gentims priskiriamų mielių rūšių (41 pav.).



41 pav. Mielių genčių paplitimas jūros ir upės vandenyje (%) ($\chi^2(46) = 221,34$; $p < 0,001$; Cramér's $V = 0,585$) ($n = 105$)

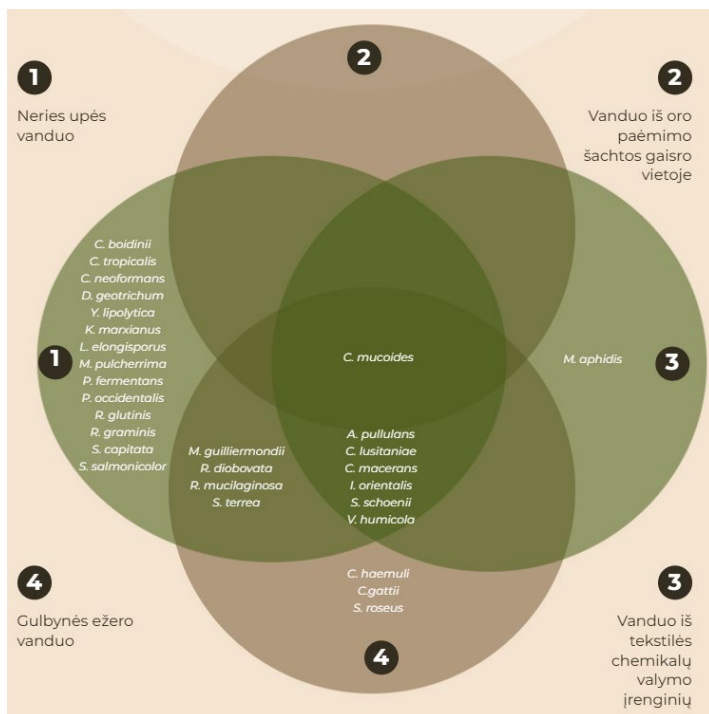
Stebėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp mielių paplitimo dirvožemyje ir vandenyje ($p < 0,001$) bei nustatytas stiprus substrato tipo (dirvožemio, vandens) ir genčių paplitimo ryšys (Cramér's $V = 0,545$). Dirvožemyje buvo nustatyta daugiausia *Goffeauzyma* (100%), *Trichosporon* (100%), *Komagataella* (94,4%), *Tausonia* (92,3%), *Solicoccozyma* (90,7%), *Cryptococcus* (84,0%), *Cystofilobasidium* (81,3%), *Naganishia* (78,3%),

Cutaneotrichosporon (76,0%), *Meyerozyma* (68,8%), *Issatchenkia* (60,9%), *Aureobasidium* (59,1%), *Vanrija* (58,3%) ir *Candida* (55,7%) gentims priklausančių mielių rūšių (42 pav.).



42 pav. Mielių genčių paplitimas vandens ir dirvožemio ėminiuose (%) ($\chi^2(28) = 213,31$; $p < 0,001$; Cramér's $V = 0,545$) ($n = 723$)

Vandenyje daugiausia aptikta *Debaryomyces* (100%), *Sporobolomyces* (95,5%), *Filobasidium* (83,3%), *Kazachstania* (76,9%) ir *Rhodotorula* (73,0%) ir gentims priskiriamų mielių rūšių (43 pav.).



43 pav. Mielų rūšių paplitimo gėlo vandens telkiniuose Venn diagrama

Venn diagrama (43 pav.) atskleidžia mielių rūšių pasiskirstymą skirtinguose vandens šaltiniuose. Didžiausia rūšių įvairovė nustatyta Neris upės vandenyje, kuriame aptiktas didžiausias rūšių skaičius (25 rūšys), o mažiausia – tekstilės chemikalų valymo įrenginių vandenyje (8 rūšys), kur dominavo pavienės, specifinėms sąlygoms prisitaikiusios rūšys. Visiems tirtų vietų ėminiams bendra buvo tik viena rūšis – *Cutaneotrichosporon mucoides*, rodanti jos gebėjimą prisitaikyti prie skirtingų aplinkos sąlygų.

3.4. Iš įvairių antropogenuotų substratų išskirtų mielių morfologinių savybių tyrimų rezultatai

Mielų, išskirtų iš antropogenuotų substratų, morfologinių savybių nustatymas yra svarbus siekiant įvertinti jų taksonominę įvairovę, prisitaikymo prie aplinkos sąlygų ypatumus ir galimą ekologinį vaidmenį. Morfologinė analizė, apimanti kolonijų išvaizdos, ląstelių formos ir dydžio stebėjimus, padeda atskirti skirtingas rūšis, kurios gali būti susijusios su specifiniais teršalų tipais ar aplinkos veiksniais. Be to, šie duomenys sudaro pagrindą tolesniems biocheminiams ir genetiniams tyrimams, leidžiantiems įvertinti mielių biotechnologinį potencialą bioremediacijos ar aplinkos mikrobiologijos kontekste.

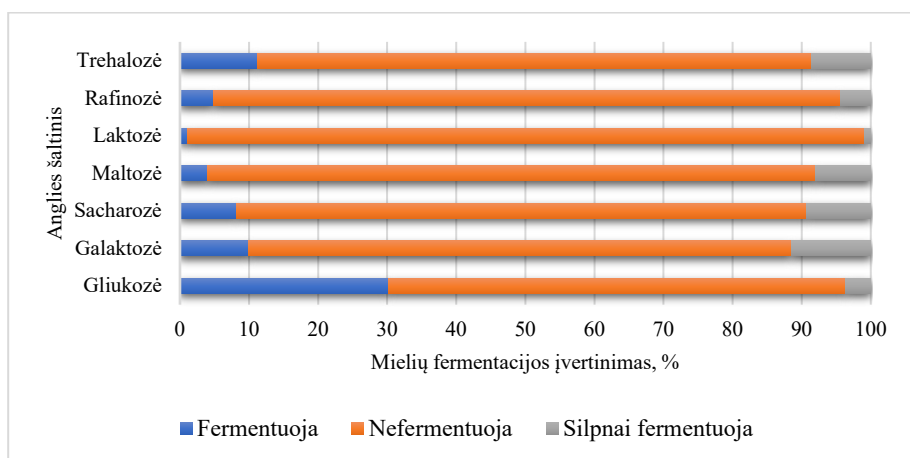
Atliktas iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių makromorfologinis ir mikromorfologinis įvertinimas. Dažniausiai išskiriamų mielių morfologiniai savitumai pateikiami 3 priede.

3.5. Iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių fiziologinių ir biocheminių savybių tyrimų rezultatai

3.5.1. Iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių vykdoma angliavandenių fermentacija

Angliavandenių fermentacijos tyrimai buvo atliekami siekiant įvertinti mielių, išskirtų iš antropogenizuotų substratų, metabolinį aktyvumą ir gebėjimą panaudoti įvairius angliavandenius kaip energijos šaltinį. Šių tyrimų metu nustatoma, kokius angliavandenius (pvz., gliukozę, sacharozę, maltozę, laktozę ir kt.) mielės geba fermentuoti, išskirdamos dujas. Gauti rezultatai padeda atskirti skirtingas mielių rūšis, įvertinti jų fiziologinius skirtumus ir prisitaikymo strategijas aplinkos sąlygoms. Be to, angliavandenių fermentacijos gebėjimai gali būti siejami su mielių potencialu biotechnologiniuose procesuose, įskaitant organinių junginių skaidymą užterštuose substratuose.

Anglies šaltinių fermentacijos tyrimų rezultatai parodė, jog daugiausia buvo išskirta mielių rūšių, kurios nefermentavo nei vieno tirto angliavandenio. Dažniausiai fermentuojamas anglies šaltinis buvo gliukozė (30,15%), o rečiausiai – laktozė (1,10%) (*Cystobasidium minutum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*) (44 pav.).



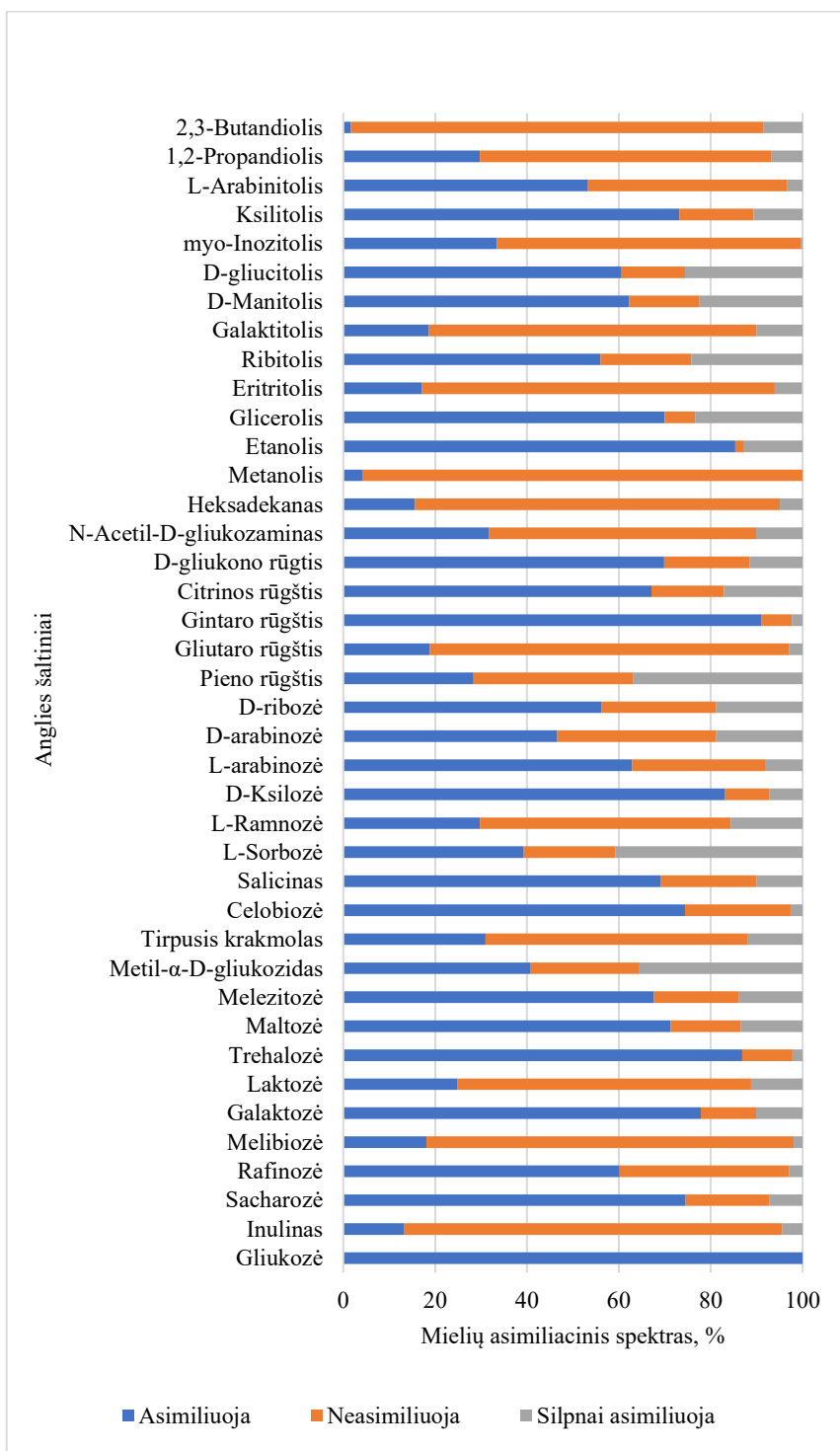
44 pav. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių vykdomos angliavandenių fermentacijos įvertinimas (%) (n=723)

Nustatyta, kad nei vieno iš angliavandenių nefermentavo *Apiotrichum*, *Aureobasidium*, *Colletotrichum*, *Coniochaeta*, *Cryptococcus*, *Cutaneotrichosporon*, *Cyberlindnera*, *Cystofilobasidium*, *Diutina*, *Exophiala*, *Filobasidium*, *Goffeauzyma*, *Holtermanniella*, *Malassezia*, *Moesziomyces*, *Naganishia*, *Papiliotrema*, *Rhodotorula*, *Saccharomycopsis*, *Saitozyma*, *Solicoccozyma*, *Sporobolomyces*, *Tausonia*, *Trichosporon*, *Udeniomyces*, *Vanrija*, *Yarrowia* genčių bei *Candida nemodendra*, *Candida palmioleophila* bei *Candida saitoana* rūšių mielės. Tik gliukozę fermentavo *Candida boidinii*, *Candida castellii*, *Candida norvegica*, *Kazachstania telluris*, *Metschnikowia kunwiensis*, *Pichia fermentans*, *Pichia occidentalis* rūšių ir *Vishniacozyma* genties mielės.

3.5.2. Iš įvairių antropogenuotų substratų išskirtų mielių vykdoma angliavandenių ir kitų anglies šaltinių asimiliacija

Angliavandenių ir kitų anglies šaltinių asimiliacijos tyrimai buvo atliekami siekiant įvertinti mielių, išskirtų iš antropogenuotų substratų, metabolinį plastiškumą ir gebėjimą prisitaikyti prie skirtingų aplinkos sąlygų. Šių tyrimų metu nustatyta, kokius organinius junginius (monosacharidus, disacharidus, alkoholius, organines rūgštis ar kitus anglies šaltinius) mielės geba panaudoti augimui ir energijos gamybai. Gauti asimiliacijos tyrimų rezultatai leidžia tiksliau identifikuoti mielių rūšis bei įvertinti jų ekologines nišas ir potencialų vaidmenį teršalų skaidymo procesuose. Be to, šie duomenys svarbūs vertinant mielių biotechnologinį potencialą pramoniniuose ar bioremediaciniuose procesuose, kuriuose svarbus gebėjimas efektyviai panaudoti įvairius anglies šaltinius.

Įvertintas mielių gebėjimas asimiliuoti įvairius anglies šaltinius ir nustatyta, kad visos mielės naudojo gliukozę kaip vienintelį anglies šaltinį o rečiausiai naudojamas anglies šaltinis buvo metanolis (4,15%) (45 pav.).



45 pav. Iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių anglies šaltinių asimiliacinis spektras (%) (n=723)

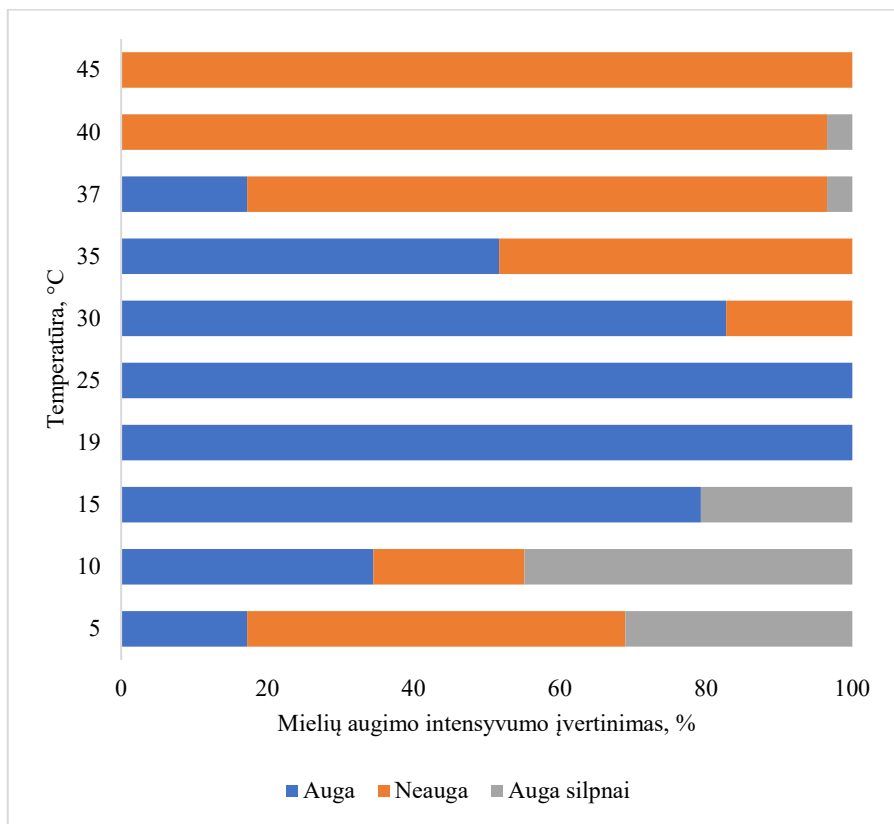
Nustatyta, kad plačiausiu asimiliaciniu spektru pasižymėjo *Aureobasidium pullulans* ir *Cutaneotrichosporon mucoides* (asimiliavo 85% tirtų anglies šaltinių), *Exophiala xenobiotica* (82,5%) ir *Vanrija humicola* (82,5%). Siauriausiu amiliaciniu spektru pasižymėjo *Candida glabrata* (5% anglies šaltinių), *Saccharomycopsis schoenii* (12,5%), *Cryptococcus gattii* (15%), *Saccharomyces cerevisiae* (15%), *Kazachstania exigua* (17,5%), *Pichia fermentans* (20%) ir *Geotrichum candidum* (22,5%).

Tirtų mielių gebėjimo asimiliuoti įvairius anglies šaltinius analizė atskleidė platų, tačiau selektyvų jų metabolinį profilį. Dauguma izoliatų aktyviausiai naudojo heksozės pagrindu sudarytus junginius, tokius kaip gliukozė, sacharozė, maltozė ir trehalozė, kurie sudaro pagrindinį energijos šaltinį daugeliui mielių rūšių. Rečiau stebėta disacharidų (pvz., galaktozės, rafinozės, melibiozės) bei alkoholių (pvz., manitolio, ksilitolio, glicerolio) asimiliacija, rodanti tiriamų mielių gebėjimą prisitaikyti prie įvairių organinių junginių, esančių aplinkoje. Tuo tarpu organinių rūgščių (pvz., citrinos rūgšties, D-gliukono rūgšties, pieno rūgšties), aminų ir alkanų asimiliacija buvo silpna arba visai nevyko, kas leidžia manyti, kad šie junginiai nėra pagrindiniai tirtų mielių metabolizmo substratai. Šie rezultatai rodo, kad antropogenizuotuose substratuose aptiktos mielės geba naudoti įvairius anglies šaltinius, o kai kurios jų pasižymi metaboliniu lankstumu, būdingu aplinkos sąlygoms atsparioms rūšims. Tai leidžia teigti, kad dalis šių mielių gali atlikti svarbų vaidmenį organinių junginių skaidymo ir bioremediacijos procesuose taršos paveiktoje aplinkoje.

3.5.3. Aplinkos sąlygų įtaka iš įvairių antropogenizuotų substratų išskirtų mielių augimui

Mielių, išskirtų iš antropogenizuotų substratų, augimo įvairiose temperatūrose ir pH tyrimai buvo atlikti siekiant nustatyti jų fiziologinį prisitaikymą bei aplinkos tolerancijos ribas. Šių tyrimų tikslas – įvertinti, kaip tirtos mielės geba augti esant kintančioms fizinėms ir cheminėms sąlygoms, būdingoms taršos paveiktoms teritorijoms, kur pH ir temperatūra dažnai svyruoja dėl pramoninės veiklos ar teršalų poveikio.

Mielių gebėjimo augti esant skirtingai aplinkos temperatūrai tyrimų rezultatai parodė, jog didžiausia mielių dalis gebėjo augti esant 19,0°C ir 25,0°C temperatūrai, tačiau nei viena mielių rūšis neaugo 45,0°C temperatūroje (46 pav., 23 lentelė).



46 pav. Mielių gebėjimo augti esant skirtingai aplinkos temperatūrai įvertinimas (%) (n=723)

Tiriant mielių gebėjimą augti esant skirtingai aplinkos temperatūrai (skaičiuota procentais nuo n=723), buvo nustatyta, kad esant 40,0°C temperatūrai augo (silpnai) tik *Cutaneotrichosporon mucoides* mielių rūšies padermės, išskirtos iš dirvožemio Alytaus raj. ir Lietuvos – Baltarusijos pasienyje. Esant iki 25,0° temperatūrai geriausiai augo *Goffeauzyma gastrica* ir *Tausonia pullulans*, išskirtos iš Klapėdos miesto dirvožemio, *Cystofilobasidium macerans* ir *Tausonia pullulans*, išskirtos iš Vilniaus miesto dirvožemio bei *Sporobolomyces roseus*, iškirta iš Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandens. Taip pat pastebėta, kad visos mielių rūšys, nepriklausomai nuo substrato, iš kurio buvo išskirtos, gerai augo esant 19,0 °C aplinkos temperatūrai, tačiau mažėjant temperatūrai, mielių augimas buvo lėtesnis (23 lentelė).

23 lentelė. Dažniausiai iš įvairių substratų išskirtų mielių rūšių gebėjimas augti esant skirtingai aplinkos temperatūrai

Mielių rūšys	Substratas	Temperatūra, °C									
		5	10	15	19	25	30	35	37	40	45
<i>C. tropicalis</i>	Dirvožemis, Alytaus raj.	-	±	±	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. mucoides</i>		-	-	±	+	+	+	+	+	±	-
<i>I. orientalis</i>		-	-	±	+	+	+	-	-	-	-
<i>K. pastoris</i>		-	-	±	+	+	+	+	±	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>		±	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. terreus</i>		-	±	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>G. gastrica</i>	Dirvožemis, Klaipėdos m.	-	±	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>N. diffluens</i>		±	±	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>		±	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. terreus</i>		-	±	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>T. pullulans</i>		-	±	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>A. pullulans</i>	Dirvožemis, Vilniaus m.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. minutum</i>		-	±	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. macerans</i>		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. saitoi</i>		-	±	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. fermentans</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>R. diobovata</i>		±	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>		±	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. terreus</i>		-	±	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>T. pullulans</i>		-	±	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. gattii</i>	Dirvožemis, LT – BY pasienis	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. mucoides</i>		-	-	±	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. fermentans</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>V. humicola</i>		-	±	+	+	+	+	±	-	-	-
<i>I. ientalis</i>	Neries upės vanduo	-	-	±	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. fermentans</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>R. diobovata</i>		±	±	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>		±	±	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>R. diobovata</i>	Baltijos jūros vanduo	±	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>		±	±	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. roseus</i>		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

(+) – augimas yra, (±) – silpnas augimas, (-) – augimo nėra.

Vertinant mielių gebėjimo augti, esant skirtingam terpės pH, rezultatus, pastebėta, jog mielės geriausiai augo esant pH 4,0–7,0. Atspariausios rūgštiniam pH=3,0 ir šarminiam pH=8,0 buvo visos *A. pullulans*, *C. tropicalis* ir *K. pastoris* rūšių padermės, nepriklausomai nuo jų išskyrimo vietos. Esant pH 3,0 augo visos *I. orientalis* ir *P. fermentans* padermės, o esant pH 8,0 - visos *C. mucoides*, *N. diffluens* ir *P. fermentans* padermės (24 lentelė). Gauti rezultatai parodo, kad mielių augimo diapazonas yra plačiose pH ribose, esant mielės, augusios esant pH 3,0 ir pH 8,0, galėtų būti laikomis ekstremotolerantinėmis.

24 lentelė. Dažniausiai iš įvairių substratų išskirtų mielių rūšių gebėjimas augti esant skirtingam terpės pH

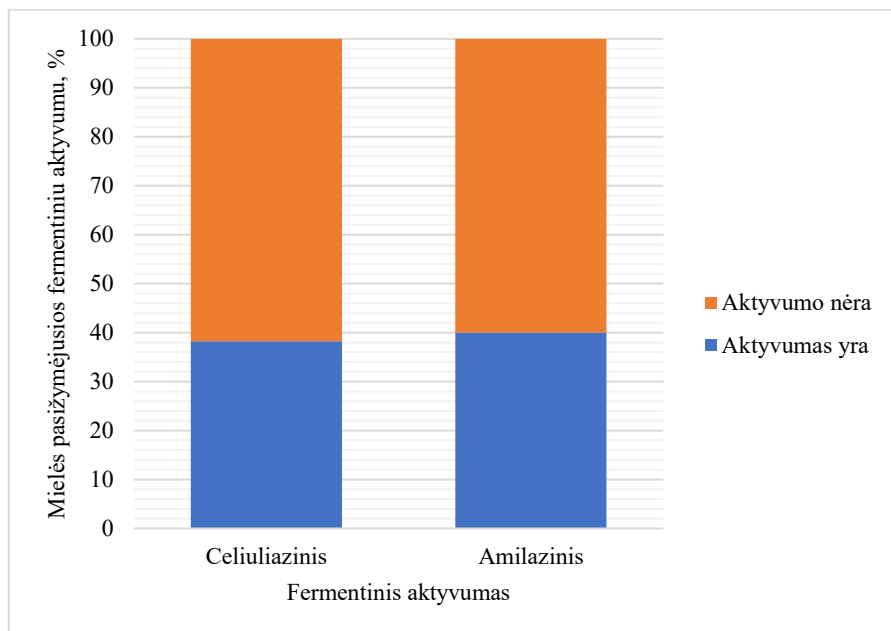
Mielių rūšys	Substratas, iš kurio buvo išskirta mielių rūšis	pH reikšmės					
		3	4	5	6	7	8
<i>Candida tropicalis</i>	Dirvožemis, Alytaus raj.	+	+	+	+	+	+
<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Issatchenkia orientalis</i>		+	+	+	+	+	-
<i>Komagataella pastoris</i>		+	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Solicoccozyma terrea</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Goffeauzyma gastrica</i>	Dirvožemis, Klaipėdos m.	-	+	+	+	+	-
<i>Naganishia diffluens</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Solicoccozyma terrea</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Tausonia pullulans</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dirvožemis, Vilniaus m.	+	+	+	+	+	+
<i>Cystobasidium minutum</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Cystofilobasidium macerans</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Cryptococcus saitoi</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Pichia fermentans</i>		+	+	+	+	+	-
<i>Rhodotorula diobovata</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Solicoccozyma terrea</i>		-	+	+	+	+	-

Mielių rūšys	Substratas, iš kurio buvo išskirta mielių rūšis	pH reikšmės					
		3	4	5	6	7	8
<i>Tausonia pullulans</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Cryptococcus gattii</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i>	Dirvožemis, LT – BY pasienis	-	+	+	+	+	-
<i>Pichia fermentans</i>		+	+	+	+	+	-
<i>Vanrija humicola</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Issatchenkia orientalis</i>		+	+	+	+	+	-
<i>Pichia fermentans</i>	Neries upės vanduo	+	+	+	+	+	-
<i>Rhodotorula diobovata</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Rhodotorula diobovata</i>		-	+	+	+	+	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Baltijos jūros vanduo	-	+	+	+	+	-
<i>Sporobolomyces roseus</i>		-	+	+	+	+	-

(+) – augimas yra, (-) – augimo nėra.

3.5.4. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių biocheminių savybių kokybinis įvertinimas

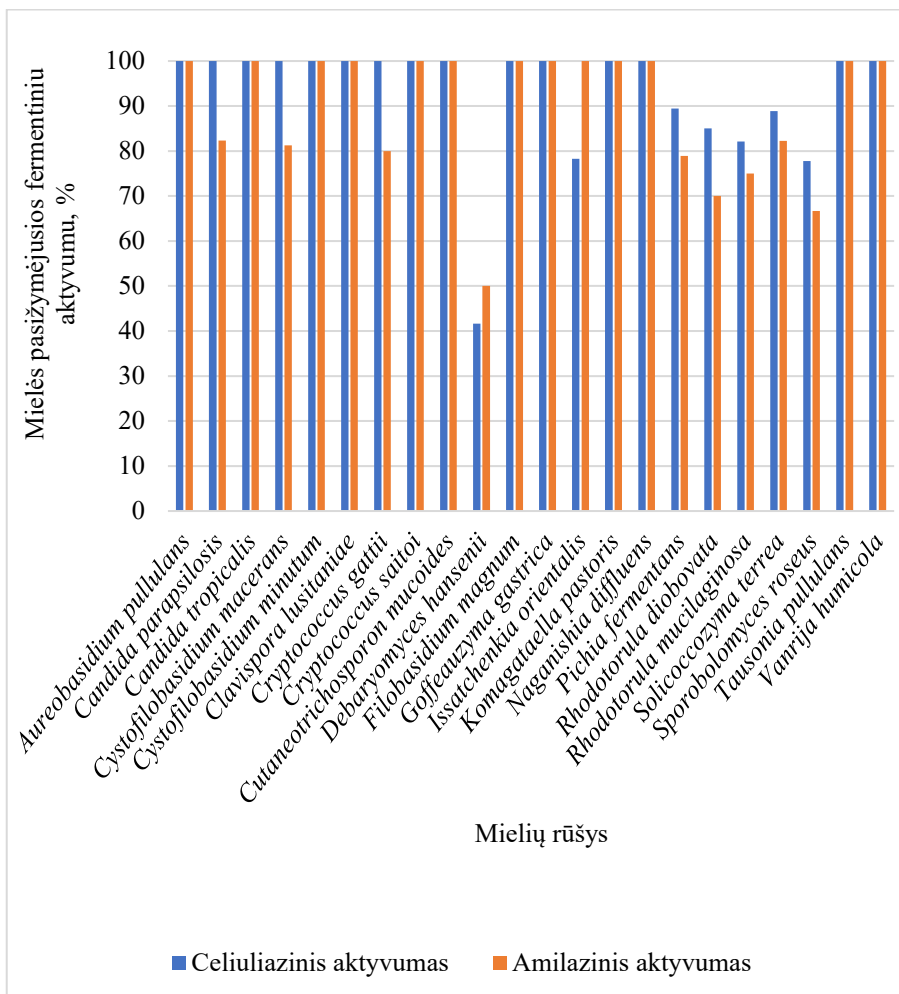
Siekiant išsiaiškinti iš įvairių atropogenizuotų substratų išskirtų mielių rūšių (109) biochemines savybes ir praktinio panaudojimo galimybes, buvo pasirinkta tirti jų celiuliazinį ir amilazinį aktyvumą. Vertinti celiuliazinį ir amilazinį aktyvumą pasirinkta dėl plataus šių fermentų substratų (celiuliozės ir krakmolo) paplitimo augalinės kilmės medžiagose. Tyrimų rezultatai parodė, kad 38,21% (42) mielių rūšių pasižymėjo celiuliaziniu aktyvumu, o amilaziniu aktyvumu pasižymėjo 40,00% (44) mielių rūšių (47 pav.).



47 pav. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių fermentinio aktyvumo kokybinis įvertinimas (%) (n=723)

Vertinant dažniausiai išskirtų mielių rūšių amilazinį ir celiuliazinį aktyvumą kokybiniais metodais, nustatyta, kad abiem aktyvumais pasižymėjo visos *Aureobasidium pullulans*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus saitoi*, *Cutaneotrichosporon mucoides*, *Cystobasidium minutum*, *Filobasidium magnum*, *Goffeauzyma gastrica*, *Naganishia diffluens* ir *Tausonia pullulans* mielių rūšių izoliatai (48 pav.).

Visi *Cryptococcus gattii* ir *Cystofilobasidium macerans* izoliatai pasižymėjo celiuliaziniu aktyvumu, o visi *Issatchenkia orientalis* izoliatai – amilaziniu aktyvumu (48 pav.).



48 pav. Dažniausiai antropogenizuotuose substratuose (bendrai dirvožemyje ir vandenyje) aptiktų mielių rūšių fermentinio aktyvumo kokybinis įvertinimas (%)

Mažiausiai aktyvios buvo *Debaryomyces hansenii* rūšies mielės, celiulaziniu aktyvumu pasižymėjo 41,67% izoliatų, o amilaziniu aktyvumu – 50,00% izoliatų (43 pav.). Vertinant dažniausiai iš dirvožemio ir vandens ėminių išskirtų mielių rūšių fermentinį aktyvumą nustatyta, kad iš dirvožemio išskirtos *Aureobasidium pullulans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus gattii* ir *Goffeazyma gastrica* mielių rūšys pasižymėjo tiek celiulaziniu tiek ir amilaziniu aktyvumu (25 lentelė).

25 lentelė. Dažniausiai antropogenuose substratuose (atskirai, pagal konkrečius substratus) aptiktų mielių rūšių kokybinis fermentinio aktyvumo įvertinimas.

Mielių rūšys	Substratas, iš kurio buvo išskirta mielių rūšis	Celiuliazinis aktyvumas	Amilazinis aktyvumas
<i>Candida tropicalis</i>	Dirvožemis, Alytaus raj.	+	+
<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i>		+	+
<i>Issatchenkia orientalis</i>		+	+
<i>Komagataella pastoris</i>		+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		+	+
<i>Solicoccozyma terrea</i>		+	+
<i>Goffeauzyma gastrica</i>	Dirvožemis, Klaipėdos m.	+	+
<i>Naganishia diffluens</i>		+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		+	+
<i>Solicoccozyma terrea</i>		-	+
<i>Tausonia pullulans</i>		+	+
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dirvožemis, Vilniaus m.	+	+
<i>Cystobasidium minutum</i>		+	+
<i>Cystofilobasidium macerans</i>		+	+
<i>Cryptococcus saitoi</i>		+	+
<i>Pichia fermentans</i>		+	-
<i>Rhodotorula diobovata</i>		+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		-	+
<i>Solicoccozyma terrea</i>		+	-
<i>Tausonia pullulans</i>		+	+
<i>Cryptococcus gattii</i>	Dirvožemis, LT – BY pasienis	+	+
<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i>		+	+
<i>Pichia fermentans</i>		-	+
<i>Vanrija humicola</i>		+	+
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Vanduo, Neris upė	-	+
<i>Pichia fermentans</i>		+	+
<i>Rhodotorula diobovata</i>		-	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		+	+
<i>Rhodotorula diobovata</i>	Vanduo, Baltijos jūra	+	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		+	-
<i>Sporobolomyces roseus</i>		+	+

(+) – aktyvumas yra, (-) – aktyvumo nėra.

Iš vandens ėminių išskirtos mielių rūšys pasižymėjo vienu iš dviejų tirtų fermentiniu aktyvumu, stebėti skirtumai tarp tos pačios rūšies mielių izoliatų. *Rhodotorula* genties mielių izoliatai pasižymėjo kintamu aktyvumu, priklausomai nuo izoliato kilmės vietos, todėl galima manyti, kad šios rūšys pasižymi metaboliniu plastiškumu. *Debaryomyces hansenii* ir *Sporobolomyces roseus* rečiau pasižymėjo celiuliaziniu aktyvumu, kas gali rodyti jų prisitaikymą prie aplinkos, kurioje dominuoja tirpesni angliavandeniai. Dažniausiai aptinkama mielių rūšis *Rhodotorula mucilaginosa* pasižymėjo abiem tirtais fermentiniais aktyvumais (25 lentelė).

3.6. Iš įvairių antropogenuotų substratų išskirtų mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo įvairių medžiagų biodegradacijos procesuose įvertinimas

3.6.1. Mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo biologiniam naftos produktais užteršto grunto valymui įvertinimas

3.6.1.1. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų atrankos ir panaudojimo biologiniam naftos produktais užteršto grunto valymui laboratorinėmis sąlygomis įvertinimas

Siekiant palyginti skirtingų taksonominių grupių mikroorganizmų augimą terpėje su dyzelinu, buvo pasirinkta tyrimą atlikti naudojant mielių, mikroskopinių grybų ir bakterijų padermes. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų atrankos rezultatai, gauti po 72 val. inkubacijos parodė, kad terpėje su 1,0 % dyzelino prasčiausiai augo ($3,60 \times 10^4$ KSV/ml) *Trichoderma harzianum* GTC BTL VLN 7, o gausiausiai – *Trichoderma longibrachiatum* GTC BTL RDV 12 ($5,50 \times 10^7$ KSV/ml). Vertinant mielių augimą, nustatyta, kad prasčiausiai augo *Rhodotorula minuta* GTC BTL KL 45 ($1,20 \times 10^4$ KSV/ml), o geriausiai - *Sporobolomyces roseus* GTC BTL RD 169 ($5,00 \times 10^7$ KSV/ml). Nustatyta, kad tarp bakterijų prasčiausiai augo *Pseudomonas putida* GTC BTL KLP 3 ($1,10 \times 10^5$ KSV/ml), o geriausiai - *Acinetobacter baumannii* GTC BTL RDV 7 ($6,50 \times 10^{10}$ KSV/ml) (49 pav.).

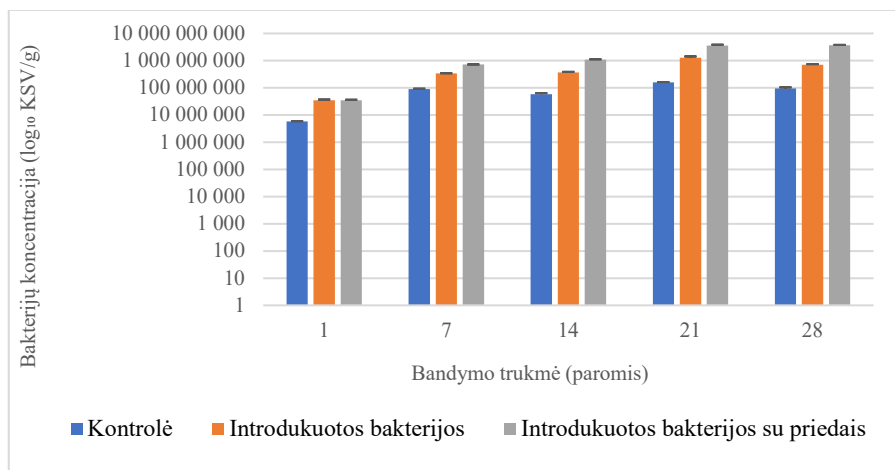
Remiantis atrankos rezultatais (pagal augimo gausumą) iš 36 tirtų mikroorganizmų (mielių $n=10$, grybų $n=8$, bakterijų $n=18$), tolimesniems bandymams buvo pasirinkti šie mikroorganizmai:

Mielės: *Yarrowia lipolytica*, *Rhodosporidium diobovatum*, *Rhodotorula mucilaginosa* ir *Sporobolomyces roseus*.

Mikroskopiniai grybai: *Penicillium dierckxii*, *Sarocladium kiliense*, *Trichoderma longibrachiatum*.

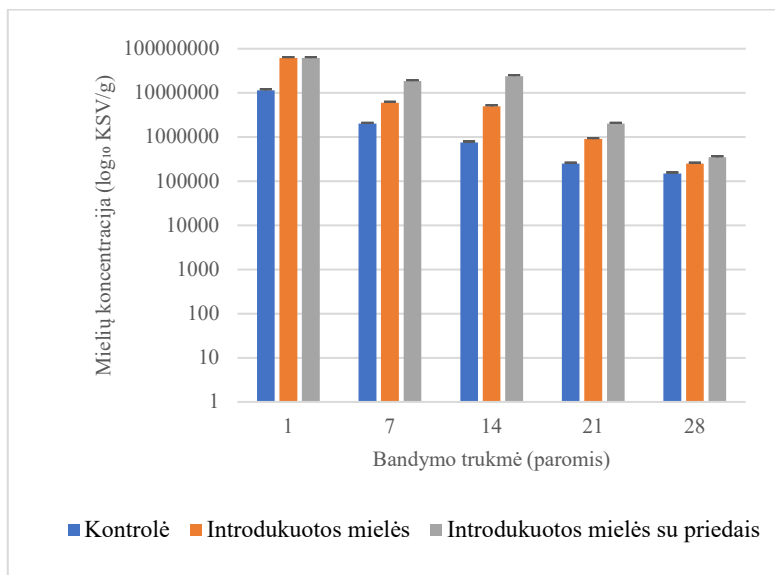
Bakterijos: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas koreensis*, *Rhodococcus fascians*.

Panaudojant aukščiau nurodytas mikroorganizmų padermes buvo suformuoti bandymo variantai su dyzelinu užterštu dirvožemiu. Nustatyta, kad bandymą atliekant modelinėmis sąlygomis, dyzeliną oksiduojančių bakterijų koncentracija (KSV/g) dirvožemyje be priedų didėjo iki 21-os bandymo paros ir sudarė $1,27 \times 10^9$ KSV/g, o vėliau pradėjo mažėti iki $7,05 \times 10^8$ KSV/g iki 28-os bandymo paros. Dirvožemyje su priedais bakterijų koncentracija didėjo visą bandymo laikotarpį nuo $3,50 \times 10^7$ KSV/g iki $3,70 \times 10^9$ KSV/g (50 pav.).



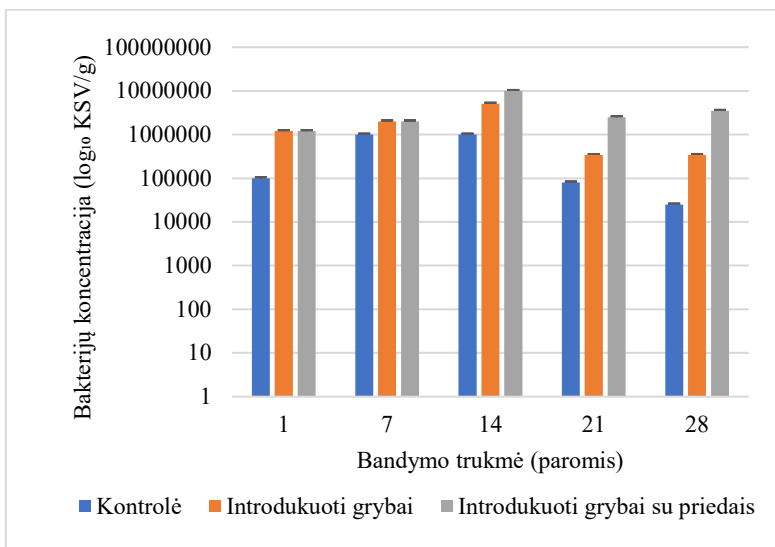
50 pav. Dyzeliną oksiduojančių bakterijų skaičiaus (KSV/g) kitimas dirvožemyje modelinėmis sąlygomis

Dyzeliną oksiduojančių mielių koncentracija dirvožemyje be priedų ir su priedais viso bandymo metu mažėjo nuo $6,15 \times 10^7$ KSV/g iki $2,50 \times 10^4$ KSV/g bandymo variante su introdukuotomis mielėmis ir iki $3,50 \times 10^4$ KSV/g bandymo variante su introdukuotomis mielėmis ir priedais (51 pav.).



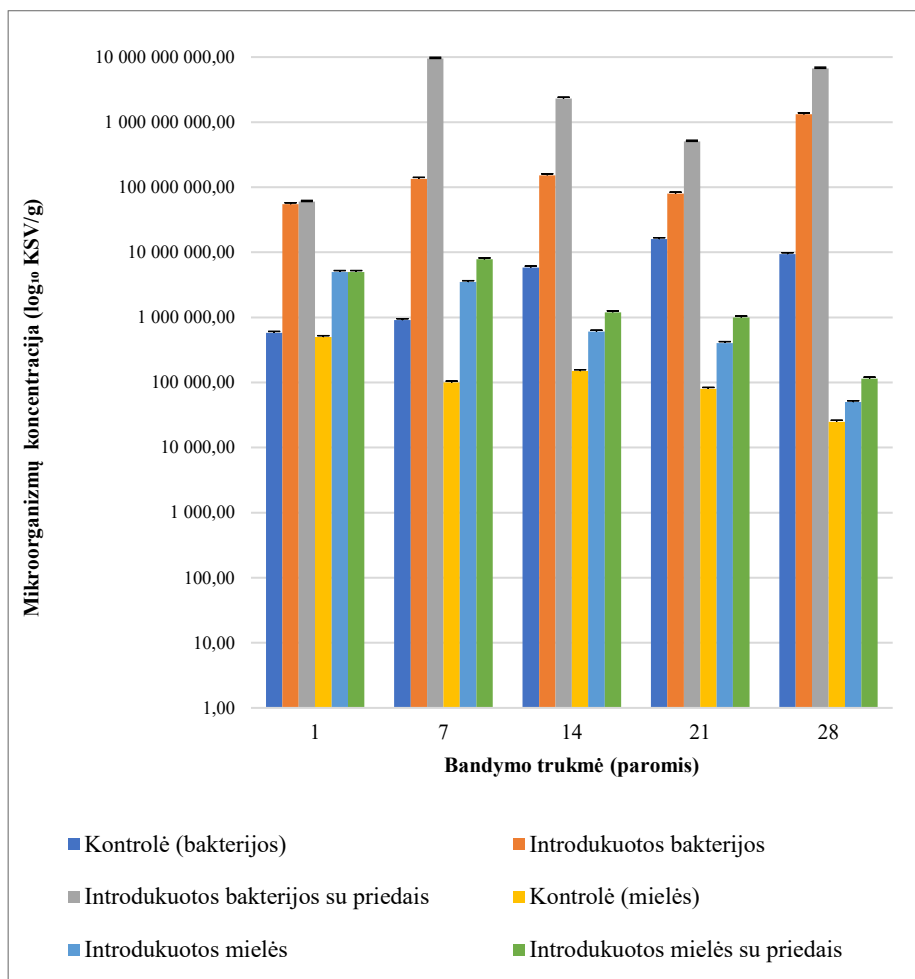
51 pav. Dizeliną oksiduojančių mielių skaičiaus (KSV/g) kitimas naftos angliavandeniliais užterštame dirvožemyje modelinėmis sąlygomis

Dyzeliną oksiduojančių mikroskopinių grybų koncentracija dirvožemyje be priedų ir su priedais didėjo iki 14 bandymo paros ir sudarė $5,10 \times 10^6 - 1,00 \times 10^7$ KSV/g, o vėliau pradėjo mažėti ir svyravo nuo $3,50 \times 10^6$ KSV/g iki $2,00 \times 10^5$ KSV/g (52 pav.).



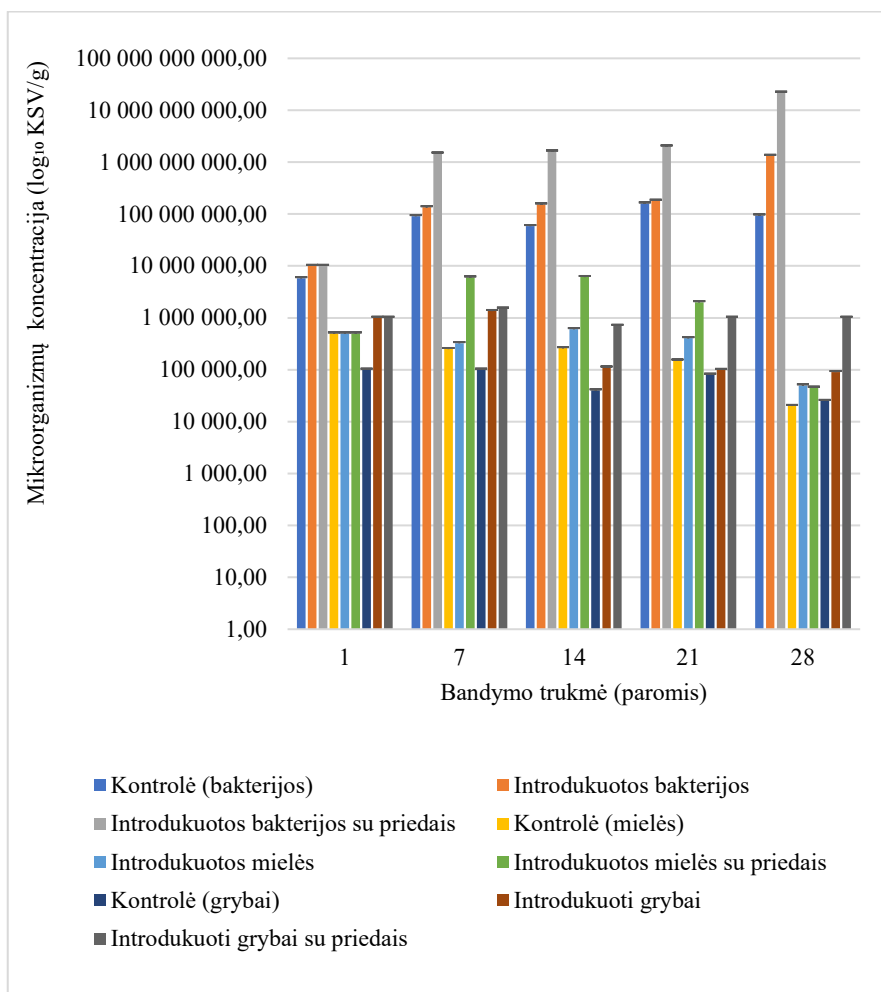
52 pav. Dizeliną oksiduojančių mikroskopinių grybų skaičiaus (KSV/g) kitimas dirvožemyje modelinėmis sąlygomis

Dyzelinu užterštame dirvožemyje su mielių ir bakterijų mišiniu, be priedų, mielių kiekis mažėjo su nedideliais svyravimais visą bandymo laikotarpį ir sudarė $5,00 \times 10^5 - 5,00 \times 10^4$ KSV/g, o bakterijų kiekis – didėjo nuo $5,50 \times 10^7$ KSV/g iki $1,32 \times 10^9$ KSV/g. Dirvožemyje su priedais mielių kiekis didėjo pirmąją bandymo savaitę ir sudarė $7,80 \times 10^6$ KSV/g, vėliau – mažėjo iki $1,15 \times 10^5$ KSV/g. Bakterijų kiekis tame pačiame dirvožemyje didėjo iki 14 bandymo paros ir sudarė $2,30 \times 10^{10}$ KSV/g, o vėliau mažėjo iki $6,70 \times 10^9$ KSV/g (53 pav.).



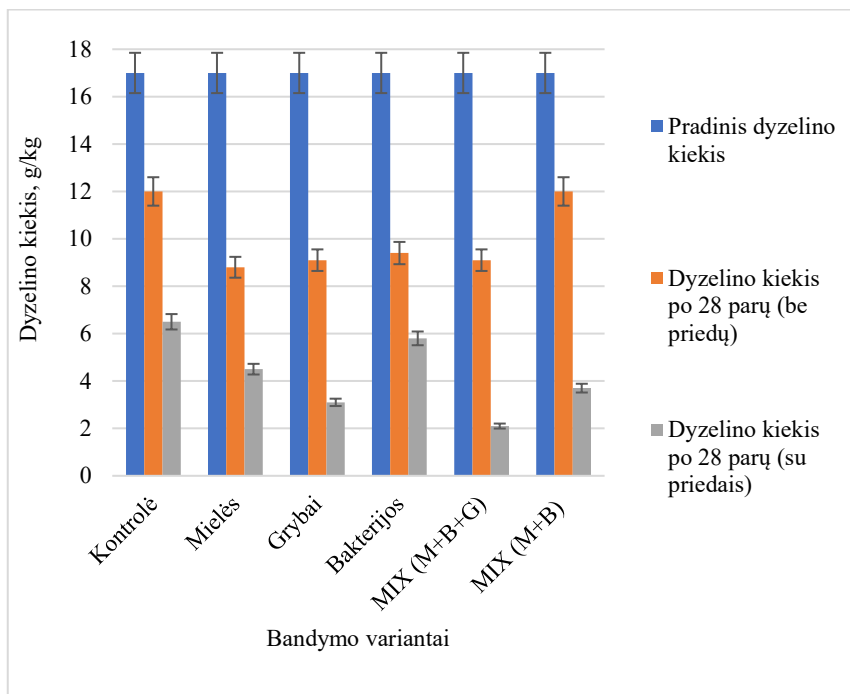
53 pav. Dyzeliną oksiduojančių bakterijų ir mielių skaičiaus kitimas naftos angliavandeniliais užterštame dirvožemyje modelinėmis sąlygomis

Dirvožemyje su mielių, bakterijų ir grybų mišiniu bei priedais visų tirtų mikroorganizmų kiekis buvo didesnis, nei bandymo be priedų metu (54 pav.).



54 pav. Dyzeliną degraduojančių mikroorganizmų skaičiaus (KSV/g) kitimas dirvožemyje modelinėmis sąlygomis

Dyzelino kiekis dirvožemyje su introdukuotomis bakterijomis be priedų sumažėjo nuo 17,0 g/kg iki 9,4 g/kg, o dirvožemyje su priedais iki 5,8 g/kg. Dyzelino kiekis dirvožemyje su introdukuotomis mielėmis sumažėjo atitinkamai iki 8,8 g/kg dirvožemyje be priedų ir 4,5 g/kg dirvožemyje su priedais. Mikroskopinių grybų mėginiuose dyzelino kiekis atitinkamai sumažėjo iki 8,5 g/kg ir 3,1 g/kg. Dyzelino kiekis dirvožemyje su bakterijų ir mielių mišiniu be priedų sumažėjo nuo 17,0 g/kg iki 12,0 g/kg, o dirvožemyje su priedais iki 3,7 g/kg. Dirvožemyje su bakterijų, mielių ir grybų mišiniu be priedų dyzelino sumažėjo nuo 17,0 g/kg iki 9,1 g/kg, o dirvožemyje su priedais – iki 2,1 g/kg (55 pav.).



55 pav. Dyzelino kiekio kitimas (g/kg) dirvožemyje modelinėmis sąlygomis (Mielės – mielių biopreparatas, Grybai – mikroskopinių grybų biopreparatas, Bakterijos – bakterijų biopreparatas, MIX (M+B+G) – mielių, bakterijų ir grybų biopreparatas, MIX (M+B) – mielių ir bakterijų biopreparatas)

Nustatyta, kad priedų naudojimas reikšmingai padidina dyzelino biodegradacijos efektyvumą visose tirtose mikroorganizmų grupėse. Po 28 parų su priedais visais atvejais nustatyta mažesnė dyzelino koncentracija nei be priedų. Didžiausias efektas nustatytas kombinuotame variante MIX (M+B+G) (mielės + bakterijos + grybai), kuriame dyzelino kiekis sumažėjo iki 2,1 g/kg (ANOVA: $p < 0,0001$, Tukey: $p < 0,05$). Šis naftą oksiduojančių mikroorganizmų mišinys buvo naudotas tolimesniems bandymams lauko sąlygomis UAB GVT LT lauko bazėje.

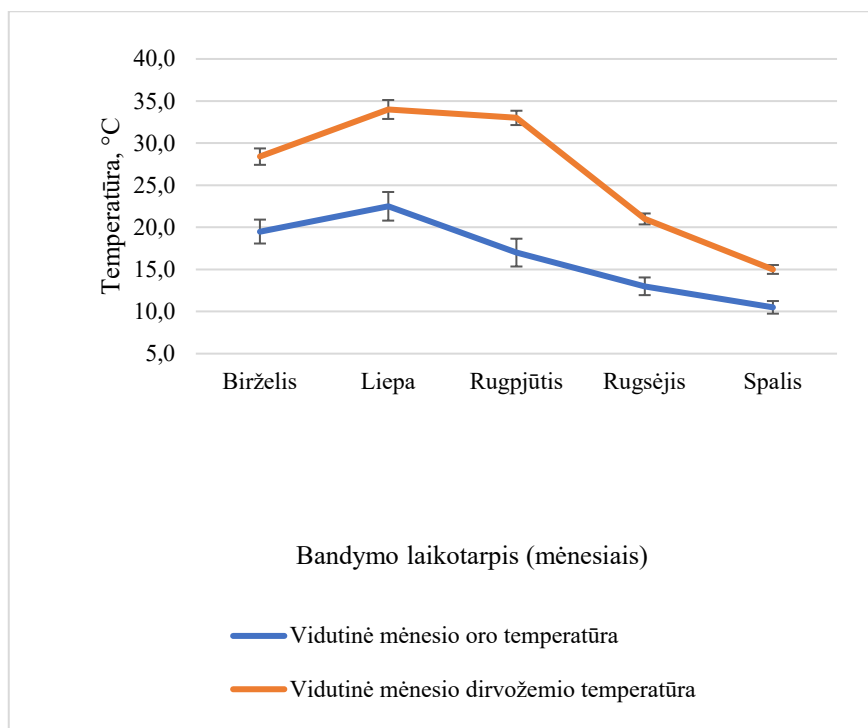
3.6.1.2. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų panaudojimo biologiniam naftos produktais užteršto grunto valymui, lauko sąlygomis, įvertinimas

Norint įvertinti laboratorinėmis sąlygomis gautų tyrimų rezultatų praktinį pritaikomumą, buvo atlikti bandymai lauko sąlygomis. Šio etapo tikslas – įvertinti naftą oksiduojančių mikroorganizmų panaudojimo efektyvumą biologiniam naftos angliavandeniliais užteršto grunto valymui realiomis aplinkos sąlygomis.

3.6.1.2.1. Aplinkos sąlygų kaita vykstant naftos angliavandenilių biologiniam skaidymui lauko sąlygomis

Dirvožemio pH šio tyrimo metu išliko artimas neutraliam viso bandymo metu ir buvo 6,0–7,0 pH intervale abiejuose bandymo variantuose.

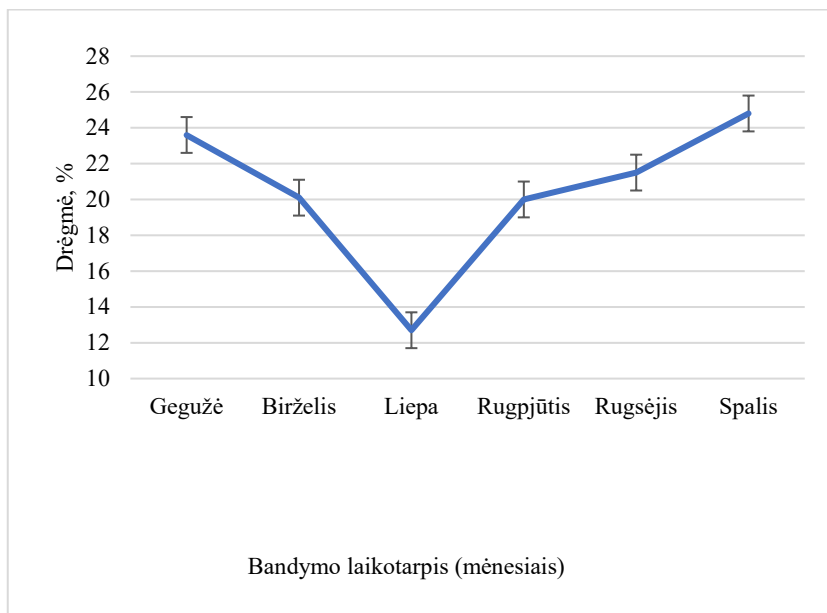
Vidutinė mėnesio aplinkos temperatūra tiriamuoju laikotarpiu svyravo nuo 10,5 iki 22,5°C (56 pav.). Vidutinė aplinkos temperatūra per visą bandymo laikotarpį buvo 16,5°C.



56 pav. Vidutinės mėnesio oro ir dirvožemio temperatūrų kitimas bandymo laikotarpiu (2021 m.)

Dirvožemio temperatūra tiriamuoju laikotarpiu svyravo nuo 15,0°C iki 34,0°C (56 pav.). Vidutinė dirvožemio temperatūra per visą tyrimo laikotarpį buvo 26,3°C.

Dirvožemio drėgmė tiriamuoju laikotarpiu tiek bandomuosiuose, tiek ir kontroliniuose kaupuose svyravo nuo 12,7% iki 24,8% (57 pav.).

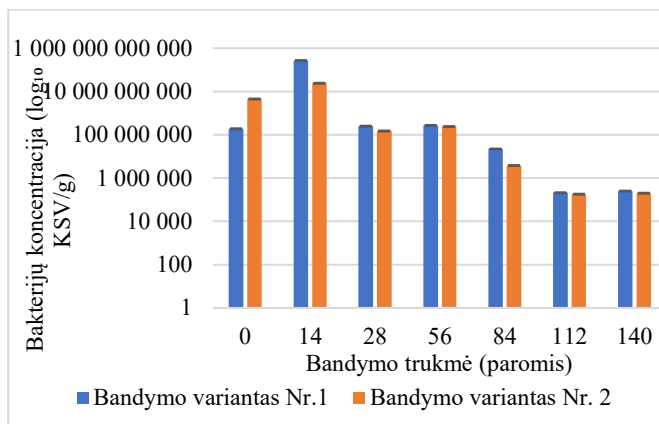


57 pav. Vidutinės dirvožemio drėgmės kitimas bandymo laikotarpiu (2021 m.)

Vertinant dirvožemio drėgmės svyravimus tyrimo metu, galima teigti, kad dirvožemio drėgnumas buvo artimas optimaliam, tačiau reikėtų pasirūpinti, kad būtų užtikrintas jos stabilumas. Priklausomai nuo dirvožemio drėgmės, jis buvo papildomai laistomas kas dvi savaites. Nebuvo reikšmingų dirvožemio drėgmės skirtumų tarp bandomojo ir kontrolinio varianto.

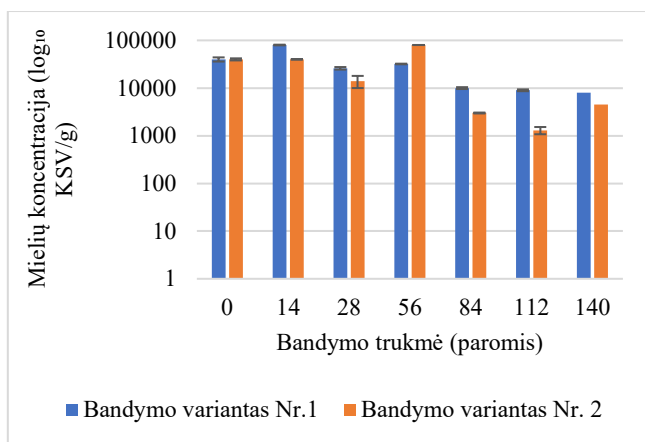
3.6.1.2.2. Mikroorganizmų koncentracijos pokyčiai valomame grunte lauko sąlygomis

Naftą oksiduojančių bakterijų koncentracija dirvožemyje taikant biopreparatą MIX(M+B+G) didėjo iki 14-osios bandymo paros ir sudarė $2,70 \times 10^{11}$ KSV/g bandymo variante Nr. 1 (su 50,0 g/kg pradine naftos angliavandenilių koncentracija) ir $2,40 \times 10^{10}$ KSV/g bandymo variante Nr. 2 (su 48,0 g/kg naftos angliavandenilių koncentracija), o vėliau mažėjo per visą tyrimo laikotarpį iki $2,10 \times 10^5$ KSV/g bandymo variante Nr. 1 ir $1,80 \times 10^5$ bandymo variante Nr. 2 (58 pav.).



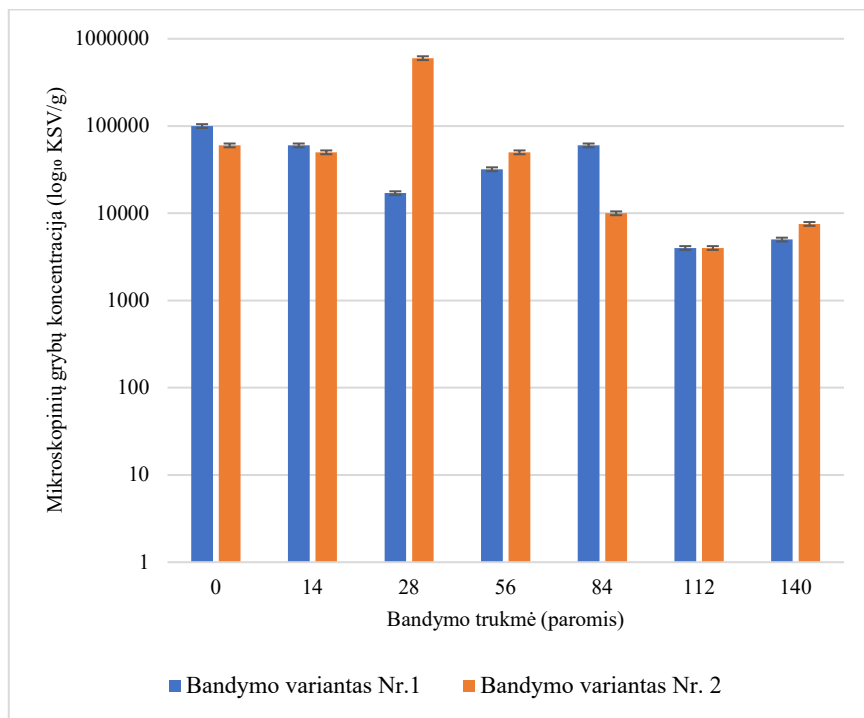
58 pav. Bakterijų (KSV/g) koncentracijos kitimas naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio bandymo variantuose lauko sąlygomis (bandymo variantas Nr. 1 su 50,0 g/kg pradine naftos angliavandenilių koncentracija, bandymo variantas Nr. 2 – su 48,0 g/kg pradine naftos angliavandenilių koncentracija)

Naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija išliko stabili iki 56 bandymo paros ir sudarė $2,60 \times 10^4 - 8,00 \times 10^4$ KSV/g bandymo variante Nr. 1 ir $1,40 \times 10^4 - 8,00 \times 10^4$ KSV/g bandymo variante Nr. 2. Nuo 56 bandymo paros mielių koncentracija pradėjo mažėti ir svyravo nuo $8,00 \times 10^3$ iki $1,00 \times 10^4$ KSV/g bandymo variante Nr. 1 ir nuo $1,30 \times 10^3$ KSV/g iki $4,50 \times 10^3$ KSV/g bandymo variante Nr. 2 (59 pav.).



59 pav. Mielių koncentracijos kitimas naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio bandymo variantuose lauko sąlygomis (bandymo variantas Nr. 1 su 50,0 g/kg pradine naftos angliavandenilių koncentracija, bandymo variantas Nr. 2 – su 48,0 g/kg pradine naftos angliavandenilių koncentracija)

Naftos angliavandenilius oksiduojančių mikroskopinių grybų koncentracija viso bandymo laikotarpiu svyravo nuo $1,30 \times 10^3$ KSV/g iki nuo $8,00 \times 10^4$ KSV/g bandymo variante Nr. 1 ir nuo $6,00 \times 10^5$ KSV/g iki $4,00 \times 10^3$ KSV/g bandymo variante Nr. 2 (60 pav.).



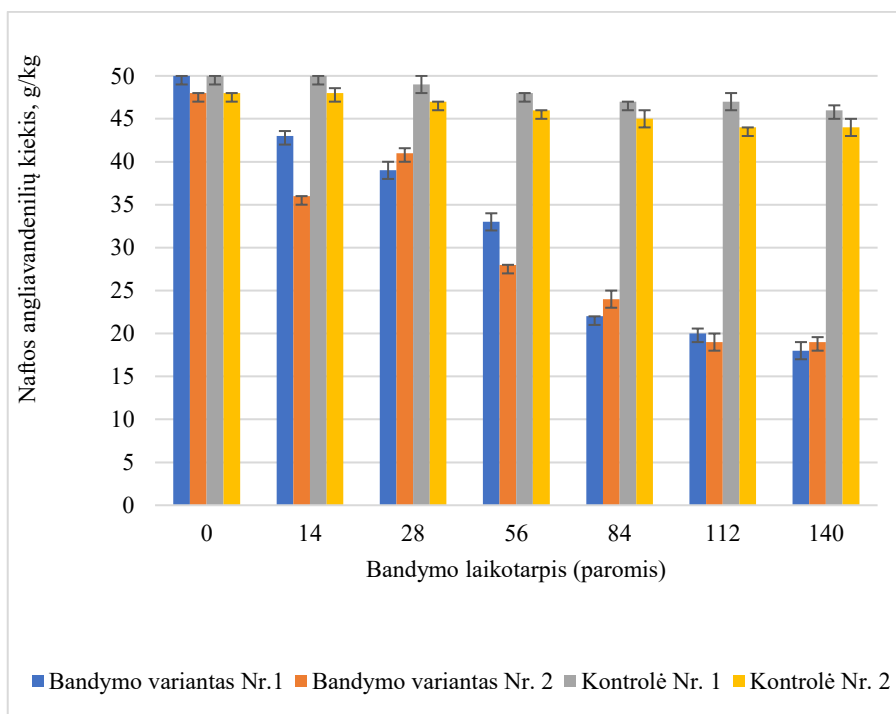
60 pav. Mikroskopinių grybų koncentracijos kitimas naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio bandymo variantuose lauko sąlygomis (bandymo variantas Nr. 1 su 50,0 g/kg pradine naftos angliavandenilių koncentracija, bandymo variantas Nr. 2 – su 48,0 g/kg pradine naftos angliavandenilių koncentracija)

3.6.1.2.3. Naftos angliavandenilių kiekio pokyčiai valomame grunte lauko sąlygomis

Naftos angliavandenilių koncentracijos pokyčiai vertinti taikant dviejų veiksnių pakartotinių matavimų dispersinę analizę (two-way repeated measures ANOVA), kur veiksniai buvo sąlyga (bandymo variantas ir kontrolė) bei laikas (0, 14, 28, 56, 84, 112 ir 140 parų). Nustatytas statistiškai reikšmingas sąlygos efektas ($F(1,1)=1918,44$; $p=0,0145$; $\eta^2=0,999$), laiko efektas ($F(6,6)=58,01$; $p<0,001$; $\eta^2=0,983$) bei reikšminga sąlygos ir laiko sąveika ($F(6,6)=32,92$; $p<0,001$; $\eta^2=0,971$). Gauti rezultatai rodo, kad naftos angliavandenilių

koncentracijos mažėjimo dinamika bandymo variantuose reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinių variantų. Poriniai palyginimai atskiruose laiko taškuose parodė, kad ryškiausi skirtumai tarp bandymo ir kontrolės pasireiškė nuo 112 paros ($p < 0,001$), tačiau taikant korekciją dėl daugybinių palyginimų statistinio reikšmingumo atskiruose laiko taškuose nenustatyta (61 pav.).

Kontroliniuose dirvožemio variantuose per penkis mėnesius naftos angliavandenilių kiekis sumažėjo nuo 50,0 g/kg iki 46,0 g/kg variante Nr.1 ir nuo 48,0 g/kg iki 44,0 g/kg variante Nr. 2. Naftos angliavandenilių kiekis bandomuosiuose variantuose visą tyrimo laikotarpį tolygiai mažėjo. Naftos angliavandenilių kiekis dirvožemyje su biopreparatu MIX (M+B+G), lyginant su kontroliniais variantais, sumažėjo 60,9% bandymo variante Nr. 1 ir 56,8% bandymo variante Nr. 2 ($p < 0,001$) (61 pav.).

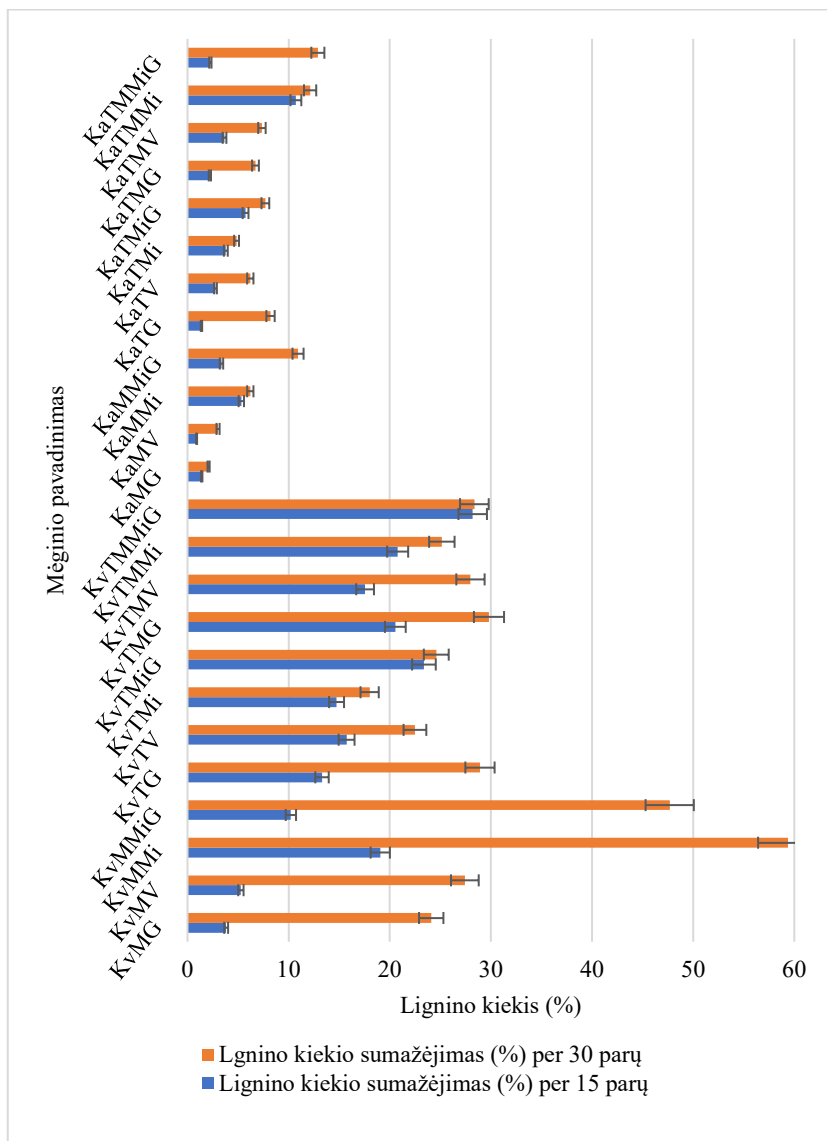


61 pav. Naftos angliavandenilių kiekio kitimas valomame grunte (g/kg), lauko sąlygomis (bandymo variantas Nr. 1 ir Kontrolė Nr. 1 – su 50 g/kg pradine naftos angliavandenilių koncentracija, bandymo variantas Nr. 2 ir Kontrolė Nr. 2 – su 48 g/kg pradine naftos angliavandenilių koncentracija) (pakartotinių matavimų ANOVA, laikas $p < 0,001$; sąlyga $p = 0,015$, laikas $\times$ sąlyga $p < 0,001$)

3.6.2. Iš įvairių antropogenuotų substratų išskirtų mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo žemės ūkio šalutinių produktų biodegradacijai įvertinimas

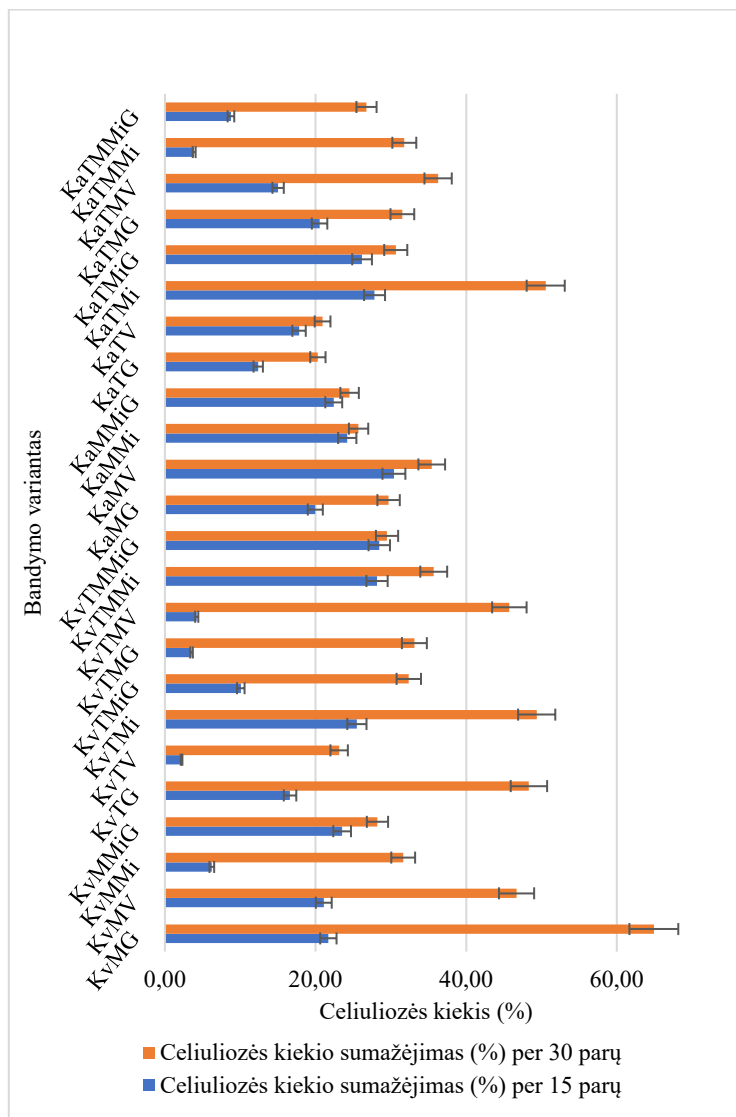
Siekiant įvertinti mielių gebėjimą skaidyti augalinės kilmės medžiagas (celiuliozę ir ligniną), bandymui buvo naudoti kanapių ir kviečių substratai bei mielės, pasižymėjusios celiuliaziniu ir oksidaziniu aktyvumu. Palyginimui buvo pasirinktas mikroskopinis grybas – *Trichoderma reesei* su žinomu celiuliaziniu ir oksidaziniu aktyvumu.

Šio bandymo metu nustatyta, kad didžiausias lignino kiekio sumažėjimas bandymo variantuose su kanapių substratu, vertinant po 15 parų inkubacijos, stebėtas bandymo variante Nr. 23 (10,7%) su *Trichoderma reesei* ir mielių (*Candida glabrata*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Cystofilobasidium macerans*, *Dipodascus armillariae*, *Geotrichum silvicola*, *Komagataella pastoris*) ir mineralinių medžiagų (NH_4NO_3 ir KH_2PO_4) mišiniais, o po 30 parų inkubacijos – mėginyje Nr. 24 (12,9%) su *Trichoderma*, mielių ir mineralinių medžiagų mišiniais bei gliukoze (62 pav.). Didžiausias lignino kiekio sumažėjimas mėginiuose su kviečių substratu, vertinant po 15 parų inkubacijos, stebėtas mėginyje Nr. 12 (28,2%) su *Trichoderma*, mielių ir mineralinių medžiagų mišiniais bei gliukoze, o po 30 parų inkubacijos – mėginyje Nr. 3 (59,4%) su mielių ir mineralinių medžiagų mišiniais (62 pav.). Gauti bandymo rezultatai leidžia teigti, kad lignino biodestrukcija per 15 ir 30 parų efektyviausiai vyko į bandymo variantus pridėjus mineralinių medžiagų mišinio ir / arba gliukozės tirpalo. Taip pat galima teigti, kad panašūs rezultatai buvo gauti naudojant mielių mišinį, tiek kartu su *Trichoderma* biopreparatu, tiek ir be jo.



62 pav. Lignino kiekio sumažėjimas (%) bandymo variantuose su kviečių ir kanapių stiebų substratais po 15 ir 30 parų (Kv - kviečių substratas, Ka – kanapių substratas, M – mielių biopreparatas, T – *Trichoderma* biopreparatas, G – gliukozė, V – vanduo, Mi – mineralinių medžiagų priedas)

Nustatyta, kad didžiausias celiuliozės kiekio sumažėjimas bandymo variantuose su kanapių substratu, vertinant po 15 parų inkubacijos, stebėtas mėginyje Nr. 14 (30,4%) su mielių mišiniu be priedų, o po 30 parų inkubacijos – mėginyje Nr. 19 (50,6%) su *Trichoderma* ir mineralinių medžiagų mišiniais (63 pav.).



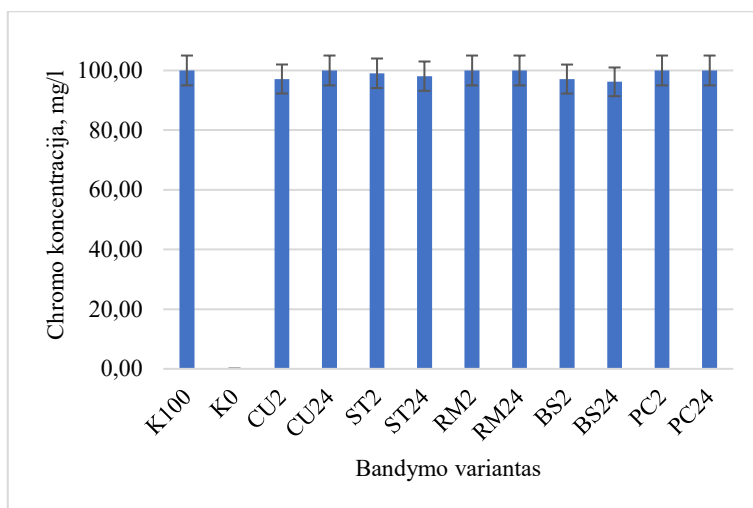
63 pav. Celiuliozės kiekio sumažėjimas (%) bandymo variantuose su kviečių ir kanapių stiebų substratais po 15 ir 30 parų (Kv - kviečių substratas, Ka – kanapių substratas, M – mielių biopreparatas, T – *Trichoderma* biopreparatas, G – gliukozė, V – vanduo, Mi – mineralinių medžiagų priedas)

Didžiausias celiuliozės kiekio sumažėjimas mėginiuose su kviečių substratu, vertinant po 15 parų inkubacijos, stebėtas mėginyje Nr. 12 (28,5%) su *Trichoderma*, mielių ir mineralinių medžiagų mišiniais ir gliukoze, o po 30 parų inkubacijos – mėginyje Nr. 1 (64,9%) su mielių mišiniu ir gliukoze (58 pav.). Gauti tyrimo rezultatai leidžia teigti, kad efektyviausiai per 30 parų celiuliozės biodestrukciją vykdė mielių mišinys su gliukozės priedu.

3.6.3. Iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių ir kitų mikroorganizmų panaudojimo chromo bioakumuliacijai įvertinimas

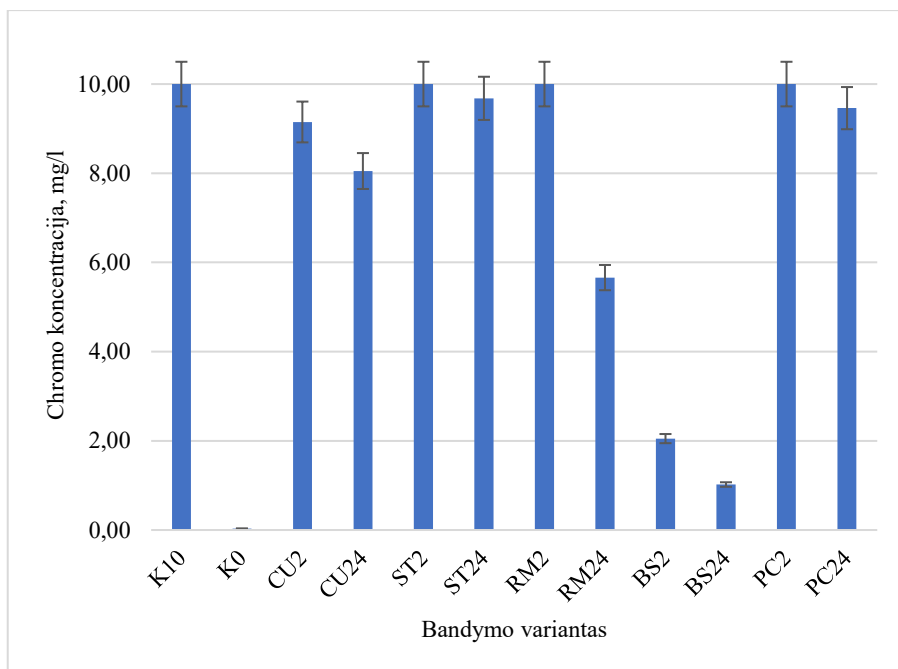
Siekiant įvertinti iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių ir kitų mikroorganizmų gebėjimą kaupti sunkiuosius metalus, buvo atlikti chromo bioakumuliacijos tyrimai. Šio darbo etapo tikslas – nustatyti mikroorganizmų potencialą biologiniam aplinkos valymui. Šie tyrimai leidžia įvertinti tiek mikroorganizmų atsparumą metalo poveikiui, tiek jų efektyvumą mažinant chromo koncentraciją aplinkoje, sudarant prielaidas tvaraus bioremediacijos metodo taikymui praktikoje.

Tiriant mikroorganizmų gebėjimą kaupti chromą esant 100,0 mg/l koncentracijai, lyginant gautus rezultatus su kontroliniu variantu (K100), reikšmingo chromo kiekio kaupimo nebuvo stebėta (64 pav.).



64 pav. Chromo koncentracijos pokyčiai bandymo variantuose su pradine 100,0 mg/l jo koncentracija (K100 – kontrolė be mikroorganizmų, chromo koncentracija 100,0 mg/l, K0 – kontrolė be chromo ir mikroorganizmų, CU2 – bandymo variantas su *Cyberlindnera jadinii*, inkubuotas 2 valandas, CU24 – bandymo variantas su *C. jadinii*, inkubuotas 24 valandas, ST2 – bandymo variantas su *Solicoccozyma terrea*, inkubuotas 2 valandas, ST24 – bandymo variantas su *S. terrea*, inkubuotas 24 valandas, RM2 – bandymo variantas su *Rhodotorula mucilaginosa*, inkubuotas 2 valandas, RM24 – bandymo variantas su *R. mucilaginosa*, inkubuotas 24 valandas, BS2 – bandymo variantas su *Bacillus subtilis*, inkubuotas 2 valandas, BS24 – bandymo variantas su *B. subtilis*, inkubuotas 24 valandas, PC2 – bandymo variantas su *Penicillium chrysogenum*, inkubuotas 2 valandas, PC24 – bandymo variantas su *P. chrysogenum*, inkubuotas 24 valandas)

Vertinant mikroorganizmų gebėjimą kaupti chromą esant jo 10,0 mg/l koncentracijai, nustatyta, kad didžiausią dalį (89,8%) chromo sukauptė *Bacillus subtilis* (BS24) per 24 bandymo valandas, šiek tiek mažesnę dalį (79,5%) – *Bacillus subtilis* (BS2) per 2 bandymo valandas (65 pav.).



65 pav. Chromo koncentracijos pokyčiai bandymo variantuose su pradine 10,0 mg/l jo koncentracija (K10 – kontrolė be mikroorganizmų, chromo koncentracija 10,0 mg/l, K0 – kontrolė be chromo ir mikroorganizmų, CU2 – bandymo variantas su *C. jadinii*, inkubuotas 2 valandas, CU24 – bandymo variantas su *C. jadinii*, inkubuotas 24 valandas, ST2 – bandymo variantas su *S. terrea*, inkubuotas 2 valandas, ST24 – bandymo variantas su *S. terrea*, inkubuotas 24 valandas, RM2 – bandymo variantas su *R. mucilaginosa*, inkubuotas 2 valandas, RM24 – bandymo variantas su *R. mucilaginosa*, inkubuotas 24 valandas, BS2 – bandymo variantas su *B. subtilis*, inkubuotas 2 valandas, BS24 – bandymo variantas su *B. subtilis*, inkubuotas 24 valandas, PC2 – bandymo variantas su *P. chrysogenum*, inkubuotas 2 valandas, PC24 – bandymo variantas su *P. chrysogenum*, inkubuotas 24 valandas)

Trečioje vietoje pagal sukauptą chromo kiekio dalį buvo *Rhodotorula mucilaginosa* (RM24), kuri per 24 valandas sukauptė 43,4% tiriamojo chromo kiekio (65 pav.).

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Tyrimų rezultatai parodė, kad mielės buvo plačiai paplitusios tiek dirvožemyje, tiek ir vandenyje. Analizuojant gautus duomenis buvo pastebėta, jog tirtame miškingų Lietuvos pasienio su Baltarusija, galimo Astravo atominės elektrinės poveikio zonos dirvožemyje ($n=48$) mielių koncentracija svyravo 10^3 – 10^5 KSV/g ribose. Literatūros šaltinių duomenimis, vidutinė mielių koncentracija vidutinio klimato juostos miškuose svyruoja nuo 10^3 iki 10^5 KSV/g (Buzzini ir kt., 2017). Tai lemia stabilesnė aplinkos temperatūra, subalansuotas drėgmės lygis bei didelis organinių medžiagų kiekis. Tropiniuose miškuose vidutinė mielių koncentracija dažniausiai būna didesnė ir sudaro nuo 10^4 iki 10^6 KSV/g. Tam įtakos turi palankesnės mielių augimui sąlygos – aukštesnė oro temperatūra bei drėgmė. Borealiniuose miškuose (taiga) mielių koncentracija svyruoja nuo 10^2 iki 10^4 KSV/g, o tai lemia žemesnė aplinkos temperatūra ir mažesnis organinių medžiagų kiekis (Buzzini ir kt., 2017). Šiame darbe atliktų tyrimų metu tirtame dirvožemyje dažniausiai buvo aptiktos *Cutaneotrichosporon*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Naganishia*, *Metschnikowia*, *Solicoccozyma* ir kt. gentims priskiriamos mielių rūšys ($n=46$). Mozzachiodi S. ir kt. (2022) teigia, jog dažniausiai vidutinio klimato miškingų vietovių dirvožemyje dažniausiai yra aptinkamos *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Komagataella*, *Lachancea*, *Naganishia*, *Papiliotrema*, *Solicoccozyma*, *Saccharomyces*, *Saitozyma* ir *Vishniakozyma* gentims priklausančios mielių rūšys. Šio tyrimo metu buvo aptikta dalis autorių minimų miško dirvožemiui būdingų mielių rūšių, tačiau skyrėsi jų aptinkamumo dažnis. Maisto medžiagų trutinguose dirvožemiuose dominavo *Ascomycota* skyriaus mielės (*Lodderomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*), o skurdesniuose dirvožemiuose vyravo *Basidiomycota* skyriaus mielės (*Cutaneotrichosporon*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*).

2019 m. spalį Alytuje kilęs padangų perdirbimo įmonės gaisras tapo vienu didžiausių ekologinių incidentų Lietuvoje per pastaruosius dešimtmečius. Degant tūkstančiams tonų padangų, į atmosferą buvo išmesti didžiuliai kiekiai kenksmingų dūmų ir cheminių junginių. Po padangų perdirbimo įmonės gaisro Alytaus mieste ir rajone buvo nustatyta, jog mielių koncentracija tirtuose dirvožemiuose 2019–2021 m. laikotarpiu svyravo 10^2 – 10^5 KSV/g ribose. Reikšmingų mielių koncentracijos pokyčių minėtu laikotarpiu nebuvo stebėta. Literatūros duomenimis, ūkinės paskirties ir miesto dirvožemiuose mielių koncentracija gali gana stipriai varijuoti, priklausomai nuo aplinkos sąlygų, dirvožemio naudojimo intensyvumo, taršos lygio, žmonių veiklos intensyvumo. Įprastai miesto dirvožemyje mielių koncentracija svyruoja nuo

10^2 iki 10^4 KSV/g, o ūkinės paskirties dirvožemyje nuo 10^4 iki 10^6 KSV/g (Sláviková ir Vadkertiová, 2003; Yurkov ir kt., 2012). Iš Alytaus miesto ir rajono ūkinės paskirties ir miesto dirvožemio ėminių ($n=33$), paimtų po padangų perdirbimo įmonės gaisro, dažniausiai buvo išskirtos *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Cutaneotrichosporon mucoides*, *Issatchenkia orientalis*, *Komagataella pastoris*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomycopsis schoenii* ir *Solicoccozyma terrea* mielių rūšys ($n=142$). Vadkertiová ir Sláviková (2006) nurodo, kad ūkinės paskirties dirvožemyje gali būti aptinkamos *Barnettozyma*, *Candida*, *Cyberlindnera*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Lipomyces*, *Metschnikowia*, *Naganishia*, *Schwanniomyces*, *Solicoccozyma* ir *Trichosporon* gentims priklausančios mielių rūšys. Dalis šio tyrimo metu nustatytų mielių rūšių iš dalies koreliavo su autorių gautais tyrimų rezultatais. Ulea E. ir kt. (2017) vidutinio klimato zonos ūkinės paskirties dirvožemyje aptiko *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus terricola*, *Debaryomyces subglobosus*, *Guehomyces pullulans*, *Rhodotorula graminis*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Solicoccozyma aerea*, *Solicoccozyma terrea*, *Solicoccozyma terricola*, *Sporobolomyces roseus*, *Trichosporon* sp. ir kitų mielių rūšių. Dalis paminėtų mielių rūšių sutampa su šiame darbe aptariamomis mielių rūšimis. Rūšinės sudėties skirtumus galėjo lemti geografiniai, ekologiniai ir dirvožemio struktūros skirtumai. Vertinant tyrimų rezultatus pastebėta, kad tolstant nuo gaisro židinio mielių rūšių skaičius didėjo *Ascomycota* (55-70%) skyriaus naudai ir atvirkščiai – artėjant link gaisro židinio – *Basidiomycota* (65-75%) skyriaus naudai. Esant didesniai organinės anglies (4,32-6,55%) ir azoto (0,30-0,48%) kiekiui, dirvožemyje, dominavo *Ascomycota* skyriaus mielės (60-70%), o mažesnio derlingumo dirvožemyje – *Basidiomycota* skyriaus mielės (50-60%). Didelė dalis mielių į dirvožemio paviršinius sluoksnius patenka su augalų nuokritomis, todėl jų rūšinė sudėtis gali reikšmingai skirtis, priklausomai nuo dirvožemyje augančių augalų rūšių (Ulea ir kt., 2017). Lietuvos geologijos tarnybos 2019 m. agrocheminių tyrimų duomenimis, tarša po padangų perdirbimo įmonės gaisro Alytaus mieste ir rajone nebuvo nustatyta. Alytaus miesto ir rajono dirvožemyje nerasta taršos padangų gaisro ir kitų galimų šaltinių kenksmingais produktais, t.y. visų tirtų cheminių medžiagų (sunkiųjų metalų, aromatinių angliavandenilių ir kt.) kiekiai dirvožemyje neviršijo didžiausių leistinų ribinių verčių, galiojančių Lietuvos gyvenamosiose teritorijose. Nebuvo aptikta ir Lietuvoje nereglamentuojamų dioksinų, furanų bei polibromintųjų difenilių, nes jų kiekiai buvo žemiau laboratorinių metodų aptikimo ribos. Skirtingais šio tyrimo laikotarpiais nebuvo stebėta reikšmingu mielių koncentracijos ir rūšinės sudėties pokyčių tirtame dirvožemyje.

Klaipėdos miesto savivaldybės teigimu, 2019 m. aplinkos monitoringo tikslu atliktų dirvožemio tyrimų metu nustatyta, jog šiaurinėje miesto dalyje esančiuose Bomelio Vitės ir Didžiosios Vitės gyvenamuosiuose mikrorajonuose chromo koncentracija dirvožemyje viršijo leistinas ribines vertes. Šią informaciją patvirtina Lietuvos geologijos tarnybos pateikti 2019 m. atliktų tyrimų rezultatai, kurie viršijo ribines chromo vertes 7,6–16,9 karto. Šiame darbe minimuose chromu užteršto dirvožemio ėminiuose ($n=20$) viso tyrimo laikotarpi (2020–2021 m.) mielių koncentracija išliko 10^2 – 10^3 KSV/g ribose. Reikšmingų mielių skaičiaus pokyčių ir skirtumų, lyginant su neužterštu dirvožemiu, nebuvo stebėta. Literatūros šaltinių duomenimis, mielių koncentracija chromu užterštame dirvožemyje gali būti žymiai mažesnė, lyginant su neužterštu dirvožemiu. Priklausomai nuo užterštumo lygio ir dirvožemio savybių, mielių koncentracija gali svyruoti nuo 10^1 iki 10^4 KSV/g. Didelės chromo koncentracijos dirvožemyje gali lemti mielių koncentracijos sumažėjimą iki mikrobiologiniais metodais neaptinkamos ribos (Yang ir kt., 2014; Bakshi ir Panigrahi, 2022). Al-Battashi H. ir kt. (2016) ir Hu J. ir kt. (2018) duomenimis, dažniausiai buvo aptiktos *Goffeauzyma gastrica*, *Naganishia diffluens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Solicoccozyma terrea* ir *Tausonia pullulans* mielių rūšys ($n=39$). Mokslininkų atliktų tyrimų metu buvo nustatyta, kad dirvožemio tarša chromu keičia dirvožemio mikroskopinių grybų bendrijos sudėtį ir struktūrą, tačiau nekeičia jų įvairovės. Užterštame dirvožemyje buvo aptikti taršos chromu bioindikatoriai, pavyzdžiui *Candida albicans*. Ši mielių rūšis geba toleruoti taršą chromu (Rodríguez ir kt., 2018). Mokslininkų aprašomi mikroskopinių grybų bendrijos pokyčiai įvyko dėl tiesioginio toksiško poveikio mikroorganizmams, kurį sukėlė didelė chromo junginių koncentracija ir reikšmingi dirvožemio savybių pokyčiai (pvz. organinių medžiagų pokyčiai, lydimi taršos chromu). Organinės medžiagos buvo svarbiausias faktorius, kuris darė įtaką mikroskopinių grybų bendrijai. Iš visų chromo frakcijų, didžiausią įtaką darė prie organinių medžiagų prisijungęs chromas ir nepastovios jo formos (Yang ir kt., 2014; Bakshi ir Panigrahi, 2022). Šioje disertacijoje aprašomų tyrimų metu statistiškai reikšmingų mielių skaičiaus ir rūšinės sudėties pokyčių nebuvo stebėta. Taip galėjo nutikti dėl palyginti trumpo tyrimo laikotarpio (2 metai) per kurį pastebėti apčiuopiamus mikroorganizmų bendrijų pokyčius yra sudėtinga, nes dirvožemis yra gana stabilus ir palyginti lėtai besikeičianti ekosistema. Kadangi pakartotiniai dirvožemio tyrimai parodė, jog chromo kiekis neviršija leistinų ribinių verčių, ilgalaikis šio metalo poveikis dirvožemio mikrobiotai laikytinas mažai tikėtiniu.

Buvo tiriamas penkių kuro bazių (Vilniaus, Vaidotų, Kauno, Radviliškio ir Klaipėdos) dirvožemis ($n=30$), sovietmečiu užterštas naftos angliavandeniliais. Šio dirvožemio ėminiuose mielių koncentracija svyravo nuo 10^3 iki 10^6 KSV/g, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija sudarė iki 10^4 KSV/g. Naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių buvo aptikta tik dviejuose dirvožemio ėminiuose, o tai galėtų reikšti galimą taršos naftos angliavandeniliais poveikį. Literatūros šaltinių duomenimis, naftos angliavandenilių buvimas dirvožemyje gali sudaryti toksiškas aplinkos sąlygas daugeliui dirvožemio mikroorganizmų. Įvairių mokslininkų gauti duomenys rodo, kad mielių koncentracija naftos angliavandeniliais užterštame dirvožemyje gali reikšmingai skirtis nuo neužteršto dirvožemio ir svyruoti nuo 10^2 iki 10^3 KSV/g (Coulon ir Delille, 2003; Evans ir kt., 2004; Hakima ir Ian, 2017; Olukunle, 2020; Achife ir kt., 2021). Neužterštame dirvožemyje mielių koncentracija dažniausiai svyruoja 10^3 iki 10^4 KSV/g ribose (Wojcik et al., 2013). Kuro bazių dirvožemio ėminiuose dažniausiai aptiktos mielių rūšys ($n=75$) buvo *R. mucilaginosa* ir *S. terreus*. Taip pat buvo aptiktos dvi naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšys – *R. mucilaginosa* ir *S. roseus*. Benmessaoud S. ir kt. (2021) duomenimis, dažniausiai naftos angliavandeniliais užterštame dirvožemyje yra aptinkamos *Rhodotorula* genties mielės. Taip pat aptinkamos tokios mielių gentys kaip *Candida*, *Exophiala*, *Pichia*, *Rhodospiridium* ir *Trichosporon* (Segal-Kischinevsky ir kt., 2022). Aptiktos pavienės naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšys (*R. mucilaginosa*, *S. roseus*) galėtų būti siejamos su sovietmečiu vykusia dirvožemio tarša naftos angliavandeniliais. Šiuo metu yra įdiegtos modernios apsaugos priemonės (naftos angliavandeniliams nelaidžios dangos), kurios maksimaliai sumažina taršos naftos angliavandeniliais tikimybę.

Tiriant mielių paplitimą ir rūšių įvairovę dirvožemyje šalia judriausių Vilniaus miesto gatvių, pastebėta, kad bendra mielių koncentracija tirtame dirvožemyje ($n=22$) svyravo nuo 10^2 iki 10^4 KSV/g, o naftos angliavandenilius degraduojančių mielių koncentracija – nuo 10^2 iki 10^3 KSV/g. Repečkienė J. ir kt. (2002) nurodomas išskirtų naftos angliavandenilius degraduojančių mielių koncentracija dirvožemyje buvo 10^3 – 10^4 KSV/g. Mielių koncentracija dirvožemyje gali priklausyti nuo aplinkos sąlygų, todėl skirtingos lokalizacijos dirvožemiuose gali būti aptinkama skirtinga mielių koncentracija. Vilniaus miesto dirvožemyje dažniausiai buvo aptiktos *R. diobovata* ir *S. terreus* mielių rūšys ($n=59$). Taip pat buvo aptikta ir naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšių ($n=15$), iš jų dažniausios buvo *R. diobovata* ir *R. mucilaginosa*. Šie rezultatai sutampa su Benmessaoud S. ir kt. (2021) teiginiu, jog *Rhodotorula* genties mielės yra

dažniausiai aptinkamos naftos angliavandenilius oksiduojančios mielės. Likusi išskirtų mielių rūšių dalis yra įprastos dirvožemio mielių rūšys. Repečkienė J. ir kt. (2002) teigimu, iš naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio dažniausiai buvo išskirtos *C. jadinii*, *D. fermentans*, *G. candidum*, *Y. lipolytica*, *P. membranifaciens*, *R. mucilaginosa*, *U. graminis* ir *W. anomalus* rūšių mielės. Naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių aptikimas dirvožemyje gali būti siejamas su buvusia arba esama jo tarša. Vilniaus miesto savivaldybės dirvožemio ir grunto monitoringo 2023 m. rezultatų ataskaitoje nurodoma, jog šalia judriausių miesto gatvių atkarpų tarša sunkiaisiais metalais ir naftos angliavandeniliais nebuvo nustatyta (Čyžius ir kt., 2023). Šią informaciją patvirtino ir Biodestruktorių tyrimo laboratorijos užsakymu atlikti agrocheminiai tyrimai. Naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių aptikimas dirvožemyje šiuo atveju galėtų reikšti buvusią taršą naftos angliavandeniliais.

Šiame darbe aprašyti tyrimai parodė, kad miško dirvožemyje mielių koncentracija siekia 10^3 – 10^5 KSV/g, o tai atitinka vidutinio klimato juostos miškams būdingas sąlygas, sudarančias palankią terpę įvairioms mielių gentims (*Cryptococcus*, *Komagataella*, *Naganishia*, *Solicoccozyma* ir kt.). Tuo tarpu antropogenizuotuose dirvožemiuose (miestų, pramonės ar ūkinės paskirties teritorijose) mielių koncentracija svyruoja 10^2 – 10^6 KSV/g ir priklauso nuo žmogaus veiklos intensyvumo, taršos lygio bei dirvožemio struktūros. Šiuose dirvožemiuose dažnesnės aplinkos poveikiui atsparesnės rūšys, pvz. *C. tropicalis*, *R. mucilaginosa*, *S. terreus* ir kt. Apskritai, miško dirvožemiai pasižymi stabilesne mielių bendrija ir įvairove, o antropogenizuoti dirvožemiai – didesne rūšinės sudėties kaita bei taršai atsparių mielių dominavimu, atspindinčiu žmogaus veiklos įtaką mikrobiologinei dirvožemio struktūrai.

Neries upės vandens tyrimų metu pastebėta, kad bendra mielių koncentracija vandens ėminiuose ($n=16$) buvo nuo 2,10 iki $4,93 \times 10^1$ KSV/ml, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija nuo 0,06 iki 2,40 KSV/ml. Literatūros duomenimis, upių vandenyje mielių koncentracija dažniausiai yra nuo 10 iki 10^4 KSV/l (Sláviková ir Vadkertiová, 1997; Pietryczuk et al., 2017). Šiame darbe aprašomų tyrimų metu dažniausiai aptikta mielių rūšis ($n=46$) buvo *R. mucilaginosa*. Taip pat buvo aptikta naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšių ($n=10$), iš kurių dažniausiai nustatytos *M. pulcherrima* ir *R. mucilaginosa*. Literatūros duomenimis, upių vandenyje yra aptinkama gana didelė mielių rūšių įvairovė. Sláviková E. ir Vadkertiová R. (1997) bei Pietryczuk A ir kt. (2017) teigia, jog Dunojaus upės (Slovakija) vandenyje dažniausiai aptiko *A. pullulans*, *Candida capitatum*, *Candida maltosa*, *Geotrichum candidum*, *I. Orientalis*, *M. pulcherrima*, *P.*

fermentans, *Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa* bei *S. cerevisiae* mielių rūšių izoliatų, tačiau jos aptiktos rečiau. Disertacijoje aprašomų tyrimų metu gauti rezultatai iš esmės sutapo su literatūros šaltinių duomenimis, skyrėsi tik mielių rūšių aptinkamumo dažnis. Gauti duomenys patvirtina, kad lyginant su literatūros šaltinių duomenimis, Neries upės ėminiuose aptiktų mielių bendrųjų būklė atitinka natūralioms upių ekosistemoms būdingus parametrus, bet turi ir taršos paveiktų bendrųjų požymių, o aptiktos mielės – ypač *M. pulcherrima* ir *R. mucilaginosa* – pasižymi gebėjimu oksiduoti organinius junginius, įskaitant naftos angliavandenilius. Tai rodo, kad Neries mikrobiota turi tam tikrą savivalos potencialą ir gebėjimą reaguoti į galimus organinės taršos patekimo atvejus. Tokių rezultatų reikšmė svarbi vertinant upės ekologinę būklę, natūralią savivalos sistemą bei jos mikroorganizmų vaidmenį organinių teršalų biotransformacijos procesuose.

Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandens ėminiuose (n=80) bendra mielių koncentracija svyravo nuo 0,00 iki 1,29 KSV/ml, o naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių koncentracija – nuo 0,00 iki 0,67 KSV/ml. Mielių koncentracija jūros vandenyje įprastai siekia iki 1,0 KSV/ml, o didesnė jų koncentracija gali būti susijusi su taršos poveikiu. Vidutiniškai ir ypač užterštose jūros dalyse mielių koncentracija gali siekti ir 10^3 – 10^6 KSV/ml (Kutty ir Philip, 2008). Šiame darbe aprašomų tyrimų metu dažniausiai buvo aptiktos *R. diobovata* ir *R. mucilaginosa* rūšių (n=115) mielės. Buvo aptikta ir naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių rūšių (n=95), iš kurių dažniausiai aptiktos buvo *R. diobovata*, *R. mucilaginosa* ir *S. roseus*. Literatūros duomenimis, iš jūros vandens gali būti išskiriamos tokios mielių rūšys: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. jadinii*, *C. lusitaniae*, *C. minutum*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, *D. hansenii*, *D. rugosa*, *G. antarctica*, *H. uvarum*, *M. guilliermondii*, *N. albida*, *P. fermentans*, *P. kudriavzevii*, *P. laurentii*, *R. babjaveae*, *R. diobovata*, *R. glutinis*, *R. graminis*, *R. mucilaginosa*, *S. cerevisiae*, *S. pararoseus*, *S. roseus*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus* ir kitos. Mielių rūšinė sudėtis priklauso nuo jūros vandens užterštumo bei sezoninių jūros vandens savybių pokyčių (Hassett ir kt., 2020). Šiame darbe aprašomų tyrimų metu buvo nustatyta, kad tiek gėlame, tiek ir sūriame vandenyje labiausiai paplitusi mielių rūšis buvo *R. mucilaginosa*. Šių tyrimų rezultatai yra svarbūs vertinant Baltijos jūros vandens Būtingės naftos terminalo akvatorijoje mielių populiacijos būklę ir gebėjimą reaguoti į organinės kilmės teršalus.

Šiame darbe aprašomų tyrimų duomenys rodo, kad gėlame (upės) ir sūriame (jūros) vandenyje mielių koncentracija ir rūšinė sudėtis reikšmingai skiriasi. Gėlame vandenyje (Neries upėje) mielių koncentracija siekė iki 10 KSV/ml, o dažniausiai aptinkamos rūšys buvo *M. pulcherrima* ir *R.*

mucilaginosa. Sūriame Baltijos jūros Būtingės naftos terminalo akvatorijos vandenyje mielių koncentracija buvo mažesnė – dažniausiai iki 1 KSV/ml, tačiau užterštose vietose gali siekti ir iki 10^3 – 10^6 KSV/ml. Dažniausiai aptinkamos rūšys – *R. diobovata*, *R. mucilaginosa* ir *S. roseus*. Apibendrinant, gėlame vandenyje mielių yra daugiau ir jų įvairovė didesnė, o sūriame – mažesnė koncentracija ir dominuoja druskingumui atsparios (halotolerantiškos) rūšys, tokios kaip *R. mucilaginosa*.

Stebėti statistiškai reikšmingi ($p < 0,001$) skirtumai tarp jūros ir upės vandens mielių rūšinės sudėties. Jūros vandenyje daugiausia aptikta *Aureobasidium*, *Candida*, *Filobasidium*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Pichia*, *Rhodotorula* ir *Sporobolomyces* gentims priklausančių mielių rūšių, o upės vandenyje – *Cystofilobasidium*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Saccharomycopsis* gentims priskiriamų mielių rūšių. Literatūros duomenimis, jūros vandenyje yra dažnai aptinkamos *Candida*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* ir *Yarrowia* gentims priklausančios mielės (Buzzini ir kt., 2021). Įvairių gėlo vandens telkinių tyrimų rezultatų palyginimas atskleidė skirtingą mielių rūšių pasiskirstymą vandens šaltiniuose. Didžiausia rūšių įvairovė nustatyta Neries upės vandenyje, kuriame aptiktas didžiausias rūšių skaičius (25 rūšys), o mažiausia – tekstilės chemikalų valymo įrenginių vandenyje (8 rūšys), kur dominavo pavienės, specifinėms sąlygoms prisitaikiusios rūšys. Visiems tirtų vietų ėminiams bendra buvo tik viena rūšis – *Cutaneotrichosporon mucoides*, rodanti jos gebėjimą prisitaikyti prie skirtingų aplinkos sąlygų.

Apibendrinant šiame darbe aprašomų įvairių atropogenizuoto dirvožemio ėminių tyrimų rezultatus, nustatyta, kad daugiausia buvo išskirta *Basidiomycota* skyriui priskiriamų mielių rūšių. Literatūros duomenimis, *Basidiomycota* skyriaus mielės yra labiau paplitusios dirvožemiuose su didesniu organinių medžiagų kiekiu (pvz. miško dirvožemyje). Šiems tyrimams dirvožemis dažniausiai buvo imamas iš miškingų vietovių ir žemės ūkio paskirties teritorijų, todėl gauti rezultatai atitinka literatūros šaltiniuose pateikiamą informaciją (Challacombe ir kt., 2019). Dirvožemio ėminiuose daugiausia buvo aptikta *Aureobasidium*, *Candida*, *Cystofilobasidium*, *Cryptococcus*, *Cutaneotrichosporon*, *Goffeauzyma*, *Issatchenkia*, *Komagataella*, *Meyerozyma*, *Naganishia*, *Solicoccozyma*, *Tausonia*, *Trichosporon*, *Vanrija* gentims priskiriamų mielių rūšių, o vandens ėminiuose *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Kazachstania*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* gentims priskiriamų mielių rūšių ($p < 0,001$). Literatūroje nurodoma, kad dažniausiai dirvožemyje yra aptinkamos *Candida*, *Naganishia*, *Rhodotorula* ir *Solicoccozyma* gentims priskiriamos mielių rūšys (Carvalho ir kt., 2020), o vandens ėminiuose *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* ir *Rhodotorula* genčių mielės (Libkind ir kt., 2017, Brandão ir kt., 2020; Yu ir

kt., 2023). Naftos angliavandeniliais užterštame dirvožemyje daugiausia aptikta *Cystofilobasidium*, *Exophiala*, *Naganishia*, *Rhodotorula* ir *Tausonia* gentims priklausančių mielių, o neužterštame – *Candida*, *Cryptococcus*, *Cutaneotrichosporon*, *Issatchenkia*, *Komagataella*, *Pichia* ir *Solicoccozyma* gentims priskiriamų mielių. Šios mielių rūšys gebėjo asimiliuoti naftos angliavandenilius. Literatūros duomenimis naftos angliavandeniliais užterštame dirvožemyje gali būti aptinkama gana plati mielių genčių įvairovė, tačiau kelios iš dažniausiai aptinkamų mielių genčių yra *Yarrowia*, *Rhodotorula* ir *Exophiala* (Gostinčar ir kt., 2009; Das ir Chandran, 2011; Kumari ir Jayanthi, 2011; Zarandi ir Harzevili, 2021). Šiame darbe aprašomų tyrimų metu iš tirtų dirvožemių buvo išskirta šioms gentims priskiriamų mielių rūšių, tokių kaip *Exophiala xenobiotica*, *Rhodotorula diobovata* ir *Rhodotorula mucilaginosa*.

Atliktų tyrimų metu nustatyta, kad didžiausia dalis išskirtų mielių rūšių nepasižymėjo anglies šaltinių fermentacija. Literatūros duomenimis (Kurtzman ir kt., 2011; Maicas, 2020), mielės gana stipriai skiriasi savo gebėjimu fermentuoti anglies šaltinius. Pavyzdžiui, tokios rūšys kaip *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* ir *Zygosaccharomyces* stipriai fermentuoja gliukozę ir kitus angliavandenius, o kitos mielių rūšys anglies šaltinius fermentuoja silpnai, arba visai nefermentuoja (Kurtzman ir kt., 2011). Taip pat buvo įvertintas mielių gebėjimas asimiliuoti anglies šaltinius. Dažniausiai asimiliuojamas anglies šaltinis buvo gliukozė, o rečiausiai – metanolis. Literatūros duomenimis, daugybė mielių geba asimiliuoti įvairius anglies šaltinius, bet nebūtinai turi gebėjimą juos fermentuoti (Kurtzman ir kt., 2011; Lok ir kt., 2021). Šiame darbe aprašomų tyrimų metu iš gamtinės aplinkos išskirtos mielių rūšys dažniausiai asimiliavo gliukozę, greičiausiai dėl to, kad gliukozė yra labiausiai gamtoje paplitęs monosacharidas ir visos, ar beveik visos kultivuojamos mielių rūšys geba ją įsisavinti. Šių tyrimų reikšmė slypi tame, kad fermentacijos ir asimiliacijos gebėjimų analizė leidžia atskirti skirtingas mielių rūšis pagal jų metabolinius ypatumus ir nustatyti potencialiai biotechnologiškai reikšmingas rūšis. Be to, gauti duomenys padeda suprasti, kaip mielės dalyvauja organinių junginių skaidymo procesuose antropogeninės taršos paveiktoje aplinkoje, ir leidžia įvertinti jų potencialą bioremediacijai bei kitoms taikomosioms sritims, kur svarbus efektyvus organinių medžiagų skaidymas.

Mielių gebėjimo augti esant skirtingoms aplinkos temperatūroms tyrimų metu nustatyta, jog didžiausia mielių dalis gebėjo augti esant 19,0°C ir 25,0°C (100%) aplinkos temperatūrai, tačiau nei viena mielių rūšis neaugo esant 45,0°C temperatūrai. Literatūros duomenimis (Moreira ir kt., 2020), mielės geriausiai auga esant 20,0–28,0°C temperatūrai. Kai kurios mielės, paplitusios

specifinėje aplinkoje, geba augti esant žemesnėms, arba aukštesnėms aplinkos temperatūroms. Mielės, aptinkamos poliariniuose regionuose, prastai auga esant 20,0°C temperatūrai, tačiau pasižymi puikiu augimu, esant 4,0–15,0°C temperatūrai. Žinduolių organizmuose aptinkamos mielės (pvz. *Cyniclomyces guttulatus*) geriausiai auga esant 35,0–37,0°C temperatūrai, tačiau kai kurių iš jų (pvz. *Malassezia furfur*) optimali augimo temperatūra yra 30,0–35,0°C. Mielių padermės, priklausančios *Candida*, *Lachancea*, *Ogataea*, *Pichia*, *Trichosporon* gali augti iki 42,0°C (ekstremotolerantai), ar net šiek tiek aukštesnės temperatūros aplinkoje (Moreira ir kt., 2020). Šių tyrimų rezultatai yra svarbūs siekiant įvertinti iš antropogenizuotų substratų išskirtų mielių fiziologines savybes ir jų prisitaikymo prie aplinkos sąlygų ribas. Nustatyta optimali augimo temperatūra (19,0–25,0 °C) atitinka mezofilinėms rūšims būdingas vertes, o tai rodo, kad dauguma tirtų mielių yra prisitaikiusios prie vidutinių klimato sąlygų ir aplinkos temperatūrų, būdingų dirvožemio bei vandens ekosistemoms Lietuvoje. Šie duomenys leidžia geriau suprasti tirtų mielių ekologinį vaidmenį ir jų išlikimo strategijas antropogeninės taršos paveiktose teritorijose. Be to, temperatūrinio augimo profilio nustatymas yra svarbus atrenkant mikroorganizmų padermes, kurios gali būti naudojamos biotechnologiniuose ar bioremediacijos procesuose, kuriuose būtinas stabilus mikroorganizmų aktyvumas kintančios temperatūros sąlygomis.

Vertinant mielių gebėjimą augti esant skirtingam terpės pH, pastebėta, kad dauguma mielių (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Solicoccozyma* ir kt.) geriausiai augo esant pH 4,0–7,0, tačiau tik pavienės mielių rūšys gali augti esant rūgštiniam (pH 3,0, pvz., *Aureobasidium*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Komagataella*, *Pichia*) ir šarminiam (pH 8,0, pvz., *Aureobasidium*, *Candida*, *Komagataella* sp.) pH. Mielės, augusios esant rūgštiniam (pH 3,0) ir šarminiam (pH 8,0) pH, galėtų būti priskiriamos ekstremotolerantams. Literatūros šaltiniuose yra nurodoma, kad dauguma mielių geriausiai auga esant pH 4,5–6,5, tačiau kai kurios mielių rūšys geba augti ir labiau rūgštinėje ar šarminėje aplinkoje (Yalçın ir Yesim, 2008; Thongekkaew ir Kongsanthia, 2016). Šie tyrimai yra reikšmingi siekiant įvertinti mielių ekologinį plastiškumą ir gebėjimą prisitaikyti prie skirtingų aplinkos sąlygų, ypač antropogeninės taršos paveiktose teritorijose, kur pH reikšmės gali svyruoti. Pavienių rūšių gebėjimas augti tiek rūgštinėje, tiek šarminėje terpėje rodo jų aukštą prisitaikymo potencialą ir galimą reikšmę biotechnologiniuose bei bioremediacijos procesuose, kuriuose mikroorganizmai veikia kintančio pH sąlygomis.

Tiriant mielių išskiriamus metabolitus buvo nustatyta, jog celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo 38,53% mielių, amilaziniu – 40,37% mielių izoliatų. Abiem minėtais fermentiniais aktyvumais pasižymėjo iki 3,00% mielių, o nei

vienu iš jų – iki 9,00% mielių. Įvairių autorių duomenimis (Manguwardoyo ir kt., 2011) apie 6,00–55,00%, iš dirvožemio išskirtų mielių pasižymi celiuliaziniu aktyvumu. Yalçın H. T. ir Çorbacı C. (2013) atlikto tyrimo metu amilaziniu aktyvumu pasižymėjo 48,00% tirtų mielių izoliatų. Gauti rezultatai yra svarbūs vertinant mielių fermentinį aktyvumą ir jų potencialą taikant biotechnologiniuose ar aplinkosauginiuose procesuose. Celiuliazinį ir amilazinį aktyvumą turinčios mielės gali dalyvauti sudėtingų organinių junginių, tokių kaip celiuliozė ar krakmolas, skaidyme, taip prisidedamos prie organinių medžiagų apykaitos ir biogeocheminių ciklų palaikymo aplinkoje. Šių fermentinių savybių nustatymas leidžia identifikuoti rūšis, kurios gali būti naudojamos pramoninėse biotransformacijos ar bioremediacijos technologijose, kur reikalingas aktyvus organinių junginių skaidymas.

Mielės yra plačiai naudojamos įvairių natūralių ir sintetinių substratų biodegradacijos procesuose. Šio tyrimo metu buvo atlikti naftos angliavandenilius oksiduojančių, šalutinius žemės ūkio produktus skaidančių ir sunkiuosius metalus bioakumuliuojančių mielių tyrimai.

Iš naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio ėminių buvo išskirti naftos angliavandenilius oksiduojančių mielių izoliatai, kurie buvo indentifikuoti, atrinktos 4 aktyviausios mielių padermės (*Y. lipolytica*, *R. diobovata*, *R. mucilaginosa*, *S. roseus*). Panaudojant šias mieles ir iš VMTI GTC BTL kolekcijos paimtas 3 mikroskopinių grybų padermes (*P. dierckxii*, *S. kiliense*, *T. longibrachiatum*) ir 6 bakterijų padermes (*A. baumannii*, *K. oxytoca*, *P. brassicacearum*, *P. koreensis*, *R. fascians*), buvo suformuoti įvairūs biopreparatų variantai. Bandymui buvo panaudoti visų trijų taksonominių grupių mikroorganizmai, nes remiantis literatūros duomenimis žinoma (Bergauer ir kt., 2005; Chamkha ir kt., 2011; Fan ir kt., 2014), kad skirtingų taksonominių grupių mikroorganizmai dalyvauja skirtingų naftos angliavandenilių frakcijų biodegradacijos procesuose. Suformuoti biopreparato variantai buvo išbandyti laboratorinėmis ir lauko sąlygomis. Skirtingi biopreparato variantai modelinėmis laboratorinėmis sąlygomis naftos angliavandenilių kiekį dirvožemyje sumažino 44,7– 87,7%. Bandymams lauko sąlygomis buvo pasirinktas efektyviausias laboratorinėmis sąlygomis atrinktas biopreparato variantas, sudarytas iš visų trijų taksonominių grupių mikroorganizmų. Šis biopreparatas naftos angliavandenilių kiekį bandymo variantuose sumažino atitinkamai 56,8% ir 60,9%. Tirtuose dirvožemio kaupuose lauko sąlygomis buvo nustatytas mikroorganizmams toksiškas 5,0% (48,0 ir 50,0 g/kg) naftos angliavandenilių kiekis. Autoriai (Bergauer ir kt., 2005; Chamkha ir kt., 2011; Fan ir kt., 2014) nurodo, kad didelės naftos angliavandenilių koncentracijos gali pažeisti mikroorganizmų ląstelių membranas, slopinti fermentų veiklą ir trikdyti

metabolinius procesus. Nepalankiomis mikroorganizmų augimui sąlygomis gauti tyrimų rezultatai parodė, kad atrinktas biopreparatas efektyviai vykdo naftos angliavandenilių biodegradaciją dirvožemyje esant iki 5,0% naftos angliavandenilių kiekiui. Įvairių autorių darbuose minimas naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio biologinio valymo metu pašalintas naftos angliavandenilių kiekis svyravo nuo 7,4% iki 76,7%. Minėtuose tyrimuose pradinis angliavandenilių kiekis buvo skirtingas ir sudarė 1,0-5,0%. Dalis autorių tyrė bendro naftos angliavandenilių kiekio sumažėjimą, o kiti – konkrečių angliavandenilių frakcijų. Biopreparatų sudėtis taip pat buvo skirtinga (Bergauer ir kt., 2005; Chamkha ir kt., 2011; Fan ir kt., 2014). Šių tyrimų rezultatai yra reikšmingi vertinant mikroorganizmų rinkinių (biopreparatų), sudarytų iš mielių, mikroskopinių grybų ir bakterijų, taikymo galimybes bioremediacijos procesuose. Parodyta, kad iš skirtingų taksonominių grupių mikroorganizmų sudaryti biopreparatai gali užtikrinti efektyvesnę naftos angliavandenilių skaidymą nei pavienės mikroorganizmų padermės, nes jie pasižymi skirtingais metaboliniais keliais ir fermentinėmis sistemomis. Aukštas biodegradacijos efektyvumas (iki 87,65 % laboratorinėmis sąlygomis ir iki 60,90 % lauko sąlygomis) rodo didelį atrinkto biopreparato potencialą taikymui praktikoje. Be to, gauti duomenys svarbūs biotechnologijų ir aplinkosaugos srityse, nes jie patvirtina, kad tikslingai parinkti mikroorganizmų rinkiniai gali būti veiksmingai taikomi naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio biologiniam valymui net esant aukštai teršalų koncentracijai.

Siekiant nustatyti mielių panaudojimo žemės ūkio šalutinių produktų (kviečių šiaudų ir kanapių stiebų) biodestrukcijai galimybes, buvo atliekami bandymai su kviečių ir kanapių substratais, nustatant mielių ir kitų mikroorganizmų veiklos sąlygotą lignino ir celiuliozės kiekio sumažėjimą (%). Lignino ir celiuliozės biodegradacijos tyrimų metu buvo nustatyta, kad didžiausios lignino ir celiuliozės skaidymo apimtys buvo pasiektos esant 30 parų bandymo trukmei. Po 30 parų inkubacijos geriausi lignino skaidymo rezultatai buvo stebėti kanapių substrate (12,89%) su *T. rossicum* ir mielių mišiniu, į kurį buvo pridėtas mineralinių medžiagų mišinys ir 0,10% gliukozės bei kviečių substrate su mielių ir mineralinių medžiagų mišiniais (59,39%). Madadi M. ir Abbas A. (2017) nurodo, jog įvairios mikroskopinių grybų rūšys per 35 dienas kviečių substrate lignino kiekį gali sumažinti 22,60–35,00%. Bautista-Guerrero A. ir kt. (2022) teigia, jog jų sukurtas mielių biopreparatas per 25 dienas lignino kiekį augalinėje medžiagoje gali sumažinti 36,00%, o aktyviausia išskirta mielių *N. albida* padermė suskaidė 27% lignino per 4 dienas. Mūsų išskirtos mielių ir *T. rossicum* padermės per 15 parų suskaidė 10,72% kanapių lignino ir 28,20% kviečių lignino. Didžiausias celiuliozės

kiekio sumažėjimas po 30 parų inkubacijos buvo stebėtas mėginyje su kanapių substratu (50,56%), *T. rossicum* ir mineralinių medžiagų mišiniu bei mėginyje su kviečių substratu (64,92%), mielių mišiniu ir 0,10% gliukozės. Knežević N. ir kt. (2021) atliktų tyrimų rezultatai parodė, jog įvairių rūšių mikroskopiniai grybai gali suskaidyti 13,20–50,20% celiuliozės per 15 dienų ir 29,60–62,00% celiuliozės per 19 dienų. Šiame darbe aprašomi tyrimų rezultatai rodo, kad mikroorganizmų sąveika kartu su papildomais mitybiniais komponentais reikšmingai padidina lignino ir celiuliozės biodegradacijos efektyvumą, o gauti duomenys sutampa su kitų autorių (Madadi & Abbas, 2017; Bautista-Guerrero ir kt., 2022; Knežević ir kt., 2023) nustatytomis tendencijomis. Šie tyrimų rezultatai yra reikšmingi vertinant mielių ir kitų mikroskopinių grybų potencialą žemės ūkio šalutinių produktų biodestrukcijai bei tvaraus biologinio perdirbimo technologijų plėtrai. Nustatyta, kad mikroorganizmų sąveika, ypač derinant mieles su mikroskopiniais grybais ir papildomais mitybiniais komponentais, ženkliai padidina lignino ir celiuliozės skaidymo efektyvumą. Tai rodo, kad iš tokių mikroorganizmų sudaryti biopreparatai gali būti efektyviai taikomi biomasės konversijos, kompostavimo ir kt. procesuose.

Siekiant įvertinti mielių gebėjimą kaupti chromo junginius (CrCl_3), laboratorinėmis sąlygomis buvo atliekami chromo bioakumuliacijos bandymai, panaudojant mieles ir kitus mikroorganizmus. Remiantis įvairių literatūros šaltinių duomenimis (Ayele ir Godeto, 2021), mūsų tyrimams atlikti buvo pasirinktos iš Klaipėdos miesto chromu užteršto dirvožemio ėminių išskirtos mikroorganizmų padermės: *B. subtilis* (bakterija), *C. jadinii* (mielė), *P. chrysogenum* (mikroskopinis grybas), *R. mucilaginosa* (mielė), ir *S. terreus* (mielė). Iš visų tirtų mikroorganizmų padermių didžiausia chromo bioakumuliacija pasižymėjo *B. subtilis*, sukaupusi 89,80% 10,00 mg/l koncentracijos chromo chlorido tirpale esančio chromo per 24 valandas. Per dvi valandas ši bakterija sukaupė 79,50% chromo buvusio minėtame tirpale. Taip pat, aktyviai chromą kaupė ir mielės *R. mucilaginosa*, per 24 val. sukaupusi 43,40% chromo, buvusio 10,00 mg/l tirpale. Mielės *C. jadinii* per 2 valandas sukaupė 0,90%, o per 24 valandas – 2,00% tirpale buvusio chromo. Visi likę mikroorganizmai reikšmingu chromo kiekiu kaupimu nepasižymėjo. 100,00 mg/l koncentracijos chromo tirpale bioakumuliacijos procesas nevyko. Yifeng Z. (2021) duomenimis, įvairios *Bacillus* genties bakterijų rūšys geba iš aplinkos pašalinti 75,00–99,00% joje esančio chromo kiekio per 5–72 valandas. Bahafid W. ir kt. (2017) duomenimis, įvairios *Candida* genties mielių rūšys gali sukaupti iki 29,10% 100,00 mg/l chromo tirpalo esančio chromo esant 2,00 g/l jų biomasės koncentracijai. Mūsų atlikto tyrimo metu taip pat buvo naudota 2,00 g/l biomasės koncentracija, tačiau skyrėsi

bioakumuliacijos efektyvumas. Šių tyrimų rezultatai yra svarbūs vertinant skirtingų mikroorganizmų (mielių ir bakterijų) gebėjimą kaupti sunkiuosius metalus bei jų potencialą taikymui aplinkos valymo procesuose.

IŠVADOS

1. Iš antropogenizuoto dirvožemio ir vandens buvo išskirtos 109 mielių rūšys, kurios priklausė 53 gentims, 26 šeimoms, 14 eilių ir 9 klasėms. Nustatyta, kad 40,39% išskirtų mielių rūšių priklausė *Ascomycota* skyriui ir 59,61% priklausė *Basidiomycota* skyriui, daugiausia išskirta *Rhodotorula* genties mielių (24,62%), dominavo *Rhodotorula mucilaginosa* (19,36%).
2. Nustatyta, kad 83,46% tirtų mielių rūšių nepasižymėjo angliavandenių fermentacija. Gliukozė buvo dažniausiai fermentuojamas (30,15%) ir asimiliuojamas (100%) anglies šaltinis. Plačiausiu asimiliaciniu spektru pasižymėjo *Aureobasidium pullulans* (85,00%), *Cutaneotrichosporon mucoides* (85,00%), *Exophiala xenobiotica* (82,50%) ir *Vanrija humicola* (82,50%), o siauriausiu – *Candida glabrata* (5,00%). Celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo 38,21%, o amilaziniu aktyvumu 40,00% išskirtų mielių rūšių.
3. Išaiškinta, kad iš antropogeninės veiklos paveiktų substratų išskirtos mielės augo esant 5,0–40,0°C temperatūrai. Esant 40,0°C aplinkos temperatūrai augo tik *Cutaneotrichosporon mucoides* rūšies padermės. Mielės augo pH 3,0–8,0 ribose.
4. Sukurtas ir patentuotas biopreparatas (LT Nr. 7087 B), sudarytas iš mielių ir kitų taksonominių grupių mikroorganizmų, kuris lauko sąlygomis sumažino naftos agliavandenių kiekį valomame grunte iki 60,90%.
5. Nustatyta, kad efektyviausiai lignino skaidymas vyko kviečių substrate su mielių ir mineralinių medžiagų mišiniu (59,39%) bei kanapių substrate su *Trichoderma rossicum*, mielių, mineralinių medžiagų mišiniu ir gliukoze (12,89%) po 30 parų. Celiuliozės skaidymas buvo efektyviausias kviečių substrate su mielių mišiniu ir gliukoze – 64,92% bei kanapių substrate su *T. rossicum* ir mineralinių medžiagų mišiniu – 50,56%.
6. Išaiškinta, kad *Rhodotorula mucilaginosa* (43,40%) ir *Bacillus subtilis* (89,80%) buvo efektyviausiai trivalentį chromo junginį (CrCl_3) kaupiantys mikroorganizmai.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Achife, C. E., Ijah, U. J. J., Bala, J. D., Oyeleke, S. B., Microbial population of soil and water around oil depot Suleja, Nigeria, and their hydrocarbon utilization. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(1), 2021, 90-113. <https://doi.org/10.38001/ijlsb.791853>;
2. Aibeche, C., Selami, N., Zitouni-Haouar, F. E. H., Oeunzar, K., Addou, A., Kaid-Harche, M., Djabeur, A., Bioremediation potential and lead removal capacity of heavy metal-tolerant yeasts isolated from Dayet Oum Ghellaz Lake water (northwest of Algeria). *International Microbiology*, 25(1), 2022, 61–73. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00191-z>;
3. Ayele, A., Godeto, Y. G., Bioremediation of chromium by microorganisms and its mechanisms related to functional groups. *Journal of Chemistry*, 2021 (2), 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/7694157>;
4. Alami, N. H., Maulidiya, L. L., Kuswytasari, N. D., Zulaika, E., Shovitri, M., The potential of yeasts from the oil-contaminated soil and mangrove rhizosphere for degrading crude oil. *Biodiversitas*, 20(7), 2019, 1833–1838. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200707>;
5. Al-Battashi, H., Joshi, S. J., Pracejus, B., Al-Ansari, A., The geomicrobiology of chromium (VI) pollution: Microbial diversity and its bioremediation potential. *The Open Biotechnology Journal*, 10(1), 2016, 379–389. <https://doi.org/10.2174/1874070701610010379>;
6. Al-Dhabaan, F. A., Isolation and identification of crude oil-degrading yeast strains from Khafji oil field. Saudi Arabia, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(10), 2021, 5786–5792. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.030>;
7. Al-Saadoon, A. H., Ali, N. M. J., Ali, L. H., Al-Badran, A. I., Effect of some ecological factors on occurrence of yeasts in soil and sediment from Iraq. *Biomedicine and Chemical Sciences*, 3(1), 2022, 117–125. <https://doi.org/10.48112/bcs.v1i3.240>;
8. Amprayn, K. O., Rose, M. T., Kecskés, M., Pereg, L., Nguyen, H. T., Kennedy, I. R., Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology*, 61, 2012, 295–299. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.009>;
9. Anuradha K., Laboratory manual for: microbiological method. Department of Biotechnology, Veerashaiva College, Balari, 2022, 19. https://veerashaivacollege.org/images/Biotechnology_2nd_sem_manual.pdf

10. Ashkanani, Z., Mohtar, R., Al-Enezi, S., Smith, P. K., Calabrese, S., Ma, X., Abdullah, M., AI-assisted systematic review on remediation of contaminated soils with PAHs and heavy metals. *Journal of Hazardous Materials*, 468, 2024, 133813. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133813>;
11. Avery, S. V., Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Advances in Applied Microbiology*, 49, 2001, 111–142. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(01\)49011-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(01)49011-3);
12. Babič, M. N., Zalar, P., Ženko, B., Džeroski, S., Gunde-Cimerman, N., Yeasts and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances. *Fungal Ecology*, 20, 2016, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.10.001>;
13. Bahafid, W., Joutey, N. T., Asri, M., Sayel, H., Tirry, N., Ghachtouli, N. E., Yeast biomass: An alternative for bioremediation of heavy metals. *Yeast - Industrial Applications*. InTechOpen, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70559>;
14. Bakshi, A., Panigrahi, A. K., Chromium contamination in soil and its bioremediation: An overview, Malik J. A., *Advances in bioremediation and phytoremediation for sustainable soil management*. Springer, 2022, 229–248. https://doi.org/10.1007/978-3-030-89984-4_15;
15. Bauer, F., Pretorius, I., Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 21(1), 2000, 27-51. <https://doi.org/10.21548/21-1-3557>;
16. Bautista-Guerrero A., Lara-Diaz R. A., Pihen V., Bandala E.R., Sanchez-Sala, J.L., Isolation and test of novel yeast strains with lignin usage capability and phenolic compound resistance. *MicrobiologyOpen*, 11, 2022. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1326>;
17. Benmessaoud S., Kara M., Assouguem A., El Asmi H., Biotypology of Yeast in Soils Polluted by Hydrocarbons in Fez-Meknes Region, Morocco. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 2021, 1606–1613. <https://www.tjnpr.org/index.php/home/article/view/414>;
18. Beopoulos, A., Desfougeres, T., Sabirova, J., Zinjarde, S., Neuvéglise, C., Nicaud, J.-M. The hydrocarbon-degrading oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. In: TIMMIS, K. N., ed. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010, p. 2111–2121. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_152;
19. Bergauer P., Fonteyne P. A., Nolard N., Schinner F., Margesin R., Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by

- psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts, *Chemosphere*, 59(7), 2005, 909–918, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.011>;
20. Biedunkiewicz, A., Dynowska, M., Ejdyś E., Sucharzewska E., Species diversity of yeast-like fungi in some eutrophic lakes in Olsztyn, *Acta Mycologica*, 48, 2013, 61–71. <https://doi.org/10.5586/am.2013.008>;
 21. Boekhout, T., Amend, A. S., El Baidouri, F., Gabaldón, T., Geml, J., Mittelbach, M., Robert, V., Tan, C. S., Turchetti, B., Vu, D., Wang, Q. M., Yurkov, A. Trends in yeast diversity discovery. *Fungal Diversity*, 114, 1, 2022, 491–537. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>;
 22. Botha, A., The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 1, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.001>;
 23. Boz D. T., Yalçın H. T., Çorbacı C., Uçar F. B., Polisiklik aromatik hidrokarbonları parçalayan mayaların taranması ve moleküler karakterizasyonu. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(2), 2015, 105–110. <https://doi.org/10.5505/tjb.2015.16023>
 24. Braga R. M., Dourado M. N., Araújo W. L., Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 1, 2016, 86-98. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>;
 25. Brandão, L. R., Barbosa, A. C. R., Barbosa, F. A. R., Rosa, C. A., Aquatic yeasts: Diversity, characteristics, and potential applications. *Journal of Water and Health*, 18(2), 2020, 91–107. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.270>;
 26. Broach J. R., Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics*, 192, 1, 1, 2012, 73–105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>;
 27. Buzzini, P., Lachance, M. A., Yurkov, A., Yeasts in natural ecosystems: Ecology, *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*. Springer International Publishing, 2017, <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2>;
 28. Buzzini, P., Turchetti, B., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D’Agata, C., Onofri, S., Yeasts in polar and alpine habitats: Biodiversity, adaptation strategies, and biotechnological potential. *Journal of Fungi*, 14(4), 134, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof14040134>;
 29. Cadete, R. M., Lopes, M. R., Rosa, C. A. Yeasts associated with decomposing plant material and rotting wood. In: Buzzini, P., Lachance, M.-A., Yurkov, A., eds. *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Cham: Springer International Publishing, 2017, p. 265–292. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_9;
 30. Carrasco M., Villarreal P., Barahona S., Alcaíno J., Cifuentes V., Baeza M., Screening and characterization of amylase and cellulase activities in

- psychrotolerant yeasts, *BMC Microbiology*, 16(1), 2016. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0640-8>;
31. Carvalho, T. S., de Souza, S. R., Gomes, M. L., Yeast diversity in Brazilian Cerrado soils and its potential use for soil quality monitoring. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 44, 2020. <https://doi.org/10.36783/18069657rbc20200097>;
 32. Celia R., Černáková L., Farnesol and Tyrosol: Secondary Metabolites with a Crucial quorum-sensing Role in Candida Biofilm Development, *Genes*, 11, 2020. <https://doi.org/10.3390/genes11040444>;
 33. Challacombe, J. F., Hesse, C. N., Bramer, L. M., McCue L. A., Lipton M., Purvine S., Nicora C., Gallegos-Graves L. V., Porras-Alfaro A., Kuske C. R., Genomes and secretomes of Ascomycota fungi reveal diverse functions in plant biomass decomposition and pathogenesis. *BMC Genomics*, 20, 976, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6358-x>;
 34. Chamkha M., Trabelsi Y., Mnif S., Sayadi S., Isolation and characterization of Klebsiella oxytoca strain degrading crude oil from a Tunisian off-shore oil field. *Journal of Basic Microbiology*, 51 (6), 580, 2011. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100073>;
 35. Chang C.F., Lee C.F., Lin K.Y., Liu S.M., Diversity of yeasts associated with the sea surface microlayer and underlying water along the northern coast of Taiwan. *Research in Microbiology*, 167(1), 2015, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.08.005>;
 36. Chudiakova C. K., Determination of the lignin content in fodder and green crop. *Selskochoziaistvenaja Biologiya*, 8, 1984, 120-124;
 37. Cogliati M., Arikan-Akdagli S., Barac A., Bostanaru A. C., Brito S., Çerikçioğlu N., Efstratiou M. A., Ergin Ç., Esposto M. C., Frenkel M., Gangneux J. P., Gitto A., Gonçalves C. I., Guegan H., Gunde-Cimerman N., Güran M., Jonikaitė E., Kataržytė M., Klingspor L., Mares M., Meijer W. G., Melchers W. J. G., Meletiadis J., Nastasa V., Novak Babič M., Ogunc D., Ozhak B., Prigitano A., Ranque S., Romanò L., Rusu R. O., Sabino R., Sampaio A., Silva S., Stephens J. H., Tehupeiory-Kooreman M., Velegraki A., Veríssimo C., Segal E., Brandão J., Environmental and bioclimatic factors influencing yeasts and molds distribution along European shores. *Science of The Total Environment*, 859, 1, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160132>;
 38. Coulon F., Dellile D., Effects of Biostimulation on Growth of Indigenous Bacteria in Sub-Antarctic Soil Contaminated with Oil Hydrocarbons. *Oil & Gas Science and Technology - Revue d'IFP Energies nouvelles*, Institut

- Français du Pétrole (IFP), 58 (4), 2003, 469-479. <https://doi.org/10.2516/ogst:2003030>;
39. Čekuolytė K., Šapaitė D., Žemgulytė E., Gudiukaitė R., Lastauskienė E., Induction of Apoptosis with Silver Nanoparticles Obtained Using Thermophilic Bacteria. *J. Funct. Biomater.* 2024, 15, 142. <https://doi.org/10.3390/jfb15060142>;
 40. Čyžius G., Stankevičius Ž. Vilniaus miesto dirvožemio ir grunto monitoringo rezultatai 2023 metais. Ataskaita. Vilnius: UAB „DGE Baltic Soil and Environment“, 2023. Prieiga per internetą: <https://aplinka.vilnius.lt/wp-content/uploads/2023/10/vilniaus-dirvozemio-monitroringas-2023.pdf> [žiūrėta 2026-02-16].
 41. Čyžius G., Stankevičius Ž., Vilniaus m. sav. dirvožemio ir grunto monitoringo rezultatai 2020 metais. UAB „DGE Baltic Soil and Environment“, 2021. Prieiga per internetą: https://aplinka.vilnius.lt/wp-content/uploads/2021/05/2020_dirvozemio_monitroringas_zip.pdf [žiūrėta 2026-02-16].
 42. Dailidavičienė J., Budreckienė R., Gružauskas R., Kerzienė S., Andrulevičiūtė V., Sinkevičienė I., The influence of probiotic additives or multienzyme composition on blood biochemical parameters and milk quality of Lithuanian Black-and-White cattle. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2018, 70(3), 701-707. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9567>;
 43. Das N., Chandran P., Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview, *Biotechnology Research International*, 2011, 2011, 13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>;
 44. Deák, T. Environmental factors influencing yeasts. In: Péter, G., Rosa, C., eds. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006, p. 155–174. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_8;
 45. Decker, C., Simmons, K. Surface water sampling: Operating procedure. Athens, GA: US Environmental Protection Agency, Science and Ecosystem Support Division, 2013. Prieiga per internetą: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/Surfacewater-Sampling.pdf> [žiūrėta 2026-02-16].
 46. Di Serio M., Aramo P., de Alteriis E., Tesser R., Santacesaria E., Quantitative Analysis of the Key Factors Affecting Yeast Growth. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42 (21), 2003, 5109-5116. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ie030078z>;

47. DURA, S. MALDI TOF mass spectrometry: Principle, methodology and applications. The Science Notes, 2020. Prieiga per internetą: <https://thesciencenotes.com/maldi-tof-mass-spectrometry-principle-methodology-and-applications/> [žiūrėta 2026-02-16].
48. Dzialo M. C., Park R., Steensels J., Lievens B., Verstrepen K. J., Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. FEMS Microbiology Reviews, 1, 41(1), 2017, S95-S128. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux031>;
49. Evans F. F., Rosado A. S., Sebastian G. V., Casella R., Machado P. L., Holstrom C., Kjelleberg S., Elsas J. D., Seldin L., Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. FEMS Microbiology, 49 (2), 2004, 295-305. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.007>;
50. Fan M., Xie R., Qin G., Bioremediation of oilcontaminated soil by a combined system of biostimulation bioaugmentation with yeast. Environmental technology, 35, 2014, 391-399. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.829504>;
51. Ferronato N., Torretta V. Waste Mismanagement in Developing Countries: A Review of Global Issues. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2019; 16(6):1060. <https://doi.org/10.3390/ijerph16061060>;
52. Gadanh M., Sampaio J. P., Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. FEMS Yeast Research, 5(3), 2005, 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.001>;
53. Garcia-Rubio R., de Oliveira H. C., Rivera J., Trevijano-Contador N., The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. Frontiers in Microbiology, 9, 10, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>;
54. Gargouri B., Mhiri N., Karray F., Aloui F., Sayadi S., Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater. BioMed Research International, 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/929424>;
55. Gluth A., Pu Y., Hu D., Chen X., Johnson Z., Li X., Ragauskas A., Qian W.-J., Zhang T., Yang B. Exploring the ligninolytic capabilities of the oleaginous yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosum*. Research Square, 2025. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-6335743/v1>;
56. Gostinčar C., Grube M., De Hoog S., Zalar P., Gunde-Cimerman, N., Extremotolerance in fungi: Evolution on the edge. FEMS Microbiology

- Ecology, 71(1), 2009, 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00794.x>;
57. Groenewald M., Lombard L., de Vries M., Lopez A. G., Smith M., Crous P. W., Diversity of yeast species from Dutch garden soil and the description of six novel Ascomycetes. FEMS Yeast Research, 18(7), 2018. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy076>;
 58. Hakima A., Ian S., Isolation of Indigenous Hydrocarbon Transforming Bacteria from Oil Contaminated Soils in Libya: Selection for Use as Potential Inocula for Soil Bioremediation. International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation, 5 (1), 8, 2017, 8-17. <https://doi.org/10.12691/ijebb-5-1-2>;
 59. Hassett B. T., Vonnahme T. R., Peng X., Jones E. B. G., Heuzé C. Global diversity and geography of planktonic marine fungi. Botanica Marina, 2020, vol. 63, no. 2, p. 121–139. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.1515/bot-2018-0113> [žiūrėta 2026-02-16].
 60. Hegazy G. E., Soliman N. A., Farag S., El-Helow E. R., Hassan H. Y., Abdel-Fattah Y. R., Correction: Isolation and characterization of *Candida tropicalis* B: a promising yeast strain for biodegradation of petroleum oil in marine environments. Microbial Cell Factories, 23(1), 2024. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02292-y>;
 61. Hlihor R., Gavrilesco M., Biosorption of heavy metals from the environment using yeasts as biosorbents. Bulletin of the Polytechnic Institute of Iasi, Section Chemistry and Chemical Engineering, LV, 2009, 21 – 37. https://www.researchgate.net/publication/314207518_BIOSORPTION_OF_HEAVY_METALS_FROM_THE_ENVIRONMENT_USING_YEASTS_AS_BIOSORBENTS;
 62. Hohmann S., Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(2), 2002, 300-72. <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.2.300-372.2002>;
 63. Hu J., Meng D., Liu X., Liang Y., Yin, Liu H., Response of soil fungal community to long-term chromium contamination. Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition), 28(9), 2018, 1838–1846. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(18\)64828-9](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(18)64828-9);
 64. Yalçın H. T., Çorbacı C. Isolation and characterization of amylase producing yeasts and improvement of amylase production. Turkish Journal of Biochemistry, 2013, vol. 38, no. 1, 101–108. Prieiga per internetą: <https://www.researchgate.net/publication/276033858> [žiūrėta 2026-02-16].

65. Yalçın S. K., Yesim O. Z., Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 2008, 325-332. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080002000024>;
66. Yang J., Lu F., Luo J., Chen J., RFLP Analysis of Soil Microbial Diversity Chromium Contaminated Soil Remediation Process. *Applied Mechanics and Materials*, 2014, 716-717. <https://www.scientific.net/AMM.716-717.1039>;
67. Igiri B. E., Okoduwa S. I. R., Idoko G. O., Akabuogu E. P., Adeyi A. O., Ejiogu I. K., Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *Journal of Toxicology*, 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2568038>;
68. International Organization for Standardization. ISO 18400-105:2017. Soil quality — Sampling — Part 105: Packaging, transport, storage and preservation of samples. Geneva: International Organization for Standardization, 2017. Prieiga per internetą: <https://www.iso.org/standard/62364.html> [žiūrėta 2026-02-16].
69. International Organization for Standardization. ISO 19458:2006 Water quality — Sampling for microbiological analysis. Geneva: ISO, 2006. Prieiga per internetą: <https://www.iso.org/standard/33845.html> [žiūrėta 2026-02-16].
70. International Organization for Standardization. ISO 6222:1999 Water quality — Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium. Geneva: ISO, 1999. Prieiga per internetą: <https://www.iso.org/standard/28960.html> [žiūrėta 2026-02-16].
71. International Organization for Standardization. ISO 8199:2018 Water quality — General requirements and guidance for microbiological examinations by culture. Geneva: ISO, 2018. Prieiga per internetą: <https://www.iso.org/standard/64151.html> [žiūrėta 2026-02-16].
72. Yu W. J., Chung D., Bae S. S., Kwon Y. M., Cho E. S., Choi G., Characterization and Biological Activities of Yeasts Isolated from Marine Environments. *Microbiology Research*, 14(4), 2023, 1984-1999. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14040134>;
73. Yurkov A. M., Yeasts of the soil – obscure but precious. *Yeast*, 35, 5, 2018, 369–378. <https://doi.org/10.1002/yea.3310>;

74. Yurkov A.M., Kemler M., Begerow D., Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*, 5, 1, 2012, 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.07.004>;
75. Jayasekara S., Ratnayake R., *Microbial Cellulases: An Overview and Applications*, Cellulose. IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>;
76. Jankevičius, K., Kalėdienė, L., Liužinas, R., Lugauskas, A., Paškevičius, A., Kmita, M., Rašomavičius, V., Didžiapetris, A. *Aplinkos biologinis valymas*. Vilnius: Apyaušris, 2003;
77. Jermakov, A. I., Arasimovitsh V. V., Jarosh, N. P., Peruanskij U. A., Lukovnikova G. A., Ikonnikova M. I., *Methods of Plant Biochemical Research*, Agropromizdat, Leningrad, Russia. 1987, 430. http://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Methods+of+Plant+Bi+ochemical+Research&author=Jermakov,+A.I.&author=Arasimovitsh,+V.V.&author=Jarosh,+N.P.&author=Peruanskij,+U.A.&author=Lukovnikova,+G.A.&author=Ikonnikova,+M.I.&publication_year=1987;
78. Ji Y., Mao G., Wang Y., Bartlam M. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Front. Microbiol.* 4:58, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00058
79. Kalia A., Sharma S., Semor N., Babele P. K., Sagar S., Bhatia R. K., Walia A., Recent advancements in hydrocarbon bioremediation and future challenges: a review. 3 *Biotech*, 12(6), 2022. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03199-y>;
80. Khot P. D., Farrance C. E., Evaluation of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Identification of Yeasts Commonly Found During Environmental Monitoring. Prieiga per internetą: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/331621-Evaluation-of-MALDI-TOF-Mass-Spectrometry-for-Identification-of-Yeasts-Commonly-Found-During-Environmental-Monitoring/> [žiūrėta 2026-02-16];
81. Knežević N., Milanović J., Veličković Z., Milošević M., Vuksanović M. M., Onjia A., Marinković A., A closed cycle of sustainable development: Effective removal and desorption of lead and dyes using an oxidized cellulose membrane. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 126, 2023, 520-536. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2023.06.041>;
82. Knop M., Yeast cell morphology and sexual reproduction - A short overview and some considerations. *Comptes Rendus - Biologies*, 334(8–9), 2011, 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.05.007>;

83. Kowalska, J., Krzysińska, J., Tyburski, J., Yeasts as a Potential Biological Agent in Plant Disease Protection and Yield Improvement—A Short Review. *Agriculture (Switzerland)*, 12, 9, 2022. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091404>;
84. Kumar A., Chandra R., Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*, 6, 2, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>;
85. Kumari M., Jayanthi A., Biodegradation of Diesel Oil using Yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5, 2011, 369-377. <https://doi.org/10.3923/rjet.2011.369.377>;
86. Kurtzman, C. P. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., eds. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011, 223–277. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00165-8>;
87. Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., eds. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. ISBN 978-0-444-52149-1. <https://www.sciencedirect.com/book/edited-volume/9780444521491/the-yeasts>;
88. Kutty S. N., Philip R., Marine yeasts-a review. *Yeast*, 25(7), 2008, 465-483. <https://doi.org/10.1002/yea.1599>;
89. Li J., Xu Y. C., Bai F. Y., *Candida pseudorugosa* sp. nov., a Novel Yeast Species from Sputum. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 2006, 4486–4490. <https://doi.org/10.1128/JCM.01391-06>;
90. Libkind D., Buzzini P., Turchetti B., Rosa C.A., Yeasts in Continental and Seawater. Buzzini, P., Lachance, M. A., Yurkov, A. (eds), *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*, Springer, 2017, 1-61. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_1;
91. Lietuvos geologijos tarnyba prie Aplinkos ministerijos. Direktorius įsakymas dėl ekogeologinių tyrimų reglamento patvirtinimo. Vilnius, 2008. Prieiga per internetą: <https://www.infollex.lt/ta/53945?ref=1> [žiūrėta 2026-02-16];
92. Lietuvos Respublikos aplinkos ministro įsakymas „Dėl ūkio subjektų aplinkos monitoringo nuostatų patvirtinimo“ [interaktyvus išteklius]. Vilnius: Lietuvos Respublikos aplinkos ministerija. Prieiga per internetą: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/caef2783e1af11ecb1b39d276e924a5d> [žiūrėta 2026-04-14].
93. Lietuvos Respublikos Sveikatos apsaugos ministerija. Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymas dėl Lietuvos higienos

- normos HN 60:2004 „Pavojingų cheminių medžiagų didžiausios leidžiamos koncentracijos dirvožemyje“ patvirtinimo. Vilnius, 2004. Prieiga per internetą: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.228693> [žiūrėta 2026-02-16];
94. Lietuvos standartizacijos departamentas. LST EN ISO 5667-1:2007 Vandens kokybė. Mėginių ėmimas. 1 dalis. Mėginių ėmimo programų ir būdų sudarymo nurodymai (ISO 5667-1:2006). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2007. Prieiga per internetą: <https://www.vdu.lt/cris/entities/standard/3c6c21be-cfb8-4cbf-a7f5-9bf7849f04de/details> [žiūrėta 2026-02-16];
 95. Lietuvos statistikos departamentas. Statistinių rodiklių analizė [interaktyvus išteklius]. Vilnius: Lietuvos statistikos departamentas. Prieiga per internetą: <https://osp.stat.gov.lt/statistiniu-rodikliu-analize> [žiūrėta 2026-04-14].
 96. Lok B., Adam M. A. A., Kamal L. Z. M., Chukwudi N. A., Sandai R., Sandai D., The assimilation of different carbon sources in *Candida albicans*: Fitness and pathogenicity. Medical Mycology, 59(2), 2021, 115-125. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa080>;
 97. Ložienė K., Švedienė J., Paškevičius A., Raudonienė V., Sytar O., Kosyan A., Influence of plant origin natural alpha-pinene with different enantiomeric composition on bacteria, yeasts and fungi. Fitoterpia, 127, 2018, 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.04.013>;
 98. Madadi M., Abbas A., Lignin Degradation by Fungal Pretreatment: A Review. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 8(2), 2017, 1-3. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000398>;
 99. Maicas S., The Role of Yeasts in Fermentation Processes. Microorganisms, 8(8), 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>;
 100. Margesin, R. Bioremediation and biodegradation of hydrocarbons by cold-adapted yeasts. In: Buzzini, P., Margesin, R., eds. Cold-adapted Yeasts. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013, 465–480. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_21;
 101. Mažeika K., Šiliauskas L., Skridlaitė G., Matelis A., Garjonytė R., Paškevičius A., Melvydas V., Features of iron accumulation at high concentration in pulcherrimin-producing *Metschnikowia* yeast biomass. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 26 (2-3), 2021, 299–311. <https://doi.org/10.1007/s00775-021-01853-z>;
 102. Medeiros, A. O., Missagia, B. S., Brandão, L. R., Callisto, M., Barbosa, F. A. R., Rosa, C. A., Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the rio doce basin in southeastern brazil. Brazilian

- Journal of Microbiology, 43(4), 2012, 1582–1594.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400043>;
103. Mejia M. P., Rojas C. A., Curd E., Renshaw M. A., Edalati K., Shih B., Vincent N., Lin M., Nguyen P. H., Wayne R., Jessup K., Parker S. S., Soil Microbial Community Composition and Tolerance to Contaminants in an Urban Brownfield Site. *Microbial Ecology*, 85(3), 2023, 998–1012. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02061-1>;
 104. Meledina, T. V., Ivanova, V. A., Golovinskaia, O. V., Harba, R. Yeast: Morphology and physiology. Saint Petersburg: ITMO University, 2021. Prieiga per internetą: <https://books.ifmo.ru/file/pdf/2760.pdf> [žiūrėta 2024-02-01].
 105. Monapathi M. E., Bezuidenhout C. C., Rhode O. H. J. Aquatic yeasts: Diversity, characteristics and potential health implications. *Journal of Water and Health*, 2020, vol. 18, no. 2, 91–105. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.2166/wh.2020.270> [žiūrėta 2026-02-16].
 106. Moreira G. A., Pires E. C., Barreto C. C., Vale H. M., Total fungi and yeast distribution in soils over native and modified vegetation in central Brazil. *Revista Brasileira De Ciencia Do Solo*, 44, 2020. <https://doi.org/10.36783/18069657rbcS20200097>;
 107. Mozzachiodi S., Bai F. Y., Baldrian P., Bell G., Boundy-Mills K., Buzzini P., Čadež N., Cubillos F. A., Dashko S., Dimitrov R., Fisher K. J., Gibson B., Gouliamova D., Greig D., Heisteringer L., Hittinger C. T., Jecmenica M., Koufopanou V., Landry C. R., Boynton P., Yeasts from temperate forests. *Yeast*, 39(1), 2022, 4–24. <https://doi.org/10.1002/yea.3699>;
 108. Navickas K., Akcinės bendrovės „ORLEN Lietuva“ Būtingės naftos terminalo jūrinės dalies monitoringo, hidrobiologinio monitoringo, ichtiologinio ir Baltijos jūros kranto zonos monitoringo 2020 m. ataskaita. Darnaus vystymosi institutas, 2020. <https://www.orldenlietuva.lt/LT/SR/Environmental/visuomen%C4%97s%20%C5%A1vietimas/Documents/7%20Baltijos%20j%C5%ABros%20ir%20kranto%20zonos%20monitoringo%20ataskaita%20u%C5%BE%202020%20m.pdf>
 109. Nevoigt E., Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 2008. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00025-07>;
 110. Nicula N. O., Lungulescu E. M., Rîmbu G. A., Marinescu V., Corbu V. M., Csutak O., Bioremediation of Wastewater Using Yeast Strains: An Assessment of Contaminant Removal Efficiency. *International Journal*

- of Environmental Research and Public Health, 20(6), 2023. <https://doi.org/10.3390/ijerph20064795>;
111. Novickij V., Lastauskienė E., Švedienė J., Grainys A., Staigvila G., Paškevičius A., Girkontaitė I., Zinkevičienė A., Markovskaja S., Novickij J., Membrane permeabilization of pathogenic yeast in alternating sub-microsecond electromagnetic fields in combination with conventional electroporation. *Journal of Membrane Biology*, 251(2), 2018, 189-195. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9951-4>;
 112. Novickij V., Staigvila G., Gudiukaitė R., Zinkevičienė A., Girkontaitė I., Paškevičius A., Švedienė J., Markovskaja S., Novickij J., Lastauskienė E., Nanosecond duration pulsed electric field together with formic acid triggers caspase-dependent apoptosis in pathogenic yeasts. *Bioelectrochemistry*, 128, 2019, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.007>;
 113. Olukunle O., Phylogenetic analysis of hydrocarbon degrading bacteria associated with crude oil polluted soil from Mesogar community, Delta State, Nigeria. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 36 (2), 2020. <https://doi.org/10.4314/njb.v36i2.8>;
 114. Pande V., Pandey S. C., Sati D., Bhatt P., Samant M., Microbial Interventions in Bioremediation of Heavy Metal Contaminants in Agroecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824084>;
 115. Pandi, R., Velu, G., Devi, P., Dananjeyan, B., Isolation and screening of soil yeasts for plant growth promoting traits. *Madras Agricultural Journal*, 2019, 439-443. <https://doi.org/10.29321/MAJ.2019.000289>;
 116. Paškevičius A., Švedienė J., Kivėrytė S., Bridžiuvienė D., Vaitonis G., Jablonskienė V. *Candida* Distribution in Onychomycosis and in vitro Susceptibility to Antifungal Agents. *Acta dermatovenerologica Croatica*, 28(4), 2020, 204–209. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33834991/>;
 117. Paškevičius A., Varnaite R., Yeast occurrence in herring products and processing environment and their biochemical peculiarities. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60, 2010, 369-373. <https://journal.pan.olsztyn.pl/YEAST-OCCURRENCE-IN-HERRING-PRODUCTS-AND-PROCESSING-ENVIRONMENT-AND-THEIR-BIOCHEMICAL,98283,0,2.html>;
 118. Paškevičius, A., Lipase activity of yeasts and yeast-like fungi functioning under natural conditions. *Biologija*, 4, 2001, 16-18. https://www.researchgate.net/publication/281362123_Lipase_activity_of_yeasts_and_yeast-like_fungi_functioning_under_natural_conditions;

119. Péter G., Takashima M., Čadež N. Yeast habitats: Different but global. In: Buzzini P., Lachance M.-A., Yurkov A., eds. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*. Cham: Springer, 2017, 39–71. Prieiga per internetą: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-61575-2_2 [žiūrėta 2026-02-16].
120. Phale S., Yeast: Characteristics and Economic Significance. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 8, 2018. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000337>;
121. Pietryczuk A., Cudowski A., Hauschild T., Świsłocka M., Więcko A., Karpowicz M. Abundance and Species Diversity of Fungi in Rivers with Various Contaminations. *Current Microbiology*, 75(5), 2018, 630-638. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1427-3>;
122. Priya A. K., Muruganandam M., Ali S. S., Kornaros M., Clean-Up of Heavy Metals from Contaminated Soil by Phytoremediation: A Multidisciplinary and Eco-Friendly Approach. *Toxics*, 11(5), 2023, 422. <https://doi.org/10.3390/toxics11050422>;
123. Raheema R., Hadi S., Dirwal A. Microbial bioremediation for sustainable development. *The Microbe*, 2026, 11, 100699. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2026.100699>.
124. Reynolds J. Serial dilution protocols. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2005. Prieiga per internetą: <https://asm.org/asm/media/protocol-images/serial-dilution-protocols.pdf> [žiūrėta 2026-02-16].
125. Repečkienė J., Levinskaitė L., Paškevičius A., Raudonienė V., Toxin-producing fungi on feed grains and application of yeasts for their detoxification. *Polish journal of veterinary sciences*, 16, 2013, 391-393. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0054>;
126. Repečkienė J., Januška V., Paškevičius A., Lugauskas A. Mikroorganizmų kiekis ir rūšių įvairovė mazutu užterštame grunte. *Botanica Lithuanica, supplementum* 4, 2002, 91–101. Prieiga per internetą: <https://gamtostyrimai.lt/leidiniai/botanica-lithuanica-supplementum-4/> [žiūrėta 2026-02-16].
127. Rodríguez I. A., Cárdenas-González J. F., Juárez V. M. M., Pérez A. R., Zárate M. de G. M., Castillo N. C. P. Biosorption of heavy metals by *Candida albicans*. In: Shiomi N., ed. *Advances in Bioremediation and Phytoremediation*. London: IntechOpen, 2018. Prieiga per internetą: <https://www.intechopen.com/chapters/58349> [žiūrėta 2026-02-16].

128. Saha, B. C., Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology. American Chemical Society, 11, 13, 2014, 2-34. <https://doi.org/10.1021/bk-2004-0889.ch001>;
129. Schoch C., Seifert K., Huhndorf S.M., Robert V., Spouge J., Levesque C., Chen W., Janzen D., Consortium A., Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences. 24, 2012, 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
130. Segal-Kischinevsky C., Romero-Aguilar L., Alcaraz L.D., López-Ortiz G., Martínez-Castillo B., Torres-Ramírez N., Sandoval G., González J., Yeasts Inhabiting Extreme Environments and Their Biotechnological Applications. Microorganisms, 10(4), 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040794>;
131. Serviené E., Serva S., Recent Advances in the Yeast Killer Systems Research. Microorganisms, 2023, 11, 1191. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051191>;
132. Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V. P., Prasad S. M., Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. Frontiers in Plant Science, 6, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>;
133. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Virdi J. S., MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology, 6, AUG, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>;
134. Sytar O., Švedienė J., Ložienė K., Paškevičius A., Kosyan A., Taran N., Antifungal properties of hypericin, hypericin tetrasulphonic acid and fagopyrin on pathogenic fungi and spoilage yeasts. Pharmaceutical Biology, 54 (2), 2016, 3121-3125. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1211716>;
135. Sláviková E., Vadkertiová R., Seasonal occurrence of yeasts and yeast-like organisms in the river Danube. Antonie Van Leeuwenhoek, 72(2), 1997, 77-80. <https://doi.org/10.1023/A:1000287005253>;
136. Sláviková E., Vadkertiová R., The occurrence of yeasts in grass-grown soils. Czech Mycology, 54, 2003, 239-247. <https://doi.org/10.33585/cmy.54310>;
137. Sohail M., Barzkar N., Michaud P., Tamadoni J. S., Babich O., Sukhikh S., Das R., Nahavandi R., Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes from Yeasts: Properties and Industrial Applications. Molecules, 27(12), 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27123783>;

138. Spencer J. F. T., Spencer D. M. Outside and inside: The morphology and cytology of the yeast cell. In: Spencer J. F. T., Spencer D. M., eds. *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997, 80–94. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03370-8_7
139. Stankevičienė A. Mikroskopinių grybų rūšių įvairovė uždaramame grunte auginamų augalų rizosferoje. *Botanikos sodo raštai / Scripta Horti Botanici*, 2012, Nr. 21, 47–56. Prieiga per internetą: <https://hdl.handle.net/20.500.12259/33500> [žiūrėta 2026-02-16].
140. Šalomskienė J., Paškevičius A., Mačionienė I., Monitoring yeast species in quarg, quarg products and their production environment during the manufacturing process. *Acta Alimentaria*, 32, 2003, 317-322. <https://doi.org/10.1556/aalim.32.2003.3.11>;
141. Švedienė J., Raudonienė V., Mizerienė G., Rimšaitė J., Davenis S. A., Ivinskis P., First Data on the investigation of gut yeasts in hermit beetle (*Osmoderma barnabita* Motschulsky, 1845) Larvae in Lithuania. *Journal of Fungi*, 10 (7), 2024. <https://doi.org/10.3390/jof10070442>;
142. Thongekkaew J., Kongsanthia J., Screening and Identification of Cellulase Producing Yeast from Rongkho Forest, Ubon Ratchathani University. *Bioengineering and Bioscience*, 4(3), 2016, 29 – 33. <https://doi.org/10.13189/bb.2016.040301>;
143. Ulea E., Lipşa F. D., Balau A. M., Filipov F., Morari E. C., Diversity of soil bacteria as indicator of soil pollution in moldavia region, romania. *Environmental Engineering and Management Journal*, 16, 2017, 879-889. <https://eemj.eu/index.php/EEMJ/article/view/3240>;
144. Vadkertiová R, Sláviková E., Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *Journal of Basic Microbiology*, 46(2), 2006, 145-152. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510609>;
145. Varnaitė R., Raudonienė V., Bridžiuvienė D., Enzymatic Biodegradation of Lignin-Cellulose Complex in Plant Origin Material. *Materials Science*, 17, 2011, 99-103. <https://doi.org/10.5755/j01.ms.17.1.258>;
146. Varnaitė, R., Paškevičius, A., Raudonienė, V., Cellulose degradation in rye straw by micromycetes and their complexes. *Ekologija*, 54, 2008, 29-31. <https://doi.org/10.2478/V10055-008-0006-0>;
147. Vepškaitė-Monstavičė I., Lukša-Žebelovič J., Apšegaitė V., Mozūraitis R., Lisicinas, R., Stanevičienė R., Blažytė-Čereškienė L., Serva S., Servienė E., Profiles of Killer Systems and Volatile Organic Compounds of Rowanberry and Rosehip-Inhabiting Yeasts Substantiate Implications for Biocontrol. *Foods* 2025, 14, 288. <https://doi.org/10.3390/foods14020288>;

148. Walker G. M. Yeasts. In: Schaechter M., ed. Desk encyclopedia of microbiology. 2nd ed. Oxford: Academic Press/Elsevier, 2009, 1174–1187. Prieiga per internetą: https://rlmc.edu.pk/themes/images/gallery/library/books/Microbiology/Desk_Encyclopedia_of_Microbiology__Second_Ed.pdf [žiūrėta 2026-02-16].
149. Wang Y., Lo W. C., Chou C. S., A modeling study of budding yeast colony formation and its relationship to budding pattern and aging. PLoS Computational Biology, 13(11), 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005843>;
150. Wang M., Zhou M., Li H., Cao Z., Ding M., Yuan Y., Construction of yeast microbial consortia for petroleum hydrocarbons degradation. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 12, 2024. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1408361>;
151. Webster J., Aquatic fungi. Nature, 261, 82, 1976. <https://doi.org/10.1038/261082c0>;
152. Wojcik A., Kurnatowski P., Błaszowska J. Potentially pathogenic yeasts from soil of children's recreational areas in the city of Łódź (Poland). International journal of occupational medicine and environmental health, 26, 2013, 477-487. <https://doi.org/10.2478/s13382-013-0118-y>;
153. Wuczkowski M., Sterflinger K. Diversity of yeasts isolated from litter and soil of different natural forest sites in Austria. Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment, 2005, vol. 56, no. 4, 201–208. Prieiga per internetą: <https://www.researchgate.net/publication/286569090> [žiūrėta 2026-02-16].
154. Zarandi M. E., Harzevili F. D., Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. Biotechnology Reports, 17, 2021, 104-109. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2017.12.006>;
155. Zawrotniak M., Wojtalik K., Rapala-Kozik M., Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule of *Candida albicans* Triggers the Release of Neutrophil Extracellular Traps. Cells, 8(12), 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8121611>.

PRIEDAI

1 PRIEDAS

DIRVOŽEMIO AGROCHEMINIŲ PARAMETRŲ ĮTAKA MIELIŲ BENDRIJŲ SUDĖČIAI IR RŪŠIŲ ĮVAIROVEI

Parametras	Vertinimas	Dominuojantis mielių skyrius	Paplitusios mielės
Organinės anglies kiekis (C, %)	Aukštas (>4,0 %)	<i>Ascomycota</i>	<i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Komagataella pastoris</i> <i>Lachancea thermotolerans</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Pichia occidentalis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Vidutinis (2,0–4,0 %)	Mišrus pasiskirstymas	<i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Naganishia albida</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Saccharomycopsis schoenii</i> <i>Solicoccozyma terrea</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	Žemas (<2,0 %)	<i>Basidiomycota</i>	<i>Cryptococcus spp.</i> <i>Cutaneotrichosporon mucoides</i> <i>Naganishia diffluens</i> <i>Papiliotrema laurentii</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Bendras azoto kiekis (N, %)	Aukštas (>0,30 %)	<i>Ascomycota</i>	<i>Candida spp.</i> <i>Komagataella pastoris</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Pichia spp.</i>
	Vidutinis (0,15–0,30 %)	Mišrus pasiskirstymas	<i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Saccharomycopsis schoenii</i> <i>Solicoccozyma terrea</i>
	Žemas (<0,15 %)	<i>Basidiomycota</i>	<i>Cryptococcus spp.</i> <i>Naganishia spp.</i> <i>Rhodotorula spp.</i>
pH	Neutralus–šarminis (>7,0)	<i>Ascomycota</i>	<i>Candida spp.</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Pichia spp.</i>
	Silpnai rūgštus–neutralus (5,5–7,0)	Mišrus pasiskirstymas	Įvairios rūšys

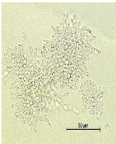
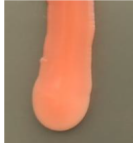
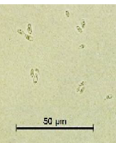
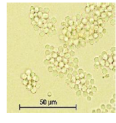
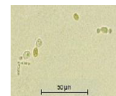
Parametras	Vertinimas	Dominuojantis mielių skyrius	Paplitusios mielės
	Rūgštus (<5,5)	<i>Basidiomycota</i>	<i>Naganishia diffluens</i> , <i>Rhodotorula graminis</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Sungouella intermedia</i> , <i>Vanrija humicola</i>
C:N santykis	Aukštas (>14:1)	<i>Ascomycota</i>	<i>Lachancea thermotolerans</i> <i>Metschnikowia kunwiensis</i> <i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Vidutinis (10–14:1)	Mišrus pasiskirstymas	Įvairios rūšys
	Žemas (<10:1)	Mišrus pasiskirstymas / <i>Basidiomycota</i>	<i>Naganishia spp.</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Solicocozyma terrea</i>
Fosforo kiekis (P ₂ O ₅ , mg/kg)	Aukštas (>300)	<i>Ascomycota</i>	<i>Candida tropicalis</i> <i>Komagataella pastoris</i> <i>Pichia spp.</i>
	Vidutinis (100–300)	Mišrus pasiskirstymas	Įvairios rūšys
	Žemas (<100)	<i>Basidiomycota</i>	<i>Cryptococcus spp.</i> <i>Naganishia spp.</i> <i>Rhodotorula spp.</i>
Kalio kiekis (K ₂ O, mg/kg)	Aukštas (>300)	<i>Ascomycota</i>	<i>Candida spp.</i> <i>Pichia spp.</i>
	Vidutinis (100–300)	Mišrus pasiskirstymas	Įvairios rūšys
	Žemas (<100)	<i>Basidiomycota</i>	<i>Naganishia spp.</i> <i>Rhodotorula spp.</i>

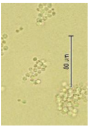
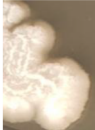
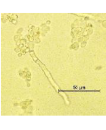
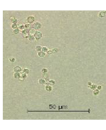
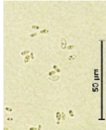
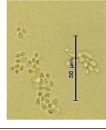
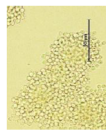
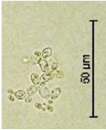
MIELIŲ TAKSONOMINĖ PRIKLAUSOMYBĖ PAGAL INDEX FUNGORUM DUOMENŲ BAZĘ

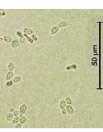
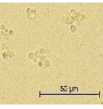
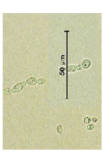
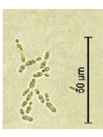
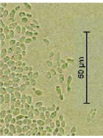
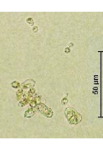
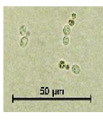
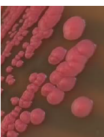
182

3 PRIEDAS

DAŽNIAUSIAI IŠ ĮVAIRIŲ ANTROPOGENIZUOTŲ SUBSTRATŲ (DIRVOŽEMIO IR VANDENS) IŠSKIRTŲ MIELIŲ MAKRO IR MIKRO MORFOLOGINIŲ POŽYMIŲ APRAŠYMAS

Substratas	Dažniausiai išskirtos mielių rūšys	Makromorfolginis vaizdas	Mikromorfolginis vaizdas	Makro ir mikro morfologinių savybių aprašymas
Dirvožemis	<i>Aureobasidium pullulans</i>			Kolonijos augimo pradžioje yra kreminės baltos spalvos ir gali perėti į rausvą, šviesiai geltoną arba šviesiai rudą. Sendamos kolonijos dažnai tamsėja, dėl melanino gamybos tampa rudos arba juodos. Jaunos kolonijos yra lygios ir drėgnos. Su amžiumi gali tapti aksominėmis ar gleivėtomis, ypač centre. Kolonijos gali susirauksėti (panašios į smegenis). Kolonijos yra žemos, išgaubtos, tačiau su amžiumi gali paugti. Kolonijų dydis gali būti labai įvairus, jos pasiekia 1–2 cm skersmenį per savaitę inkubuojant 25–30 °C temperatūroje. Formuoja septuotus, bespalvius ir kartais melanizuotus hifus. Hifai gali išsiskirti ir su amžiumi tapti tamsiai pigmentuoti.
	<i>Candida tropicalis</i>			Kolonijų spalva varijuoja nuo kreminės iki baltos spalvos, su amžiumi gali įgauti tiek tiek gelsvos arba smėlio spalvos. Kolonijos lygios, kreminės ir pastos konsistencijos. Su amžiumi gali labiau susirauksėti arba išsausėti. Kolonijos išgaubtos, bet gali būti plokščios arba tiek tiek iškilusios. Kolonijų kraštai lygūs ir taisyklingi. Kolonijos gali pasiekti 1–2 cm skersmenį per 48–72 valandas, inkubuojamos 25–37 °C temperatūroje. Ląstelės ovalios arba elipsės formos, skersmuo 3–6 µm. Pumpurai (blastokonidijos) yra pavieniai arba sudaro mažas grupes ir dažnai susidaro ant siaurų kaklelių.
				Gali formuoti pseudohifus, kurie yra pailgos, stiliškos struktūros, atrodo kaip mielių ląstelių grandinės. Skirtingai nuo kai kurių kitų <i>Candida</i> rūšių, <i>Candida tropicalis</i> gali formuoti tikrus hifus.
	<i>Cystobasidium minutum</i>			Kolonijos būna nuo baltos iki kreminės spalvos, bręsdamos įgyti rausvą arba lašišos atspalvį. Jaunos kolonijos yra lygios, drėgnos ir blizgios. Senstant gali tapti sviesto arba gleivingos konsistencijos. Kolonijos yra žemos, išgaubtos, jų kraštai lygūs ir taisyklingi. Kolonijos gali pasiekti 1–2 cm skersmenį per 48–72 valandas, inkubuojamos 25–30 °C temperatūroje. Ląstelės yra ovalios arba cilindrinės, 3–7 µm skersmens. Pumpurai (blastokonidijos) yra pavieniai arba sudaro mažas grupes. Tam tikromis sąlygomis gali sudaryti pseudohifus, kurie atrodo kaip pailgos, gijinės struktūros, sudarytos iš mielių ląstelių grandinių su pertvariniais susiaurėjimais. Tikrųjų hifų neformuoja.
	<i>Cryptococcus gattii</i>			Kolonijos būna apvalios, tiek tiek iškilusios ir gali turėti lygų arba grublėtą paviršių. Kolonijos dažnai būna baltos, šviesiai pilkos arba rausvos spalvos. Kai kurios kolonijos gali pasikeisti į gelsvas arba rudo atspalvio su amžiumi. Kolonijos yra 1–5 mm skersmens, tačiau su laiku gali augti didesnės. Kolonijos gali būti standžios arba tiek tiek gleivingos. Tai dimorfinė mielė, kuri gali sudaryti tiek mielinę, tiek ir hifinę formas priklausomai nuo aplinkos sąlygų. Dažniausiai ji būna mielių formos. Ląstelės yra apvalios arba ovalios, nuo 4 iki 10 µm skersmens. Formuoja kapsules.
	<i>Cystofilobasidium macerans</i>			Kolonijos paprastai būna apvalios, tiek tiek iškilusios ir lygios, tačiau gali turėti ir tiek tiek nelygų paviršių. Jos dažnai būna mažos ir švelniai iškilusios. Spalva svyruoja nuo švelniai rausvos iki ryškiai oranžinės. Kolonijos būna tvirtos, tiek tiek drėgnos. Kai kurios kultūros gali būti tiek tiek lipnios arba gleivingos. Ląstelės būna mielių pavidalo, t.y. viena ląstelė, kuri turi apvalią arba ovalią formą. Ląstelių skersmuo dažnai svyruoja nuo 4 iki 8 µm. Formuoja kapsules, hifų neformuoja.

				Kolonijos yra apvalios ir šiek tiek iškiliškos, jų paviršius gali būti lygus arba šiek tiek nelygus. Kolonijos dažnai būna mažos, tačiau gali išaugti iki didesnio dydžio priklausomai nuo kultūros augimo sąlygų. Kolonijos dažniausiai yra baltos arba šviesiai kreminės spalvos. Vėliau, su amžiumi, jos gali tapti gelsvos arba šviesiai rusvos. Kolonijos būna standžios, šiek tiek drėgnos arba gleivingos, priklausomai nuo augimo sąlygų ir kultūros amžiaus. Ląstelės yra mielinių formos, apvalios arba ovalios, jų skersmuo svyruoja nuo 4 iki 8 µm. Išsidėsto grupelėmis. Formuoja kapsules, neformuoja hifų.
				Kolonijos yra apvalios, šiek tiek iškiliškos, gali būti įvairių dydžių, priklausomai nuo augimo sąlygų ir kultūros amžiaus. Kolonijos pradžioje būna baltos arba šviesiai kreminės spalvos, tačiau augimo metu gali tapti gelsvos, rusvos. Spalva gali keistis priklausomai nuo augimo sąlygų. Kolonijos būna minkštos arba gleivingos, o kai kurios kultūros gali būti drėgnos ir šiek tiek lipnios. Kolonijos paviršius gali būti lygus arba šiek tiek grublėtas. Tai yra dimorfinė mielė, turintis tiek mielinių, tiek ir hifų formą, priklausomai nuo augimo sąlygų. Mielės formos ląstelės būna apvalios arba ovalios formos, jų skersmuo nuo 3 iki 6 µm. Gėba formuoti hifus. Hifai gali būti įvairaus storio ir kartais būna šakoti. Gali formuoti blastosporas. Gali formuoti kapsulę.
				Kolonijos apvalios, iškilių kraštų, šiek tiek šlapios ir gleivingos. Kolonijų paviršius lygus, tačiau gali turėti nelygių, šiurkščių kraštų. Kolonijos baltos, kreminės arba gelsvos spalvos. Augimo metu spalva gali šiek tiek keistis, senstant gali tapti gelsvai rusva. Kolonijos būna drėgnos ir gleivingos. Ląstelės būna apvalios arba ovalios formos. Ląstelių dydis gali svyruoti nuo 3 iki 8 µm skersmens. Ląstelės išsidėsto pavieniui arba grupelėmis. Formuoja blastosporas, hifų neformuoja.
				Kolonijos apvalios ir iškilių kraštų. Kolonijų paviršius būna lygus, tačiau vėlesniais augimo etapais gali atsirasti šiurkštumo, o kraštai gali tapti nelygūs. Kolonijos baltos arba šviesiai kreminės spalvos. Su amžiumi ir augimo proceso metu spalva gali tapti gelsva arba šviesiai ruda. Kolonijos yra standžios, tačiau gali turėti šiek tiek gleivingo paviršiaus. Kolonijų tekstūra gali būti šiek tiek drėgna arba sausa standi. Ląstelės apvalios arba ovalios formos. Ląstelės skersmuo svyruoja nuo 4 iki 8 µm, gali formuoti grupes. Formuoja blastosporas, hifų neformuoja.
				Kolonijos apvalios, iškiliškos, lygiais kraštais. Kolonijų dydis gali skirtis, tačiau paprastai jos būna mažos ir kompaktiškos. Kolonijos pradžioje būna baltos arba šviesiai kreminės spalvos. Vėliau, su amžiumi, gali įgyti gelsvą atspalvį. Kolonijos būna standžios ir sausos, tačiau gali tapti šiek tiek gleivingos, priklausomai nuo augimo sąlygų ir terpės drėgmės. Kolonijų paviršius būna lygus. Ląstelės yra apvalios arba
				ovalios formos. Dydis apie 3-7 mikromus. Ląstelės dažnai randamos pavieniui arba susijungusios į grupes. Formuoja blastosporas, gali formuoti pseudohifus.
				Kolonijos apvalios, iškilių kraštų, lygios ir šiek tiek lipnios. Kolonijų kraštai gali turėti nelygių. Kolonijos baltos arba šviesiai kreminės spalvos, su amžiumi gali patamsėti. Kolonijos standžios, tačiau kai kuriose kultūrose gali būti matomas šiek tiek gleivingas paviršius. Ląstelės apvalios arba ovalios formos. Ląstelių dydis svyruoja nuo 3 iki 7 µm, dažnai išsidėsto grupėmis, tačiau gali būti randamos ir pavieniui. Formuoja blastosporas, gali formuoti pseudohifus.
				Kolonijos būna apvalios, iškiliškos, o jų kraštai lygtūs. Kolonijos paviršius būna lygus ir kompaktiškas, tačiau gali raukšlėti. Kolonijos būna baltos, kreminės arba šviesiai geltonos spalvos, spalva gali šiek tiek keistis augimo metu. Kolonijos yra standžios ir sausos. Ląstelės yra apvalios arba ovalios formos, skersmuo nuo 3 iki 7 µm. Ląstelės dažniausiai susijungia į grupes, tačiau gali būti randama ir pavienių ląstelių. Formuoja blastosporas, gali formuoti pseudohifus.

	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			Kolonijos apvalios ir iškilios, lygiais kraštais. Viena iš ryškiausių šios rūšies savybių yra raudona arba oranžinė spalva, kurią kolonijos įgyja dėl gaminamų pigmentų. Kolonijos yra šiek tiek lipnios arba gleivingos. Paviršius dažnai būna blizgantis. Ląstelės yra apvalios, ovalios arba elipsės formos, skersmuo nuo 3 iki 7 µm, gali būti pavienės arba susijungusios į grupes. Formuoja blastosporas, gali formuoti pseudohifus.
	<i>Sclerococczyma terreia</i>			Kolonijos apvalios, šiek tiek iškilios, lygiais kraštais, baltos arba šviesiai kreminės spalvos. Kartais gali įgauti šviesiai gelsvą arba pilką atspalvį. Kolonijos konsistencija standi ir šiek tiek sausa, paviršius lygus. Ląstelės apvalios, ovalios arba elipsės formos, skersmuo nuo 3 iki 7 µm. Ląstelės dažniausiai išsidėsto pavieniui, tačiau gali būti randamos ir grupėmis. Formuoja blastosporas, gali formuoti pseudohifus.
	<i>Tausonia pullulans</i>			Kolonijos apvalios ir iškilios. Jos auga lėtai, o kolonijos kraštai dažnai būna nelygūs, neryškūs, paviršius gali būti lygus arba šiek tiek granuliuotas. Kolonijos pirmiausia būna baltos arba šviesiai kreminės spalvos, tačiau su laiku dažnai įgauna juodą, rudą, arba pilką atspalvį. Kolonijos standžios ir drėgnos, jose gali būti matomas gleivėtumas. Paviršius būna šiek tiek blizgantis, o konsistencija – tvirta. Ląstelės apvalios arba ovalios formos, skersmuo nuo 3 iki 7 µm, dažniausiai pavienės, tačiau gali susijungti į grupes, mažus pseudohifus. Gali formuoti hifus ir pseudohifus.
	<i>Vanrija humicola</i>			Kolonijos apvalios ir iškilios, su nelygiais kraštais, auga lėtai ir paprastai būna mažos. Pradžioje gali būti baltos arba šviesiai kreminės spalvos, tačiau su laiku įgauna šviesiai geltoną arba pilką atspalvį. Kolonijos paviršius yra standus ir šiek tiek sausas. Ląstelės apvalios arba ovalios formos, skersmuo nuo 3 iki 7 µm, dažniausiai pavienės, gali susijungti į grupes. Formuoja blastosporas, gali formuoti pseudohifus.
Vanduo	<i>Issatchenkia orientalis</i>			Kolonijos apvalios ir iškilių kraštų. Kolonijų paviršius būna lygus, tačiau vėlesniais augimo etapais gali atsirasti šiurkštumo, o kraštai gali tapti nelygūs. Kolonijos baltos arba šviesiai kreminės spalvos. Su amžiumi ir augimo proceso metu spalva gali tapti gelsva arba šviesiai ruda. Kolonijos yra standžios, tačiau gali turėti šiek tiek gleivingo paviršiaus. Kolonijų tekstūra gali būti šiek tiek drėgna arba sausa ir standi. Ląstelės apvalios arba ovalios formos. Ląstelės skersmuo svyruoja nuo 4 iki 8 µm, gali formuoti grupes. Formuoja blastosporas, hifų neformuoja.
	<i>Pichia fermentans</i>			Kolonijos būna apvalios, iškilios, o jų kraštai lygūs. Kolonijos paviršius būna lygus ir kompaktiškas, tačiau gali raiškėti. Kolonijos būna baltos, kreminės arba šviesiai geltonos spalvos, spalva gali šiek tiek keistis augimo metu. Kolonijos yra standžios ir sausos. Ląstelės yra apvalios arba ovalios formos, skersmuo nuo 3 iki 7 µm. Ląstelės dažniausiai susijungia į grupes, tačiau gali būti randama ir pavienių ląstelių. Formuoja blastosporas, gali formuoti pseudohifus.
	<i>Rhodotorula diobovata</i>			Kolonijos apvalios, iškilios ir šiek tiek nelygios, gali turėti neryškius kraštus. Kolonijų paviršius lygus, tačiau kartais gali būti šiek tiek granuliuotas gleivingas. Kolonijos šviesiai rožinės arba raudonos spalvos, tačiau gali įgauti šviesiai oranžinį atspalvį. Kolonijos konsistencija švelni, šiek tiek gleivinga. Ląstelės apvalios, ovalios arba elipsės formos, skersmuo nuo 3 iki 8 µm, pavienės, tačiau gali suformuoti mažas grupes. Formuoja blastosporas, gali formuoti pseudohifus.
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			Kolonijos apvalios ir iškilios, dažnai neryškiais kraštais. Kolonijos rožinės, raudonos arba oranžinės spalvos. Jaunos kolonijos būna ryškiai rožinės arba raudonos, tačiau suaugusios gali išblukti ir tapti šviesiai rožinės arba kreminės spalvos. Kolonijų paviršius gali būti lygus arba gleivingas. Ląstelės apvalios, ovalios arba elipsės formos, skersmuo nuo 4 iki 8 µm, pavienės arba išsidėsčiusios grupėmis.
	<i>Sporobolomyces roseus</i>			Kolonijos apvalios, iškilios, dažnai neryškiais kraštais, mažos, auga vidutiniu greičiu, nepasiekdamos didelio dydžio. Kolonijų paviršius lygus, tačiau kartais šiek tiek granuliuotas arba švelniai gleivingas. Kolonijos ryškiai rožinės arba raudonos spalvos, jos gali tapti šviesesnės, įgaunamosios kremiškai arba šviesiai rožinį atspalvį senstant. Kolonijos standžios, tačiau gali turėti šiek tiek gleivinės struktūros. Ląstelės apvalios arba ovalios, skersmuo nuo 4 iki 8 µm, pavienės, tačiau gali išsidėstyti grupėmis formuodamos pseudohifus.

4 PRIEDAS

PATENTAS



LIETUVOS RESPUBLIKOS VALSTYBINIS PATENTŲ BIURAS
STATE PATENT BUREAU OF THE REPUBLIC OF LITHUANIA

PATENTAS

P a t e n t

Nr. 7087

Šis dokumentas patvirtina, kad vadovaujantis Lietuvos Respublikos patentų įstatymu išradimas, nurodytas pridedamame patento aprašyme, yra įrašytas į Lietuvos Respublikos patentų registrą.

It is hereby certified that following the Patent Law of the Republic of Lithuania the invention as outlined in the attached Patent Specification has been entered into the Register of Patents of the Republic of Lithuania.

Išdavimo data
Date of issue

2024-09-10, Vilnius



Direktorė
Director

Irina Urbonė



(11) **LT 7087 B**

(51) Int. Cl.(2024.01)

B09C 1/10
C12N 1/00

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2024 507**
(22) Paraiškos padavimo data: **2024-02-07**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2024-08-12**
(45) Patento paskelbimo data: **2024-09-10**

(73) Patento savininkas:
**Gamtos tyrimų centras, Akademijos g. 2,
08412 Vilnius, LT**
**UAB „GVT LT“, Antakalnio g. 42-41, 10304
Vilnius, LT**

(72) Išradėjas:
Algimantas PAŠKEVIČIUS, LT
Jonas ŽVIRGŽDAS, LT
Jurgita ŠVEDIENĖ, LT
Spartakas PETROVAS, LT
Ieva PAUNKSNYTĖ-MARKEVIČIENĖ, LT
Irma GALGINIENĖ, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Virgina Adolfina DRAUGELIENĖ, UAB
**TARPINĖ, A.P.Kavoliuko g. 24-152, LT-
04328 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

Biopreparatas naftos produktais užterštam gruntui valyti ir valymo būdas

(57) Referatas:

Išradimas priklauso biotechnologijos ir aplinkos apsaugos sritims ir skirtas naftos produktais užterštam gruntui valyti. Biopreparatas apima naftą oksiduojančių mikroorganizmų kompleksą kartu su mikroorganizmus maitinančių maistinių medžiagų mišiniu, kuriame minėtas mikroorganizmų mišinys apima bakterijų mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus, mielių mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus ir mikroskopinių grybų mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus.

SUMMARY

INTRODUCTION

Yeasts are unicellular eukaryotic microorganisms, belonging to the kingdom Fungi. They are classified within the phyla *Ascomycota* and *Basidiomycota*. Advances in molecular methods have rapidly increased the number of described yeast species, currently estimated at about 3,500. However, yeast diversity and distribution remain poorly studied in many regions, including endangered habitats. Yeasts, like other soil microorganisms, are affected by anthropogenic disturbances such as agriculture, urbanization, and pollution (Boekhout et al., 2022; Medeiros et al., 2012).

Yeast diversity and distribution depend on the chemical, physical, and biological properties of habitats and interactions with other microorganisms. As integral members of microbial communities, yeasts are often among the first colonizers of nutrient-rich substrates. Beyond utilizing simple carbohydrates, they participate in the biodegradation of complex organic compounds, act as primary and secondary decomposers, and contribute to nutrient cycling within food webs (Buzzini et al., 2017).

Yeasts occur in all natural and human-made environments, including soil, water, plants, animals, and the atmosphere. Some species are pathogenic or opportunistic, while others exhibit high tolerance to pollution and play an important role in the biodegradation of natural and anthropogenic contaminants. Their ability to remove organic compounds and heavy metals from polluted environments makes yeasts promising agents for bioremediation. Pollutant removal occurs through metabolic activity or adsorption on yeast cell surfaces, and many species produce biodegradable biosurfactants that enhance the degradation of hydrophobic pollutants and improve wastewater treatment efficiency (Walker, 2009; Nicula et al., 2023).

Yeasts are widely studied by Lithuanian and international researchers due to their short life cycle, simple structure, and broad biotechnological potential. They are applied in biotechnology, pharmaceuticals, agriculture, and environmental management (Servienė & Serva, 2023; Vepškaitė-Mostavičė et al., 2025). In Lithuania, research has mainly focused on yeast metabolites, metal accumulation, pathogenicity, physiology, and occurrence in agricultural and natural substrates. However, studies addressing yeast distribution in contaminated versus pristine environments and their application in environmental remediation remain limited (Repečkienė et al., 2002; Šalomskienė et al., 2003; Paškevičius et al., 2010).

For the research described in this dissertation soil and water samples were collected from sites directly or potentially affected by anthropogenic activity, including areas near the Astravyets Nuclear Power Plant (Lithuanian border), territories in Alytus following the tire recycling plant fire, chromium-contaminated areas in Klaipėda, high-traffic areas in Vilnius and fuel depot territories, as well as water from the Neris River, Alytus city, and the Baltic Sea near the Būtingė oil terminal.

These anthropogenically impacted substrates were selected to isolate yeast strains exhibiting increased tolerance to environmental pollution and the ability to biodegrade or bioaccumulate contaminants, and to assess their potential for application in bioremediation processes.

The results significantly expand national knowledge on yeast diversity, distribution, and ecological characteristics in human-impacted environments. The study has a strong applied dimension: a novel biopreparation for petroleum hydrocarbon-contaminated soil remediation was developed in Lithuania. Additionally, the biodegradation potential of agricultural residues substrates and pilot chromium bioaccumulation experiments highlight the practical environmental applications of these microorganisms.

AIM OF THE STUDY

To investigate the distribution and biodiversity of yeasts in various anthropogenic substrates, to characterize their biological and ecological properties, and to assess their potential applicability in environmental bioremediation processes.

OBJECTIVES OF THE STUDY

1. To isolate and identify yeasts from various anthropogenic substrates (water and soil);
2. To determine the morphological, physiological and biochemical characteristics of the isolated yeasts;
3. To evaluate the potential practical applications of the isolated yeasts in the biodegradation of agricultural residues, heavy metals and petroleum hydrocarbons.

DEFENDED STATEMENTS

1. Yeasts belonging to the phylum *Basidiomycota* predominate in anthropogenic soil and water samples, with *Rhodotorula mucilaginosa* being the most frequently identified species.
2. Yeasts isolated from anthropogenic soil and water samples mostly do not ferment carbon sources; however, they are capable of assimilating a broad spectrum of them. They grow at temperatures of 5–40 °C and at pH 3–8, while some strains are able to grow under more extreme conditions.
3. Biopreparations developed on the basis of purposefully selected microorganisms (yeasts, other microscopic fungi, and bacteria) ensure efficient biodegradation of petroleum hydrocarbons and agricultural residues.
4. Yeasts of the species *Rhodotorula mucilaginosa* are capable of accumulating small amounts (up to 10.0 mg/L) of chromium compounds (CrCl_3), thereby contributing to the reduction of their environmental dispersion.

SCIENTIFIC RELEVANCE AND NOVELTY OF THE STUDY

This study presents the first comprehensive analysis of yeast species composition in anthropogenically affected water and soil samples in Lithuania and the Baltic States, including environments contaminated with petroleum hydrocarbons, heavy metals, and pollutants from a tire recycling plant fire. A detailed assessment of yeast diversity in the Baltic Sea at the Būtingė oil terminal area was also conducted.

A total of 109 yeast species were isolated, representing 53 genera, 26 families, 14 orders, and 9 classes. *Basidiomycota* dominated (59.6%), while *Ascomycota* accounted for 40.4% of the isolates. The genus *Rhodotorula* was the most prevalent, with *Rhodotorula mucilaginosa* as the dominant species.

An effective biopreparation composed of yeasts, bacteria, and filamentous fungi was developed for the bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. The biopreparation has been patented (Patent No. 7087, issued on 10 September 2024, registered in the Register of Patents of the Republic of Lithuania). The selected microorganisms demonstrated the ability to survive under toxic conditions and efficiently degrade hydrocarbons.

Furthermore, yeast strains capable of degrading lignin and cellulose in agricultural by-products (wheat straw and hemp stalks) and accumulating low concentrations of chromium were identified, highlighting their potential for practical environmental applications.

1. MATERIALS AND METHODS

1.1. Isolation of Yeasts from Soil Samples

Soil samples were collected from sites affected by actual or potential anthropogenic pollution, including areas impacted by environmental incidents (a tire recycling plant fire in Alytus), historically or currently contaminated locations (chromium-contaminated soils in Klaipėda and fuel storage areas), and potential risk zones (urban roadside soils in Vilnius and the Lithuanian–Belarusian border near the Astravyets nuclear power plant).

Sampling areas were divided into plots, and composite samples were prepared from at least four subsamples collected from the 0–15 cm soil layer after removing surface debris. Each composite sample represented at least 150.0 g of soil collected from a minimum area of 5 m². Samples were homogenized, placed in sterile containers, and transported and stored at 5.0±1.0°C until analysis.

Yeasts were isolated and quantified using the serial dilution plating method. Soil samples were processed within 24 h, sieved, thoroughly mixed, and diluted (1:10) in sterile water, followed by serial dilutions. Aliquots were plated in triplicate on selective and non-selective media, including Rose Bengal CAF Agar, Sabouraud Dextrose Agar, glucose–ammonium agar, and diesel-containing medium. Plates were incubated for 2–4 days at 19.0±1.0 °C or 26.0±1.0°C, depending on the medium.

After incubation, yeast colonies were counted, and abundance was expressed as colony-forming units per gram of absolutely dry soil. Dry weight was determined by oven-drying samples at 105.0°C, and results were reported as mean values of replicate measurements.

1.1.1. Soil sampling locations

Soil samples (n=153) were collected from several Lithuanian sites selected to represent different types of actual or potential anthropogenic contamination.

Samples were analyzed at the Agrochemical Research Laboratory of the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry to determine physicochemical properties, including pH, nutrient availability, organic carbon, total nitrogen, exchangeable acidity and pollutants (heavy metals).

1.1.1.1. Forest soils near the Lithuanian-Belarus border (Astravyets area)

Eight long-term monitoring sites were established in forest ecosystems within Lithuanian territory along an approximately 60 km arc about 30 km from the Astravyets nuclear power plant. Both organic (OH) and mineral (M) soil horizons were sampled (n=48) annually at the end of summer from 2019 to 2021, yielding a total of 48 soil samples.

1.1.1.2. Alytus city and district after a tire-recycling plant fire

Soil sampling (n=33) was conducted annually in October from 2019 to 2021 in Alytus city and the surrounding district at sites potentially affected by pollutants released during a tire-recycling plant fire. A total of 33 soil samples were collected from urban, agricultural/household, and forest environments at varying distances from the fire source. Sampling locations were selected in cooperation with the National Public Health Centre under the Ministry of Health.

1.1.1.3. Chromium-contaminated soils in Klaipėda

In 2020–2021 (June and September), soil samples (n=20) were collected from five sites in Klaipėda city with previously identified elevated chromium concentrations. Sampling locations were selected based on coordinates provided by the Lithuanian Geological Survey, resulting in a total of 20 soil samples. Existing chromium data were evaluated against national hygienic limit values (Lietuvos Respublikos Sveikatos apsaugos ministerija, 2004), and selected samples were further analyzed for chromium and other heavy metals.

1.1.1.4. Soils contaminated with petroleum hydrocarbons

In June 2020, thirty soil samples (n=30) were collected from fuel depot territories where contamination with petroleum hydrocarbons was considered most likely. Sampling sites were described in detail; however, exact sampling locations were not disclosed for confidentiality reasons.

1.1.1.5. Soils near the busiest streets in Vilnius

During June 2020–2021, 22 soil samples (n=22) were collected from green zones adjacent to heavily trafficked sections of Geležinio Vilko Street

and Savanorių Avenue in Vilnius, where contamination by petroleum hydrocarbons and other traffic-related pollutants was considered most probable.

1.1.2. Water sampling locations

1.1.2.1. Neris River water samples

Water samples (n=16) from the Neris river were collected in June 2020–2021. In total, 16 water samples were taken from river sections located upstream of Vilnius, within the city, and downstream of the city. Sampling sites covered different hydrological sections of the river, including residential areas, protected areas, tributary inflow, and bridge crossings.

1.1.2.2. Alytus city water samples after the tire-recycling plant fire

During the 2019–2021 period, water samples (n=9) were collected once per year in October from sites within Alytus city that were potentially affected by hazardous pollutants released during the tire-recycling plant fire. Three samples were collected annually, resulting in a total of nine water samples. Sampling locations included water used for firefighting purposes, such as an air-intake shaft at the fire site, water from non-operational textile chemical treatment facilities, and water from Gulbynės Lake, which was used during firefighting operations.

1.1.2.3. Baltic Sea water samples in the Būtingė oil terminal area

Baltic Sea water samples (n=80) were collected within the framework of the AB „ORLEN Lietuva“ Monitoring of the impact of the 2021–2025 environmental monitoring program of the Būtingė oil terminal on environmental quality (sea and coastal zone), coordinated by the Geoenvironmental Research Laboratory (project leader: dr. Kęstutis Jokšas). A total of 80 Baltic Sea water samples were collected, with eight samples taken quarterly from eight monitoring stations (B-1 to B-8) located within the Būtingė oil terminal area. Sampling was conducted quarterly from the second quarter of 2021 through the third quarter of 2023, following the established monitoring scheme (Navickas, 2020).

1.2. Yeast identification and characterization methods

1.2.1.1. Determination of morphological characteristics

Isolated yeast colonies were assessed macroscopically on Yeast Morphology Agar (BD Difco, USA) based on colony texture, color, surface appearance, elevation, and margin characteristics, including the presence of hyphae or pseudohyphae. Micromorphology was examined using slide cultures prepared on morphological agar, incubated for 48 h at $28.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ in humid chambers. Preparations were observed with a Leica DM5000B microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany) at $400\times$ and $1000\times$ magnification, recording cell morphology and filament formation relevant for species identification.

1.2.1.2. Determination of physiological characteristics

Yeast physiological profiling included carbohydrate fermentation and assimilation, as well as growth at different temperatures and pH values. Fermentation tests were performed in Yeast nitrogen base medium (BD Difco, USA) supplemented with individual carbohydrates (Merck KGaA, Germany), and monitored for up to 28 days at $28.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ using inverted Durham tubes. Results were classified based on CO_2 production intensity and timing.

Carbon source assimilation was assessed on Yeast Nitrogen Base media containing individual carbon sources, including carbohydrates, organic acids, alcohols, and hydrocarbons. Plates were inoculated with yeast suspensions using a sterile multichannel inoculator and incubated at $28.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 2–4 days, with assimilation recorded relative to positive (glucose) and negative (no carbon source) controls.

Temperature tolerance was evaluated on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (BD Difco, USA) at $5,0\text{--}45,0^{\circ}\text{C}$ based on visible growth after 2–4 days. pH tolerance was assessed in liquid Sabouraud dextrose medium (BD Difco, USA) adjusted to different pH values using standardized inocula, with growth evaluated visually by turbidity after 2 days at $25.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$.

1.2.1.3. Identification using morphological and physiological test results

Species identification was based on combined results of the above tests using the species keys in Kurtzman et al. (2011) and electronic database <https://theyeasts.org/>. In addition, the DBB reaction was performed on SDA-

grown cultures using DBB reagent (Sigma-Aldrich, USA) to differentiate yeasts of *Ascomycota* and *Basidiomycota* based on color change.

1.2.1.4. Enzymatic activity assays

Cellulolytic activity was tested on medium containing carboxymethylcellulose sodium salt (Merck KGaA, Germany) and Yeast nitrogen base, followed by staining with Congo red (Sigma-Aldrich, USA) and washing with 5 M NaCl. A yellow halo around colonies indicated a positive result (Carrasco et al., 2016).

Amylolytic activity was tested on medium with soluble starch (Merck KGaA, Germany) and Yeast nitrogen base; plates were flooded with Lugol's solution (Sigma-Aldrich, USA) and evaluated immediately. A clear/yellowish halo indicated positive activity (Carrasco et al., 2016).

1.3. Identification using chromogenic media

Chromogenic agar (Liofilchem, Italy) is a selective medium containing chromogenic substrates that are cleaved by organism-specific enzymes, producing characteristic colony and/or medium colors. Such media are mainly used in laboratory medicine but can also support environmental studies when targeting certain genera; however, the range of identifiable species is limited and typically includes selected *Candida*, *Diutina*, *Wickerhamiella*, *Issatchenkia*, *Meyerozyma*, and some *Trichosporon* species (Li et al., 2006).

1.4. Identification using mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS identification was performed by comparing protein mass spectra of unknown isolates with reference spectra in a database, typically focusing on the m/z 2–20 kDa range dominated by ribosomal proteins and other abundant cellular proteins, enabling reliable genus- and species-level identification (Singhal et al., 2015; Khotir Farrance, 2017; Dura, 2020). Pure 2–3 day cultures from SDA were prepared using direct transfer and formic-acid extraction, then analyzed on a Bruker (USA) instrument according to the manufacturer's workflow.

1.5. Identification using sequencing

Genetic identification targeted the LSU rDNA D1/D2 region, recognized as a standard for fungal identification (Shoch et al., 2012). DNA was extracted

using “ZR-Fungal/Bacterial DNA MiniPrep” (Zymo-Research, USA) with minor modifications, quantified by spectrophotometry (Implen, Germany), and amplified by PCR using NL1/NL4 primers with KAPATaq Ready-Mix (KAPABiosystems, USA) on a Techne TC-5000 (Bibby Scientific Ltd, UK) thermocycler. PCR products were checked by agarose gel electrophoresis using Midori Green Advance (Nippon Genetics, Germany) and a DNA size standard ZR 50 bp DNA (Zymo-Research, USA). Sequencing was performed by BaseClear B.V. (Leiden, Netherlands); sequences were assembled in BioEdit (version 7.0.5.3., Tom Hall, Ibis Biosciences, USA) and compared with <https://theyeasts.org/> (The Yeasts Trust, Netherlands) using pairwise alignment.

1.6. Biodegradation-related studies of yeasts isolated from anthropogenic substrates

1.6.1. Selection of yeasts and other microorganisms for bioremediation of petroleum-hydrocarbon-contaminated soil under laboratory conditions

For these experiments, yeasts isolated from petroleum-hydrocarbon-contaminated soil on agar media containing 1% diesel were used. Primary screening was based on growth intensity in liquid media supplemented with 1,0% diesel, prepared according to Jankevičius et al. (2003), using separate formulations for yeasts/microscopic fungi and for bacteria.

Considering that petroleum hydrocarbon bioremediation involves multiple microbial groups, biodegradation potential was evaluated in yeasts, microscopic fungi, and bacteria, and compared between single cultures and mixed microbial communities (Das and Chandran, 2011). Microscopic fungi and bacterial isolates were obtained from the State Scientific Research Institute Nature Research Centre collection and screened alongside yeast isolates.

All cultures were inoculated at an initial concentration of 10^5 CFU/ml and incubated for 72 h at $26.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ with shaking (150 rpm) in an incubator KS 4000 control (IKA, Germany). Microbial abundance was determined by serial dilution plating followed by incubation at $26.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ for 2–4 days. The most actively growing strains were selected for laboratory-scale bioremediation experiments in diesel-contaminated soil.

Selected microorganisms (10^9 CFU/ml) were introduced into soil contaminated with 2.0% diesel, creating 12 experimental variants, each containing 1.3 kg of soil. Experiments were conducted over 28 days with and

without nutrient additives, including Azofoska NPK 15-15-15 (Emolus, Ltd.), $\text{NH}_4(\text{NO}_3)$ and KCl (Sigma-Aldrich, USA).

Microbial abundance (CFU/g) was monitored weekly by plating on agar media containing 1% diesel for bacteria, fungi, and yeasts. Petroleum hydrocarbon concentrations (g/kg) were measured biweekly at GVT LT, Ltd. (now Toksika, Ltd.) according to LST EN ISO 16703 (LAND 89-2010). After one month, an additional microbial suspension (10^9 CFU/ml) was added to all variants except the control.

1.6.2. Evaluation of bioremediation in outdoor conditions

A production-scale biopreparation was formulated from the most active laboratory-selected strains, comprising bacteria (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas koreensis*, *Rhodococcus fascians*), yeasts (*Yarrowia lipolytica*, *Rhodosporidium diobovatum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces roseus*), and microscopic fungi (*Penicillium dierckxii*, *Sarocladium kiliense*, *Trichoderma longibrachiatum*). The biopreparation was activated from 10^6 to 10^9 CFU/ml in a 30.0 L fermenter and scaled up in a 3.0 m³ fermenter using a defined liquid medium containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, diesel, Polisorbate 80 (Sigma-Aldrich, USA), Azofoska NPK (S) 15-15-15 (11) (Emolus, Ltd., Lithuania), and beer wort (11°Blg; Vilniaus alus, Ltd., Lithuania).

Four field variants (two treated and two controls) were established in diesel-contaminated soil with initial petroleum hydrocarbon concentrations of 48.0–50.0 g/kg at the PI „Grunto valymo technologijos“ (now „Toksika“, Ltd.) site in Kiškėnai village (Klaipėda district). The biopreparation ($\geq 10^9$ CFU/ml) was applied by spraying, and soil aeration was performed biweekly. Microbial abundance (CFU/g) was monitored in week 2 and during months 1–3, while soil pH, moisture, soil and ambient temperature were measured monthly. Residual petroleum hydrocarbons were determined after two weeks and then monthly up to three months according to LST EN ISO 16703 (LAND 89-2010).

1.6.3. Evaluation of biodegradation of agricultural residues

Yeast biodegradation activity was evaluated using plant substrates—wheat straw (*Triticum aestivum*) and hemp stems (*Cannabis sativa*). One gram of each substrate was placed in round-bottom flasks and inoculated with microbial mixtures comprising *Trichoderma rossicum* and selected yeasts (*Candida glabrata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cystofilobasidium macerans*, *Dipodascus armillariae*, *Geotrichum silvicola*, *Guehomyces pullulans*, *Komagataella pastoris*). Substrates were sterilized (5075EL,

Tuttnauer, Netherlands) at 121.0°C for 15 min. Samples were incubated at 28.0±1.0°C, and lignin and cellulose degradation was assessed after 15 and 30 days. In total, 26 experimental variants were prepared.

Cellulose content was determined by sequential chemical treatment followed by filtration, drying at 105.0°C to constant mass, and calculation according to Jermakov et al. (1987). Lignin content was determined using acid hydrolysis, filtration, drying at 105.0°C, and calculation according to Chiudakova (1984).

1.6.4. Evaluation of chromium bioaccumulation by microorganisms

Microbial capacity to accumulate heavy metals was evaluated using 10.0 and 100.0 mg/l CrCl₃ solutions sterilized by filtration through 0.22 µm cellulose nitrate filters (Merck KGaA, Germany). Microorganisms were isolated from trivalent chromium-contaminated soil in Klaipėda city, and five representative strains were selected: *Bacillus subtilis*, *Cyberlindnera jadinii*, *Penicillium chrysogenum*, *R. mucilaginosus*, and *Solicoccozyma terrea*.

Standardized suspensions (10⁹ CFU/ml; OD₅₃₀ for yeasts and fungi, OD₆₂₅ for bacteria) were incubated in sterile flasks containing chromium solutions. Chromium accumulation was assessed after 2 and 24 h across 23 experimental variants. After centrifugation (Sigma 2-16 KL, Sigma Laborzentrifugen, Germany), supernatants were analyzed for chromium concentration at the Agrochemical Research Laboratory of the Lithuanian Centre for Agricultural and Forestry Sciences according to LST EN ISO 11885:2009.

1.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 27. Results were considered statistically significant at $p < 0.05$. Associations between categorical variables were assessed using Pearson's χ^2 test; when test assumptions were not met due to small expected frequencies, Monte Carlo simulation was applied to obtain more accurate p-values.

Time dynamics and the effects of experimental and control conditions were evaluated using two-way repeated measures ANOVA, with condition and time as factors. Main effects and interaction (Time × Condition) were analyzed, and effect size was estimated using partial eta squared (η^2).

Frequency of occurrence was calculated as the percentage of samples in which a species was detected. Descriptive statistics (minimum, maximum, mean) and standard deviation were calculated using Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). Venn diagrams were created using Piktochart (Piktochart Sdn. Bhd., Malaysia).

2. RESULTS

2.1. Yeast occurrence and biodiversity in anthropogenic soils

2.1.1. Yeast occurrence and biodiversity in forest soil at the Lithuanian border within the potential Astravyets nuclear plant impact zone in 2019-2021

Forest soil (n=48) on the Lithuanian side near the Belarus border, close to the Astravyets nuclear power plant, was investigated to support long-term environmental monitoring. In addition to physicochemical analyses, microbiological assessments, including yeasts, were performed as indicators of ecosystem status. Although no contamination has been recorded, the study provides baseline data for background conditions and long-term trend evaluation.

During the study period, yeast abundance ranged from 0.00 to 2.70×10^5 CFU/g, with a mean of 3.11×10^4 CFU/g. The highest value was observed in 2020 (sample 1OH). In the organic (OH) layer, mean yeast concentrations were 2.60×10^4 CFU/g (2020), 8.20×10^4 CFU/g (2021), and 2.00×10^4 CFU/g (2022), while in the mineral layer they were 1.30×10^4 , 3.50×10^4 , and 4.50×10^3 CFU/g, respectively.

From these samples, 46 yeast isolates were obtained and 14 yeast species were identified. Yeast species composition included 42.86% *Ascomycota* and 57.14% *Basidiomycota*. The most frequently detected species were *Cryptococcus gattii* (23.91%), *Cutaneotrichosporon mucoides* (13.04%), and *Trichosporon inkin* (10.87%). No statistically significant differences were observed ($p>0.05$).

2.1.2. Yeast occurrence and biodiversity in Alytus city and district soils after a tire-recycling plant fire in 2019-2021

Soils (n=33) in the Alytus district located along the smoke plume from a tire-recycling plant fire (2019) were investigated to assess potential effects on soil biological balance, with emphasis on yeasts as sensitive indicators of contamination and ecological change.

During 2019–2021, yeast abundance ranged from 10^2 to 10^5 CFU/g, with both highest and lowest values recorded in individual sites each year. No statistically significant relationship was found between yeast abundance or species composition and distance from the fire epicenter, indicating no measurable impact of the fire on yeast communities ($p>0.05$).

A total of 142 yeast isolates representing 50 species were identified. Taxonomic composition varied by year, with *Ascomycota* dominating overall (53.70%), but no significant temporal shifts at the phylum level were detected. Species richness differed among distance zones, with two species (*Saccharomycopsis schoenii* and *Nakaseomyces glabratus*) present in all zones; dominant species included *S. terreus*, *C. mucoides*, *K. pastoris*, and *R. mucilaginosa*.

Agrochemical parameters showed wide variability (pH 4.4–7.6; available P 50–1525 mg/kg; K 68–1050 mg/kg; C:N 9:1–18:1), reflecting differences in land use and organic matter input. However, no statistically significant associations were observed between these parameters and yeast abundance or biodiversity ($p > 0.05$).

2.1.3. Yeast occurrence and biodiversity in chromium-contaminated soils in Klaipėda in 2020–2021

Soils ($n=20$) contaminated with chromium compounds in Klaipėda city were investigated to assess the effects of chromium on soil biological balance and microbial community structure, with particular focus on yeasts as potential indicators of contamination and adaptation. Chromium concentrations ranged from 52,0 to 1350,0 mg/kg, exceeding the national limit value (80,0 mg/kg) by up to 16.9-fold. However, agrochemical analyses performed in 2021 indicated that chromium and other metals did not exceed applicable limit values.

Yeast abundance showed no major fluctuations during the study period. Concentrations ranged from 0.00 to 12.53×10^2 CFU/g across seasons in 2020–2021, with mean values between 2.54×10^2 and 4.08×10^2 CFU/g. The highest yeast counts were recorded in individual samples in each sampling period, but no consistent temporal trend was observed.

In total, 39 yeast isolates representing 16 species were identified. The most frequently detected species were *Solicoccozyma terreus*, *Goffeauzyma gastrica*, *Naganishia diffluens*, *R. mucilaginosa*, and *Tausonia pullulans*. Species dominance varied by season and year. In the most chromium-contaminated soil (1350 mg/kg), *S. terreus* and *Pichia fermentans* were detected; *S. terreus* occurred across different contamination levels, whereas *P. fermentans* was restricted to the most contaminated site.

2.1.4. Yeast occurrence and biodiversity in petroleum-hydrocarbon-contaminated fuel depot soils in 2020

Soils (n=30) from former fuel depot sites heavily contaminated with petroleum hydrocarbons due to historical handling and storage practices were investigated to assess effects on soil biological balance, with emphasis on yeasts as organisms capable of hydrocarbon degradation and bioremediation-related activity.

A total of 30 soil samples were analyzed. Yeasts were detected in 90.0% of samples, whereas petroleum-hydrocarbon-degrading yeasts occurred in 6.7%. Mean yeast abundance was 1.67×10^5 CFU/g, ranging from 0.00 to 4.09×10^6 CFU/g. The highest yeast concentration was recorded in sample No. 6, which also contained the highest number of hydrocarbon-degrading yeasts.

From these soils, 75 yeast isolates were obtained and 34 yeast species were identified. The most frequently isolated species included *R. mucilaginosa* (20.00%), *S. terreus* (20.00%), *Cryptococcus saitoi*, *Rhodotorula diobovata*, and *Tausonia pullulans* (each 16.67%), and *Aureobasidium pullulans* and *Cystobasidium minutum* (each 13.33%). Two petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeast species were identified: *S. roseus* and *R. mucilaginosa*.

2.1.5. Yeast occurrence and biodiversity in anthropogenic soils in Vilnius in 2020-2021

Soils (n=22) adjacent to major traffic corridors in Vilnius were investigated to assess the effects of long-term exposure to heavy metals and petroleum hydrocarbons on microbial communities, with emphasis on yeasts as indicators of urban environmental status.

In 2020 and 2021, 11 soil samples were analyzed each year. In 2020, yeasts were detected in 63.60% of samples, whereas in 2021 they were present in all samples; petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeasts were detected in both years but more frequently in 2021. Mean total yeast abundance decreased from 3.73×10^3 CFU/g in 2020 to 7.41×10^2 CFU/g in 2021, while mean petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeast abundance ranged from 3.43×10^2 CFU/g in 2020 to 7.00×10^1 CFU/g in 2021.

Overall, 59 yeast isolates representing 33 species were identified. The most frequently detected species were *S. terreus*, *R. diobovata*, *C. macerans*, *P. fermentans*, and *R. mucilaginosa*. In total, 15 petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeast isolates belonging to nine species were obtained, with *R. diobovata* and *R. mucilaginosa* being the most common.

2.2. Yeast occurrence and biodiversity in anthropogenic water bodies

2.2.1. Yeast occurrence and biodiversity in Neris River water samples in 2020-2021

Water (n=16) from the Neris River was analyzed to assess microbiological status and the ecosystem's potential for natural petroleum hydrocarbon degradation, focusing on total yeasts and petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeasts.

In 2020, yeasts were detected in 37.50% of samples, with total yeast concentrations ranging from 5.00 to 2.50×10^1 CFU/ml and petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeasts from 0.21 to 0.58 CFU/ml. In 2021, yeasts were present in all samples, while petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeasts were absent in only 12.50%. Total yeast concentrations ranged from 2.10 to 4.93×10^1 CFU/ml, and petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeasts from 0.06 to 2.40 CFU/ml.

Overall, 46 yeast isolates representing 25 species were identified. Dominant species included *R. mucilaginosa* and *R. diobovata*, while petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeasts comprised 10 isolates belonging to six species, most frequently *Metschnikowia pulcherrima* and *R. mucilaginosa*.

2.2.2. Yeast occurrence and biodiversity in Alytus city water samples after the tire - recycling plant fire in 2019-2021

Water (n=9) from an air intake shaft, textile chemical treatment facilities, and Gulbynės Lake was investigated following the Alytus tire-recycling plant fire to quantify yeasts and identify contamination-tolerant species with potential biotechnological relevance.

Yeast concentrations in the sampled waters ranged from 0.00 to 10^3 CFU/ml and were generally similar among sites, except for one location where yeasts were not detected in 2021. In total, 25 yeast isolates representing 14 species were identified. *Basidiomycota* dominated in 2019–2020, whereas *Ascomycota* prevailed in 2021. Overall, *Basidiomycota* accounted for most species (73.10%), with *Cutaneotrichosporon mucoides*, *Cystofilobasidium macerans*, and *R. mucilaginosa* being the most frequent.

2.2.3. Yeast occurrence and biodiversity in Baltic Sea Būtingė oil terminal zone

Sea water (n=80) from the offshore and coastal zones around the ORLEN Lietuva Būtingė oil terminal was investigated within the 2021–2025 environmental quality monitoring program to assess microbiological status under potential oil hydrocarbon impact, focusing on yeasts.

Across the study period, total yeast concentrations ranged from 0.00 to 1.29 CFU/ml. Petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeasts showed a similar pattern, ranging from 0.00 to 1.21 CFU/ml.

In total, 115 yeast isolates representing 36 species were identified. The dominant species was *R. mucilaginosa* (54.17%), followed by *R. diobovata* (12.50%). Ninety five petroleum-hydrocarbon-oxidizing yeast isolates belonging to 19 species were obtained, with *R. mucilaginosa* (62.50%), *R. diobovata* (16.67%), and *S. roseus* (12.50%) being the most frequent.

2.3. Taxonomic synthesis of yeasts isolated from different anthropogenic substrates

Study sites represented diverse contamination sources, including chromium-contaminated soils (Klaipėda), petroleum hydrocarbons (former fuel depots, traffic-affected urban soils), and incident-related impacts (Alytus fire) with secondary contamination pathways in soil and water. Frequently detected yeasts showed increased tolerance to pollutants and the ability to degrade organic compounds, indicating their role in self-regulation processes of impacted ecosystems.

Overall, *Basidiomycota* predominated (59.61%) over *Ascomycota* (40.39%). The dominant classes were *Saccharomycetes* (36.38%), *Tremellomycetes* (30.57%), and *Microbotryomycetes* (27.66%). The most abundant orders were *Saccharomycetales*, *Sporidiobolales*, and *Filobasidiales*, while the most abundant families included *Sporidiobolaceae*, *Saccharomycetaceae*, *Filobasidiaceae*, *Piskurozymaceae*, and *Trichosporonaceae*. At the genus level, *Rhodotorula*, *Candida*, and *Solicoccozyma* dominated. The most frequently isolated species was *R. mucilaginosa*, followed by *Solicoccozyma terrea* and several other ecologically and biotechnologically relevant taxa.

Statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed between yeast communities in sea and river water, as well as between soil and water. Sea water was dominated by genera such as *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Candida*, and *Aureobasidium*, whereas river water was characterized by

Cystofilobasidium, *Metschnikowia*, *Issatchenkia*, and *Saccharomycopsis*. Soil samples showed higher frequencies of *Solicoccozyma*, *Cutaneotrichosporon*, *Naganishia*, *Trichosporon*, *Komagataella*, and related genera, while water samples were more frequently dominated by *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Filobasidium*, and *Debaryomyces*.

2.4. Morphological characterization of yeasts isolated from anthropogenic substrates

Morphological characterization (macro- and micromorphology) was performed to support assessment of taxonomic diversity, environmental adaptation, and ecological roles. These observations provide a basis for subsequent biochemical and genetic analyses, with key morphological traits of the most frequently isolated yeasts summarized in Appendix 2.

2.5. Physiological and biochemical characterization

2.5.1. Carbohydrate fermentation by yeasts isolated from anthropogenic substrates

Fermentation tests were used to assess metabolic activity and carbohydrate utilization. Most yeast isolates did not ferment the tested substrates; glucose was the most frequently fermented carbon source (30.15%), while lactose was rarely fermented (1.10%).

No carbohydrates were fermented by yeasts of the genera *Apiotrichum*, *Aureobasidium*, *Colletotrichum*, *Coniochaeta*, *Cryptococcus*, *Cutaneotrichosporon*, *Cyberlindnera*, *Cystofilobasidium*, *Diutina*, *Exophiala*, *Filobasidium*, *Goffeauzyma*, *Holtermanniella*, *Malassezia*, *Moesziomyces*, *Naganishia*, *Papiliotrema*, *Rhodotorula*, *Saccharomycopsis*, *Saitozyma*, *Solicoccozyma*, *Sporobolomyces*, *Tausonia*, *Trichosporon*, *Udeniomyces*, *Vanrija*, *Yarrowia*, as well as the species *Candida nemodendra*, *Candida palmioleophila*, *Candida saitoana*. Glucose-only fermentation was observed for *Candida boidinii*, *Candida castellii*, *Candida norvegica*, *Kazachstania telluris*, *Metschnikowia kunwiensis*, *P. fermentans*, *P. occidentalis*, and yeasts of the genus *Vishniacozyma*.

2.5.2. Assimilation of carbohydrates and other carbon sources

Assimilation testing was used to assess metabolic plasticity and the ability to grow on a wide range of carbon sources. All yeasts utilized glucose as the

sole carbon source, while the least utilized carbon source was methanol (4.15%).

The broadest assimilation spectra were observed for *A. pullulans* and *C. mucoides* (each assimilated 85.00% of tested carbon sources), followed by *Exophiala xenobiotica* (82.50%) and *Vanrija humicola* (82.50%). The narrowest assimilation spectra were observed for *Candida glabrata* (5.00%), *Saccharomycopsis schoenii* (12.50%), *Cryptococcus gattii* (15.00%), *Saccharomyces cerevisiae* (15.00%), *Kazachstania exigua* (17.50%), *P. fermentans* (20.00%), and *Geotrichum candidum* (22.50%).

Assimilation profiling revealed a broad but selective metabolic capacity: most isolates preferentially utilized hexose-related substrates, while assimilation of some disaccharides and alcohols was less common, and organic acids and alkanes were weakly utilized or not assimilated. This indicates notable metabolic flexibility and potential relevance of these yeasts for organic compound transformation and bioremediation in anthropogenic environments.

2.5.3. Influence of environmental conditions on the growth of yeasts isolated from different anthropogenic substrates

2.5.3.1 Temperature tolerance

Most yeasts grew at 19.0°C, whereas no species grew at 45.0°C. At 40.0°C, only *Cutaneotrichosporon mucoides* strains showed weak growth, originating from Alytus district and Lithuania–Belarus border soils. The most intensive growth at $\leq 25.0^\circ\text{C}$ was observed for *G. gastrica* and *T. pullulans* (Klaipėda soils), *C. macerans* and *T. pullulans* (Vilnius soils), and *S. roseus* (Baltic Sea water). Overall, all species grew well at 19.0°C and 25.0°C, with growth rates decreasing at lower temperatures.

2.5.3.2. pH tolerance

Yeasts generally showed optimal growth at pH 4.0–7.0. The widest tolerance to both acidic (pH 3.0) and alkaline (pH 8.0) conditions was observed for *C. tropicalis*, *K. pastoris*, and *A. pullulans*, regardless of isolation site. All strains of *Issatchenkia orientalis* and *P. fermentans* grew at pH 3.0, while all strains of *C. mucoides*, *Naganishia diffluens*, and *P. fermentans* grew at pH 8.0.

2.5.4. Qualitative assessment of biochemical traits of yeasts isolated from anthropogenic substrates

2.5.4.1. Cellulase and amylase activity

Cellulolytic activity was detected in 38.21% (42) and amylolytic activity in 40.00% (44) of yeast species. All strains of several frequently isolated species, including *A. pullulans*, *Candida tropicalis*, *C. mucoides*, *G. gastrica*, *N. diffluens*, and *T. pullulans*, exhibited both activities. All *C. gattii* and *C. macerans* strains were cellulolytic, whereas all *I. orientalis* strains were amylolytic.

Lower enzymatic activity was observed in *Debaryomyces hansenii*, while *Rhodotorula* species showed variable activity depending on origin, indicating metabolic plasticity. Reduced cellulolytic activity in *D. hansenii* and *S. roseus* may reflect adaptation to environments dominated by readily available carbohydrates.

2.6. Evaluation of the use of yeasts and other microorganisms isolated from anthropogenic substrates in biodegradation processes

2.6.1. Evaluation of the use of yeasts and other microorganisms for biological remediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons

2.6.1.1. Laboratory-scale evaluation of the selection and application of oil-oxidizing microorganisms for bioremediation of diesel-contaminated soil

To compare the growth of different taxonomic groups in diesel-containing media, the study included yeasts, filamentous fungi, and bacteria. After 72 h incubation in liquid medium with 1% diesel, the selection results showed that among filamentous fungi the weakest growth was observed for *Trichoderma harzianum* (3.6×10^4 CFU/ml), while the strongest growth was for *Trichoderma longibrachiatum* (5.5×10^7 CFU/ml). For yeasts, the weakest growth was recorded for *Rhodotorula minuta* (1.2×10^4 CFU/ml), whereas the strongest growth was for *S. roseus* (5.0×10^7 CFU/ml). Among bacteria, the weakest growth was observed for *Pseudomonas putida* (1.1×10^5 CFU/ml), while the strongest growth was recorded for *Acinetobacter baumannii* (6.5×10^{10} CFU/ml).

Based on the selection results (highest CFU), the following microorganisms were chosen for further experiments:

Yeasts: *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium diobovatum*, *R. mucilaginosa*, and *S. roseus*;

Filamentous fungi: *Sarocladium kiliense*, *T. longibrachiatum*, and *Penicillium dierckxii*;

Bacteria: *A. baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas koreensis*, and *Rhodococcus fascians*.

Using these strains, multiple experimental variants were established in diesel-contaminated soil (model conditions).

Dynamics of oil-oxidizing microorganisms in soil (CFU/g)

Oil-oxidizing bacteria. In soil without additives, bacterial counts increased up to day 21 (1.27×10^9 CFU/g), then decreased to 7.05×10^8 CFU/g by day 28. In soil with additives, bacterial counts increased throughout the experiment from 3.50×10^7 to 3.70×10^9 CFU/g;

Oil-oxidizing yeasts. Yeast counts decreased throughout the experiment in both variants (with and without additives): from 6.15×10^7 CFU/g down to 2.50×10^4 CFU/g in the yeast-only variant, and to 3.50×10^4 CFU/g in the yeast + additives variant;

Oil-oxidizing filamentous fungi. Fungal counts increased until day 14 (5.10×10^6 to 1.00×10^7 CFU/g), then decreased, fluctuating between 3.50×10^6 and 2.00×10^5 CFU/g.

In diesel-contaminated soil with a yeast + bacteria mixture and no additives, yeast abundance decreased with minor fluctuations from $\sim 5.00 \times 10^5$ to 5.00×10^4 CFU/g, while bacterial counts increased from 5.50×10^7 to 1.32×10^9 CFU/g. With additives, yeast abundance initially increased to 7.80×10^6 CFU/g during the first week and subsequently declined to 1.15×10^5 CFU/g. In the same variant, bacterial counts increased until day 14 (2.30×10^{10} CFU/g) and then decreased to 6.70×10^9 CFU/g.

In soil containing a yeast + bacteria + fungi mixture with additives, the abundance of all tested microorganisms was consistently higher than in the corresponding no-additive variant.

Diesel concentrations decreased in all tested variants:

- Bacteria only: from 17.0 g/kg to 9.4 g/kg (no additives) and 5.8 g/kg (with additives);
- Yeasts only: to 8.8 g/kg (no additives) and 4.5 g/kg (with additives);
- Fungi only: to 8.5 g/kg (no additives) and 3.1 g/kg (with additives);
- Yeasts + bacteria: to 12.0 g/kg (no additives) and 3.7 g/kg (with additives);
- Yeasts + bacteria + fungi: to 9.1 g/kg (no additives) and 2.1 g/kg (with additives).

Overall, the mixed consortium of bacteria, yeasts, and filamentous fungi (MIX (M+B+G)) showed the highest petroleum hydrocarbon biodegradation efficiency and was therefore selected for field-scale trials at the GVT LT, Ltd. production site.

2.6.1.2. Evaluation of the use of oil-oxidizing microorganisms for the biological remediation of petroleum-contaminated soil under field conditions

To evaluate the practical applicability of laboratory results, field-scale experiments were conducted to assess the effectiveness of oil-oxidizing microorganisms in remediating petroleum-contaminated soil under real environmental conditions.

2.6.1.2.1. Changes in environmental conditions during biological degradation of petroleum hydrocarbons under field conditions

Soil pH remained near neutral (pH 6.0–7.0) throughout the experiment. Mean monthly ambient temperatures ranged from 10.5 to 22.5 °C, with an overall mean of 16.5 °C, while soil temperatures varied from 15.0 to 34.0 °C (mean 26.3 °C). Soil moisture ranged from 12.7% to 24.8% in both experimental and control variants and was maintained near optimal levels by periodic watering. No significant differences in soil moisture were observed between treatments.

2.6.1.2.2. Changes in microorganism abundance in remediated soil under field conditions

In soil treated with the biopreparation, oil-oxidizing bacteria increased until day 14, reaching 2.70×10^{11} CFU/g in experimental variant No. 1 (50.0 g/kg hydrocarbons) and 2.40×10^{10} CFU/g in variant No. 2 (48.0 g/kg), followed by a gradual decline to $\sim 2.10 \times 10^5$ and 1.80×10^5 CFU/g, respectively.

Oil-oxidizing yeast abundance remained relatively stable until day 56, ranging from 2.60×10^4 to 8.00×10^4 CFU/g (variant No. 1) and from 1.4×10^4 to 8.00×10^4 CFU/g (variant No. 2), after which values declined to 8.00×10^3 – 1.00×10^4 CFU/g and 1.30×10^3 – 4.50×10^3 CFU/g, respectively.

Oil-oxidizing filamentous fungi concentration varied throughout the experiment, ranging from 1.3×10^3 to 8.0×10^4 CFU/g in variant No. 1 and from 6.0×10^5 to 4.0×10^3 CFU/g in variant No. 2.

2.6.1.2.3. Changes in petroleum hydrocarbon concentrations in remediated soil under field conditions

In control soil variants, petroleum hydrocarbon concentrations decreased only slightly over five months (from 50.0 to 46.0 g/kg and from 48.0 to 44.0 g/kg). In contrast, experimental variants showed a continuous decline, with biopreparation application resulting in a 60.90% reduction in variant No. 1 and a 56.80% reduction in variant No. 2 compared with controls ($p < 0.05$).

A temporary increase in petroleum hydrocarbons observed in experimental variant No. 2 after 28 days was attributed to insufficient soil homogenization. This issue was subsequently corrected by improving sample preparation, ensuring data reliability in later analyses.

2.6.2. Evaluation of the use of yeasts and other microorganisms isolated from various anthropogenic substrates for the biodegradation of agricultural residues

The ability of yeasts to degrade agricultural residues materials was evaluated using hemp and wheat substrates, in comparison with the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. Lignin and cellulose degradation was assessed after 15 and 30 days under different supplementation conditions.

For hemp substrate, the highest lignin reduction after 15 days was observed in variants combining *Trichoderma* with the yeast biopreparation and mineral additives (10.72%), while after 30 days the greatest reduction

occurred in variants supplemented with minerals and glucose (12.89%). In wheat substrate, lignin degradation was more pronounced, reaching 28.20% after 15 days and up to 59.39% after 30 days, with the highest values recorded in variants containing mineral supplements and/or glucose.

Cellulose degradation in hemp substrate was highest after 15 days in variants with the yeast biopreparation alone (30.41%) and after 30 days in variants containing *Trichoderma* with mineral supplements (50.56%). In wheat substrate, the greatest cellulose reduction reached 28.46% after 15 days and 64.92% after 30 days, particularly in variants supplemented with glucose.

Overall, lignin biodegradation was most effective in the presence of mineral supplements and/or glucose, while cellulose degradation after prolonged incubation was strongest when the yeast biopreparation was supplemented with glucose.

2.6.3. Evaluation of the use of yeasts and other microorganisms isolated from anthropogenic substrates for chromium bioaccumulation

Chromium bioaccumulation experiments were conducted to assess the ability of microorganisms isolated from anthropogenic substrates to accumulate heavy metals and their potential for bioremediation. These experiments provided insight into microbial tolerance to chromium toxicity and their effectiveness in reducing chromium concentrations.

At a chromium concentration of 100.0 mg/L, no significant accumulation was observed compared with the control. In contrast, at 10.0 mg/L, *B. subtilis* showed the highest accumulation capacity, reaching 89.80% after 24 h and 79.50% after 2 h. The third highest accumulation was observed for *R. mucilaginosa*, which accumulated 43.40% of chromium after 24 h.

3. DISCUSSION

3.1. Yeasts in forest and anthropogenic soils

In forest soils along the Lithuanian–Belarusian border, yeast concentrations (10^3 – 10^5 CFU/g) corresponded to values typically reported for temperate forest ecosystems and are supported by moderate temperatures, balanced moisture, and high organic matter availability (Buzzini et al., 2017). These levels are lower than those observed in tropical forests and higher than those reported for boreal forests (Buzzini et al., 2017). The detected genera (e.g., *Cutaneotrichosporon*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Naganishia*, *Metschnikowia*, *Solicoccozyma*) are consistent with those commonly reported from temperate forest soils, although relative abundances varied (Mozzachiodi et al., 2022).

Following the tire-recycling plant fire in Alytus in 2019, yeast concentrations in urban and agricultural soils during 2019–2021 ranged from 10^2 to 10^5 CFU/g, which falls within ranges reported for comparable land-use types (Slavikova & Vadkertiova, 2003; Yurkov et al., 2012). Frequently isolated species overlapped with taxa commonly reported from agricultural soils (Vadkertiova & Slavikova, 2006; Lipša et al., 2017). Differences in species composition are likely related to local ecological factors, particularly vegetation and litter input (Ulea et al., 2017). Agrochemical monitoring indicated that contaminant concentrations did not exceed regulatory thresholds after the fire, and several compound groups were below detection limits. Consistent with these findings, no clear fire-related effects on yeast abundance or diversity were detected.

3.2. Yeasts in chromium- and hydrocarbon-affected soils

In Klaipėda soils with previously reported elevated chromium, yeast abundance remained low (10^2 – 10^3 CFU/g) and relatively stable over 2020–2021. Similar ranges have been reported in chromium-contaminated soils, where yeast abundance may decline to 10^1 – 10^4 CFU/g or below detection at high Cr loads (Yang et al., 2014; Bakshi & Panigrahi, 2022). The most frequently detected species (*S. terreus*, *G. gastrica*, *N. diffluens*, *R. mucilaginosa*, *T. pullulans*) are consistent with previous reports from chromium-impacted soils (Al-Battashi et al., 2016; Hu et al., 2018). The limited changes observed may reflect the short observation period and later measurements indicating chromium concentrations below threshold values,

reducing the likelihood of sustained impacts (Yang et al., 2014; Bakshi & Panigrahi, 2022).

In historically hydrocarbon-contaminated soils from former fuel depots, total yeast abundance ranged from 10^3 to 10^6 CFU/g, while hydrocarbon-oxidizing yeasts occurred at 10^2 – 10^4 CFU/g and were detected only in a subset of samples. Comparable studies report reduced yeast abundance (10^2 – 10^3 CFU/g) in contaminated soils compared with uncontaminated sites (10^3 – 10^4 CFU/g) (Coulon & Delille, 2003; Evans et al., 2004; Wojcik et al., 2013; Hakima & Ian, 2017; Olukunle, 2020; Achife et al., 2021). Frequent detection of *Rhodotorula mucilaginosa* and *Solicoccozyma terrea*, and identification of hydrocarbon degraders (*S. roseus*, *R. mucilaginosa*), align with reports highlighting *Rhodotorula* and related genera as typical of hydrocarbon-impacted soils (Benmessaoud et al., 2021; Segal-Kischinevsky et al., 2022). Limited detection of degraders may reflect historical contamination and current infrastructure measures reducing active leakage.

In soils adjacent to major traffic corridors in Vilnius, yeast abundance (10^2 – 10^4 CFU/g) and hydrocarbon-degrading yeasts (10^2 – 10^3 CFU/g) were comparable to previous observations (Repečkienė et al., 2002). Dominance of *S. terrea* and *R. diobovata*, including among degraders, is consistent with the recognized role of *Rhodotorula* in hydrocarbon degradation (Benmessaoud et al., 2021). Municipal monitoring indicated no exceedance of heavy metal or petroleum hydrocarbon limits, supported by agrochemical analyses (Čyžius and Stankevičius, 2023), suggesting that detected degraders likely reflect low-level chronic or historical exposure rather than current acute contamination.

Overall, forest soils showed yeast abundance typical of temperate ecosystems (10^3 – 10^5 CFU/g), whereas anthropogenized soils exhibited a wider range (10^2 – 10^6 CFU/g) and a greater contribution of pollution tolerant taxa (e.g., *C. tropicalis*, *R. mucilaginosa*, *S. terrea*), reflecting stronger and more variable anthropogenic pressures.

3.3. Yeasts in freshwater and marine environments

In Neris River water, total and hydrocarbon-oxidizing yeasts occurred at ~ 10 CFU/mL, consistent with commonly reported riverine levels ($\sim 10^4$ CFU/L) (Sláviková & Vadkertiová, 1997; Pietryczuk et al., 2017). Dominance of *R. mucilaginosa* and the presence of hydrocarbon-oxidizing taxa, particularly *R. mucilaginosa* and *M. pulcherrima*, align with published river-water profiles, indicating a typical microbial background with retained oxidative potential (Sláviková & Vadkertiová, 1997; Pietryczuk et al., 2017).

In Baltic Sea samples, total yeasts ranged from 0.00 to 1.29 CFU/mL and hydrocarbon-degrading yeasts from 0.00 to 0.67 CFU/mL, values typical for marine waters (Kutty & Philip, 2008). Frequent detection of *R. mucilaginosa* and *R. diobovata*, together with hydrocarbon-degrading taxa (*R. mucilaginosa*, *R. diobovata*, *Sporobolomyces roseus*), is consistent with reports showing marine yeast communities respond to pollution gradients and seasonal variability (Hassett et al., 2020). Across both freshwater and marine environments, *R. mucilaginosa* emerged as the most widespread species, highlighting its ecological versatility.

3.4. Taxonomic patterns across substrates

Across all anthropogenic substrates, *Basidiomycota* constituted a larger share of yeast species than *Ascomycota*, consistent with reports highlighting the prominence of basidiomycetous yeasts in organic-matter-rich environments (Challacombe et al., 2019). Clear substrate-related patterns ($p < 0.001$) were observed at the genus level: soils were dominated by genera such as *Aureobasidium*, *Candida*, *Cystofilobasidium*, *Cryptococcus*, *Cutaneotrichosporon*, *Goffeauzyma*, *Issatchenkia*, *Komagataella*, *Meyerozyma*, *Naganishia*, *Solicoccozyma*, *Tausonia*, *Trichosporon*, and *Vanrija*, whereas aquatic environments were characterized by *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Kazachstania*, *Rhodotorula*, and *Sporobolomyces*. These distributions broadly agree with published data for soil and water habitats (Libkind et al., 2017; Brandão et al., 2020; Carvalho et al., 2020; Yu et al., 2023).

Statistically significant differences ($p < 0.001$) were also observed between river and sea water communities, with sea water enriched in *Aureobasidium*, *Candida*, *Filobasidium*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Pichia*, *Rhodotorula*, and *Sporobolomyces*, and river water enriched in *Cystofilobasidium*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, and *Saccharomycopsis*. These patterns are consistent with previous Baltic Sea region studies (Buzzini et al., 2021).

3.5. Functional traits: fermentation, assimilation, temperature, pH, and enzymes

Most isolates did not ferment the tested carbon sources; glucose was the most frequently fermented carbon source, whereas lactose was rarely fermented. Assimilation profiling revealed universal glucose utilization and rare methanol utilization, consistent with the known dissociation between assimilation and fermentation abilities in yeasts and strong interspecies

variability in fermentation capacity (Kurtzman et al., 2011; Maicas, 2020; Lok et al., 2021). Given the ubiquity of glucose in nature, its dominant assimilation among environmental isolates is expected, while these profiles are most informative for metabolic differentiation and identification of taxa with applied potential.

Temperature-growth tests (728 isolates) showed optimal growth at 19.0–25.0°C, maximal growth at 19.0°C, and no growth at 45.0°C, reflecting the predominantly mesophilic character of environmental yeasts and reported optima around 20.0–28.0°C (Moreira et al., 2020). pH tolerance was greatest at pH 4.0–7.0, with some taxa able to grow at pH 3.0 and/or pH 8.0, in line with typical yeast optima and known exceptions (Yalçın & Yesim, 2008; Thongekkaew & Kongsanthia, 2016). Together, these results indicate ecological plasticity relevant for environments with fluctuating temperature and pH.

Enzymatic screening showed cellulase activity in 38.21% and amylase activity in 40.00% of isolates, values comparable to those reported for environmental yeasts (Manguwardoyo et al., 2011; Yalçın & Çorbacı, 2013). These activities support the ecological role of yeasts in degradation of plant-derived polymers and highlight taxa with potential applications in biotransformation and biodegradation.

3.6. Applied potential: hydrocarbons, plant biomass, and chromium

Hydrocarbon degradation experiments showed that mixed consortia of yeasts, filamentous fungi, and bacteria substantially outperformed single microbial groups, supporting the concept of complementary degradation of different hydrocarbon fractions by distinct taxonomic groups (Bergauer et al., 2005; Chamkha et al., 2011; Fan et al., 2014). In laboratory soil microcosms, hydrocarbon reduction reached 44.71–87.65%, while the most effective consortium achieved 60.90% and 56.80% removal under field conditions despite a high initial contamination level (5%, 48–50 g/kg). These values compare favorably with published reports, where removal efficiencies vary widely depending on contamination level, hydrocarbon fractions, and consortium composition (Bergauer et al., 2005; Chamkha et al., 2011; Fan et al., 2014).

In plant biomass degradation experiments, the highest lignin and cellulose reductions were observed after 30 days, particularly when mineral supplements and/or glucose were added. The enhanced performance of mixed microbial systems is consistent with studies demonstrating that microbial interactions and nutrient availability strongly influence lignocellulose

degradation (Madadi & Abbas, 2017; Bautista-Guerrero et al., 2022; Knežević et al., 2023), supporting the applicability of yeast–*Trichoderma* mixtures for plant-waste biodestruction.

Chromium bioaccumulation assays revealed strong uptake by *B. subtilis* at 10.0 mg/L (up to 89.80% within 24 h), moderate uptake by *R. mucilaginosa*, and no significant accumulation at 100.0 mg/L. These results align with reports of high chromium removal by *Bacillus* spp. and variable, condition-dependent uptake by yeasts (Bahafid et al., 2017; Zhang, 2021), highlighting both the potential and the concentration limits of microbial heavy-metal remediation.

CONCLUSIONS

1. A total of 109 yeast species were isolated from various anthropogenically affected substrates (soil and water), belonging to 53 genera, 26 families, 14 orders, and 9 classes. It was shown that 40.39% of the isolated species belonged to the phylum *Ascomycota* and 59.61% to *Basidiomycota*. The genus *Rhodotorula* was the most prevalent (24.62%), with *Rhodotorula mucilaginosa* as the dominant species (19.36%).
2. It was found that 83.46% of the studied yeast species did not exhibit carbohydrate fermentation. Glucose was the most frequently fermented (30.15%) and universally assimilated (100%) carbon source. The widest assimilation spectrum was observed in *Aureobasidium pullulans* (85.00%), *Cutaneotrichosporon mucoides* (85.00%), *Exophiala xenobiotica* (82.50%), and *Vanrija humicola* (82.50%), while the narrowest was found in *Candida glabrata* (5.00%). Cellulolytic activity was detected in 38.21% and amylolytic activity in 40.00% of the isolated yeast species.
3. It was revealed that the majority (94.83%) of yeast species grew at temperatures of 5.0–40.0°C. Only strains of *Cutaneotrichosporon mucoides* were able to grow at 40.0°C. Yeasts showed optimal growth within the pH range of 4.0–7.0.
4. A biopreparation composed of yeasts and other taxonomic groups of microorganisms was developed and patented (LT No. 7087 B), which reduced petroleum hydrocarbon content in contaminated soil by up to 60.90% under field conditions.
5. It was found that the most efficient lignin degradation occurred in wheat substrate with a mixture of yeasts and mineral nutrients (59.39%) and in hemp substrate with *Trichoderma rossicum*, yeasts, mineral nutrients, and glucose (12.89%) after 30 days. Cellulose degradation was most efficient in wheat substrate with a yeast mixture and glucose (64.92%) and in hemp substrate with *T. rossicum* and mineral nutrients (50.56%).
6. It was revealed that *Rhodotorula mucilaginosa* (43.40%) and *Bacillus subtilis* (89.80%) were the most effective trivalent chromium-accumulating microorganisms.

LIST OF PUBLICATIONS

Publications on the topic of the dissertation

1. **Žvirgždas, J.**, Paškevičius, A., Švedienė, J., Raudonienė, V., Jacevičius, P., Yeasts in the Soils of the Alytus Region after the Fire of the Tyre Processing Plant. Polish Journal of Environmental Studies, 33(1), 2024, 991-1000. <https://doi.org/10.15244/pjoes/172847>
2. **Žvirgždas, J.**, Paškevičius, A., Petrovas, S., Galginienė, I., Iljasevičius, K., Isolation, selection, and use of oil-degrading microorganisms for biological treatment of contaminated soil. Polish Journal of Environmental Studies, 32 (3), 2023, 2455–2464. <https://doi.org/10.15244/pjoes/160198>;
3. Jefanova, O., Baužienė, I., Lujanienė, G., Švedienė, J., Raudonienė, V., Bridžiuvienė, D., Paškevičius, A., Levinskaitė, L., **Žvirgždas, J.**, Petrošius, R., Skuratovič, Z., Mažeika, J., Initiation of radioecological monitoring of forest soils and plants at the Lithuanian border region before the start of the Belarusian nuclear power plant operation. Environmental Monitoring and Assessment, 192 (10), 2020. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08638-y>

Other publications

1. Klavins L., Zommere A., Kviesis J., Krims-Dāvis K., Ozola M., Mačionienė I., Levinskaitė L., **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Klavina L., Šalaševičienė A., Klavins M. Short path to bioactivity: chemical profiling and bioactive potential of lipophilic Norway spruce (*Picea abies*) extract fractions. Wood Science and Technology, 59 (4), 2025. <https://doi.org/10.1007/s00226-025-01671-5>
2. Švedienė J., Paškevičius A., **Žvirgždas J.**, Paunksnytė-Markevičienė I., Galginienė I., Iljasevičius K. The effect of the biopreparation GTC/GVT2021 and organic additives on the cleaning of soil contaminated with petroleum products. Collection of scientific articles "Human and Nature Safety 2025", Kaunas (VMU), 317-320. ISSN 1822-1823 (Print) ISSN 2538-9122 (Online). <https://doi.org/10.7220/2538-9122.2025>
3. Puišo J., **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Arslonova S., Adlienė D., Antimicrobial Properties of Newly Developed Silver-Enriched Red Onion–Polymer Composites, Antibiotics, 13(5), 2024. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050441>

4. Puišo J., Paškevičius A., **Žvirgždas J.**, Dimitrova T. L., Litvakas A., Adlienė D., Application of red onion peel extract for green synthesis of silver nanoparticles in hydrogels exhibiting antimicrobial properties, *Gels*, 9 (6), 2023. <https://doi.org/10.3390/gels9060498>;
5. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Levinskaitė L., Yeast distribution and biodiversity in chromium-contaminated soil of Klaipėda city. Collection of scientific articles "Human and Nature Safety 2023", Kaunas (VMU), 266-271. <https://doi.org/10.7220/2538-9122.2023>;
6. **Žvirgždas J.**, Kiverytė, S., Paškevičius, A., Jacevičius, P., A Retrospective Study of dermatomycosis Causative Agents in Vilnius University Hospital Santaros Clinics. *Laboratorinė medicina*, 23 (4), 2021, 198–206. https://www.researchgate.net/publication/359134676_A_Retrospective_Study_of_Dermatomycosis_Causative_Agents_in_Vilnius_University_Hospital_Santaros_Clinics.

Presentations at international scientific conferences

1. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Švedienė J., Raudonienė V., Jacevičius P., Yeasts in the soils of the Alytus region after the fire of the tire processing plant – 33rd International conference Ecology & Safety 2023, August 14–17, Burgas, Bulgaria (online conference).
2. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Levinskaitė L., Jokšas K., Yeast prevalence and biological diversity in Baltic sea water at the Butinge oil terminal in 2021–2022 – 32nd International conference Ecology & Safety 2023, August 14–17, Burgas, Bulgaria (online conference).
3. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Levinskaitė L., Yeast distribution and biodiversity in chromium-contaminated Klaipėda city soil – Twenty-ninth International Scientific and Practical Conference Human and Nature Safety 2023, May 10–12, Akademija, Kaunas dist., Lithuania.
4. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Petrovas S., Iljasevičius K., Galginienė I., Isolation, selection and use of oil degrading microorganisms for biological treatment of contaminated soil – 31st International conference Ecology & Safety 2022, August 16–19, Burgas, Bulgaria (online conference).

Presentations at national scientific conferences

1. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Levinskaitė L., Jokšas K., Yeast distribution and biodiversity in the Baltic Sea in the territory of the Būtingė oil terminal – 15th Lithuanian Young Scientists Conference

Biofuture: Perspectives in Natural and Life Sciences, 24 November 2022, Vilnius, Lithuania,
https://www.lma.lt/uploads/BIOATEITIS%20prane%C5%A1im%C5%B3%20tez%C4%97s_2022.pdf

2. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Petrovas S., Iljasevičius K., Galginienė I., Selection and application of oil-oxidizing microorganisms for biological remediation of contaminated soil – 10th Young Scientists Conference Young Scientists – for Agricultural Progress, 2021 November 18, Vilnius, Lithuania,
http://www.lma.lt/uploads/LMA%20leidyba/Jaunieji%20mokslininkai%20-%20%C5%BEem%C4%97s%20%C5%ABkio%20pa%C5%BEangai.%20Prane%C5%A1im%C5%B3%20tez%C4%97s_2021.pdf
3. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Iljasevičius K., Galginienė I., Selection of oil-oxidizing microorganisms for efficient degradation of its products – 13th Young Scientists Conference Biofuture: Perspectives in Natural and Life Sciences, 4 December 2020, Vilnius, Lithuania
https://www.lma.lt/uploads/news/id1049/LMA_BIOATEITIS_gamtos%20ir%20gyvybes%20mokslu%20perspektyvos_programa-pranesimu%20tezes-taisytos.pdf.

Internships

1. 2021 02 02 / 07 / 19 / 23. VMU doctoral students' methodological training. Scientific sources: critical selection, systematic selection, comparison, types of literature reviews; methods, forms and tests of scientific text preparation; methodological choices: from theory to empiricism. Academic ethics: why, what, how?
2. 2020 03 06 / 2020 08 26. Short-term scientific internship at the Department of Food Science and Technology of Kaunas University of Technology on the topic of methods for determining microbial enzymes. Consultant Assoc. Prof. Dr. Dalia Čižeikienė.

Other scientific activities

1. The project "Development and Implementation of the National Science Popularization System" implementation measure "Strengthening the Capacities of Scientists and Other Researchers" of the EU Funds Investment Operational Programme Priority 9 "Public Education and Increasing Human Resource Potential" and the Nature Research Center's

event program was presented at the Science Festival "Spaceship Earth" 2022-2024;

2. On 18 November 2021, a diploma was received for the best presentation Selection and application of oil-oxidizing microorganisms for biological remediation of contaminated soil at the 10th Young Scientists Conference "Young Scientists for Agricultural Progress".
3. In 2021, a certificate of appreciation was received for participation in the annual conference of scientific papers of participants of the Baltic Sea Project and the GLOBE program;
4. From 2020-10-19 to 2021-05-31, the preparation of the bachelor's thesis of Gedas Mačiulaitis, a student of Microbiology and Biotechnology studies at the Life Sciences Center, was supervised.

ABOUT THE AUTHOR

Name Jonas
Surname Žvirgždas

Education

2017 - 2019 Vilnius University, Faculty of Medicine, Medical Biology / Master.
Master's thesis topic: "Prevalence of dermatophytes and application of laboratory diagnostic methods".
The work was carried out in the Microbiology Laboratory of the Laboratory Medicine Center of Vilnius University Hospital, Santaros Klinikos.

2016 - 2017 Vilnius University, Life Sciences Center, Additional Studies (Biology).
Vilnius College, Faculty of Health Care, Biomedical

2013 - 2016 Diagnostics / Bachelor.
Bachelor's thesis topic: "Improvement of the methodology for identifying fungi using the MALDI-TOF method by evaluating the influence of various factors on its quality".
The work was carried out in the Microbiology Laboratory of the Laboratory Medicine Center of the Santaros Klinikos of Vilnius University Hospital.

Professional experience

2023 09 – until now Head of Rare and Dangerous Infectious Disease Agents Testing Subdepartment
National Public Health Surveillance Laboratory, BI

2022 12 – 2024 06 **Biologist**
Nature Research Center, State Research Institute

2020 04 – until now **Medical biologist**
National Public Health Surveillance Laboratory, BI

2019 07 – 2019 10 **Microbiologist**
Northway biotechpharma, JSC

2016 09 – 2019 07 **Mikrobiology technician**
Vilnius University Hospital, Santaros Klinikos.

Membership

- Lithuanian Society of Laboratory Medicine;
- EFLM Academy.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo mokslinio darbo vadovui dr. Algimantui Paškevičiui už kantrybę, vertingas pastabas, nuoširdų palaikymą ir profesionalią pagalbą rengiant šią disertaciją.

Taip pat dėkoju visiems Biodestruktorių tyrimo laboratorijos darbuotojams ir kolegoms, prisidėjusiems prie šio darbo įgyvendinimo – už pagalbą eksperimentuose, konstruktyvią kritiką ir bendradarbiavimą.

Nuoširdžiai dėkoju savo šeimai ir artimiesiems už supratimą, moralinį palaikymą ir kantrybę disertacijos rengimo laikotarpiu.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijos disertacijos tema

1. **Žvirgždas, J.**, Paškevičius, A., Švedienė, J., Raudonienė, V., Jacevičius, P., Yeasts in the Soils of the Alytus Region after the Fire of the Tyre Processing Plant. Polish Journal of Environmental Studies, 33(1), 2024, 991-1000. <https://doi.org/10.15244/pjoes/172847>
2. **Žvirgždas, J.**, Paškevičius, A., Petrovas, S., Galginienė, I., Iljasevičius, K., Isolation, selection, and use of oil-degrading microorganisms for biological treatment of contaminated soil. Polish Journal of Environmental Studies, 32 (3), 2023, 2455–2464. <https://doi.org/10.15244/pjoes/160198>;
3. Jefanova, O., Baužienė, I., Lujanienė, G., Švedienė, J., Raudonienė, V., Bridžiuviienė, D., Paškevičius, A., Levinskaitė, L., **Žvirgždas, J.**, Petrošius, R., Skuratovič, Z., Mažeika, J., Initiation of radioecological monitoring of forest soils and plants at the Lithuanian border region before the start of the Belarusian nuclear power plant operation. Environmental Monitoring and Assessment, 192 (10), 2020. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08638-y>

Kitos publikacijos

1. Klavins L., Zommere A., Kviesis J., Krims-Dāvis K., Ozola M., Mačionienė I., Levinskaitė L., **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Klavina L., Šalaševičienė A., Klavins M. Short path to bioactivity: chemical profiling and bioactive potential of lipophilic Norway spruce (*Picea abies*) extract fractions. Wood Science and Technology, 59 (4), 2025. <https://doi.org/10.1007/s00226-025-01671-5>
2. Švedienė J., Paškevičius A., **Žvirgždas J.**, Paunksnytė-Markevičienė I., Galginienė I., Iljasevičius K. Biopreparato GTC/GVT2021 ir organinių priedų poveikis naftos produktais užteršto dirvožemio valymui. Mokslo straipsnių rinkinys „Žmogaus ir gamtos sauga 2025“, Kaunas (VDU), p. 317-320. ISSN 1822-1823 (Print) ISSN 2538-9122 (Online). <https://doi.org/10.7220/2538-9122.2025>
3. Puišo J., **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Arslonova S., Adlienė D., Antimicrobial Properties of Newly Developed Silver-Enriched Red Onion–Polymer Composites, Antibiotics, 13(5), 2024. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050441>

4. Puišo J., Paškevičius A., **Žvirgždas J.**, Dimitrova T. L., Litvakas A., Adlienė D., Application of red onion peel extract for green synthesis of silver nanoparticles in hydrogels exhibiting antimicrobial properties, *Gels*, 9 (6), 2023. <https://doi.org/10.3390/gels9060498>;
5. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Levinskaitė L., Mielių paplitimas ir biologinė įvairovė chromu užterštame Klaipėdos miesto dirvožemyje. Mokslo straipsnių rinkinys „Žmogaus ir gamtos sauga 2023“, Kaunas VDU), p. 266-271. <https://doi.org/10.7220/2538-9122.2023>;
6. **Žvirgždas, J.**, Kiverytė, S., Paškevičius, A., Jacevičius, P., A Retrospective Study of dermatomycosis Causative Agents in Vilnius University Hospital Santaros Clinics. *Laboratorinė medicina*, 23 (4), 2021, 198–206. https://www.researchgate.net/publication/359134676_A_Retrospective_Study_of_Dermatomycosis_Causative_Agents_in_Vilnius_University_Hospital_Santaros_Clinics.

Pranešimai tarptautinėse mokslinėse konferencijose

1. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Švedienė J., Raudonienė V., Jacevičius P., Yeasts in the soils of the Alytus region after the fire of the tire processing plant – 33rd International conference Ecology & Safety 2023, rugpjūčio 14 – 17, Burgas, Bulgarija (nuotolinė konferencija).
2. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Levinskaitė L., Jokšas K., Yeast prevalence and biological diversity in Baltic sea water at the Butinge oil terminal in 2021-2022 – 32nd International conference Ecology & Safety 2023, rugpjūčio 14 – 17, Burgas, Bulgarija (nuotolinė konferencija).
3. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Levinskaitė L., Mielių paplitimas ir biologinė įvairovė chromu užterštame Klaipėdos miesto dirvožemyje – Dvidešimt devintoji tarptautinė mokslinė – praktinė konferencija Žmogaus ir gamtos sauga 2023, gegužės 10-12, Akademija, Kauno raj., Lietuva.
4. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Petrovas S., Iljasevičius K., Galginienė I., Isolation, selection and use of oil degrading microorganisms for biological treatment of contaminated soil – 31st International conference Ecology & Safety 2022, rugpjūčio 16–19, Burgas, Bulgarija (nuotolinė konferencija).

Pranešimai nacionalinėse mokslinėse konferencijose

1. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Levinskaitė L., Jokšas K., Mielių paplitimas ir biologinė įvairovė Baltijos jūroje Būtingės naftos terminalo teritorijoje – 15-oji Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija Bioateitis:

- gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos, 2022 m. lapkričio 24, Vilnius, Lietuva,
https://www.lma.lt/uploads/BIOATEITIS%20prane%C5%A1im%C5%B3%20tez%C4%97s_2022.pdf
2. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Petrovas S., Iljasevičius K., Galginienė I., Naftą oksiduojančių mikroorganizmų atranka ir pritaikymas užteršto dirvožemio biologiniam valymui – 10-oji jaunųjų mokslininkų konferencija Jaunieji mokslininkai – žemės ūkio pažangai, 2021 m. lapkričio 18, Vilnius, Lietuva,
http://www.lma.lt/uploads/LMA%20leidyba/Jaunieji%20mokslininkai%20-%20%C5%BEem%C4%97s%20%C5%ABkio%20pa%C5%BEangai.%20Prane%C5%A1im%C5%B3%20tez%C4%97s_2021.pdf
 3. **Žvirgždas J.**, Paškevičius A., Iljasevičius K., Galginienė I., Naftą oksiduojančių mikroorganizmų atranka efektyviam jos produktų skaidymui – 13-oji jaunųjų mokslininkų konferencija Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos, 2020 m. gruodžio 4, Vilnius, Lietuva
https://www.lma.lt/uploads/news/id1049/LMA_BIOATEITIS_gamtos%20ir%20gyvybes%20mokslu%20perspektyvos_programa-pranesimu%20tezes-taisytos.pdf

Stažuotės

1. 2021 02 02 / 07 /19 / 23. VDU doktorantų metodologiniai mokymai. Mokslo šaltiniai: kritinė atranka, sisteminė atranka, lyginimas, literatūros apžvalgų tipai; mokslo teksto rengimo būdai, formos ir išbandymai; metodologiniai pasirinkimai: nuo teorijos iki empirikos. Akademinė etika: kodėl, kas, kaip?
2. 2020 03 06 / 2020 08 26. Trumpalaikė mokslinė stažuotė Kauno technologijos universiteto Maisto mokslo ir technologijos katedroje tema: „Mikroorganizmų fermentų nustatymo metodai“. Konsultantas doc. dr. Dalia Čižeikienė.

Kita mokslinė veikla

1. Įsijungta į ES fondų investicijų veiksmų programos 9 prioriteto „Visuomenės švietimas ir žmogiškųjų išteklių potencialo didinimas“ įgyvendinimo priemonės „Mokslininkų ir kitų tyrėjų gebėjimų stiprinimas“ projektą „Nacionalinės mokslo populiarinimo sistemos plėtra ir įgyvendinimas“ ir Mokslo festivalyje „Erdvėlaivis Žemė“ 2022-2024 pristatyta Gamtos tyrimų centro renginių programa;

2. 2021-11-18 gautas diplomatas už geriausią pranešimą Naftą oksiduojančių mikroorganizmų atranka ir pritaikymas užteršto dirvožemio biologiniam valymui 10-ojoje Jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Jaunieji mokslininkai – žemės ūkio pažangai“.
3. 2021 m. gauta padėka už dalyvavimą kasmetinėje Baltijos jūros projekto ir GLOBE programos dalyvių mokslinių darbų konferencijoje;
4. 2020-10-19 – 2021-05-31 vadovauta Gyvybės mokslų centro Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų studento Gedo Mačiulaičio bakalauro baigiamojo darbo rengimui.

APIE AUTORIŲ

Vardas Jonas
Pavardė Žvirgždas

Išsilavinimas

- 2017 - 2019 Vilniaus Universitetas, Medicinos fakultetas,
Medicinos biologija / Magistras.
Magistro darbo tema: “Dermatofitijų sukėlėjų paplitimas ir laboratorinės diagnostikos metodų taikymas“.
Darbas atliktas Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje.
- 2016 - 2017 Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras,
Papildomos studijos (biologija).
- 2013 - 2016 Vilniaus kolegija, Sveikatos priežiūros fakultetas,
Biomedicininė diagnostika / Bakalauro.
Bakalauro darbo tema: „Grybų identifikavimo MALDI-TOF metodu tyrimo metodikos tobulinimas įvertinant įvairių veiksnių įtaką jo kokybei“.
Darbas atliktas Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje.

Profesinė patirtis

- 2023 09 – iki dabar **Retų ir pavojingų užkrečiamųjų ligų sukėlėjų tyrimų poskyrio vedėjas**
Nacionalinė Visuomenės Sveikatos Priežiūros Laboratorija, BĮ
- 2022 12 – 2024 06 **Biologas**
Gamtos tyrimų centras, valstybinis mokslinių tyrimų institutas
- 2020 04 – iki dabar **Medicinos biologas**

	Nacionalinė Visuomenės Sveikatos Priežiūros Laboratorija, BĮ
2019 07 – 2019 10	Mikrobiologas Northway biotechpharma, UAB
2016 09 – 2019 07	Mikrobiologijos laborantas VUL Santaros klinikos, VšĮ

Narystė

- Lietuvos laboratorinės medicinos draugija;
- EFLM Academy.

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.