



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
w Lublinie



WYDZIAŁ
AGROBIOINŻYNIERII

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE

Wydział Agrobiotechnologii
Dyscyplina naukowa: Rolnictwo i ogrodnictwo

mgr inż. Michał Tomasz Możejko

Rozprawa doktorska
Doctoral dissertation

**Badania nad ekologicznymi uwarunkowaniami występowania szczepów
keratynolitycznego grzyba *Trichophyton ajelloi* w glebach uprawnych i ich
zdolnościami do przetwarzania odpadowej keratyny pierza na preparaty nawożeniowe**

*Research on the ecological determinants of the occurrence of strains of the keratinolytic
fungus *Trichophyton ajelloi* in agricultural soils and their abilities to convert feather
keratin waste into fertilizer preparations*

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej

Promotor: dr hab. Justyna Bohacz, prof. Uczelni

Lublin, 2023

*Serdeczne podziękowania kieruję w stronę Pani Promotor,
dr hab. Justyny Bohacz prof. Uczelni,
której nieoceniona pomoc zarówno merytoryczna w kwestiach
realizowanej rozprawy doktorskiej, jak również cenne rady
dotyczące warsztatu naukowego zaowocowały
w moim rozwoju jako młodego naukowca.
Pragnę z głębi serca podziękować za stworzenie przyjaznych
i opartych na szacunku, wzajemnym zrozumieniu i współpracy
warunków dla pracy naukowej i dydaktycznej
oraz sprowadzanie mojej naukowej działalności
na właściwe tory w chwilach trudnych i pełnych niepewności.
Bardzo dziękuję za wszelkie słowa otuchy podczas tej niełatwej
drogi naukowej, od tytułu zawodowego inżyniera, przez magistra,
aż po ścieżkę wiodącą do ubiegania się o stopnień naukowy doktora.
Przede wszystkim jestem wdzięczny za opiekę naukową
i sprawowanie pieczy nad realizacją postawionych sobie
celów naukowych, a także możliwość poszerzania moich horyzontów
badawczych, dydaktycznych i popularyzujących naukę.*

*Prosto z serca dziękuję także **Pani prof. dr hab.
Teresie Kornilłowicz-Kowalskiej,**
za wzbudzenie moich zainteresowań tematyką mikrobiologii,
a także za ciepłe przyjęcie mnie jako doktoranta,
a następnie pracownika badawczo-dydaktycznego
Katedry Mikrobiologii Środowiskowej. Serdecznie dziękuję
za sprawowanie nade mną pieczy jako Opiekun Naukowy,
w pierwszych latach mojej drogi w kierunku stopnia naukowego
doktora, a także za wszelkie cenne uwagi dotyczące etyki
i rzetelności w pracy naukowej. Dziękuję również za wszystkie cenne
naukowe dyskusje, oraz za zaufanie i wiarę wobec moich naukowych możliwości.
Jestem naprawdę wdzięczny za wszystkie dobre i pokrzepiające
słowa wypowiedziane nie tylko podczas okresu realizacji doktoratu,
lecz pojawiające się już od momentu wkroczenia na ścieżkę naukową
powiązaną z Katedrą Mikrobiologii Środowiskowej.*

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 30.05.2023.....

Podpis promotora Justyna Bohac.....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów~~/~~Promotora~~ ~~pomoocniczego~~* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/~~pendrive~~ wersją elektroniczną.

Data 30.05.2023 r......

Podpis autora Michał Morzejko.....

* niepotrzebne skreślić

Spis treści

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską	6
Streszczenie	9
Summary.....	11
I. Wprowadzenie.....	13
1. Pochodzenie materii keratynowej, skala występowania odpadów keratynowych.....	13
2. Sposoby zagospodarowania odpadów keratynowych.....	14
3. Mikroorganizmy uczestniczące w procesie rozkładu keratyny	15
4. Grzybowa biodegradacja natywnej keratyny	17
5. Znaczenie siarki w żywieniu roślin i rośliny siarkolubne.....	17
6. Biopreparaty.....	18
II. Hipotezy i cele badań.....	20
1. Hipotezy główne i szczegółowe.....	20
2. Założenia i cele badań.....	21
III. Materiały i metody.....	23
1. Materiały	24
1.1. Gleby użyte do izolacji grzybów i doświadczeń modelowych [P.2.; P.5.]	24
1.2. Odpadowe pierze kurcząt jako substrat keratynowy [P.2.; P.3.; P.4.]	25
1.3. Szczepy grzybów keratynolitycznych wytypowane do badań [P.3.; P.4.; P.5.]	25
1.4. Hydrolizat keratynowy (bionawóz/biopreparat) [P.5.].....	26
1.5. Rośliny, użyte jako testery skuteczności działania otrzymanych biopreparatów keratynowych [P.5.]	26
2. Metody analityczne	27
2.1. Identyfikacja gatunkowa wyizolowanych szczepów grzybów [P.2.]	27
2.2. Podłoże hodowlane grzybów <i>Trichophyton ajelloi</i> [P.3.].....	28
2.3. Wskaźniki aktywności keratynolitycznej [P.3.; P.4.].....	28

2.4. Oznaczanie innych uzdolnień hydrolitycznych szczepów <i>Trichophyton ajelloi</i> [P.4.]	29
2.5. Określanie optymalnych parametrów procesu biodegradacji odpadowej keratyny pierza przez szczepy <i>Trichophyton ajelloi</i> i wskaźników ich oceny [P.4.]	30
2.6. Oznaczanie fitotoksyczności, biologicznej aktywności gleby i parametrów chemicznych gleb po wprowadzeniu hydrolizatu keratynowego [P.5.]	31
3. Analizy wyników badań [P.2.; P.3.; P.4.; P.5.]	34
3.1. Publikacja 2 [P.2.]	34
3.2. Publikacja 3 [P.3.]	34
3.3. Publikacja 4 [P.4.]	35
3.4. Publikacja 5 [P.5.]	35
IV. Omówienie wyników i dyskusja	37
1. Publikacja 1 [P.1.]	37
2. Publikacja 2 [P.2.]	38
3. Publikacja 3 [P.3.]	43
4. Publikacja 4 [P.4.]	76
5. Publikacja 5 [P.5.]	82
V. Ważniejsze wyniki i wnioski	93
VI. Bibliografia	99
VII. Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład cyklu publikacji	112
1. Publikacja 1 [P.1.]	113
2. Publikacja 2 [P.2.]	123
3. Publikacja 3 [P.3.]	146
4. Publikacja 4 [P.4.]	199
5. Publikacja 5 [P.5.]	242
VIII. Oświadczenia dotyczące wkładu w przygotowanie opublikowanych prac naukowych	280
Wykaz dorobku naukowego niebędącego przedmiotem rozprawy doktorskiej	293

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Badania naukowe do rozprawy doktorskiej przedstawione jako cykl 5 prac w tym 4 opublikowanych: jednej pracy przeglądowej [**publikacja 1, P.1.**] i trzech oryginalnych prac twórczych [**publikacja 2, P.2.; publikacja 4, P.4.; publikacja 5, P.5.**] oraz jednego nieopublikowanego artykułu naukowego [**umownie publikacja 3, P.3.**] realizowane były w ramach:

- zadania badawczego RKM/DS4/ (lata 2005 - 2018) pt. „Badania nad ekologią i uzdolnieniami biochemicznymi grzybów glebowych/Badania nad ekologią i uzdolnieniami biochemicznymi saprotroficznych drobnoustrojów” a następnie zadania badawczego RKM/S/21/ (lata 2019 - 2022) pt. „Badania nad ekologią mikrogrzybów i wykorzystaniem wyselekcjonowanych szczepów grzybów do biodegradacji poprodukcyjnego pierza na cele praktyczne”, finansowanych ze środków MNiSW/MEiN na utrzymanie potencjału badawczego UP w Lublinie, w których byłem jednym z wykonawców
oraz
- projektu badawczego, finansowanego ze środków na naukę przyznanych przez MEiN na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców na okres od 1.05.2022 r. do 31.01.2023 r., pt. „Badanie fitotoksyczności płynów pochodzących otrzymanych po grzybowej biodegradacji pierza oraz ich wpływu na biologiczną aktywność gleby oraz wzrost roślin” nr RKM/MN-2/RIO/22, którego byłem kierownikiem i głównym wykonawcą.

W pracy przeglądowej [**P.1.**] jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem. W dwóch pracach badawczych jestem pierwszym autorem [**P.4.; P.5.**], a w dwóch drugim autorem i autorem korespondencyjnym [**P.2.; P.3.**].

Jedna z prac badawczych [**P.3.**] stanowiąca element badań naukowych nad rozwiązywanym problemem została wysłana do czasopisma.

Mój udział w powstaniu artykułów naukowych został uzgodniony ze wszystkimi współautorami i przedstawiony w rozdziale VIII. Współczynnik Impact Factor (IF) oraz punkty MEiN za opublikowane prace wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej przedstawiono zgodnie z rokiem opublikowania, na podstawie obowiązujących na dzień

26.05.2023 r. danych w bazie Journal Citation Reports (JCR) oraz w wykazie czasopism punktowanych MEiN (lata 2019 - 2021).

[P.1.] Możejko, M., Bohacz, J., **2021**. Mikroorganizmy i enzymy keratynolityczne. W: Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa. Babicz, M., Nowakowicz-Dębek, B. (red.). Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, s. 96-103.
ISBN: 978-83-7259-344-3.

(MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁ 20 pkt., IF_{JCR} 0,000)

Mój wkład naukowy w tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji pracy; zebraniu i analizie literatury; przygotowaniu tekstu manuskryptu; współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje; wykonaniu korekt wydawniczych na poszczególnych etapach procesu publikacji; pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy w całej pracy określam na 90%.

[P.2.] Bohacz, J., Możejko, M., Kornilowicz-Kowalska, T., Siebielec, G., **2022**. Impact of ecological factors on the occurrence and spatial-taxonomic structure of keratinophilic fungi and their co-occurrence in arable soils. Agriculture 12, 194.

<https://doi.org/10.3390/agriculture12020194>

(MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁ 100 pkt., IF_{JCR} 3,408)

Mój wkład naukowy w tej pracy polegał na: współudziale w tworzeniu koncepcji badań; zaplanowaniu, założeniu doświadczenia i przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych obejmujących, przygotowanie próbek gleb do badań, izolację grzybów keratynofilnych z czterech gleb uprawnych; współuczestniczeniu w identyfikacji gatunkowej grzybów; współudziale w analizie i interpretacji wyników; współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu; wykonaniu zamieszczonych w pracy rysunków, tabel i statystycznych analiz; współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje; wykonaniu edycji manuskryptu i korekt wydawniczych na poszczególnych etapach procesu publikacji; pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy w całej pracy określam na 45%.

[P.3.] Bohacz, J., Możejko, M. Biodegradation of feather keratin by pigmenting and non-pigmenting fungal strains of *Trichophyton ajelloi* from two soils with different physical and chemical properties.

*Mój wkład naukowy w tej pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu, założeniu doświadczenia i przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, które obejmowały oznaczanie aktywności keratynolitycznej najliczniej występujących w badanych glebach uprawnych 37 szczepów geofilnego grzyba *Trichophyton ajelloi*, współudziale w analizie i interpretacji wyników, współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu, wykonaniu zamieszczonych w pracy rysunków, tabel i statystycznych analiz, pełnieniu roli autora korespondencyjnego.*

Mój udział procentowy w całej pracy określam na 50%.

[P.4.] Możejko, M., Bohacz, J., 2022. Optimization of conditions for feather waste biodegradation by geophilic *Trichophyton ajelloi* fungal strains towards further agricultural use. International Journal of Environmental Research and Public Health 19, 10858. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710858>

(MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁ 140 pkt., IF_{JCR} 4,614)

*Mój wkład naukowy w tej pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji badań i wybranych założeń metodycznych; zaplanowaniu, założeniu doświadczenia i przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, które obejmowały badania nad optymalizacją warunków hodowli i składu podłoża hodowlanego wytypowanych trzech szczepów grzyba *Trichophyton ajelloi*; współudziale w analizie i interpretacji wyników; współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu; wykonaniu zamieszczonych w pracy rysunków, tabel i statystycznych analiz; współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje; wykonaniu edycji manuskryptu i korekt wydawniczych na poszczególnych etapach procesu publikacji.*

Mój udział procentowy w całej pracy określam na 55%.

[P.5.] Możejko, M., Bohacz, J., 2023. Effect of keratin hydrolysates obtained from feather decomposition by *Trichophyton ajelloi* on plant germination, growth and biological activity of selected arable soils under model conditions. Agronomy 13, 187. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010187>

(MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁ 100 pkt., IF_{JCR} 3,949)

Mój wkład naukowy w tej pracy polegał na współudziale w tworzeniu koncepcji badań i wybranych założeń metodycznych; zaplanowaniu, założeniu doświadczenia i przeprowadzeniu analiz, które obejmowały wpływ hydrolizatów keratynowych na kiełkowanie i wczesny wzrost roślin oraz aktywność biologiczną gleby; współudziale w analizie i interpretacji wyników; współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu; przygotowaniu zamieszczonych w pracy rysunków, tabel i statystycznych analiz; współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje; wykonaniu edycji manuskryptu i korekt wydawniczych na poszczególnych etapach procesu publikacji.

Mój udział procentowy w całej pracy określam na 60%.

Sumaryczny Impact factor (IF) ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: 11,971

Suma punktów ww. publikacji zgodnie z wykazem MEiN wg roku publikacji: 360

Liczba cytowań łącznie według Web of Science Core Collection (WoS): 5 (bez autocytowań: 2)

Liczba cytowań łącznie według Scopus: 5 (bez autocytowań: 2)

Liczba cytowań łącznie według Google Scholar: 5 (bez autocytowań: 2)

Streszczenie

Odpady keratynowe w postaci pierza kurcząt powstające jako produkt uboczny podczas produkcji drobiu stanowią cenne źródło białka, azotu i siarki, które można zagospodarować na cele praktyczne wykorzystując wyspecjalizowane keratynolityczne drobnoustroje.

Nadrzędnym celem pracy było poznanie ekologicznych uwarunkowań wzrostu grzybów keratynofilnych w glebach różniących się właściwościami fizyko-chemicznymi oraz pozyskanie keratynolitycznych drobnoustrojów jako potencjału szczepowego do dalszych badań, a następnie wyselekcjonowanie spośród nich najbardziej efektywnych litycznie, wobec odpadowego pierza, szczepów z przeznaczeniem do otrzymania hydrolizatów keratynowych (bionawozów) o wysokiej wartości nawozowej, mogących mieć zastosowanie w uprawie roślin o dużym zapotrzebowaniu na siarkę.

Izolacji grzybów keratynofilnych i towarzyszących im grzybów nie-keratynofilnych dokonano z czterech gleb uprawnych różniących się parametrami fizyko-chemicznymi. Identyfikację gatunkową grzybów prowadzono w oparciu o tradycyjne metody na podstawie cech makro- i mikromorfologicznych, a wybranych szczepów w oparciu o reakcje PCR i sekwencjonowania nukleotydów. Najliczniej występująca w grupie grzybów keratynofilnych populacja reprezentująca gatunek *Trichophyton ajelloi* została wskazana jako źródło szczepów do badań nad oceną uzdolnień do biodegradacji odpadowego pierza kurcząt i pozyskania hydrolizatów keratynowych (bionawozów/biopreparatów). Oceny aktywności keratynolitycznej badanych w pierwszej kolejności 37 szczepów grzybów *Trichophyton ajelloi*, dokonano na podstawie oznaczania aktywności enzymów uczestniczących w rozkładzie keratyny piór, uwalniania organicznych i mineralnych form azotu i siarki powstałych w tym procesie, ubytku masy piór i zmian pH podłoża. Wytypowane na podstawie wysokiej aktywności mineralizacyjnej trzy szczepy *Trichophyton ajelloi* zostały następnie wykorzystane w badaniach dotyczących doboru optymalnych warunków hodowli i składu podłoża w celu wzmocnienia wydajności mineralizacyjnej tych grzybów. W ostatnim etapie badań otrzymany hydrolizat keratynowy z hodowli szczepu o najwyższych uzdolnieniach w tym zakresie oceniano pod kątem aktywności fitotoksycznej, wpływu na aktywność biologiczną gleb i wzrost rzepaku *Brassica napus* L. var. *napus*, rośliny o wysokim zapotrzebowaniu na siarkę.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że grzyby keratynofilne i inne towarzyszące im grzyby kolonizujące odpadowe pierze kurcząt występują obficie w glebach uprawnych różniących się właściwościami fizyko-chemicznymi. Wykazano, że uziarnienie gleby odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu struktury przestrzenno-taksonomicznej

keratynofilnej mykobioty, a jego korzystne oddziaływanie jest związane z obecnością frakcji pyłu i iłu odpowiadających za takie właściwości gleby jak zasobność w składniki pokarmowe oraz zatrzymywanie wody w glebie.

W oparciu o badania nad wyselekcjonowaną grupą szczepów keratynolitycznych grzybów z gatunku *Trichophyton ajelloi* stwierdzono, że potencjał keratynolityczny grzybów glebowych uwarunkowany jest zmiennością wewnątrzgatunkową. Istotną rolę w kształtowaniu wartości biodegradacyjnej szczepów *Trichophyton ajelloi* wobec pierza odpadowego obok właściwości gleby jako środowiska ich bytowania odgrywa także zdolność do sekrecji pigmentu. Szczepy pochodzące z gleby gliniastej odznaczają się na ogół wyższą aktywnością keratynolityczną niż wyizolowane z czarnoziemem w zakresie takich wskaźników tej aktywności jak, ubytek masy substratu (pióra), aktywność keratynazy i zawartość jonów amonowych. Natomiast wyizolowane z czarnoziemem, m.in. wyższą aktywnością proteazy, większym uwalnianiem rozpuszczalnych białek, peptydów i aminokwasów. Wykazano, że stopień biodegradacji keratyny pierza przez szczepy *Trichophyton ajelloi* może być sterowany poprzez odpowiedni dobór warunków hodowli i składu podłoża hodowlanego. Nie istnieją jednak jedne optymalne warunki, wspólne dla wszystkich wskaźników keratynolizy. Ich dobór powinien być modyfikowany w zależności od kierunku i celu badań. Na ogół wykazano, że 1% dawka pierza, wyjściowe pH hodowli 4,5, temperatura 28°C, brak łatwo przyswajalnego źródła C i energii oraz stacjonarne warunki hodowli są najbardziej optymalne dla podniesienia potencjału keratynolitycznego szczepów *Trichophyton ajelloi*. Także wzrost dawki substratu w zakresie od 1% do 2% korzystnie wpływa na ubytek pierza. Otrzymane po hodowli *Trichophyton ajelloi* hydrolizaty keratynowe, zwłaszcza rozcieńczone 1:2 nie wykazują fitotoksyczności i wywierają stymulujące oddziaływanie na rośliny we wczesnych fazach ich wzrostu i rozwoju, silniejsze względem rzepaku (*Brassica napus* L. var. *napus*) aniżeli rzeżuchy (*Lepidium sativum* L.). Generalnie hydrolizat keratynowy stymuluje także biologiczną aktywność gleby mierzoną wskaźnikami mikrobiologicznymi, biochemicznymi i enzymatycznymi zwłaszcza gleb lekkich (gleba piaszczysta), a jego oddziaływanie w glebach żyzniejszych (czarnoziem) uwarunkowane jest obsadą rośliny.

Słowa kluczowe: grzyby keratynofilne, *Trichophyton ajelloi*, wskaźniki keratynolizy, hydrolizaty keratynowe, biologiczna aktywność gleby

Summary

Keratin waste in the form of chicken feathers generated as a byproduct of poultry production is a valuable source of protein, nitrogen and sulfur that can be utilized for practical purposes by using specialized keratinolytic microorganisms.

The primary objective of the study was to identify the ecological conditions for the growth of keratinophilic fungi in soils with different physical and chemical properties, and to obtain keratinolytic microorganisms as potential strains for further research. The aim was to select the most effective lytic strains capable of degrading feather waste for the purpose of obtaining keratin hydrolysates (biofertilizers) with high fertilizer value, which can be used in the cultivation of plants with high sulfur requirements.

Isolation of keratinophilic and accompanying non-keratinophilic fungi was carried out from four arable soils differing in physical and chemical parameters. The identification of fungal species was performed using traditional methods based on macro- and micromorphological characteristics, and selected strains were further identified using PCR reactions and nucleotide sequencing. The most abundant population within the group of keratinophilic fungi, representing the species *Trichophyton ajelloi*, has been identified as a potential source of strains for studying their ability to biodegrade chicken feather waste and obtain keratin hydrolysates (biofertilizers/biopreparations). The keratinolytic activity of the first 37 *Trichophyton ajelloi* fungal strains tested was assessed on the basis of determining enzyme activities involved in feather keratin degradation, release of organic and mineral forms of nitrogen and sulfur formed in this process, feather weight loss, and medium pH changes. The three *Trichophyton ajelloi* strains, selected on the basis of their high mineralization activity, were further analyzed to determine the optimal culture conditions and substrate composition in order to enhance their mineralization efficiency. In the final stage of the study, the obtained keratin hydrolysate from the culture of the strain with the highest capabilities in this regard was evaluated for its phytotoxic activity, impact on soil biological activity, and growth of *Brassica napus* L. var *napus*, a plant with high sulfur demand.

Based on the obtained results, it has been found that keratinophilic fungi and other associated fungi colonize chicken feather waste abundantly in arable soils with varying physical and chemical properties. Soil particle size has been shown to play a crucial role in shaping the spatial and taxonomic structure of keratinophilic mycobiota, and its beneficial impact is associated with the presence of silt and clay fractions, which are responsible for soil properties such as nutrient richness and water retention. Based on the studies conducted on the selected

group of keratinolytic *Trichophyton ajelloi* strains, it has been observed that the keratinolytic potential of soil fungi is influenced by intra-species variation. In addition to soil properties as a habitat, the ability of *Trichophyton ajelloi* strains to secrete pigment also plays an important role in shaping their biodegradation capabilities towards waste feathers. Strains derived from loamy soil generally exhibit higher keratinolytic activity than those isolated from chernozem, as indicated by parameters such as substrate (feather) weight loss, keratinase activity, and ammonium ion content. On the other hand, strains isolated from chernozem demonstrate higher protease activity and greater release of soluble proteins, peptides and amino acids. It has been shown that the degree of feather keratin biodegradation by *Trichophyton ajelloi* strains can be controlled by appropriate selection of culture conditions and growth medium composition. However, there are no universally optimal conditions that apply to all keratinolysis indicators. The selection of conditions should be modified depending on the direction and purpose of the research. Generally, it has been shown that a 1% feather substrate concentration, initial culture pH of 4.5, temperature of 28°C, absence of readily available carbon and energy sources, and static cultivation conditions are most optimal for enhancing the keratinolytic potential of *Trichophyton ajelloi* strains. Additionally, increasing the substrate concentration within the range of 1% to 2% has been found to have a positive impact on feather degradation. The keratin hydrolysates obtained after *Trichophyton ajelloi* cultures, especially when diluted at a ratio of 1:2, do not show phytotoxicity and exert a stimulating effect on plants during their early growth and development stages. Moreover, they have a stronger impact on oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *napus*) compared to garden cress (*Lepidium sativum* L.). In general, keratin hydrolysate stimulates the biological activity of the soil, as measured by microbiological, biochemical, and enzymatic indicators, particularly in lighter soils (sandy soil). Its effects in more fertile soils (chernozem) are influenced by plant density.

Key words: keratinophilic fungi, *Trichophyton ajelloi*, keratinolysis parameters, keratin hydrolysates, soil biological activity

I. Wprowadzenie

1. Pochodzenie materii keratynowej, skala występowania odpadów keratynowych

Resztki zwierzęce bogate w keratynę, białko o wysokiej zawartości azotu i siarki organicznej stanowią naturalną komponentę wielu środowisk. Materia keratynowa w postaci piór, włosów oraz innych skeratynizowanych pozostałości zwierzęcych występuje w wierzchniej jak i w głębszej warstwie gleby jako wynik naturalnej aktywności wielu drobnych ssaków, głównie gryzoni, a także ptaków (Chmel i Vlácilíková 1975; Volleková 1985; Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2002; Moallaei i in. 2006; Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011; Javoreková i in. 2012; Kačínová i in. 2013; Deshmukh i in. 2017). W glebach uprawnych, źródłem natywnej keratyny są także nawozy organiczne takie jak obornik, zawierający resztki keratynowe (szczecina, włosy, pierze) pochodzące od zwierząt gospodarczych i ptactwa domowego. W środowisku naturalnym resztki keratynowe spotykane są także w gniazdach ptaków i wypluwkach, będących niestrawionymi resztkami pokarmu ptaków drapieżnych oraz krukowatych (Ciesielska i in. 2017; Korniłowicz-Kowalska i in. 2018; Kitowski i in. 2022) [P.2].

Materię keratynową stanowią również poprodukcyjne przemysłowe odpady keratynowe, do których należą pióra, kopyta, rogowizna, sierść itp., powstające, jako produkty uboczne w ubojniach zwierząt rzeźnych oraz drobiu (Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011). Niestąbnący wzrost spożycia mięsa drobiowego przyczynia się do wzrostu ilości powstających odpadów keratynowych, wśród których dużą część stanowi pierze kurcząt. Jak wynika z danych podanych przez Główny Urząd Statystyczny (2021) i OECD-FAO (2017) w ostatnim pięcioleciu spożycie mięsa drobiowego wzrosło w Polsce o 6%, a na świecie o 32%. Przyczyniło się to znacząco do zwiększenia puli powstających odpadów pierza, głównie kurcząt. W 2011 roku, jak podawały Korniłowicz-Kowalska i Bohacz (2011) ilość odpadowego pierza kurcząt brojlerów sięgała w Polsce 77 tys. Mg, natomiast roczna produkcja tych odpadów w USA 1 mln Mg. Biorąc pod uwagę fakt, że pierze stanowi 5-7% masy ciała ptactwa domowego (Onifade i in. 1998) oraz roczną produkcję żywca rzeźnego drobiu, która w Polsce wynosiła w 2021 roku 3578 tysięcy Mg (Główny Urząd Statystyczny 2022), to w Polsce obecnie jest wytwarzane 173,9 - 243,5 tysięcy Mg pierza odpadowego. W skali światowej jest to ok. 9 mln Mg (Vavrova i in. 2022) [P.3.; P.4.].

2. Sposoby zagospodarowania odpadów keratynowych

Poprodukcyjne pierze klasyfikowane jest według Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. jako materiał odpadowy 3 kategorii o małym zagrożeniu dla zdrowia ludzi i zwierząt, posiadający jednocześnie zróżnicowane możliwości ponownego wykorzystania, po odpowiednim przetworzeniu [P.3.].

Przyjazne środowisku biologiczne metody zagospodarowania odpadowej biomasy, zwłaszcza o znacznym potencjale do ponownego wykorzystania, są szczególnie aktualne w obecnym czasie niekorzystnych zmian klimatu, do których przyczynia się także niewłaściwe zarządzanie zasobami przyrody. Obecne regulacje prawne w zakresie gospodarki odpadami (Dz. U. z 2013 r., poz. 21. Ustawa o odpadach z dnia 14 grudnia 2012 r.; Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009) zobowiązują lokalne samorządy i przedsiębiorców do działań w kierunku ograniczenia powstawania odpadów (Bohacz 2017a). Jednocześnie działania te są alternatywną opcją do istniejących fizyko-chemicznych metod zagospodarowania poprodukcyjnych odpadów pochodzenia przemysłowego, czy rolniczego (Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011) [P.4.]. Fizyko-chemiczne metody przetwarzania odpadów organicznych wywierają bowiem na środowisko szkodliwy wpływ i generują dodatkowe koszty, co jest również niekorzystne z ekonomicznego punktu widzenia. Do odpadów organicznych o wysokim potencjale do ponownego wykorzystania należą między innymi odpady ligninocelulozowe z uwagi na dużą zawartość węgla organicznego i potencjał próchnicotwórczy oraz odpady keratynowe o wysokiej zawartości białka (90%), azotu (12 - 18%) i siarki organicznej (2 - 5%) (Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011) [P.4.].

Wśród propozycji dotyczących możliwości zagospodarowywania wartościowych odpadów keratynowych dominują technologie przyjazne środowisku, tj. kompostowanie z odpadami ligninocelulozowymi (Bohacz i Korniłowicz-Kowalska 2009; Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2010; Bohacz 2017a, 2018, 2019; Bohacz i Korniłowicz-Kowalska 2019), przetwarzanie mikrobiologiczne w celu otrzymania bioproduktów o wysokim potencjale nawożeniowym i paszowym (Bohacz 2017b; Bohacz i in. 2020 a, b) oraz pozyskiwanie enzymów keratynolitycznych o zastosowaniu medycznym, farmaceutycznym, przemysłowym i bioenergetycznym (Brandelli i in. 2015). Kompostowane odpady ligninocelulozowe dostarczają kompostu o wysokich walorach nawożeniowych, który jest bezpieczny pod względem sanitarnym i fitosanitarnym (Bohacz 2019). Glebowe grzyby z rodzaju

Chrysosporium, *Arthroderma*, *Trichophyton* oraz wyizolowane z kompostów grzyby *Aphanoascus keratinophilus* są uznawane za naturalne czynniki bionawożeniowe, gdyż podczas biodegradacji odpadowej natywnej keratyny uwalniają rozpuszczalne białka, peptydy i aminokwasy oraz mineralne formy siarki i azotu, istotne z nawozowego punktu widzenia (Bohacz 2017b; Bohacz i Kornilowicz-Kowalska 2019; Bohacz i in. 2020a, b; Możejko i Bohacz 2022) [P.4.; P.5].

W powszechnym stosowaniu technologii mikrobiologicznych do przetwarzania odpadów keratynowych, największe ograniczenia wynikają z ich małej podatności na biodegradację, uwarunkowaną strukturą chemiczną w tym przede wszystkim obecnością licznych wiązań disiarczkowych (Kornilowicz-Kowalska i Bohacz 2011).

3. Mikroorganizmy uczestniczące w procesie rozkładu keratyny

Zdolnością do biodegradacji natywnej keratyny charakteryzują się larwy moli oraz wyspecjalizowane pokarmowo drobnoustroje, do których należą niektóre bakterie, promieniowce i grzyby (Gerard 2002; Bohacz 2017b; Możejko i Bohacz 2021) [P.1.; P.3.]. Do bakterii rozkładających białko keratynowe należą zarówno bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne z rodzaju *Kocuria*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Geobacillus*, *Chryseobacterium*, *Fervidobacterium*, *Lysobacter*, *Microbacterium*, *Sarcina*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio* (Nam i in. 2002; Riffel i Brandelli 2002; Łaba i Rodziewicz 2004; Thys i in. 2004; Rodziewicz i Łaba 2006; Peddu i in. 2009; Jahan i in. 2010; Silhavy i in. 2010; Choińska i in. 2011; Gopinath i in. 2015; Łaba i in. 2018; Li 2019; Alahyaribeik i in. 2020; Huang i in. 2020; Cavello i in. 2021), promieniowce z rodzaju *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Actinomadura*, *Nocardiosis*, *Thermoactinomyces* (Chitte i in. 1999; Gousterova i in. 2005; Jayalakshmi i in. 2010; Godheja i Shekhar 2014; Gopinath i in. 2015; Omran 2017; Wang i in. 2017; Tamreihao i in. 2019; Espersen i in. 2021) [P.1.; P.2.] oraz grzyby keratynofilne należące do dermatofitów i grupy *Chrysosporium* (Kornilowicz-Kowalska i Bohacz 2011) [P.1.; P.2.]. Grzyby keratynofilne występują na wszystkich kontynentach świata w różnych środowiskach poddanych działalności człowieka i zwierząt począwszy od gleb Antarktydy (Mercantini i in. 1989), poprzez Amerykę Północną (Otčenášek i in. 1967; Hamm i in. 2020), Amerykę Południową (Pontes i in. 2013), kraje Europy (Mercantini i in. 1980; Caretta i in. 1992; Kornilowicz-Kowalska i Bohacz 2002; Ulfig i in. 2002, 2003; Kačínová i in. 2013; Ogórek i in. 2022), kraje Azji (Deshmukh 2002; Jain i Sharma 2012; Deshmukh i Verekar 2014), w Afryce (Youssef i in. 1992; Zaki i in. 2005), a skończywszy na glebach w Australii (Cano i in. 2002) [P.3.]. Rozmieszczenie i zróżnicowanie

rodzajowe i gatunkowe keratynolitycznej glebowej mykobioty zależy od wielu czynników ekologicznych (Garg i in. 1985; Al-Musallam 1989; Kornilowicz-Kowalska i Bohacz 2002), wśród których Garg i in. (1985) wyszczególniają grupę czynników klimatycznych, takich jak temperatura i światło, promieniowanie UV oraz zmiany sezonowe; czynniki glebowe, tj. pH i wilgotność, zasobność w N, S i próchnicę, a także obecność metali ciężkich, kwasów tłuszczowych i tłuszczów, soli i agrochemikaliów; oraz czynniki biotyczne, tj. ptaki i inne zwierzęta stanowiące źródło substratu keratynowego (Garg i in. 1985). Wśród innych czynników ekologicznych, od których zależy wzrost *keratinomyces* w tym dermatofitów geofilnych w glebach uprawnych wymieniane są także CaCO₃ i fosfor przyswajalny (Böhme i Ziegler 1969; Garg i in. 1985; Al-Musallam 1989; Kornilowicz 1992; Simpanya 2000; Kornilowicz-Kowalska i Bohacz 2002; Ciesielska i in. 2014; Sharma i Swati 2014) [P.2.].

Grzyby obok bakterii stanowią ważną grupę ekologiczną eukariotycznych mikroorganizmów keratynolitycznych, pośród których największe znaczenie przypisuje się *Arthrodermataceae* i *Onygenaceae* (Parihar i Kushwaha 2000; Kornilowicz-Kowalska i Bohacz 2011; Godheja i Shekhar 2014) [P.1.]. Wśród dermatofitów geofilnych wyróżnia się te, które są patogenne (*Microsporum gypseum*, *Microsporum fulvum*), patogenne sporadycznie (*Microsporum cookei*, *Trichophyton ajelloi*) i niepatogenne (*Trichophyton terrestre* i *Trichophyton georgiae*) (Otčenášek i Dvořák 1975). Do grzybów nie-dermatofitycznych należą grzyby z grupy *Chrysosporium*, m.in. *Aphanoascus keratinophilus*, *A. fulvescens*, *Chrysosporium tropicum*, *Ch. articulatum*, *Arthroderma tuberculatum* i *A. multifidum* oraz *Ctenomyces serratus* (van Oorschot 1980; Hayette i Sacheli 2016; Bohacz 2017b; Bohacz i in. 2020a, b) [P.3.]. W literaturze przedmiotu, jako grzyby o uzdolnieniach do rozkładu keratyny wymieniane są także rodzaje *Penicillium*, *Aspergillus*, *Doratomyces*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* (Gradišar i in. 2005, Călin i in. 2017). Jednakże jak podaje Filipello-Marchisio (2000) grzyby te zdolne są jedynie do biodegradacji innych niż białka keratynowe, łatwiej biodegradowalnych międzykomórkowych substratów zawartych w natywnej keratynie. Kunert (2000) jako kryterium różnicowania grzybów keratyno- i niekeratynolitycznych przyjął stopień rozkładu natywnej keratyny (włosy), użytej jako jedyne źródło C, N, S i energii w 8-tygodniowych hodowlach płynnych. Grzyby, które w tych warunkach rozkładały co najmniej 40% natywnej keratyny zaliczył do keratynolitycznych, a pozostałe do niekeratynolitycznych.

4. Grzybowa biodegradacja natywnej keratyny

Zdolność grzybów keratynolitycznych do biodegradacji natywnej keratyny warunkowana jest wydzielaniem specyficznych wobec substratu keratynowego enzymów proteolitycznych zwanych keratynazami (Takiuchi i in. 1984; Filipello-Marchisio 2000; Bohacz i Kornilowicz-Kowalska 2012). Większość keratynaz wydzielana jest na zewnątrz komórki, a ich sekrecja indukowana jest obecnością keratyny w środowisku (Rodziewicz i Łaba 2006; Kornilowicz-Kowalska i Bohacz 2011; Srivastava i in. 2011; Brandelli i in. 2015). Kunert (2000) podaje, że grzybowa biodegradacja keratyny prowadzona jest w kilku etapach obejmujących lizę enzymatyczną i mechaniczny atak za pomocą specjalnych struktur grzybni zwanych organami perforacyjnymi wytworzonymi przez dermatofity lub tzw. „boring hyphae” występujących u grzybów z grupy *Chrysosporium*. Intensywność biodegradacji keratyny pierza jest ściśle uwarunkowana także temperaturą, odczynem środowiska, oraz dostępnością łatwo przyswajalnych źródeł węgla (Kačínová i in. 2014) [P.1.; P.4.].

Zaawansowanie procesu biodegradacji keratyny pierza przez grzyby można określić na podstawie pomiaru różnych parametrów. Kornilowicz-Kowalska (1997a, b) wykazała, że istnieją liczne wskaźniki odzwierciedlające poziom aktywności keratynolitycznej grzybów, do których obok aktywności proteolitycznej i keratynolitycznej należy stężenie uwalnianych rozpuszczalnych białek i peptydów, grup aminowych (N-NH_2), jonów amonowych (N-NH_4^+), siarczanów (S-SO_4^{2-}), alkalizacja podłoża hodowlanego, a także ubytek masy piór. Bohacz (2017b) ten ostatni wskaźnik określiła jako najbardziej miarodajny wskaźnik procesu biodegradacji pierza kurcząt i opisała go jako „economic coefficient” [P.4.]. Na przemiany S-keratyny podczas biodegradacji keratyny pierza w szczególności zwrócili uwagę Bohacz i in. (2020b), którzy wskazali, że wyznacznikiem efektywności grzybowej keratynolizy obok procesów mineralizacji azotu, mogą być również procesy mineralizacji siarki organicznej [P.4.]. Na tej podstawie otrzymany w wyniku grzybowej biodegradacji piór odpadowych hydrolizat keratynowy można rozpatrywać jako potencjalny nawóz mineralno-organiczny (biopreparat/bionawóz) do użyźniania gleby i poprawy plonowania roślin, co również znalazło odzwierciedlenie w cyklu prezentowanych prac własnych [P.3.; P.4.; P.5.].

5. Znaczenie siarki w żywieniu roślin i rośliny siarkolubne

Wśród roślin o szczególnym zapotrzebowaniu na siarkę wymienić można przedstawicieli rodzin *Brassicaceae* i *Liliaceae* (Groth i in. 2020), wśród których rzepak (*Brassicaceae*) jest

rośliną o wysokiej wrażliwości na niedobory tego pierwiastka w glebie (Marazzi i Städler 2004).

Rola siarki w metabolizmie roślin wynika z jej funkcji jako pierwiastka wchodzącego w skład białek strukturalnych oraz enzymów, które odgrywają kluczową rolę w syntezie ważnych dla *Brassicaceae* i innych roślin związków takich jak białka, ligniny i kwasy tłuszczowe, ale także jako składnika wielu różnych związków biologicznie czynnych. Jak donoszą Kozłowska-Strawska i Badora (2013) oraz Groth i in. (2020) siarka wpływa na skład ilościowo-jakościowy tłuszczu w nasionach rzepaku oraz właściwości decydujące o smaku i zapachu niektórych roślin użytkowych. Dodatkowo, szczególnie wysokie zapotrzebowanie na siarkę roślin z rodziny *Brassicaceae* wynika z obecności w biomacie tych roślin wielu związków funkcjonalnych zawierających siarkę, tj. glutationu (GSH), sulfolipidów, glukozylanów (GSL), fitoaleksyn i alliin (Kozłowska-Strawska i Badora 2013). Siarka ze względu na jej rolę w pobieraniu azotu, najważniejszego makroelementu decydującego o wzroście roślin, pełni także ważną funkcję w plonowaniu roślin (Jakubus 2006) [P.5.]. W praktyce rolniczej siarka jest stosowana przeważnie jako składnik nawozów mineralnych, stanowiących nawozy chemiczne co w przypadku zbyt intensywnego i nieadekwatnego stosowania może powodować pogorszenie stanu środowiska glebowego (Jakubus 2006; Kozłowska-Strawska i Badora 2013) [P.4.].

6. Biopreparaty

Alternatywą, wobec chemicznych środków nawożeniowych, a zarazem przyjazną dla środowiska i bezpieczną dla zdrowia konsumentów formą nawozów są preparaty nawożeniowe otrzymane na bazie odpadów organicznych poddanych mikrobiologicznej biodegradacji i biotransformacji [P.4.]. Kornilowicz-Kowalska i Bohacz (2011) oraz Brandelli i in. (2015) podają, że hydrolizaty uzyskane w procesie mikrobiologicznego rozkładu keratyny pierza mogą być stosowane do nawożenia roślin jako nawozy azotowe lub jako „soil amendments”. Takie nawozy wytworzone przy udziale mikroorganizmów lub/i ich metabolitów lub/i w oparciu o ekstrakty roślinne oraz substancje humusowe określane są jako biopreparaty, biostymulatory, a nawet szczepionki mikrobiologiczne (Pylak i in. 2019), ale także jako bionawozy (biofertilizers) (Dasgupta i in. 2021). Według da Silva (2011) biopreparaty o charakterze hydrolizatów białkowych, proponowane do zastosowania w rolnictwie podnoszą żyzność gleby oraz stymulują wzrost i rozwój roślin. Szczególne znaczenie przypisywane jest bionawozom, które zawierają specjalnie dobrane mikroorganizmy lub związki przeznaczone pod uprawę określonych roślin.

W oparciu o dane z piśmiennictwa wskazujące na przekształcanie w procesie biodegradacji keratyny pierza, N i S-organiczej tych odpadów w ich mineralne formy, dostępne dla roślin, uzasadnionym wydaje się ukierunkowanie tych przemian na pozyskiwanie biopreparatów/bionawozów dla celów nawożenia roślin siarkolubnych oraz gleb o niedostatecznej zawartości siarki. Wciąż jednak pomimo postępu w zakresie gospodarki odpadami, włączając odpady pochodzenia zwierzęcego, brakuje praktycznego rozwiązania problemów dotyczących otrzymywania, zastosowania, a także oceny efektywności działania nawozów, uzyskanych w wyniku mikrobiologicznej biodegradacji i biotransformacji odpadów pierza kurcząt. Coraz bardziej jednak widoczny w ostatnich latach wzrost zainteresowania pozyskiwaniem bezpiecznych dla środowiska oraz zdrowia ludzi i zwierząt preparatów mikrobiologicznych celem ich wdrażania do praktyki, jako środków do użyźniania gleb, nawożenia i ochrony roślin, wskazuje na potrzebę prowadzenia badań nad wykorzystaniem potencjału drobnoustrojów jako naturalnych czynników bionawożeniowych.

II. Hipotezy i cele badań

1. Hipotezy główne i szczegółowe

Nadrzędnym celem prezentowanych badań, prowadzonych jako doświadczenia laboratoryjne i modelowe, było pozyskanie efektywnych szczepów grzybów mogących mieć zastosowanie w procesie utylizacji i przetwarzania pierza odpadowego na biopreparaty o wysokiej wartości użyźniającej i nawozowej.

Główna hipoteza badawcza zakładała, że wysoka liczebność w glebach uprawnych określonych gatunków grzybów keratynolitycznych, zasiedlających odpadowe pierze kurcząt świadczy o ich wysokiej aktywności keratynolitycznej, co stwarza realne podstawy do wykorzystania tych grzybów dla celów przetwarzania natywnej keratyny piór w wysokoazotowe i wysokosiarkowe hydrolizaty z przeznaczeniem jako biostymulatory wzrostu roślin o wysokim zapotrzebowaniu na te składniki oraz jako środki poprawiające aktywność biologiczną gleb, zwłaszcza ubogich w węgiel organiczny.

Hipotezy szczegółowe zakładały, że

1. obecność grzybów keratynofilnych i współwystępowanie grzybów nie-keratynofilnych, zasiedlających odpadowe pierze kurcząt w glebach uprawnych uwarunkowane było właściwościami chemicznymi i fizycznymi gleby;
[Publikacja 2; P.2.]
2. dominujący w badanych glebach uprawnych gatunek keratynolityczny *Trichophyton ajelloi* różni się aktywnością keratynolityczną w obrębie szczepów, a cecha ta może mieć związek z typem gleby oraz zróżnicowaniem właściwości fizjologicznych;
[Publikacja 3; P.3.]
3. optymalizacja warunków hodowli i składu podłoża grzyba *Trichophyton ajelloi* pozwoli przyspieszyć proces biodegradacji wartościowych poprodukcyjnych odpadów piór kurcząt i doprowadzi do uzyskania bioproduktu o wysokiej wartości nawozowej;
[Publikacja 4; P.4.]
4. otrzymany na drodze grzybowej biodegradacji hydrolizat keratynowy z uwagi na wysoką zawartość rozpuszczalnych białek i peptydów oraz mineralnych form siarki i azotu jest szczególnie przydatny do zastosowania, jako bionawóz pod uprawę roślin o wysokim zapotrzebowaniu na siarkę i poprawia aktywność biologiczną gleb.
[Publikacja 5; P.5.]

2. Założenia i cele badań

Do realizacji nadrzędnego celu badań i weryfikacji postawionych hipotez badawczych wyznaczono następujące po sobie szczegółowe cele badawcze, które dotyczyły:

1. Przeglądu literatury dotyczącej mikroorganizmów keratynolitycznych, charakterystyki enzymów keratynolitycznych oraz ogólnego mechanizmu rozkładu natywnej keratyny;
[Publikacja 1; P.1.]
2. Poznania składu rodzajowego i gatunkowego, przynależności taksonomicznej oraz częstotliwości występowania grzybów keratynofilnych i nie-keratynofilnych zasiedlających skeratynizowane resztki zwierzęce (odpadowe pierze kurcząt) w glebach uprawnych różniących się właściwościami fizykochemicznymi takimi jak skład granulometryczny, zawartość substancji organicznej, azotu i innych makroelementów oraz odczynem. Analizę mykologiczną badanych gleb prowadzono w oparciu o różne wskaźniki oceny frekwencji, podobieństwa i różnorodności organizmów w środowisku, a uzyskane dane korelowano z parametrami fizyko-chemicznymi gleb. Przeprowadzone badania służyły ponadto zgromadzeniu materiału szczepowego grzybów keratynofilnych jako wyjściowego do dalszych badań, związanych z biodegradacją odpadów pierza przez te grzyby oraz możliwością praktycznego zastosowania w rolnictwie;
[Publikacja 2; P.2.]
3. Oceny aktywności keratynolitycznej najliczniej występującego w glebach uprawnych gatunku, reprezentowanego przez *Trichophyton ajelloi*, na podstawie aktywności enzymów keratynolitycznych, mineralnych i organicznych produktów biodegradacji natywnej keratyny, alkalizacji podłoża oraz utraty masy piór w hodowlach wybranej grupy szczepów tych grzybów. Przeprowadzone badania służyły także wyselekcjonowaniu szczepów najefektywniejszych pod względem potencjału keratynolitycznego, jako biologicznych czynników przekształcających odpady pierza w hydrolizaty o dużej zawartości ważnych w żywieniu roślin mineralnych związków azotu i siarki. Dodatkowym aspektem tych badań była próba powiązania aktywności keratynolitycznej szczepów *Trichophyton ajelloi* ze zdolnością do produkcji rozpuszczalnych pigmentów lub brakiem tych uzdolnień;
[Publikacja 3; P.3.]

4. Określenia optymalnych parametrów składu podłoża oraz warunków hodowli dla przyspieszenia procesu keratynolizy odpadów pierza kurcząt przez wyizolowane wcześniej **[P.3.]** szczepy *Trichophyton ajelloi* oraz otrzymania wartościowego preparatu nawożeniowego. W ocenie optymalizacji analizowanych parametrów uwzględniono aktywność enzymów odpowiedzialnych za biodegradację natywnej keratyny piór, utratę masy tych odpadów i stopień alkalizacji podłoża oraz przede wszystkim poziom akumulacji organicznych i mineralnych form azotu i siarki;
[Publikacja 4; P.4.]
5. Zbadania wpływu hydrolizatów keratynowych uzyskanych po rozkładzie pierza kurcząt przez wyselekcjonowany szczep *Trichophyton ajelloi* wykazujący najwyższą, spośród testowanych szczepów tego gatunku aktywność keratynolityczną pod kątem fitotoksyczności oraz oddziaływania na wzrost roślin i aktywność biologiczną gleby. Oceny dokonywano analizując wpływ tego preparatu na kiełkowanie i przyrost biomasy rzepaku (*Brassica napus* L. var. *napus*), rośliny o wysokich wymaganiach względem siarki oraz na aktywność mikrobiologiczną, biochemiczną i enzymatyczną, a także niektóre parametry chemiczne gleby.
[Publikacja 5; P.5.]

III. Materiały i metody

Kolejność zadań badawczych służących rozwiązaniu podjętej problematyki, weryfikacji postawionych w jej ramach hipotez oraz założonych celów przedstawiono na schemacie 1.



Schemat 1. Etapy realizacji celów badań.

1. Materiały

1.1. Gleby użyte do izolacji grzybów i doświadczeń modelowych [P.2.; P.5.]

Objęte badaniami gleby uprawne o różnych właściwościach fizyko-chemicznych pochodziły z gospodarstw znajdujących się na terenie województwa lubelskiego (południowo-wschodnia Polska).

Dwie gleby na podstawie oznaczanych parametrów fizyko-chemicznych [P.2.], pobrane z gospodarstw indywidulanych w Sobieszynie, czyli gleba I: (51°59'85,73N; 22°13'34,30E) oraz gleba II: (51°59'68,00N; 22°13'46,96E) zostały odpowiednio zakwalifikowane według World Reference Base (IUSS Working Group WRB 2015) jako kambisole (Cambisols, CM) o uziarnieniu odpowiednio piasku gliniastego (loamy sand) (Cambisol I) i gliny piaszczystej (sandy loam) (Cambisol II), które umownie w przedłożonych pracach przedstawiano jako gleba piaszczysta (Cambisol I) i gleba gliniasta (Cambisol II). Kolejna, trzecia gleba pobrana z gospodarstwa indywidualnego z miejscowości Żulice (gleba III: 50°53'57,20N; 23°78'26,85E) zakwalifikowana została, jako czarnoziem (Chernozem, CH) o uziarnieniu pyłu gliniastego (silt loam). Czwarta gleba, pochodząca z gospodarstwa doświadczalnego w Bezku (gleba IV: 51°19'N; 23°25'E) należącego do Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie została zakwalifikowana do leptosoli (Leptosols, LP) o uziarnieniu pyłu gliniastego (silt loam), którą określano jako rędzina (Rendzina).

Spośród gleb typu CM, gleba I (gleba piaszczysta) o $pH_{KCl} = 3,4$ charakteryzowała się najniższą spośród badanych gleb zawartością C organicznego (0,59%), N ogólnego (0,059%), substancji organicznej (1,01%), przyswajalnego potasu (K_2O) (80,0 mg kg^{-1}), frakcji pyłu (\emptyset 0,05 - 0,002 mm = 14,69%) i iłu ($\emptyset < 0,002$ mm = 1,23%), oraz najwyższą w stosunku do pozostałych gleb frakcją piasku (\emptyset 2 - 0,05 mm = 84,08%). Gleba II (gleba gliniasta) o $pH_{KCl} = 5,4$ zawierała 1,02% C organicznego, 0,107% N ogólnego, 1,76% substancji organicznej i najniższy poziom przyswajalnego fosforu ($P_2O_5 = 67,0$ mg kg^{-1}). Gleba III typu CH (czarnoziem) charakteryzowała się zawartością C organicznego na poziomie 1,45%, N ogólnego 0,154%, substancji organicznej równej 2,5%, przyswajalnych form: potasu (K_2O) na poziomie 207 mg kg^{-1} , fosforu (P_2O_5) na poziomie 114,0 mg kg^{-1} , $pH_{KCl} = 5,0$ oraz najwyższą spośród badanych gleb frakcją pyłu (\emptyset 0,05 - 0,002 mm = 75,58%), a najniższą frakcją piasku (\emptyset 2 - 0,05 mm = 17,37%). Gleba typu LP charakteryzowała się najwyższą zawartością C organicznego, która wynosiła 3,16 %, N ogólnego 0,301%, substancji organicznej równej 5,44%, przyswajalnego potasu (K_2O) na poziomie 472,0 mg kg^{-1} , a fosforu (P_2O_5) na

poziomie 212,0 mg kg⁻¹ o pH_{KCl} = 6,9 oraz najwyższą spośród badanych gleb frakcją iłu (Ø <0,002 mm = 9,99%).

Wszystkie gleby (gleba I, II, III i IV) zostały wykorzystane jako materiał do izolacji grzybów keratynofilnych i grzybów współtowarzyszących oraz dla celów określenia współzależności pomiędzy właściwościami fizyko-chemicznymi gleb, a częstością występowania i składem jakościowym tych grzybów [P.2.].

Glebę I (Cambisol I) umownie określoną jako gleba piaszczysta, glebę II (Cambisol II) umownie określoną jako gleba gliniasta i glebę III, tj. czarnoziem (Chernozem) wytypowano do badań nad określeniem fitotoksycznego działania hydrolizatu keratynowego otrzymanego po biodegradacji odpadowego pierza kurcząt przez grzyby, opisywanego także jako bionawóz/biopreparat. W dalszym etapie badań glebę piaszczystą i czarnoziem wybrano do badań nad wpływem tego hydrolizatu na aktywność biologiczną gleb i wzrost roślin w warunkach modelowych [P.5.].

1.2. Odpadowe pierze kurcząt jako substrat keratynowy [P.2.; P.3.; P.4.]

Odpadowe białe pióra kurcząt pochodziły z Zakładów Drobiarskich „Superdrob” w Lublinie. Umyte i oczyszczone od wszelkich pozostałości poubojowych pióra, dokładnie płukano wodą destylowaną, suszono w temperaturze 55°C i rozdrabniano ręcznie na fragmenty o wielkości 1 - 5 mm. Rozdrobnione pierze kurcząt umieszczano w określonych porcjach w kolbach Erlenmayera o pojemności 300 cm³ i sterylizowano metodą gazowania w celu zachowania nienaruszonej struktury białka keratynowego [P.2.; P.3.; P.4.].

Do izolacji grzybów keratynolitycznych zastosowano metodę przynęty keratynowej (Korniłłowicz-Kowalska i Bohacz 2002) posypując równomierną warstwą jałowych piór wyłożone na płytki Petriego próbki gleb [P.2.].

W celu oznaczania uzdolnień wytypowanych szczepów grzybów do biodegradacji natywnej keratyny pierza prowadzono hodowle w kolbach Erlenmayera zawierające sterylne pióra jako jedyne źródło C, N, S i energii dla badanych grzybów [P.3.; P.4.].

1.3. Szczepy grzybów keratynolitycznych wytypowane do badań [P.3.; P.4.; P.5.]

Do badań nad aktywnością keratynolityczną grzybów keratynofilnych wyizolowanych z badanych próbek glebowych wybrano *Trichophyton ajelloi* - gatunek o największej średniej liczbie notowań wśród tych grzybów. Jako kryterium wyboru szczepów *Trichophyton ajelloi*, przyjęto częstość występowania w próbkach badanych gleb. Na tej podstawie za

reprezentatywne uznano szczepy wyizolowane z gleby gliniastej i czarnoziemiu, gdzie ich udział wynosił odpowiednio 30% i 22%. W pozostałych badanych glebach: piaszczystej i rędzinie wynosił on odpowiednio 4,2% i 0%. Łącznie do badań wytypowano 37 szczepów: 20 z gleby gliniastej (Cambisol II) i 17 z czarnoziemiu [P.3.]. Przyjęto przy tym zasadę, że na jedną płytkę Petriego z glebą i przynętą keratynową przypadał tylko jeden szczep tego gatunku. Szczepy *Trichophyton ajelloi* wyizolowane z gleby gliniastej oznaczono numerami od I-XVI oraz XXI, XXII, XXVIII, XXIX, a z czarnoziemiu numerami XVII-XX, XXIII-XXVII, XXX-XXXVII. Szczep referencyjny *Trichophyton ajelloi* var. *ajelloi* CBS119779 pochodził z kolekcji Centraalbureau voor Schimmelcultures (Niderlandy).

Do badań nad optymalizacją warunków hodowli i składu podłoża [P.4.], wytypowano trzy spośród 37 przebadanych szczepów *Trichophyton ajelloi* [P.3.]. Wybrane szczepy oznaczone nr III, XII i XIV pochodziły z gleby gliniastej (Cambisol II) i cechowały się wysoką aktywnością hydrolityczną i mineralizacyjną wobec natywnej keratyny piór, stwarzając realną podstawę do pozyskania hydrolizatów keratynowych o dużej zawartości mineralnych form N i S, uwalnianych podczas biodegradacji poprodukcyjnego pierza [P.5.].

1.4. Hydrolizat keratynowy (bionawóz/biopreparat) [P.5.]

Do badań dotyczących oceny potencjalnych możliwości wykorzystania otrzymanych po biodegradacji pierza odpadowego hydrolizatów keratynowych jako stymulatorów kiełkowania i wzrostu roślin oraz aktywności biologicznej gleby w warunkach doświadczeń modelowych, wykorzystano hydrolizat keratynowy otrzymany po 18-dniowej biodegradacji piór kurcząt przez szczep *Trichophyton ajelloi* oznaczony nr XII.

1.5. Rośliny, użyte jako testery skuteczności działania otrzymanych biopreparatów keratynowych [P.5.]

W badaniach nad oddziaływaniem hydrolizatów keratynowych otrzymanych po grzybowej biodegradacji pierza na kiełkowanie i wzrost roślin zastosowano test fitotoksyczności z wykorzystaniem roślin testowych o dużym zapotrzebowaniu na siarkę, tj. *Lepidium sativum* L. (pieprzyca siewna) i *Brassica napus* L. var. *napus* (rzepak) odmiana „Hugo”. Natomiast oceny wpływu hydrolizatu keratynowego na przyrost biomasy roślin oraz aktywność biologiczną gleby dokonywano w doświadczeniach modelowych z rzepakiem *Brassica napus* L. var. *napus*.

2. Metody analityczne

2.1. Identyfikacja gatunkowa wyizolowanych szczepów grzybów [P.2.]

2.1.1. Tradycyjne metody identyfikacji gatunkowej grzybów

Wyizolowane czyste kultury grzybów przechowywano na skosach agarowych w temperaturze +4°C na pożywce Sabourauda, sukcesywnie dokonując ich identyfikacji rodzajowej i gatunkowej na podstawie cech makro- i mikromorfologicznych. Obserwacje cech mikromorfologicznych prowadzono w mikrokulturach czystych hodowli grzybów przy użyciu mikroskopu Olympus BS-41, wyposażonego w kamerę CVIII4 z oprogramowaniem Cell-A. Ocena uwzględniała takie cechy jak kształt i wielkość zarodników, strzępek zarodnikotwórczych i innych struktur rozmnożeniowych, w tym ciał owocujących (stadium teleomorfy), występowanie różnych form morfologicznych strzępek wegetatywnych, a także określenie zdolności do wytwarzania chlamydospor.

Obserwacje makroskopowe dotyczyły morfologii kolonii grzybów wyrosłych na płytkach Petriego oraz wzrostu na skosach, co obejmowało ocenę wielkości i struktury kolonii, zdolności do uwalniania pigmentów do podłoża, a także barwę awersu i rewersu. Klasyfikację gatunkową (lub tylko rodzajową) zgromadzonej kolekcji szczepów grzybów przeprowadzono na podstawie opracowań systematycznych van Oorschota (1980), Nelsona i in. (1983), Kwaśnej i in. (1991) oraz Domscha i in. (2007). Aktualna nomenklatura analizowanych grzybów została zweryfikowana w Index Fungorum: www.indexfungorum.org.

2.1.2. Molekularne metody identyfikacji gatunkowej grzybów [P.3.; P.4.]

Identyfikację gatunkową wytypowanych do badań aktywności keratynolitycznej szczepów *Trichophyton ajelloi*, zweryfikowano za pomocą metod molekularnych, tj. reakcji PCR i sekwencjonowania nukleotydów, przeprowadzonych w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Izolację materiału genetycznego (DNA) wykonano pobierając grzybnię z hodowli na płytkach Petriego metodą manualną opisaną w pracy Liu i Paterson (2011). Następnie przeprowadzono reakcję PCR i sekwencjonowanie matryc produktów reakcji w wykorzystaniem specyficznych starterów: ITS1: 5-CCGTAGGTGAACCTGGCGG-3 oraz ITS4: 5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3.

Produkty PCR oczyszczono, a następnie przeprowadzono sekwencjonowanie z użyciem zestawu: BigDye Terminator Mix v3.1 i analizatora genetycznego ABI3730xl oraz ww. starterów. Uzyskane odczyty złożono w odpowiednie kontigi uzyskując sekwencję

konsensusową. Otrzymane sekwencje porównano z bazą danych UNITE (<https://unite.ut.ee/>). Dokładne warunki reakcji PCR i sekwencjonowania nukleotydów podano w pracy Bohacz (2017b).

Sekwencje identyfikacyjne umieszczono w Gen Banku pod numerami akcesyjnymi ON 461895 szczep *Trichophyton ajelloi* oznaczony jako III, ON 468679 szczep *Trichophyton ajelloi* oznaczony jako XII, ON 461993 szczep *Trichophyton ajelloi* oznaczony jako XIV.

2.2. Podłoże hodowlane grzybów *Trichophyton ajelloi* [P.3.]

Do zbadania aktywności keratynolitycznej wytypowanych 37 szczepów *Trichophyton ajelloi* i szczepu referencyjnego *Trichophyton ajelloi* var. *ajelloi* CBS119779 przygotowywano sterylne podłoże mineralne w 100 cm³ porcjach w kolbach Erlenmayera o pojemności 300 cm³ i składzie (g dm⁻³): KH₂PO₄ - 1,5; NaCl - 0,01; MgCl₂ 6H₂O - 0,05; woda destylowana 1 dm³, pH = 4,5, które łączono z 1 g sterylnych piór, jako jedynym źródłem azotu, siarki, węgla i energii. Skład podłoża z wyjątkiem pH oparto na opracowanym wcześniej (Bohacz 2017b) podłożu dla grzybów keratynolitycznych z rodzaju *Chrysosporium*. Podłoże hodowlane szczepiono 1 cm³ zawiesiny zarodników grzybów o gęstości 10⁶ - 10⁸ cfu cm⁻³, pochodzących z dwutygodniowych hodowli szczepów *Trichophyton ajelloi*.

2.3. Wskaźniki aktywności keratynolitycznej [P.3.; P.4.]

Uzdolnienia do biodegradacji odpadów pierza przez wytypowane szczepy *Trichophyton ajelloi* oceniano na podstawie aktywności enzymów: keratynazy i proteazy, produktów keratynolizy i mineralizacji N-organicznego i S-organicznego zawartych w tych odpadach, co obejmowało rozpuszczalne białka i peptydy, grupy aminowe (aminokwasy) i tiolowe (aminokwasy siarkowe), jony amonowe i siarczanowe oraz pH podłoża i ubytek masy piór.

Oznaczenia aktywności enzymatycznych oraz stężenia uwalnianych produktów i pH prowadzono w płynach pohodowlanych. Płyny pohodowlane otrzymano przez sączenie, a następnie filtrowanie przez filtry o średnicy 33 mm i wielkości porów 0,22 μm (Millipore, Millex-HV Syringe Filters). Aktywność enzymów keratynolitycznych, stężenie organicznych i mineralnych form azotu i siarki oraz pH podłoża oznaczano po 7, 14, 21, 28, 35 i 42 dniach hodowli wszystkich 37 badanych szczepów. Ubytek masy substratu oznaczano na koniec doświadczenia.

2.3.1. Oznaczanie aktywności enzymów keratynolitycznych

Aktywność keratynazy oznaczano metodą Yu i in. (1968) zmodyfikowaną przez Anbu i in. (2008) w 0,1 M buforze TRIS-HCL, pH = 8,1 wobec 20 mg rozdrobnionego pierza kurcząt jako substratu keratynowego i temperaturze inkubacji 37°C. Aktywność proteazy oznaczano metodą Ansona (1938) zmodyfikowaną przez Kornilłowicz (1994) w 0,028 M buforze fosforanowym pH = 7,8 z dodatkiem 2 mM jonów magnezu stosując 1% roztwór kazeiny jako substrat w 37°C przez 1 h. Oznaczenie aktywności obu enzymów: proteazy kazeinolitycznej i keratynazy prowadzono z wykorzystaniem spektrofotometru UV-VIS-1800 (RayLeigh, Chiny) przy długości fali odpowiednio 280 nm (keratynaza) i 720 (proteaza).

2.3.2. Oznaczanie organicznych i mineralnych produktów keratynolizy piór oraz pH

Pomiaru rozpuszczalnych białek i peptydów w płynach pochodzących dokonano metodą Lowry'ego i in. (1951). Zawartość aminokwasów, mierzonych poziomem grup aminowych oznaczano metodą ninhydrynową według opisu Kornilłowicz-Kowalskiej (1997a). Zawartość jonów amonowych w płynach hodowlanych została określona metodą nessleryzacji (Kornilłowicz-Kowalska 1997b), natomiast siarczanów na podstawie intensywności zmętnienia w reakcji z chlorkiem baru ($BaCl_2$) metodą nefelometryczną (Kornilłowicz-Kowalska 1997b). Oznaczenie stężenia grup tiolowych w płynach pochodzących prowadzono na podstawie reakcji barwnej grup -SH z odczynnikiem Ellmana (Ellman 1959). Wartość pH płynów pochodzących została określona przy użyciu pH metru CP-505 (Elmetron, Zabrze, Polska), wyposażonego w elektrodę szklaną.

2.3.3. Oznaczanie ubytku masy piór

Ubytek masy substratu keratynowego (pierze kurcząt) oznaczono po 42 dniach trwania doświadczenia metodą wagową po wysuszeniu w 105°C w suszarce KBC G-65/250 (Promed, Warszawa, Polska).

2.4. Oznaczanie innych uzdolnień hydrolitycznych szczepów *Trichophyton ajelloi* [P.4.]

Z uwagi na złożony charakter chemiczny odpadów bogatych w keratynę, obok priorytetowych uzdolnień keratynolitycznych grzybów przeprowadzono także wstępną ocenę uzdolnień do rozkładu „zwykłych” białek, takich jak żelatyna, węglowodanów na przykładzie skrobi oraz tłuszczu, stosując trójmaślan. Badaniami objęto trzy szczepy *Trichophyton ajelloi*

(nr III, XII i XIV). Hodowle prowadzono na płytkach Petriego z selektywnym podłożem zestalonym agarem zawierającym żelatynę, skrobię oraz trójmaślan jako jedyne źródło C, N i energii (podłoże z żelatyną) oraz C i energii (podłoże ze skrobią oraz tłuszczem). Hodowle inkubowano w 28°C przez 7 dni. Oceny uzdolnień do produkcji zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych, amylolitycznych i lipolitycznych dokonywano na podstawie stwierdzenia klarownych stref rozkładu odpowiednich substratów. Uzyskane wyniki przedstawiono jako indeks enzymatyczny obliczony według de Lima i in. (2020).

Dokonano także wstępnej optymalizacji temperatury wzrostu grzybów *Trichophyton ajelloi*. W tym celu zastosowano cztery temperatury inkubacji (20°C, 28°C, 37°C, 50°C) hodowli wybranych trzech szczepów *Trichophyton ajelloi*, założonych na płytkach Petriego z pożywką Sabourauda i maltozową (MEA).

2.5. Określanie optymalnych parametrów procesu biodegradacji odpadowej keratyny pierza przez szczepy *Trichophyton ajelloi* i wskaźników ich oceny [P.4.]

Do optymalizacji warunków hodowli i składu podłoża wyselekcjonowanych trzech szczepów (oznaczonych nr III, XII i XIV) z grupy 37 szczepów *Trichophyton ajelloi* [P.3.] jako wyjściowe (kontrolne, nieoptymalizowane), stosowano podłoże mineralno-keratynowe o składzie jak podano w rozdziale 2.2.

W celu doboru optymalnych parametrów hodowli dla procesu biodegradacji keratyny pierza odpadowego przez *Trichophyton ajelloi* testowano różne źródła węgla i azotu (1%, 1,5% i 2,0% pierza odpadowego, 1% ksylozę i 1% glukozę), pH podłoża hodowlanego (pH = 4,5; 6,5 i 8,5), temperaturę inkubacji (20°C, 28°C i 37°C) oraz napowietrzanie hodowli (hodowle stacjonarne i wytrząsane). Jako kryterium oddziaływania poszczególnych czynników przyjęto aktywność enzymów uczestniczących w rozkładzie białka keratynowego, tj. aktywność proteazy, keratynazy i reduktazy disiarczkowej, stężenie produktów keratynolizy, co obejmowało rozpuszczalne białka i peptydy oraz aminokwasy, grupy aminowe i tiolowe, jony amonowe i siarczanowe oraz pH oznaczane w płynach pohodowlanych, a także ubytek masy piór.

Hodowle prowadzono przez 42 dni. Okresowo tj. po 7, 14, 21, 28 i 35 dniach w oddzielonych od grzybni płynach pohodowlanych oznaczano aktywność enzymów oraz organicznych i mineralnych produktów keratynolizy piór, a także pH. Płyny pohodowlane oddzielono przez odwirowanie pozostałości grzybni w 4°C przy 7000 rpm/min. Ubytek masy piór oznaczano po 42 dniach hodowli (rozdział 2.3.3).

Aktywności enzymów proteazy i keratynazy, zawartości produktów rozkładu piór, tj. rozpuszczalne białka i peptydy, grupy aminowe i tiolowe, jony amonowe i siarczanowe oraz pH podłoża oznaczano jak podano w rozdziale 2.3.1 i 2.3.2. Oznaczenie aktywności reduktazy disiarczkowej przeprowadzono spektrofotometrycznie (spektrofotometr mikropłytkowy EPOCHTM BioTek) według metody Holmgren (1977) w modyfikacji Aharonowitz i in. (1993) w 50 mM buforze Tris-HCl o pH = 8,0 w obecności 1 mM NADPH i 0,2 mM EDTA oraz 0,02 mM DTNB [Kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy)] w 95% etanolu [P.4.].

Oznaczanie składu aminokwasowego w płynach pochodzących z hodowli szczepu *Trichophyton ajelloi* nr III na podłożu zawierającym 1% pierza kurcząt w 4 wariantach hodowli stacjonarnej: z dodatkiem 1% ksylozy i 1% glukozy inkubowanych w 20°C i 37°C oraz jednym wariantem hodowli wytrząsanej (28°C, bez dodatku cukru). Rozdział aminokwasów prowadzono metodą chromatografii jonowymiennej z wykorzystaniem analizatora aminokwasów AAA 400 firmy Ingos (Czechy, Praga) [P.4.].

2.6. Oznaczanie fitotoksyczności, biologicznej aktywności gleby i parametrów chemicznych gleb po wprowadzeniu hydrolizatu keratynowego [P.5.]

2.6.1. Model doświadczenia

Oceny oddziaływania hydrolizatu keratynowego otrzymanego po biodegradacji pierza kurcząt przez wyselekcjonowany szczep *Trichophyton ajelloi* na kiełkowanie i wzrost roślin testowych dokonano w teście fitotoksyczności posługując się gotowym zestawem Phytotoxkit (Tigret, Polska) oraz stosując próbki 3 gleb: Cambisol I i Cambisol II (umownie nazwanych odpowiednio, jako gleba piaszczysta i gliniasta) oraz czarnoziem (Chernozem).

W celu zbadania wpływu otrzymanych hydrolizatów keratynowych na aktywność biologiczną gleby i wzrost rzepaku *Brassica napus* L. var. *napus* założono doświadczenie wazonowe na dwóch glebach, tj. na glebie piaszczystej (Cambisol I) oraz na czarnoziemie (Chernozem). Gleby wytypowano na podstawie różnic we właściwościach chemicznych oraz uzyskanych wyników fitotoksyczności.

Model doświadczalny obejmował 4 warianty dla każdej z dwóch badanych gleb, w trzech powtórzeniach:

- I wariant (kontrola 1): gleba, woda
- II wariant (kontrola 2): gleba, woda, rzepak
- III wariant: gleba, hydrolizat keratynowy
- IV wariant: gleba, hydrolizat keratynowy, rzepak

Doświadczenie prowadzono przez 60 dni w fitotronie Biogenet FD147 Inox w temperaturze 23°C w ciągu dnia oraz 17,5°C w nocy przy 85,0% wilgotności powietrza. Zadany fotoperiod w tym czasie wynosił 15 godzin dnia oraz 9 godzin nocy.

Okresowo, tj. po 3, 30 i 60 dniach oznaczano aktywność biologiczną gleby badanych kombinacji doświadczalnych w oparciu o wskaźniki mikrobiologiczne, enzymatyczne, biochemiczne i zawartość ogólnej puli dsDNA w próbkach gleby. Oznaczano także biomasę roślin oraz parametry chemiczne gleby.

2.6.2. Oznaczanie liczebności mikroorganizmów glebowych

Oznaczenia ogólnej liczebności bakterii i grzybów, drobnoustrojów proteolitycznych, oraz bakterii i grzybów celulolitycznych prowadzono metodą wysiewu dziesiętnych rozcieńczeń badanych próbek glebowych na odpowiednio dobranych dla każdej grupy drobnoustrojów podłożach, stosując standardowe metody płytkowe, powszechnie używane w mikrobiologii gleby. Ostateczne wyniki przedstawiono w jtk kg⁻¹ s.m. gleby.

2.6.3. Oznaczanie aktywności enzymatycznej i biochemicznej

Aktywność oddechową, mierzoną ilością wydzielonego CO₂ oznaczono według metodyki podanej przez Rühling i Tyler (1973). Aktywność dehydrogenazy oznaczano metodą Thalmanna (1968) wobec 1% roztworu 2,3,5 chlorku trójfenylotetrazoliowego (TTC) jako substratu rozpuszczonego w buforze Tris-HCl o pH = 7,4. Pomiaru TPF dokonano spektrofotometrycznie (spektrofotometr UV-VIS-1800 RayLeigh, Chiny) przy długości fali 485 nm. Aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej mierzono wobec 0,1% roztworu PNPNa (4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate) w buforze uniwersalnym o pH 6,5 i 11,0. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 400 nm wobec próby odczynnikowej (Tabatabai i Bremner 1969). Wyniki podano w mmol PNP kg⁻¹ s.m. gleby h⁻¹.

Aktywność proteazy w próbkach glebowych oznaczono spektrofotometrycznie przy długości fali 578 nm według metody Ladda i Butlera (1972) z użyciem 1% roztworu kazeinianu sodu rozpuszczonego w 0,1 M buforze Tris-HCl o pH = 8,1. Wyniki podano w mg tyrozyny kg⁻¹ s.m. gleby h⁻¹.

Oznaczenia suchej masy gleby prowadzono w 105°C z wykorzystaniem wagosuszarki (MAC 50/NH, RADWAG, Radom, Polska).

2.6.4. Oznaczanie parametrów chemicznych

Wartość pH gleb w różnych wariantach doświadczalnych mierzono potencjometrycznie w 1 M KCl przy użyciu pH-metru CP-505 (Elmetron, Zabrze, Polska), wyposażonego w elektrodę szklaną.

W celu stwierdzenia wpływu hydrolizatów na parametry chemiczne gleby przeprowadzono pomiar zawartości ogólnego węgla organicznego (TOC), azotu (N), przyswajalnego fosforu (P) i potasu (K). Ogólny węgiel organiczny (TOC) oznaczono z wykorzystaniem niedispersyjnego analizatora gazów w podczerwieni NDIR (TOC-VCSH Analyzer, Shimadzu, Japonia), natomiast zawartość azotu całkowitego (N) metodą Kjeldahla, z wykorzystaniem mineralizatora (Tecator DigesterTM Auto 2520, FOSS, Dania) i analizatora (KjelROC Analyzer, OPSIS LiquidLINE, Szwecja). Zawartość fosforu w próbkach glebowych oznaczono spektrofotometrycznie (Spektrofotometr UV-1800, Shimadzu Corporation, Japonia), natomiast zawartość potasu zmierzono z wykorzystaniem spektrometrii absorpcji atomowej z atomizacją w płomieniu (FAAS) (SpektrAA 280FS z autosamplerem SPS-3 i diluterem SIPS, Varian, Australia).

2.6.5. Pomiar stężenia dsDNA

Izolację glebowego DNA z każdego wariantu doświadczalnego i ze wszystkich terminów doświadczalnych przeprowadzono przy pomocy gotowego zestawu DNA GeneMATRIX Series (EUR_X, Gdańsk, Polska), postępując zgodnie z załączoną procedurą. Do pomiaru stężenia dsDNA zastosowano spektrofotometr UV-VIS NanoDrop One do analizy DNA, RNA i białek (ThermoFisher Scientific, USA).

Za czyste DNA próbek glebowych przyjęto zgodnie z danymi literaturowymi (Olson i Morrow 2012) materiał genetyczny, którego stosunek A₂₆₀/A₂₈₀ mieścił się w przedziale 1,80 - 2,00.

2.6.6. Określenie biomasy rzepaku

Jako jeden z parametrów oceny wpływu wprowadzonego dogłębowo hydrolizatu keratynowego na wzrost i rozwój rzepaku przyjęto plon świeżej masy tej rośliny. W tym celu okresowo, tj. po 3, 14, 21 i 30 dniach rośliny oddzielano od gleby poprzez otrząsanie korzeni i ważono (PS 210/C/2, RADWAG, Radom, Polska)

3. Analizy wyników badań [P.2.; P.3.; P.4.; P.5.]

3.1. Publikacja 2 [P.2.]

Dla wyznaczenia dominantów gatunkowych grzybów zasiedlających pióra kurcząt w badanych glebach obliczono współczynniki dominacji gatunkowej (Trojan 1975). W celu dokładnego poznania zależności pomiędzy zbiorowiskami grzybów, zasiedlających badane gleby obliczono współczynniki różnorodności gatunkowej (D) Simpsona (Krebs 1994) oraz współczynniki podobieństwa gatunkowego (S) Marczewskiego-Steinhaus (Szewczyk 2007). Oszacowano również strukturę przestrzenną i taksonomiczną zbiorowisk grzybów, przyjmując za Kornilłowicz-Kowalską i in. (2020), że struktura taksonomiczna zbiorowisk grzybów to proporcjonalny udział liczby gatunków wchodzących w skład danej grupy systematycznej (rzędy) w odniesieniu do ogólnej liczby gatunków, wyrażony w %. Natomiast struktura przestrzenna to proporcjonalny udział liczby notowań (=liczba szczepów), przypadających na przedstawicieli tej samej grupy taksonomicznej (rzędy) w odniesieniu do ogólnej liczby notowań (szczepów), także wyrażony w %.

W celu stwierdzenia wzajemnych relacji pomiędzy badanymi wskaźnikami, tj. liczebnością szczepów, gatunków, rzędów i grup ekologiczno-fizjologicznych (grzyby keratyno- i nie-keratynofilne), a parametrami fizyko-chemicznymi gleb, przeprowadzono analizę korelacji liniowej r-Pearsona. Dane skorelowano na trzech poziomach istotności, tj. $\alpha = 0,05$; $0,01$; $0,001$. W celu wykazania różnic między glebami pod względem częstości występowania grzybów keratynofilnych, a także nie-keratynofilnych przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a następnie test post-hoc Tukey'a na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

3.2. Publikacja 3 [P.3.]

Wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test post-hoc HSD-Tukey'a ($\alpha = 0,05$) zastosowano dla wykazania istotnych różnic w aktywności keratynolitycznej, mierzonej

różnymi parametrami pomiędzy wytypowanymi do badań szczepami *Trichophyton ajelloi*, wyizolowanymi z gleby gliniastej i czarnoziemiu, a także pomiędzy szczepami pigmentującymi i niepigmentującymi z obydwu tych gleb. Celem zbadania współzależności między badanymi parametrami aktywności keratynolitycznej grzybów i czasem trwania doświadczenia wykonano analizę regresji, wyznaczając funkcję regresji krzywoliniowej (wielomian trzeciego stopnia) i współczynniki determinacji R^2 (kwadrat współczynnika korelacji krzywoliniowej wyrażonej w %). Dla wykazania różnic w biodegradacji odpadowego pierza (ocenianej na podstawie badanych wskaźników keratynolizy) w zależności od pochodzenia szczepów grzybów, przeprowadzono analizę składowych głównych (PCA).

3.3. Publikacja 4 [P.4.]

W celu wykazania istotnych różnic pomiędzy badanymi szczepami *Trichophyton ajelloi* (szczepy nr III, XII i XIV), a optymalizowanymi warunkami hodowli i składem podłoża przeprowadzono wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Dla zademonstrowania zależności pomiędzy aktywnością keratynolityczną szczepów grzybów *Trichophyton ajelloi* oznaczonych nr III, XII i XIV, a optymalizowanymi parametrami hodowli wykonano analizę składowych głównych (PCA).

Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji zaproponowano optymalne warunki dla najwydajniejszej biodegradacji poprodukcyjnego pierza kurcząt przez badane trzy szczepy *Trichophyton ajelloi* w odniesieniu do wszystkich optymalizowanych parametrów biodegradacji natywnej keratyny.

3.4. Publikacja 5 [P.5.]

Na podstawie uzyskanych danych w teście fitotoksyczności wyliczono siłę kiełkowania nasion (Z_K), współczynnik inhibicji wzrostu korzeni (I_K) i współczynnik wydłużenia pędu rośliny (I_N) według Czop i in. (2016) oraz indeks kiełkowania (ang. Germination Index - G_I) według (Carvalho Neves i in. 2020). Wyliczono także średni stosunek długości korzenia do długości pędu stosując wzór podany przez Czop i in. (2016).

W celu określenia istotnych różnic pomiędzy badanymi mikrobiologicznymi, biochemicznymi i enzymatycznymi parametrami biologicznej aktywności gleby oraz różnicami w biomacie roślin w różnych wariantach doświadczalnych w trakcie trwania doświadczenia, przeprowadzono wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) na poziomie istotności $\alpha =$

0,05. Dodatkowo dla uchwycenia wzajemnych powiązań między badanymi wskaźnikami, a parametrami chemicznymi w badanych wariantach doświadczalnych, wyliczono współczynniki korelacji liniowej r-Pearsona na poziomach istotności $\alpha = 0,05$; 0,01 i 0,001.

Dla wykazania zależności pomiędzy badanymi wskaźnikami mikrobiologicznymi, biochemicznymi i enzymatycznymi oraz ich zmianami w zależności od terminu doświadczalnego wykonano analizę składowych głównych (PCA).

W analizie statystycznej uzyskanych wyników badań wykorzystano oprogramowanie Statistica ver. 13.3 (StatSoft, Kraków, Polska) oraz program Arstat (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie).

IV. Omówienie wyników i dyskusja

Zagadnienia przedstawione w publikacjach 1, 2, 3, 4 i 5 [P.1.; P.2.; P.3.; P.4.; P.5.] stanowią całościowe rozwiązanie problemu badawczego wchodzącego w zakres gospodarki odpadami o obiegu zamkniętym, realizowane w warunkach doświadczeń modelowych i laboratoryjnych z przeznaczeniem na cele praktyczne. W pierwszym etapie rozwiązywania problemu badawczego zebrano informacje dotyczące aktualnej wiedzy na temat mikroorganizmów keratynolitycznych, wydzielanych przez nie enzymów i mechanizmu rozkładu natywnej keratyny przez drobnoustroje [P.1.]. W kolejnym kroku podjęto badania dotyczące izolacji i identyfikacji glebowych grzybów keratynolitycznych oraz określenia zależności ich występowania do właściwości fizyko-chemicznych gleb, zbierając przy tym materiał szczepowy do dalszych badań [P.2.]. Następnie w oparciu o wytypowaną, reprezentatywną grupę szczepów przeprowadzono ocenę uzdolnień tych grzybów do rozkładu odpadowej keratyny pierza oraz optymalizację tego procesu dla celów otrzymania biopreparatu o wysokiej wartości nawozowej [P.3.; P.4.]. W końcowym etapie badań sprawdzano ewentualne fitotoksyczne działanie otrzymanego biopreparatu i jego wpływ na wzrost roślin oraz aktywność biologiczną gleb w powiązaniu z ich właściwościami chemicznymi [P.5.].

Przedstawiony problem rozwiązywano poprzez wyznaczenie i realizację szczegółowych celów, które opisano w poszczególnych publikacjach.

W poniższym opisie wyników badań wstawiono odnośniki do rysunków i tabel, które znajdują się w poszczególnych opublikowanych artykułach naukowych [P.2.; P.4.; P.5.] umieszczonych w rozdziale VII.

Wyniki nieopublikowanej pracy [P.3.] w postaci rysunków i tabel zostały umieszczone na końcu opisu tej części badań w rozdziale IV.3 oraz znajdują się w załączonym tekście tej pracy w rozdziale VII.

1. Publikacja 1 [P.1.]

- *Przegląd literatury dotyczący mikroorganizmów i enzymów keratynolitycznych, mechanizmu rozkładu natywnej keratyny oraz niektórych odpadów keratynowych.*

[P.1.] Możejko, M., Bohacz, J., 2021. Mikroorganizmy i enzymy keratynolityczne. W: Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa. Babicz, M., Nowakowicz-Dębek, B. (red.).

Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, s. 96-103. ISBN: 978-83-7259-344-3.

W publikacji przeglądowej [P.1.] przedstawiono różnorodność mikroorganizmów keratynolitycznych i syntetyzowanych przez nie enzymów. Scharakteryzowano, najważniejsze z aplikacyjnego punktu widzenia drobnoustroje zdolne do biodegradacji odpadowej keratyny oraz omówiono znaczenie tego procesu dla środowiska. Skupiono się w szczególności na wymienieniu i opisanu mikroorganizmów zaliczanych do keratynolitycznych bakterii, w tym promieniowców, ale także grzybów strzępkowych należących do dermatofitów geofilnych oraz grupy *Chrysosporium*, ponieważ są one zdolne do enzymatycznej dekompozycji trudnodegradowalnego białka jakim jest keratyna z wytworzeniem cennych z przemysłowego i rolniczego punktu widzenia bioproduktów i biokomponentów. W przedstawionej pracy w sposób zwięzły odniesiono się także do ogólnej charakterystyki mikrobiologicznych keratynaz oraz mechanizmu keratynolizy. Tematyka ta z punktu widzenia poznawczego i eksperymentalnego stanowiła przedmiot pozostałych badań realizowanych w ramach dysertacji doktorskiej, przedstawionych w poszczególnych publikacjach tj. [P.2.], [P.3.], [P.4.] i [P.5].

2. Publikacja 2 [P.2.]

- *Ocena różnorodności bioty grzybów zasiedlających resztki keratynowe (odpady pierza kurcząt) w glebach uprawnych, wykazujących różnice we właściwościach fizykochemicznych, tj. zawartość frakcji granulometrycznych, poziom substancji organicznej, azotu i kilku innych składników oraz pH na podstawie wskaźników oceny frekwencji występowania i różnorodności tych organizmów w środowisku wraz z ustaleniem ich powiązań z parametrami środowiska glebowego.* Przeprowadzone badania pozwoliły ponadto zgromadzić kolekcję szczepów *keratinomycetes*, którą wykorzystano jako materiał wyjściowy do selekcji szczepów przeznaczonych do dalszych badań nad aktywnością keratynolityczną tych grzybów oraz możliwością zastosowania do otrzymania biopreparatów nawożeniowych.

[P.2.] Bohacz, J., Możejko, M., Kornilowicz-Kowalska, T., Siebielec, G., 2022. Impact of ecological factors on the occurrence and spatial-taxonomic structure of keratinophilic fungi and their co-occurrence in arable soils. *Agriculture* 12, 194.

<https://doi.org/10.3390/agriculture12020194>

Gleba rozpatrywana jest jako rezerwuuar różnych mikroorganizmów, wśród których wyróżnia się potencjalnie chorobotwórcze dermatofity i inne pokrewne grzyby o uzdolnieniach keratynolitycznych (Ajello 1956). Pomimo powszechności występowania mikroorganizmów w środowisku glebowym niewiele jest prac, które traktują występowanie grzybów keratynofilnych (=keratynolitycznych) w glebach, jako naturalnych czynników bionawożeniowych. Takie podejście wynika z udziału tych grzybów w przemianach N-organicznego i S-organicznego w glebie oraz dostarczaniu łatwo przyswajalnych form tych pierwiastków dla mikrobiomu glebowego i korzeni roślin. Niewiele jest także prac dotyczących uwarunkowań ekologicznych występowania tych grzybów w glebach, zwłaszcza w kontekście typów gleb i ich frakcji granulometrycznych. W przedstawionej pracy badano zależności między różnorodnością grzybów zasiedlających natywną keratynę w postaci pierza kurcząt, wśród których wyróżniono grzyby keratyno- i nie-keratynofilne, a właściwościami fizykochemicznymi gleby.

Z badanych próbek czterech gleb, tj. gleby I typu Cambisol, umownie określonej jako gleba piaszczysta, gleby II typu Cambisol, umownie określanej jako gleba gliniasta, czarnoziem (gleba III typu Chernozem) oraz gleby IV, typu Leptosol opisywanej jako rędzina, wyizolowano łącznie 1000 izolatów grzybów, sklasyfikowanych jako keratynofilne i niekeratynofilne o gatunkowej przynależności i różnorodności uwarunkowanej typem gleby (Tabela 3).

Na podstawie cech fenotypowych wyodrębnione grzyby keratynofilne sklasyfikowano do 5 rodzajów oraz 7 gatunków. Wśród grzybów niekeratynofilnych zidentyfikowano 19 rodzajów i 19 gatunków (Tabela 2). Zbiorowiska obu grup grzybów w badanych glebach, należały do 7 rzędów Ascomycota: Capnodiales, Erysiphales, Eurotiales, Glomerellales, Hypocreales, Onygenales i Thelebolales oraz jednego (Mucorales) Zygomycota. Wśród wymienionych, rząd Onygenales reprezentował grzyby keratynofilne, a pozostałe rzędy grzyby niekeratynofilne (Rysunek 2 i 3, Tabela 5). W strukturze taksonomicznej do najbogatszych gatunkowo należał rząd Hypocreales. Biorąc pod uwagę strukturę taksonomiczną zbiorowisk grzybów glebowych zasiedlających odpady pierza za najbogatszą uznano czarnoziem (21 gatunków z 6 rzędów), a za najuboższą rędzinę (12 gatunków z 5 rzędów) (Rysunek 2). W odniesieniu do struktury przestrzennej, uwzględniającej liczbę notowań, do najbogatszych rzędów zaliczono Hypocreales w obrębie grzybów niekeratynofilnych i Onygenales w obrębie *keratinomycetes* (Rysunek 3). Najwyższą liczbę notowań (rzędy) grzybów keratyno- i niekeratynofilnych stwierdzono w glebie gliniastej i czarnoziemie. W największym stopniu dotyczyło to Hypocreales i Onygenales (Rysunek 3). Wyliczone dla badanych gleb

współczynniki Marczewskiego-Steinhaus'a wskazały na niskie podobieństwo gatunkowe grzybów (na ogół poniżej 50%). Najwięcej wspólnych gatunków zanotowano w glebie gliniastej i czarnoziemiu, a najmniej między glebą piaszczystą i rędziną (Tabela 4). Z wartości współczynnika Simpsona, określającego zróżnicowanie gatunkowe z uwzględnieniem frekwencji gatunków wynika, że największą w ujęciu łącznym (obie grupy grzybów) różnorodnością gatunkową charakteryzowały się gleba piaszczysta i czarnoziem, a najmniejszą rędzina. Uwzględniając grzyby keratynofilne, największą różnorodność gatunkową wykazano dla czarnoziemiu, a najmniejszą ponownie dla rędziny. W przypadku zbiorowisk grzybów niekeratynofilnych, cechujących się dużym zróżnicowaniem gatunkowym we wszystkich 4 glebach, nieznacznie większą różnorodnością gatunkową odznaczały się rędzina i czarnoziem niż gleba piaszczysta i gliniasta (Tabela 5).

Na podstawie wyliczonych współczynników dominacji gatunkowej wykazano, że w glebie piaszczystej, gliniastej i czarnoziemiu dominującym gatunkiem wśród keratynofilnych grzybów był *Trichophyton ajelloi* z grupy dermatofitów geofilnych, który stanowił odpowiednio 12%, 40% i 29% wszystkich izolatów grzybowych, co według przyjętej przez Kornilowicz-Kowalską i in. (2020) skali frekwencji grzybów oznaczało, że zaliczyć go można do występujących często i bardzo często (Rysunek 1 A-C). *Trichophyton ajelloi* nie występował w próbkach rędziny. W tej ostatniej glebie dominującym gatunkiem wśród grzybów keratynofilnych był *Ctenomyces serratus* z grupy Chrysosporium, określony na podstawie frekwencji jako gatunek liczny w tej glebie (Rysunek 1D).

W podsumowaniu ogólnej frekwencji, bogactwa oraz różnorodności gatunkowej grzybów keratynofilnych stwierdzono, że wskaźniki te były największe w czarnoziemiu. W dyskusji nad wyjaśnieniem tego zjawiska zasugerowano jako główną przyczynę „historię” powstania tych gleb, w których istotną rolę odgrywała fauna glebowa - źródło natywnej keratyny oraz warunki panujące w tych glebach, zwłaszcza odczyn sprzyjający procesowi keratynolizy. W tym kontekście powołano się na wcześniejsze informacje podane przez Kornilowicz-Kowalską i Bohacz (2002) wskazujące na tzw. animalizację czarnoziemów oraz na rezultaty prac Kornilowicz (1992, 1993), Kornilowicz-Kowalskiej i Bohacz (2002) oraz Bohacz i Kornilowicz-Kowalskiej (2012), w których wykazano, że słabo kwaśny oraz obojętny odczyn gleby sprzyja rozwojowi większości grzybów keratynofilnych. Przytoczone dane są zbieżne z rezultatami badań własnych, które wykazały dodatnią korelację między częstotliwością występowania *keratinomycetes* i pH gleby, wskazując na wzrost frekwencji tych grzybów wraz ze wzrostem pH (Tabela 6).

W badaniach realizowanych w publikacji 2 [P.2.] *novum* stanowiło, zbadanie wpływu poszczególnych frakcji granulometrycznych, tj. piasku, pyłu i łu na frekwencję *keratinomyces* w glebie. Uzyskane wyniki wskazały na skorelowanie frekwencji tych grzybów z poziomem tych frakcji wyrażające się wzrostem frekwencji wraz ze wzrostem zawartości frakcji pyłowej ($\emptyset = 0,05 - 0,002$ mm) i iłowej ($\emptyset < 0,002$ mm) i odwrotnie, spadkiem frekwencji wraz ze wzrostem frakcji piasku ($\emptyset = 2,0 - 0,05$ mm) (Tabela 6 i 7). Znalazło to odzwierciedlenie w parametrach wzrostu grzybów keratynofilnych, które były najniższe w glebie piaszczystej o najwyższej frakcji piasku i najniższej frakcji pyłu i łu oraz najwyższe w czarnoziemiu odznaczającym się najniższą zawartością piasku oraz najwyższą pyłu i łu (Tabela 1 i 2). Ponadto czarnoziem charakteryzował się także największym wskaźnikiem różnorodności gatunkowej *keratinomyces* mierzonym współczynnikiem Simpsona (0,5587) (Tabela 5). W dyskusji zwrócono uwagę, że kwestia ta została poruszona wcześniej w pracy Bohacz i Kornilowicz-Kowalskiej (2012), gdzie odnotowano, że ogólne bogactwo grzybów keratynofilnych w glebie jest dodatnio skorelowane z poziomem frakcji o $\emptyset < 0,02$ mm, w skład której wchodzi obie frakcje, tj. pyłowa i iłowa. W dalszej części dyskusji analizowano jaki to ma wpływ na wzrost i rozwój grzybów keratynofilnych. Wykorzystując informacje zawarte w innych publikacjach (de Jong i in. 1983; Owczarzak i in. 2015), wskazujące na istotny wpływ frakcji granulometrycznych na właściwości fizyko-chemiczne gleb, podkreślono znaczenie uziarnienia w utrzymaniu zasobności gleb w składniki pokarmowe oraz zatrzymywanie wody w glebie. Uznano, że w tych glebach, w których uziarnienie zwiększa te właściwości, czyli glebach o wyższym poziomie frakcji pyłowej i iłowej, a tym samym o większej pojemności sorpcyjnej oraz wodnej grzyby keratynofilne znajdują lepsze warunki do wzrostu i rozwoju.

Wyniki badań własnych przedstawione w omawianej publikacji 2 [P.2.] wykazały ponadto nierównomierne rozmieszczenie i selekcję populacji w obrębie zbiorowisk grzybów keratynofilnych. Efekt ten dotyczył populacji *Trichophyton ajelloi* i *Ctenomyces serratus*, gatunków keratynolitycznych typowych dla gleb klimatu umiarkowanego i chłodnego (Domsch i in. 2007). Wyrażało się to dominacją *Trichophyton ajelloi* w glebach piaszczystej, gliniastej i czarnoziemiu przy braku występowania w rędzinie i odwrotnie, zasiedleniu tej ostatniej gleby przez monokulturę *Ctenomyces serratus* przy niższym lub sporadycznym występowaniu tego gatunku odpowiednio w czarnoziemiu i glebie gliniastej oraz braku występowania w glebie piaszczystej (Tabela 3). W pracy wyjaśniono przyczynę tego zjawiska w czym pomocna była analiza korelacji między częstotliwością występowania tych gatunków, a właściwościami badanych gleb. W odniesieniu do populacji *Ctenomyces serratus* zwrócono przede wszystkim

uwagę na znaczenie pH gleby, zawartość węglanu wapnia oraz frakcji pyłu i iłu, co wyrażało się wzrostem częstości występowania tych grzybów wraz ze wzrostem odczynu gleby i zawartości wymienionych składników. Drugi z omawianych gatunków, najliczniej występujący w badanych glebach, czyli *Trichophyton ajelloi* to gatunek acidofilny i acidotolerancyjny (Garg i in. 1985; Hubálek 2000). Temu gatunkowi ze względu na jego wytypowanie do dalszych etapów badań poświęcono poniżej więcej uwagi. O preferencji przez *Trichophyton ajelloi* środowisk kwaśnych, pozbawionych CaCO₃ donosiły wcześniej Kornilowicz-Kowalska i Bohacz (2002). Badania przeprowadzone w niniejszej pracy wskazują na dominację tego gatunku począwszy od gleb silnie kwaśnych (gleba piaszczysta) do kwaśnych (gleba gliniasta i czarnoziem) oraz jego nieobecności w glebie o odczynie obojętnym (rędzina). Ponadto, mimo że korelacja między frekwencją *Trichophyton ajelloi*, a pH gleby, poziomem C organicznego, substancji organicznej i N całkowitego była nieistotna ($\alpha = 0,05$) to ujemne wartości współczynników korelacji dla tych cech wyraźnie wskazują na spadek występowania tego grzyba wraz ze wzrostem wartości wymienionych parametrów (Tabela 6). Podobną tendencję wykazano w odniesieniu do wzajemnych relacji między częstością występowania *Trichophyton ajelloi*, a poziomem kationów alkalicznych (magnezu i wapnia) oraz fosforu w glebie. W oparciu o uzyskane dane ogólnie stwierdzono, że występowaniu i rozwojowi populacji *Trichophyton ajelloi* sprzyjały gleby kwaśne o niskiej zasobności w substancję organiczną, frakcję iłu oraz makroelementy takie jak P, Ca, Mg i K.

W omawianej pracy dużo uwagi poświęcono także grzybom towarzyszącym *keratinomycetes* podczas kolonizacji pierza kurcząt w badanych glebach. Grzyby te umownie zwane nie-keratynofilnymi najliczniej były reprezentowane przez populacje 5 gatunków, co było zależne od typu gleby. W glebie piaszczystej dominującym gatunkiem był *Penicillium simplicissimum* (17% ogółu grzybów i 20 % w obrębie grzybów nie-keratynofilnych) (Rysunek 1A). W glebie gliniastej stwierdzono współdominację populacji: *Purpureocillium lilacinum*, *Metacordyceps chlamydosporia* oraz *Cunninghamella elegans* o udziale odpowiednio 17%, 15% i 15% grzybów ogółem oraz 28%, 26% i 25% w grupie grzybów nie-keratynofilnych (Rysunek 1B). Gatunkiem nie-keratynofilnym o najwyższej frekwencji w czarnoziemiu i rędzinie okazał się *Metacordyceps chlamydosporia*. Grzyb ten reprezentował w czarnoziemiu 18% wszystkich wyizolowanych grzybów i 38% w obrębie grzybów nie-keratynofilnych oraz odpowiednio 11% i 30% w rędzinie (Rysunek 1C i 1D).

3. Publikacja 3 [P.3.]

- *Ocena aktywności keratynolitycznej szczepów *Trichophyton ajelloi* - gatunku najliczniej występującego w badanych glebach uprawnych na podstawie aktywności enzymów uczestniczących w rozkładzie natywnej keratyny piór, organicznych i mineralnych produktów keratynolizy, zmian pH podłoża hodowlanego oraz ubytku masy piór.* Celem badań było także wyselekcjonowanie szczepów *Trichophyton ajelloi* o najwyższej aktywności keratynolitycznej jako producentów hydrolizatów keratynowych bogatych w mineralne związki azotu i siarki, łatwo przyswajalne przez rośliny i drobnoustroje. W toku badań ustalano także zależność pomiędzy aktywnością keratynolityczną oraz zdolnością do produkcji rozpuszczalnych pigmentów przez szczepy *Trichophyton ajelloi*.

[P.3.] Bohacz, J., Możejko, M. Biodegradation of feather keratin by pigmented and non-pigmented fungal strains of *Trichophyton ajelloi* from two soils with different physical and chemical properties.

Jak wynika z literatury przedmiotu, na świecie wśród dermatofitów geofilnych izolowanych z różnych środowisk *Trichophyton ajelloi* spotykany jest dość rzadko, zwłaszcza w glebach uprawnych. W latach 1992 - 2015 *Trichophyton ajelloi* i jego stadium doskonałe *Arthroderma uncinatum* izolowano przede wszystkim z siedlisk zwierząt, gleb parków oraz gleb uprawnych i to głównie w Polsce (Taghipour i in. 2021). Grzyb ten zaliczany jest do geofilnych dermatofitów o bardzo znikomej patogeniczności (Otčenášek and Dvořák 1975) i znany jest z uzdolnień do rozkładu natywnej keratyny piór z uwolnieniem dużych ilości jonów amonowych i siarczanowych (Korniłowicz-Kowalska 1997a, b).

Z przeprowadzonych w niniejszej pracy badań wynika, że aktywność keratynolityczna *Trichophyton ajelloi* mierzona ubytkiem masy piór po 42 dniach hodowli wynosiła maksymalnie 37% - 39% i była średnio istotnie wyższa ($\alpha = 0,05$) w hodowlach szczepów wyizolowanych z gleby gliniastej niż z czarnoziemem (Tabela 1). Dla wyjaśnienia odnotowanych różnic zwrócono uwagę na znacznie szybsze rozrastanie grzybni szczepów wyizolowanych z gleby gliniastej niż czarnoziemem (Tabela 2) oraz ich wyższą aktywność keratynazową, co mogło determinować szybszą kolonizację, a w efekcie rozkład natywnej keratyny piór. Również wyższe pH gleby gliniastej (pH = 5,4) - bliższe optimum keratynolizy (pH = 6,0) (Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011) niż pH czarnoziemem (pH = 5,0) mogło mieć wpływ

na zdominowanie populacji *keratinomycetes* w glebie gliniastej przez szczepy efektywniejsze pod względem mechanicznego rozbijania oraz enzymatycznej hydrolizy natywnej keratyny zawartej w piórach. O wpływie pH środowiska bytowania na efektywność utraty masy piór w hodowlach grzybów keratynolitycznych donosili wcześniej Bohacz (2017b) oraz Bohacz i in. (2020a). Cytowani autorzy wykazali, że różne gatunki grzybów z grupy *Chrysosporium*, wyizolowane ze środowisk o wyższym pH (Phaeozem, pH = 7,28) powodują szybszy rozkład masy piór niż wyizolowane ze środowisk o niższym pH (wypluwki niektórych ptaków drapieżnych, pH = 4,04).

W przypadku pozostałych wskaźników aktywności keratynolitycznej, czyli aktywności proteazy, poziomu uwalnianych organicznych i mineralnych form azotu i siarki oraz alkalizacji podłoża, wyższe wartości odnotowano dla szczepów wyizolowanych z czarnoziemów niż z gleby gliniastej (Tabela 3). Wyjaśnienie z kolei tych różnic na tle odwrotnej reakcji dotyczącej tempa utraty masy piór i aktywności keratynazy nasycało trudności. Jako prawdopodobną przyczynę przyjęto znaczny udział białek keratynowych w materii organicznej czarnoziemów spowodowany bytowaniem licznych populacji drobnych ssaków co jest podkreślane w literaturze gleboznawczej. Stały dopływ materii keratynowej jako substratu mógł więc zaowocować wydajniejszym procesem enzymatycznej proteolizy i mineralizacji białek przez grzyby keratynofilne. O roli fauny glebowej i związanych z tym różnic w odniesieniu do bogactwa mykobioty keratynolitycznej gleb takich jak czarnoziemy i gleby brunatne pisały wcześniej Kornilowicz-Kowalska i Bohacz (2002).

Rozpatrując udział enzymów w procesie keratynolizy udowodniono, że rozkład białek keratynowych możliwy jest dzięki działaniu kaskady enzymów, zapewniającej kompleksową biodegradację (Kornilowicz-Kowalska 1997a, b; Bohacz 2017b). W niniejszych badaniach wykazano, że aktywność proteazy kazeinianowej była wysoka przez pierwsze 7 dni, po czym spadała do końca pierwszego miesiąca badań w hodowlach grzybów wyizolowanych z czarnoziemów. W tym samym czasie w hodowlach grzybów wyizolowanych z gleby gliniastej utrzymywała się na zbliżonym poziomie. Później rosła w obu grupach badanych szczepów (Rysunek 1, Tabela S1). Uzyskane wyniki są zbieżne z wynikami Cavello i in. (2012), a także Galarza i in. (2012), którzy wykazali wysoką aktywność proteazy podczas biodegradacji keratyny pierza przez *Paecilomyces lilacinus*, a także w hodowlach *Trichophyton ajelloi* zawierających włosy jako jedyne źródło C, N, S i energii. Najwyższą średnią aktywnością proteazy w obrębie szczepów wyizolowanych z gleby gliniastej charakteryzował się szczep oznaczony nr XXI oraz III, a z czarnoziemów szczep oznaczony XXXI (Tabela 3).

Kolejnymi enzymami działającymi w kaskadzie enzymów, biorącymi udział w biodegradacji skeratynizowanych struktur są keratynazy. W hodowlach badanych szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleby gliniastej i z czarnoziemiu aktywność keratynazowa rosła przez cały czas trwania doświadczenia, tzn. przez 6 tygodni i była wyższa, jak wspomniano poprzednio, w hodowlach grzybów wyizolowanych z gleby gliniastej (Rysunek 2, Tabela 3, Tabela S2). Podobną dynamikę zmian aktywności keratynazy w hodowlach grzybów zawierających keratynę pierza jako jedyne źródło C, N, S i energii wykazali Anbu i in. (2008) oraz Maruthi i in. (2011) na przykładzie keratynolitycznych szczepów *Trichophyton* sp. HA-2 i *Chrysosporium tropicum*. Zdecydowanie wyższa (średnio o 22%), aktywność keratynazy w przypadku szczepów pochodzących z gleby gliniastej niż tych z czarnoziemiu przypuszczalnie była uwarunkowana odczynem tej gleby, sięgającym dolnego zakresu optimum pH dla aktywności tego enzymu, co podkreślono wcześniej. Szczególnie wysoką aktywnością keratynazy charakteryzował się szczep *Trichophyton ajelloi* nr III z gleby gliniastej oraz nr XXXIII z czarnoziemiu (Tabela 3).

W oparciu o wyniki analizy PCA dowiedziono, że aktywność keratynazy i proteazy w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* jest skorelowana z powstawaniem organicznych i mineralnych produktów keratynolizy (Rysunek 3). Wśród analizowanych produktów, uwalnianie rozpuszczalnych białek i peptydów w hodowlach obu grup szczepów systematycznie rosło (Rysunek 4, Tabela S3). Średnio było o 6% wyższe w hodowlach szczepów wyizolowanych z czarnoziemiu, w stosunku do hodowli szczepów wyizolowanych z gleby gliniastej. W obrębie badanych szczepów, szczepy oznaczone nr XXIX i III z gleby gliniastej oraz nr XXXIII i XXVII z czarnoziemiu, charakteryzowały się uwalnianiem największej ilości rozpuszczalnych białek i peptydów, podczas biodegradacji odpadowego pierza kurcząt (Tabela 3). Dynamika uwalniania rozpuszczalnych białek i peptydów oraz aminokwasów, mierzonych zawartością grup aminowych i tiolowych w trakcie biodegradacji keratyny pierza przez grzyby *Trichophyton ajelloi* osiągała maksimum pod koniec trwania doświadczenia (Rysunek 4-6, Tabela S3-S5). Podobny przebieg uwalniania rozpuszczalnych białek i peptydów wykazali Al-Musallam i in. (2013) podczas wzrostu *Coprinopsis* sp. w hodowlach zawierających zmielone pierze kurcząt oraz Bohacz (2017b), a także Bohacz i in. (2020 a, b) w hodowlach różnych gatunków grzybów keratynolitycznych, z pociętymi piórami kurcząt użytymi jako jedyne źródło C, N, S i energii. Podczas uwalniania połączeń tiolowych przez badane w niniejszej pracy szczepy *Trichophyton ajelloi* uwidoczniły się różnice w dynamice tego procesu w obrębie szczepów z gleby gliniastej. Po początkowym nasileniu uwalniania grup -SH w pierwszych dwóch tygodniach nastąpił ich spadek, a następnie ponowny

wzrost od 4 tygodnia. Uwalnianie grup tiolowych przez szczepy z czarnoziemiu było bardziej równomierne, zaznaczyło się w początkowym okresie hodowli i trwało do jej zakończenia (Rysunek 5, Tabela S4). Uwalnianie związków tiolowych (cysteina) we wczesnym rozkładzie piór kurcząt (brojlery) przez grzyby, z maksimum w 20 dniu, notowali także Godheja i Shekhar (2014). Jak wynika z badań własnych maksimum akumulacji połączeń tiolowych w obu grupach szczepów wystąpiło w ostatnich dwóch tygodniach hodowli (35 i 42 dzień) (Rysunek 5, Tabela S4). Ogólnie wydajniejsze w uwalnianiu grup tiolowych były szczepy *Trichophyton ajelloi* wyizolowane z gleby gliniastej. Średnie stężenie grup -SH w płynach pohodowlanych tych szczepów było o 28% wyższe od średniego stężenia tych grup w płynach pohodowlanych szczepów z czarnoziemiu. Szczepami o najwyższej aktywności uwalniania tioli, okazały się szczepy nr V z gleby gliniastej i nr XXXIII z czarnoziemiu (Tabela 3). Stężenie grup aminowych w hodowlach szczepów wyizolowanych z czarnoziemiu, było ogólnie wyższe o 14% w porównaniu z zawartością tych grup w hodowlach szczepów z gleby gliniastej (Rysunek 6, Tabela S5). Szczep oznaczony nr XII z gleby gliniastej oraz nr XXXIII wyizolowany z czarnoziemiu, charakteryzowały się uwalnianiem największej ilości grup aminowych podczas biodegradacji odpadowego pierza kurcząt (Tabela 3).

Jak podają Kornilowicz-Kowalska (1997a, b), Bohacz (2017b) oraz Możejko i Bohacz (2022) podczas grzybowej keratynolizy pierza uwalniane są mineralne formy azotu i siarki. Grzyby bowiem w procesie keratynolizy przekształcają grupy -SH cysteiny w mineralne formy siarki w postaci siarczanów i siarczynów (Kunert 2000), a grupy -NH₂ aminokwasów w procesie deaminacji do mineralnych form azotu w postaci jonów amonowych.

Stężenie jonów amonowych w płynach pohodowlanych szczepów *Trichophyton ajelloi*, wyizolowanych zarówno z gleby gliniastej jak i czarnoziemiu rosło do 21 dnia hodowli na piórach z maksimum pomiędzy 14, a 21 dniem hodowli, po czym spadało, a następnie od 35 dnia ponownie rosło (Rysunek 7, Tabela S6). Podobne rezultaty, wskazujące na nasilenie deaminacji białek keratynowych piór w pierwszym okresie biodegradacji tych odpadów przez grzyby keratynolityczne uzyskała Bohacz (2017b) oraz Bohacz i in. (2020b). Prowadząc hodowle stacjonarne *Aphanoascus fulvescens* oraz *Chrysosporium articulatum* cytowani autorzy odnotowali maksimum uwalniania amoniaku 28 dnia rozkładu piór (Bohacz 2017b), a w hodowlach *Arthroderma multifidum* i *Arthroderma tuberculatum* między 12, a 14 dniem tego procesu (Bohacz i in. 2020b). W badaniach własnych przez cały okres trwania doświadczenia notowano wyższe stężenie jonów amonowych w płynach pohodowlanych szczepów *Trichophyton ajelloi* pochodzących z gleby gliniastej (Rysunek 7, Tabela 3). Średnie stężenie jonów amonowych (NH₄⁺) w płynach pohodowlanych tych grzybów było wyższe o 9% od

średniej ich zawartości w płynach pochodzących z szczepów wyizolowanych z czarnoziemiu. Wśród badanych szczepów, szczep oznaczony nr XII, wyizolowany z gleby gliniastej oraz szczep oznaczony nr XXVII, wyodrębniony z czarnoziemiu, charakteryzowały się najsilniejszymi zdolnościami do mineralizacji organicznych związków azotu zawartych w piórach (Tabela 3).

O akumulacji siarczanów podczas biodegradacji pierza przez grzyby keratynofilne z rodzaju *Chrysosporium* oraz nietypowe keratynolityczne szczepy z gatunku *Talaromyces trachyspermus* i *Scopulariopsis brevicaulis* oraz *Geotrichum candidum* donosili wcześniej Rajak i in. (1991). O uwalnianiu siarczanów podczas biotransformacji S-organiczej natywnej keratyny przez grzyby keratynofilne z grupy *Chrysosporium* i dermatofitów geofilnych, a także grzybów nie-keratynofilnych donosiła także Kornilowicz-Kowalska (1997a, b) i Bohacz (2017b). Wytwarzanie siarczanów podczas bakteryjnego rozkładu piór notowali natomiast Łaba i in. (2013). Z badań własnych wynika, że proces transformacji S-keratyny w siarczany, w hodowlach grzybów keratynofilnych obserwowany na przykładzie szczepów *Trichophyton ajelloi* był zróżnicowany w zależności od pochodzenia szczepów. Wyrażało się to niższą o 6% (wartości średnie) zawartością siarczanów w hodowlach szczepów wyodrębnionych z gleby gliniastej niż z czarnoziemiu (Tabela 3). Dynamika wytwarzania siarczanów charakteryzowała się wzrostem stężenia w pierwszych 3 tygodniach, następnie ich spadkiem i ponownym wzrostem od 5 tygodnia biodegradacji natywnej keratyny piór przez badane szczepy (Rysunek 8, Tabela S7). Największe zdolności do produkcji siarczanów wykazywały szczepy *Trichophyton ajelloi* nr V i III z gleby gliniastej oraz nr XXXIV z czarnoziemiu (Tabela 3).

Jak podają Kornilowicz-Kowalska i Bohacz (2011) istotnym czynnikiem warunkującym sulfitolizę natywnej keratyny jest alkalizacja środowiska reakcji. Związane jest to procesami deaminacji aminokwasów i/lub aktywności zewnątrzkomórkowej proteazy, o czym pisali także Al-Musallam i in. (2013). Z badań własnych wynika, że silniejszą alkalizację podłoża powodowały szczepy wyizolowane z czarnoziemiu niż z gleby gliniastej (Tabela 3). Alkalizacja podłoża w hodowlach wszystkich badanych grzybów wyizolowanych z obu badanych gleb, rosła intensywnie przez pierwsze trzy tygodnie trwania doświadczenia z maksimum 21 dnia hodowli (Rysunek 9, Tabela S8).

Wykazane w niniejszej pracy istotne zróżnicowanie wskaźników rozkładu natywnej keratyny pierza odpadowego w zależności od źródła pochodzenia szczepów *Trichophyton ajelloi*, może wynikać z różnic we właściwościach fizjologicznych tych grzybów, co jest uwarunkowane genetycznie. Odnotowano bowiem, że szczepy wyizolowane z gleby gliniastej i czarnoziemiu różniły się pomiędzy sobą szybkością rozrastania grzybni, barwą kolonii i

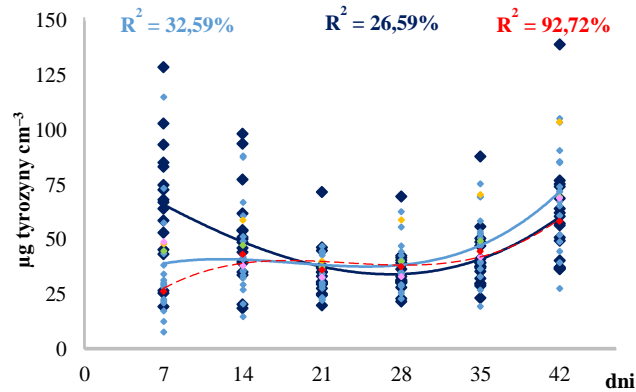
zdolnością wydzielania ciemnowiśniowego pigmentu (Tabela 2). W obrębie szczepów z gleby gliniastej, zdolność do wytwarzania pigmentu na pożywce Sabourauda po 7 i 14 dniach wzrostu wykazywało odpowiednio 10% i 60% tych szczepów, natomiast wśród szczepów z czarnoziemem, udział zdolnych do wydzielania pigmentu wynosił odpowiednio 6% i 29% (Tabela 2). O genetycznym zróżnicowaniu wewnątrzgatunkowym szczepów *Trichophyton ajelloi*, wyizolowanych z różnych gleb donosili Ciesielska i in. (2014). W niniejszej pracy w oparciu o wyniki analizy wariancji dowiedziono, że zróżnicowanie aktywności keratynolitycznej pomiędzy szczepami *Trichophyton ajelloi* uwarunkowane jest nie tylko środowiskiem występowania szczepów, jakimi są odmienne gleby, ale także istotnie zależy od takich właściwości fizjologicznych jak synteza rozpuszczalnych pigmentów (Tabela 4).

Ta dotychczas nieobserwowana przez innych autorów zależność, wyrażała się potwierdzonymi statystycznie różnicami we wskaźnikach aktywności keratynolitycznej, obejmujących aktywność keratynazy i proteazy, poziom rozpuszczalnych białek i peptydów, grup $-NH_2$ i $-SH$ oraz jonów: NH_4^+ i SO_4^{2-} , a także pH pomiędzy szczepami wytwarzającymi dyfundujący do podłoża ciemnowiśniowy pigment, a szczepami nie produkującymi tego barwnika, bez względu na środowisko glebowe, z którego zostały wyizolowane (Tabela 4). Statystyczne różnice w odniesieniu do tych dwóch grup szczepów umownie nazwanych jako pigmentujące i niepigmentujące, analizowane w oparciu o parametry aktywności keratynolitycznej były bardziej widoczne w obrębie szczepów pochodzących z gleby gliniastej niż czarnoziemem. Dotyczyły bowiem większej liczby wskaźników aktywności keratynolitycznej na korzyść szczepów pigmentujących (Tabela 4). Wśród nich na podkreślenie zasługują różnice w poziomie uwalniania jonów amonowych pomiędzy szczepami pigmentującymi i niepigmentującymi. Zastosowana w pracy analiza wariancji wykazała, że było ono istotnie wyższe w grupie szczepów pigmentujących, co z uwagi na znaczenie tych jonów, jako ważnego czynnika nawozowego zwiększa realne możliwości wykorzystania tych szczepów. Dla wyjaśnienia przyczyn opisywanego efektu, jako jedną z możliwości, przyjęto odmienne stadia rozwojowe szczepów pigmentujących i niepigmentujących (Tabela 4). Sugestię tą oparto na doniesieniach Dawson i Gentles (1959), którzy zdolność do produkcji ciemnowiśniowego pigmentu przypisywali stadium doskonałemu (teleomorfa) *Trichophyton ajelloi*. Pozwala to przypuszczać, że większa aktywność szczepów pigmentujących, zwłaszcza w odniesieniu do mineralizacji N-organicznej natywnej keratyny piór (użytej jako jedyne źródło C, N, S i energii) i uwalniania N-amonowego mogła mieć związek z większym zapotrzebowaniem tych szczepów na C organiczny w porównaniu ze szczepami niepigmentującymi jako stadiami niedoskonałymi (anamorfa). Potwierdzałyby to także szybciej

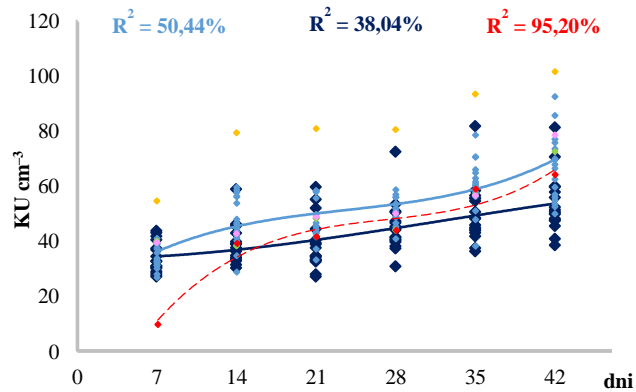
rozrastająca się na piórach grzybnia, zwłaszcza szczepów pigmentujących z gleby gliniastej. Poczynione spostrzeżenia dodatkowo zdecydowały o wytypowaniu tych szczepów do dalszych badań. Do najaktywniejszych wśród nich należały szczepy nr III, XII i XIV/XV. Odznaczały się one silniejszymi od pozostałych szczepów wyizolowanych z gleby gliniastej oraz z czarnoziemem uzdolnieniami do wytwarzania jonów amonowych oraz dużą efektywnością produkcji siarczanów, co było ważną przesłanką, do dalszych badań nad oceną tych szczepów jako czynników bionawożeniowych (Tabela 3).

W pierwszej kolejności wytypowane szczepy zostały poddane badaniom w zakresie optymalizacji warunków hodowli, służącej pozyskiwaniu hydrolizatów keratynowych (biopreparatów) o wysokiej zawartości mineralnych form azotu i siarki, a w dalszej kolejności do badań nad wpływem tych preparatów na rośliny oraz aktywność biologiczną gleb.

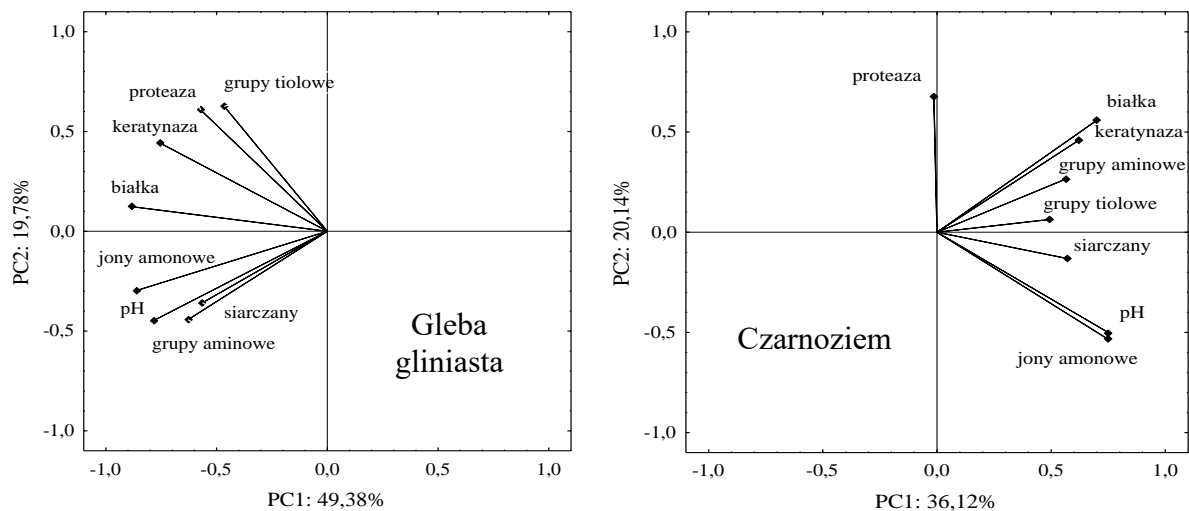
Rysunki i tabele cytowane w opisie dotyczącym publikacji 3 [P.3.]



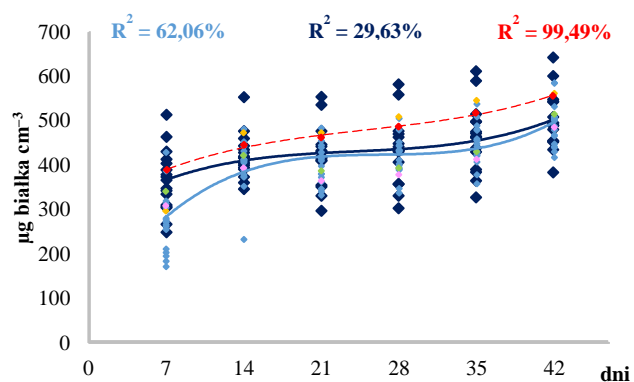
Rysunek 1. Dynamika zmian aktywności proteazy podczas biodegradacji piór przez szczepy *Trichophyton ajelloi*.
 Objaśnienia: Znaczniki oznaczają szczepy *Trichophyton ajelloi* pochodzące z gleby gliniastej (♦), czarnoziemiu (◆) i szczep referencyjny (◇), a także szczepy wybrane do optymalizacji, tj. III (◆), XII (◆) i XIV (◆). Analogiczne kolory wykorzystano wobec linii trendu oraz współczynników determinacji (R^2).



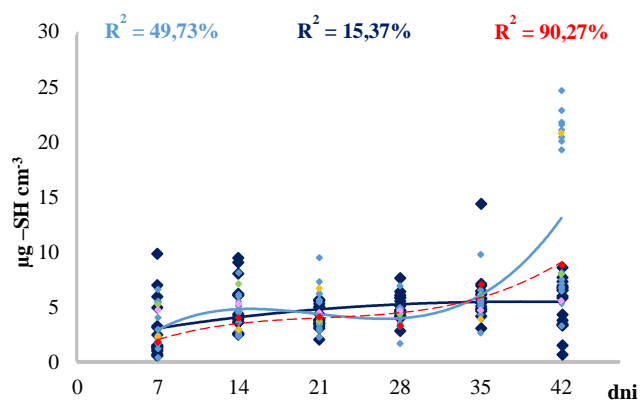
Rysunek 2. Dynamika zmian aktywności keratynazy podczas biodegradacji piór przez szczepy *Trichophyton ajelloi*. Objaśnienia: jak na Rysunku 1.



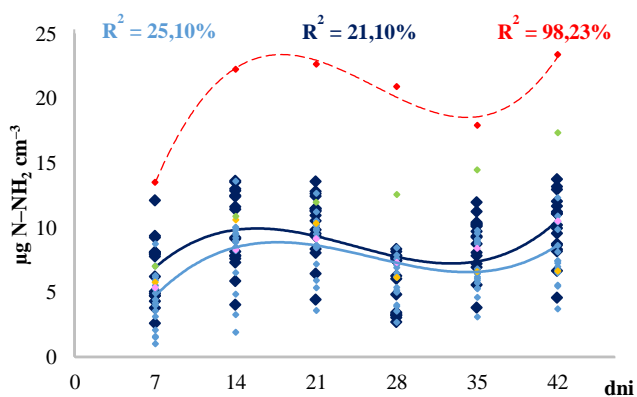
Rysunek 3. Analiza składowych głównych (PCA) wskaźników aktywności keratynolitycznej szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleby gliniastej i czarnoziemiu.



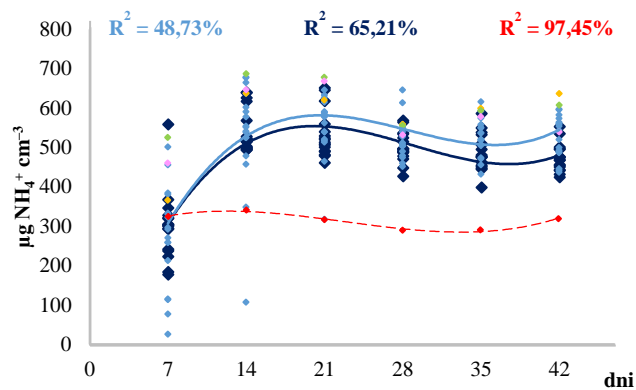
Rysunek 4. Dynamika zmian stężenia rozpuszczalnych białek i peptydów podczas biodegradacji piór przez szczep *Trichophyton ajelloi*. Objasnienia: jak na Rysunku 1.



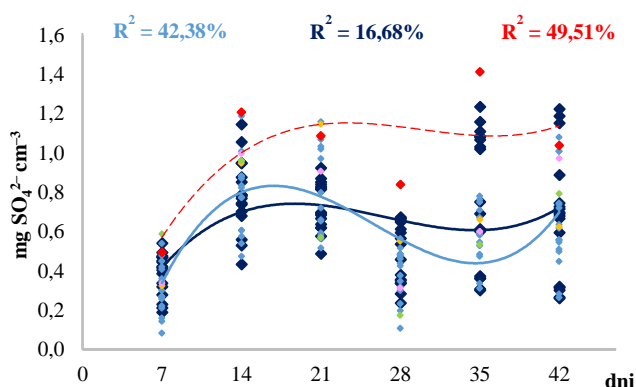
Rysunek 5. Dynamika zmian stężenia grup tiolowych podczas biodegradacji piór przez szczep *Trichophyton ajelloi*. Objasnienia: jak na Rysunku 1.



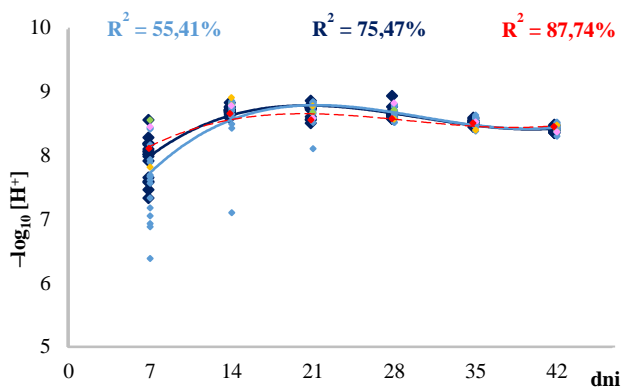
Rysunek 6. Dynamika zmian stężenia grup aminowych podczas biodegradacji piór przez szczep *Trichophyton ajelloi*. Objasnienia: jak na Rysunku 1.



Rysunek 7. Dynamika zmian stężenia jonów amonowych podczas biodegradacji piór przez szczepy *Trichophyton ajelloi*. Objaśnienia: jak na Rys. 1.



Rysunek 8. Dynamika zmian stężenia siarczanów podczas biodegradacji piór przez szczepy *Trichophyton ajelloi*. Objaśnienia: jak na Rysunku 1.



Rysunek 9. Dynamika zmian pH płynów pochodowlanych podczas biodegradacji piór przez szczepy *Trichophyton ajelloi*. Objaśnienia: jak na Rysunku 1.

Tabela 1. Stopień rozkładu masy pierza (%) po 42 dniach przez szczepy *Trichophyton ajelloi* wyizolowane z gleb uprawnych.

Gleba	Szczep <i>Trichophyton ajelloi</i>	Ubytek masy pierza (%)
Gleba gliniasta ^B (Cambisol)	I	34,60 ± 2,05 ^{defg}
	II	31,70 ± 4,09 ^{bcdefg}
	III	37,33 ± 4,64 ^{fg}
	IV	30,93 ± 1,25 ^{bcdef}
	V	32,90 ± 0,16 ^{cdefg}
	VI	22,80 ± 0,54 ^a
	VII	32,03 ± 2,51 ^{bcdefg}
	VIII	26,87 ± 1,48 ^{abc}
	IX	35,33 ± 2,11 ^{defg}
	X	29,90 ± 0,51 ^{abcdef}
	XI	33,40 ± 0,57 ^{cdefg}
	XII	36,90 ± 0,62 ^{efg}
	XIII	25,23 ± 0,60 ^{ab}
	XIV	36,57 ± 1,37 ^{efg}
	XV	35,77 ± 2,68 ^{defg}
	XVI	29,97 ± 3,29 ^{abcdef}
	XXI	28,90 ± 0,22 ^{abcd}
	XXII	29,47 ± 1,48 ^{abcde}
	XXVIII	24,67 ± 0,90 ^{ab}
	XXIX	32,27 ± 0,69 ^{bcdefg}
Średnia Gleba gliniasta		31,38 ± 4,58
Czarnoziem ^A	XVII	29,57 ± 1,16 ^{AB}
	XVIII	31,27 ± 1,00 ^{AB}
	XIX	27,73 ± 1,07 ^{AB}
	XX	32,33 ± 2,60 ^B
	XXIII	29,30 ± 1,04 ^{AB}
	XXIV	29,20 ± 0,79 ^{AB}
	XXV	26,77 ± 2,47 ^{AB}
	XXVI	28,37 ± 2,46 ^{AB}
	XXVII	38,93 ± 0,94 ^C
	XXX	28,30 ± 1,28 ^{AB}
	XXXI	29,73 ± 1,52 ^{AB}
	XXXII	27,07 ± 0,19 ^{AB}
	XXXIII	29,47 ± 0,58 ^{AB}
	XXXIV	25,83 ± 0,59 ^A
	XXXV	29,73 ± 0,90 ^{AB}
	XXXVI	29,90 ± 1,24 ^{AB}
	XXXVII	29,70 ± 2,45 ^{AB}
Średnia Czarnoziem		29,60 ± 3,17
Szczep referencyjny ^C	REF	38,60 ± 1,50 ^{gC}
Średnia Obie gleby		30,56 ± 4,09

Objaśnienia: Litery małe (a, b, c, itd.) lub duże (A, B, C) oznaczają średnie, które tworzą jednorodną grupę (test post-hoc HSD-Tukey'a dla wieloczynnikowej ANOVA) w obrębie każdej z badanych gleb oddzielnie. Małe i duże litery dla szczepu referencyjnego odnoszą się odpowiednio do szczepów wyizolowanych z gleby gliniastej (Cambisol) i czarnoziem. Duże litery dla gleb odnoszą się do wszystkich szczepów *Trichophyton ajelloi* pochodzących z tych gleb. Gdy dwóm porównywanym średniom przypisano tę samą literę (np. a lub A), tzn. że średnie te nie różnią się między sobą istotnie (przy $\alpha = 0,05$); jeśli średnie były oznaczone różnymi literami (np. a i b, lub A i B), tzn. że różniły się istotnie (przy $\alpha = 0,05$).

Tabela 2. Wybrane parametry cech morfologicznych kolonii *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych (gleby gliniastej i czarnoziem).

Gleba	Numer szczeputu	Średnica kolonii [mm]	Awers	Rewers	
7 dni					
Gliniasta (Cambisol)	I	26,00 ± 1,00	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	II	22,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	III	24,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	IV	23,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	V	24,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	VI	14,25 ± 0,25	Kremowy	Brak pigmentu	
	VII	19,25 ± 0,25	Kremowy	Brak pigmentu	
	VIII	21,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	IX	23,50 ± 0,50	Brązowy	Brak pigmentu	
	X	25,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XI	23,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XII	21,25 ± 0,25	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XIII	24,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XIV	25,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XV	26,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XVI	16,25 ± 0,25	Kremowy	Brak pigmentu	
	XXI	14,50 ± 0,50	Kremowy	Brak pigmentu	
	XXII	27,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXVIII	9,50 ± 0,50	Kremowy	Brak pigmentu	
XXIX	19,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu		
Średnia Gleba gliniasta		21,58 ± 0,38			
Czarnoziem	XVII	22,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XVIII	17,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XIX	24,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XX	23,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXIII	27,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXIV	21,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXV	21,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXVI	20,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXVII	25,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XXX	11,25 ± 0,25	Kremowy	Brak pigmentu	
	XXXI	10,50 ± 0,50	Kremowy	Brak pigmentu	
	XXXII	10,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXXIII	9,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXXIV	15,50 ± 0,50	Kremowy	Brak pigmentu	
	XXXV	13,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXXVI	11,50 ± 0,50	Kremowy	Brak pigmentu	
	XXXVIII	14,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	Średnia Czarnoziem		17,69 ± 0,46		
	Referencyjny	REF	23,50 ± 0,50	Kremowy	Brak pigmentu

cd. Tabeli 2.

Gleba	Numer szczepu	Średnica kolonii [mm]	Awers	Rewers	
14 dni					
Gliniasta (Cambisol)	I	52,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	II	47,00 ± 1,00	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	III	45,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	IV	51,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	V	47,50 ± 0,50	Brązowy	Brak pigmentu	
	VI	30,50 ± 0,50	Kremowy	Brak pigmentu	
	VII	45,50 ± 4,50	Kremowy	Brak pigmentu	
	VIII	46,00 ± 1,00	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	IX	49,25 ± 0,25	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	X	55,00 ± 2,00	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XI	47,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XII	41,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XIII	48,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XIV	52,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XV	54,00 ± 1,00	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XVI	35,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXI	27,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXII	58,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XXVIII	21,00 ± 1,00	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXIX	49,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
Średnia Gleba gliniasta		45,30 ± 0,85			
Czarnoziem	XVII	46,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XVIII	33,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XIX	51,50 ± 0,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	XX	47,00 ± 1,00	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXIII	48,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Ciemnowiśniowy	
	XXIV	45,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXV	46,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXVI	42,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXVII	53,00 ± 1,00	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Ciemnowiśniowy	
	XXX	35,00 ± 1,00	Kremowy	Brak pigmentu	
	XXXI	27,00 ± 2,00	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXXII	35,00 ± 1,00	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXXIII	32,25 ± 0,25	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXXIV	36,00 ± 1,00	Kremowy	Brak pigmentu	
	XXXV	38,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXXVI	35,50 ± 0,50	Kremowy (brzegi) Brązowy (środek)	Brak pigmentu	
	XXXVIII	42,50 ± 1,50	Brązowy	Ciemnowiśniowy	
	Średnia Czarnoziem		40,93 ± 0,75		
	Referencyjny	REF	51,00 ± 2,00	Kremowy	Brak pigmentu

Tabela 3. Wskaźniki keratynolizy pierza odpadowego (średnie ± odchylenia standardowe) w płynach hodowlanych *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleby gliniastej i czarnoziem.

Numer szczepu	Proteaza [μg tyrozyny cm ⁻³]	Keratynaza [KU cm ⁻³]	Rozpuszczalne białka i peptydy [μg białka cm ⁻³]	Grupy aminowe [μg N-NH ₂ cm ⁻³]
I	57,97 ± 1,63 ^h	60,33 ± 1,76 ⁿ	445,85 ± 7,70 ^g	7,93 ± 0,33 ^{gh}
II	34,29 ± 1,35 ^{bc}	55,60 ± 1,97 ^{kl}	409,91 ± 5,91 ^{ef}	7,03 ± 0,27 ^{ef}
III	63,42 ± 2,77 ⁱ	81,94 ± 1,79 ^o	476,81 ± 10,12 ^h	7,69 ± 0,27 ^g
IV	56,93 ± 3,22 ^h	52,87 ± 2,08 ^{hijk}	392,52 ± 5,70 ^{de}	6,84 ± 0,36 ^{de}
V	59,60 ± 2,49 ^{hi}	56,42 ± 1,66 ^{lm}	409,46 ± 11,90 ^{ef}	7,50 ± 0,15 ^{fg}
VI	50,01 ± 2,29 ^g	49,74 ± 2,63 ^{fgh}	336,41 ± 9,89 ^a	4,35 ± 0,16 ^b
VII	55,76 ± 2,17 ^h	53,76 ± 2,05 ^{jkl}	379,24 ± 10,05 ^{cd}	6,17 ± 0,20 ^c
VIII	32,62 ± 1,65 ^b	46,32 ± 1,52 ^{cde}	361,56 ± 10,98 ^{bc}	6,52 ± 0,22 ^{cd}
IX	39,26 ± 2,31 ^d	53,91 ± 1,90 ^{jkl}	406,80 ± 15,74 ^{ef}	7,10 ± 0,25 ^{ef}
X	56,32 ± 1,99 ^h	47,67 ± 2,22 ^{def}	358,77 ± 5,72 ^b	6,18 ± 0,27 ^c
XI	37,65 ± 1,97 ^{cd}	51,23 ± 1,87 ^{ghij}	405,16 ± 9,64 ^{ef}	8,71 ± 0,24 ^{jk}
XII	48,16 ± 2,27 ^{fg}	50,19 ± 1,84 ^{fghi}	414,88 ± 15,43 ^f	12,38 ± 0,24 ^m
XIII	31,11 ± 2,14 ^b	39,33 ± 2,04 ^a	356,39 ± 9,52 ^b	4,62 ± 0,22 ^b
XIV	44,05 ± 2,31 ^e	52,92 ± 1,68 ^{hijk}	390,79 ± 5,72 ^{de}	8,18 ± 0,26 ^{hi}
XV	44,27 ± 1,61 ^{ef}	53,14 ± 1,82 ^{ijkl}	405,42 ± 7,73 ^{ef}	9,04 ± 0,40 ^k
XVI	48,93 ± 2,28 ^g	59,71 ± 2,80 ^{mn}	451,01 ± 15,67 ^g	3,11 ± 0,21 ^a
XXI	62,51 ± 1,93 ⁱ	48,86 ± 2,65 ^{efg}	449,82 ± 12,23 ^g	8,52 ± 0,32 ^{ij}
XXII	22,62 ± 1,55 ^a	43,95 ± 2,59 ^{bc}	417,58 ± 8,10 ^f	7,67 ± 0,33 ^g
XXVIII	38,92 ± 2,44 ^d	44,84 ± 2,56 ^{bcd}	399,52 ± 19,02 ^{ef}	7,87 ± 0,26 ^{gh}
XXIX	38,65 ± 3,87 ^d	47,80 ± 2,85 ^{def}	497,50 ± 12,45 ⁱ	10,92 ± 0,39 ^l
Średnia Gleba gliniasta	46,15 ± 2,21	52,53 ± 2,11	408,27 ± 10,46	7,42 ± 0,27
XVII	52,26 ± 2,50 ^{FG}	46,57 ± 2,20 ^{GH}	378,60 ± 8,27 ^C	5,45 ± 0,08 ^B
XVIII	44,18 ± 2,28 ^{CD}	36,58 ± 2,15 ^{AB}	327,20 ± 11,51 ^A	7,06 ± 0,16 ^{CD}
XIX	37,45 ± 1,92 ^B	41,42 ± 1,63 ^{DEF}	352,86 ± 10,75 ^B	3,74 ± 0,20 ^A
XX	49,90 ± 1,85 ^{EF}	51,28 ± 2,95 ^I	382,93 ± 11,12 ^{CD}	6,79 ± 0,29 ^C
XXIII	27,48 ± 1,76 ^A	39,29 ± 2,08 ^{ABCDE}	418,57 ± 13,63 ^{EF}	7,75 ± 0,32 ^E
XXIV	46,73 ± 1,85 ^{DE}	43,59 ± 3,01 ^{FG}	454,42 ± 5,66 ^{IJK}	7,48 ± 0,44 ^{DE}
XXV	42,68 ± 2,51 ^{CD}	41,64 ± 2,50 ^{EF}	402,18 ± 6,97 ^{DE}	6,69 ± 0,18 ^C
XXVI	37,08 ± 2,89 ^B	39,33 ± 2,62 ^{BCDE}	412,54 ± 13,49 ^{EF}	7,66 ± 0,20 ^E
XXVII	54,60 ± 2,50 ^G	48,30 ± 1,86 ^{HI}	546,43 ± 8,76 ^L	9,58 ± 0,21 ^F
XXX	52,24 ± 3,35 ^{FG}	43,06 ± 1,65 ^F	429,42 ± 19,26 ^{FGH}	9,85 ± 0,32 ^{FG}
XXXI	89,29 ± 4,02 ^H	41,81 ± 1,96 ^{EF}	469,17 ± 16,52 ^{JK}	9,89 ± 0,37 ^{FG}
XXXII	40,45 ± 3,61 ^{BC}	40,19 ± 2,15 ^{CDEF}	441,06 ± 9,38 ^{GHI}	9,94 ± 0,42 ^{FG}
XXXIII	53,57 ± 3,06 ^{FG}	66,08 ± 1,92 ^J	568,28 ± 16,78 ^L	11,51 ± 0,32 ^I
XXXIV	49,96 ± 2,87 ^{EF}	41,04 ± 1,80 ^{CDEF}	452,39 ± 13,64 ^{IJK}	10,09 ± 0,34 ^{FGH}
XXXV	51,74 ± 2,71 ^{FG}	38,16 ± 2,28 ^{ABCD}	459,03 ± 14,54 ^{IJK}	10,29 ± 0,43 ^{GH}
XXXVI	52,14 ± 2,32 ^{FG}	35,88 ± 2,70 ^A	450,34 ± 18,20 ^{HIJ}	10,57 ± 0,35 ^H
XXXVII	25,31 ± 1,92 ^A	37,66 ± 1,83 ^{ABC}	420,18 ± 15,76 ^{EFG}	10,01 ± 0,62 ^{FGH}
Średnia Czarnoziem	47,47 ± 2,58	43,05 ± 2,19	433,27 ± 12,60	8,49 ± 0,31
Referencyjny	40,78 ± 4,26 ^{deBC}	42,71 ± 2,35 ^{bEF}	473,76 ± 25,59 ^{hK}	20,05 ± 0,67 ^{Nj}

c.d. Tabeli 3.

Numer szczepu	Grupy tiolowe [$\mu\text{g -SH cm}^{-3}$]	Jony amonowe [$\mu\text{g NH}_4^+ \text{cm}^{-3}$]	Siarczany [$\text{mg SO}_4^{2-} \text{cm}^{-3}$]	pH [- $\log_{10}[\text{H}^+]$]
I	6,38 ± 0,74 ^{ghij}	540,46 ± 11,52 ⁱ	0,63 ± 0,02 ^{de}	8,47 ± 0,04 ^{def}
II	7,06 ± 0,61 ^{jk}	500,43 ± 24,50 ^{gh}	0,54 ± 0,04 ^b	8,37 ± 0,06 ^{bc}
III	6,91 ± 0,36 ^{ijk}	569,55 ± 11,69 ^j	0,71 ± 0,02 ^g	8,49 ± 0,06 ^{defgh}
IV	7,21 ± 0,35 ^{jk}	508,78 ± 8,77 ^h	0,59 ± 0,02 ^c	8,41 ± 0,06 ^{cd}
V	7,35 ± 0,44 ^k	533,23 ± 11,07 ⁱ	0,72 ± 0,03 ^g	8,51 ± 0,03 ^{efghi}
VI	5,50 ± 0,40 ^{cdef}	333,74 ± 10,65 ^b	0,65 ± 0,02 ^{ef}	7,86 ± 0,05 ^a
VII	6,99 ± 0,29 ^{jk}	462,50 ± 7,10 ^d	0,65 ± 0,01 ^{ef}	8,30 ± 0,03 ^b
VIII	6,46 ± 0,34 ^{ghij}	482,47 ± 7,14 ^{ef}	0,60 ± 0,02 ^{cd}	8,43 ± 0,03 ^{cde}
IX	6,70 ± 0,81 ^{hijk}	547,06 ± 9,38 ⁱ	0,65 ± 0,04 ^{ef}	8,41 ± 0,03 ^{cd}
X	5,38 ± 0,58 ^{bcdef}	509,44 ± 8,28 ^h	0,61 ± 0,03 ^{cde}	8,48 ± 0,07 ^{defg}
XI	5,88 ± 0,51 ^{efgh}	584,81 ± 9,97 ^j	0,59 ± 0,02 ^{cd}	8,62 ± 0,04 ^k
XII	5,78 ± 0,48 ^{defg}	607,79 ± 9,05 ^k	0,60 ± 0,03 ^{cde}	8,60 ± 0,03 ^{jk}
XIII	4,36 ± 0,34 ^a	472,58 ± 5,43 ^{de}	0,63 ± 0,03 ^{cde}	8,41 ± 0,07 ^{cd}
XIV	4,95 ± 0,58 ^{abcd}	570,67 ± 8,73 ^j	0,69 ± 0,04 ^{fg}	8,58 ± 0,04 ^{ijk}
XV	5,64 ± 0,060 ^{cdefg}	582,87 ± 11,93 ^j	0,69 ± 0,04 ^g	8,57 ± 0,06 ^{hijk}
XVI	4,58 ± 0,57 ^{ab}	464,89 ± 7,00 ^d	0,61 ± 0,03 ^{cde}	8,30 ± 0,09 ^b
XXI	5,29 ± 0,41 ^{bcde}	461,92 ± 12,25 ^d	0,39 ± 0,02 ^a	8,53 ± 0,06 ^{fghijk}
XXII	5,67 ± 0,45 ^{cdefg}	462,85 ± 8,80 ^d	0,43 ± 0,02 ^a	8,56 ± 0,06 ^{ghijk}
XXVIII	6,16 ± 0,49 ^{fghi}	370,55 ± 10,03 ^c	0,50 ± 0,03 ^b	8,31 ± 0,03 ^b
XXIX	4,19 ± 0,66 ^a	490,39 ± 9,93 ^{fg}	0,60 ± 0,03 ^{cd}	8,60 ± 0,03 ^{jk}
Średnia Gleba gliniasta	5,92 ± 0,50	502,85 ± 10,16	0,60 ± 0,03	8,44 ± 0,05
XVII	5,22 ± 0,59 ^F	518,21 ± 5,82 ^{IJ}	0,62 ± 0,03 ^C	8,48 ± 0,03 ^{BCD}
XVIII	6,31 ± 0,38 ^G	527,01 ± 7,42 ^J	0,74 ± 0,04 ^{FG}	8,56 ± 0,03 ^{DE}
XIX	5,11 ± 0,43 ^{EF}	465,55 ± 11,48 ^H	0,68 ± 0,02 ^{DE}	8,35 ± 0,04 ^A
XX	4,96 ± 0,55 ^{EF}	512,56 ± 5,96 ^I	0,76 ± 0,03 ^{GH}	8,44 ± 0,09 ^{BC}
XXIII	4,40 ± 0,59 ^{DE}	451,41 ± 7,13 ^{EFG}	0,39 ± 0,02 ^A	8,59 ± 0,04 ^{EF}
XXIV	4,39 ± 0,52 ^{DE}	438,97 ± 6,18 ^{DE}	0,46 ± 0,02 ^B	8,45 ± 0,06 ^{BC}
XXV	6,48 ± 0,59 ^G	424,83 ± 7,56 ^{BC}	0,48 ± 0,02 ^B	8,43 ± 0,06 ^{AB}
XXVI	5,03 ± 0,73 ^{EF}	435,58 ± 9,07 ^{CD}	0,49 ± 0,03 ^B	8,52 ± 0,03 ^{CDE}
XXVII	5,37 ± 0,50 ^F	529,14 ± 7,46 ^J	0,42 ± 0,02 ^A	8,65 ± 0,03 ^F
XXX	5,05 ± 0,53 ^{EF}	452,49 ± 7,09 ^{FG}	0,73 ± 0,03 ^{FG}	8,55 ± 0,02 ^{DE}
XXXI	3,78 ± 0,46 ^{CD}	442,45 ± 11,71 ^{DEF}	0,66 ± 0,03 ^{CD}	8,45 ± 0,05 ^{BC}
XXXII	3,36 ± 0,45 ^{BC}	441,95 ± 10,32 ^{DEF}	0,75 ± 0,03 ^{GH}	8,52 ± 0,02 ^{CDE}
XXXIII	6,94 ± 0,67 ^G	456,94 ± 6,54 ^{GH}	0,70 ± 0,03 ^{EF}	8,52 ± 0,14 ^{CDE}
XXXIV	3,83 ± 0,45 ^{CD}	414,17 ± 10,11 ^B	0,83 ± 0,03 ^I	8,51 ± 0,02 ^{BCDE}
XXXV	3,60 ± 0,25 ^{BC}	448,98 ± 7,31 ^{EFG}	0,73 ± 0,03 ^{FG}	8,52 ± 0,03 ^{CDE}
XXXVI	2,86 ± 0,35 ^{AB}	425,61 ± 6,37 ^{BC}	0,79 ± 0,04 ^{HI}	8,51 ± 0,02 ^{BCD}
XXXVII	2,17 ± 0,38 ^A	444,42 ± 9,11 ^{DEFG}	0,64 ± 0,02 ^{CD}	8,55 ± 0,04 ^{DE}
Średnia Czarnoziem	4,64 ± 0,50	460,60 ± 8,04	0,64 ± 0,03	8,51 ± 0,05
Referencyjny	4,92 ± 0,33 ^{abcEF}	311,64 ± 8,76 ^{aA}	1,01 ± 0,04 ^{hJ}	8,52 ± 0,02 ^{efghijCDE}

Objaśnienia: jak w Tabeli 1.

Tabela 4. Różnice w aktywności keratynolitycznej szczepów pigmentujących i niepigmentujących *Trichophyton ajelloi*.

Wskaźnik keratynolizy	Gleba gliniasta (Cambisol)		Czarnoziem	
	Szczepy pigmentujące	Szczepy niepigmentujące	Szczepy pigmentujące	Szczepy niepigmentujące
Proteaza [μg tyrozyny cm ⁻³]	41,17 ^{aB}	53,62 ^{bD}	37,80 ^{aA}	51,50 ^{bC}
Keratynaza [KU cm ⁻³]	53,06 ^{bD}	51,73 ^{aC}	40,65 ^{aA}	44,05 ^{bB}
Rozpuszczalne białka i peptydy [μg białka cm ⁻³]	415,72 ^{bA}	397,09 ^{aB}	413,05 ^{aA}	441,70 ^{bC}
Grupy aminowe [μg N-NH ₂ cm ⁻³]	8,15 ^{bC}	6,32 ^{aA}	7,63 ^{aB}	8,85 ^{bD}
Grupy tiolowe [μg -SH cm ⁻³]	5,83 ^{aB}	6,06 ^{bC}	4,67 ^{aA}	4,62 ^{aA}
Jony amonowe [μg NH ₄ ⁺ cm ⁻³]	534,33 ^{bD}	455,63 ^{aB}	483,51 ^{bC}	451,06 ^{aA}
Siarczany [mg SO ₄ ²⁻ cm ⁻³]	0,61 ^{bC}	0,59 ^{aB}	0,57 ^{aA}	0,67 ^{bD}
pH [-log ₁₀ [H ⁺]]	8,51 ^{bC}	8,34 ^{aA}	8,54 ^{bD}	8,49 ^{aB}

Objaśnienia: Litery, tj. małe (a, b) lub duże (A, B, C, D) oznaczają średnie, które tworzą jednorodną grupę (test post-hoc HSD-Tukey'a dla wieloczynnikowej ANOVA) odpowiednio, w obrębie każdej z badanych gleb oddzielnie oraz w obrębie obu gleb łącznie. Gdy dwóm porównywanym średnim przypisano tę samą literę (np. a, lub A), średnie te nie różnią się istotnie (przy $\alpha = 0,05$); jeśli średnie oznaczono różnymi literami (np. a i b, lub A i B), różnią się one istotnie od siebie (przy $\alpha = 0,05$).

Aneks - materiały uzupełniające (S)

Tabela S1. Dynamika zmian aktywności proteazy podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Tabela S2. Dynamika zmian aktywności keratynazy podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Tabela S3. Dynamika zmian stężenia rozpuszczalnych białek i peptydów podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Tabela S4. Dynamika zmian stężenia grup tiolowych podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Tabela S5. Dynamika zmian stężenia grup aminowych podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Tabela S6. Dynamika zmian stężenia jonów amonowych podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Tabela S7. Dynamika zmian stężenia siarczanów podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Tabela S8. Dynamika zmian pH podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Tabela S1. Dynamika zmian aktywności proteazy podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Gleba	Szczep	Proteaza [$\mu\text{g tyrozyny cm}^{-3}$]						
		Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Gliniasta (Cambisol)	I	43,71 $\pm 1,91$	51,48 $\pm 1,48$	47,19 $\pm 1,18$	55,92 $\pm 2,23$	58,73 $\pm 1,03$	90,83 $\pm 1,95$	
	II	31,66 $\pm 2,10$	41,12 $\pm 2,04$	22,48 $\pm 1,38$	28,92 $\pm 0,91$	36,76 $\pm 0,86$	44,82 $\pm 0,83$	
	III	48,15 $\pm 3,90$	58,87 $\pm 3,26$	40,24 $\pm 0,55$	59,02 $\pm 3,99$	70,56 $\pm 1,27$	103,70 $\pm 3,63$	
	IV	73,52 $\pm 3,43$	49,41 $\pm 3,54$	29,22 $\pm 1,34$	34,54 $\pm 1,54$	69,67 $\pm 8,57$	85,21 $\pm 0,91$	
	V	57,77 $\pm 3,43$	67,16 $\pm 3,24$	28,03 $\pm 0,86$	29,59 $\pm 2,63$	69,75 $\pm 3,63$	105,32 $\pm 1,18$	
	VI	17,68 $\pm 1,18$	15,01 $\pm 1,21$	43,12 $\pm 2,72$	62,94 $\pm 2,74$	75,59 $\pm 3,02$	85,72 $\pm 2,89$	
	VII	22,85 $\pm 1,13$	88,39 $\pm 2,30$	44,75 $\pm 2,15$	40,53 $\pm 1,09$	52,51 $\pm 1,74$	85,50 $\pm 4,60$	
	VIII	29,59 $\pm 0,64$	33,80 $\pm 1,76$	23,59 $\pm 0,73$	26,33 $\pm 1,92$	33,21 $\pm 2,98$	49,19 $\pm 1,89$	
	IX	22,19 $\pm 0,91$	29,66 $\pm 2,15$	32,54 $\pm 1,95$	35,35 $\pm 1,68$	48,37 $\pm 3,18$	67,45 $\pm 3,97$	
	X	38,53 $\pm 1,18$	87,79 $\pm 1,54$	44,82 $\pm 1,84$	40,83 $\pm 1,45$	53,70 $\pm 3,14$	72,26 $\pm 2,81$	
	XI	29,66 $\pm 2,28$	36,17 $\pm 3,62$	32,99 $\pm 0,75$	34,61 $\pm 1,10$	40,16 $\pm 1,13$	52,29 $\pm 2,95$	
	XII	44,82 $\pm 1,09$	47,56 $\pm 2,08$	37,57 $\pm 1,64$	40,01 $\pm 1,27$	49,41 $\pm 2,16$	69,60 $\pm 5,38$	
	XIII	28,48 $\pm 2,73$	42,23 $\pm 3,40$	23,59 $\pm 0,28$	25,59 $\pm 0,52$	27,07 $\pm 1,01$	39,72 $\pm 4,93$	
	XIV	49,04 $\pm 2,54$	38,09 $\pm 3,02$	32,84 $\pm 0,79$	33,14 $\pm 3,26$	42,16 $\pm 1,57$	69,01 $\pm 2,68$	
	XV	34,39 $\pm 1,09$	41,27 $\pm 2,44$	36,54 $\pm 1,21$	40,31 $\pm 0,73$	47,48 $\pm 2,38$	65,61 $\pm 1,83$	
	XVI	12,80 $\pm 0,93$	32,62 $\pm 2,14$	44,16 $\pm 2,37$	47,26 $\pm 3,50$	53,03 $\pm 1,55$	103,70 $\pm 3,22$	
	XXI	115,16 $\pm 1,73$	60,95 $\pm 2,51$	34,54 $\pm 1,90$	42,90 $\pm 1,27$	47,26 $\pm 1,78$	74,26 $\pm 2,36$	
	XXII	21,30 $\pm 0,83$	20,86 $\pm 1,19$	22,78 $\pm 2,27$	23,22 $\pm 2,16$	19,67 $\pm 1,62$	27,88 $\pm 1,21$	
	XXVIII	8,06 $\pm 0,86$	27,29 $\pm 0,36$	30,69 $\pm 2,64$	44,60 $\pm 3,57$	50,89 $\pm 3,05$	71,97 $\pm 4,17$	
	XXIX	30,55 $\pm 3,07$	35,58 $\pm 2,55$	30,10 $\pm 3,47$	34,91 $\pm 3,25$	39,57 $\pm 5,36$	61,17 $\pm 5,56$	
	Średnia Gleba gliniasta		37,99 $\pm 1,85$	45,27 $\pm 2,29$	34,09 $\pm 1,60$	39,03 $\pm 2,04$	49,28 $\pm 2,55$	71,26 $\pm 2,95$

c.d. Tabeli S1.

Gleba	Szczep	Proteaza [μg tyrozyny cm^{-3}]						
		Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Czarnoziem	XVII	52,44 $\pm 1,81$	92,82 $\pm 3,72$	34,61 $\pm 3,86$	30,62 $\pm 1,58$	34,98 $\pm 2,41$	68,05 $\pm 1,64$	
	XVIII	67,45 $\pm 3,92$	45,56 $\pm 2,34$	29,88 $\pm 0,42$	30,62 $\pm 1,55$	31,73 $\pm 4,49$	59,84 $\pm 1,00$	
	XIX	19,01 $\pm 1,99$	48,15 $\pm 2,09$	27,29 $\pm 0,48$	29,73 $\pm 0,48$	37,20 $\pm 3,07$	63,31 $\pm 3,41$	
	XX	58,06 $\pm 1,64$	76,48 $\pm 1,09$	30,40 $\pm 1,13$	31,14 $\pm 1,68$	46,60 $\pm 1,92$	56,73 $\pm 3,65$	
	XXIII	26,33 $\pm 0,73$	18,27 $\pm 2,43$	24,19 $\pm 1,27$	30,10 $\pm 2,19$	29,66 $\pm 1,34$	36,32 $\pm 2,60$	
	XXIV	42,75 $\pm 2,64$	61,17 $\pm 1,00$	45,86 $\pm 2,59$	41,20 $\pm 1,03$	39,05 $\pm 1,96$	50,37 $\pm 1,91$	
	XXV	44,75 $\pm 2,84$	50,44 $\pm 2,54$	44,38 $\pm 2,02$	40,09 $\pm 3,40$	36,54 $\pm 2,63$	39,87 $\pm 1,63$	
	XXVI	66,27 $\pm 4,53$	33,43 $\pm 2,47$	29,36 $\pm 1,63$	27,66 $\pm 1,18$	29,14 $\pm 3,77$	36,61 $\pm 3,74$	
	XXVII	127,36 $\pm 3,92$	38,68 $\pm 1,56$	36,54 $\pm 1,31$	38,90 $\pm 1,62$	37,28 $\pm 2,92$	48,82 $\pm 3,64$	
	XXX	82,40 $\pm 1,56$	53,33 $\pm 2,95$	37,65 $\pm 3,55$	37,94 $\pm 4,26$	40,61 $\pm 2,63$	61,54 $\pm 5,16$	
	XXXI	74,04 $\pm 5,06$	97,26 $\pm 3,95$	70,93 $\pm 3,37$	68,86 $\pm 1,92$	86,98 $\pm 5,23$	137,65 $\pm 4,56$	
	XXXII	101,85 $\pm 7,89$	34,69 $\pm 5,21$	24,85 $\pm 1,10$	21,38 $\pm 1,76$	23,00 $\pm 2,82$	36,91 $\pm 2,91$	
	XXXIII	63,39 $\pm 3,52$	49,56 $\pm 3,27$	36,61 $\pm 3,36$	42,09 $\pm 2,00$	55,25 $\pm 3,03$	74,56 $\pm 3,21$	
	XXXIV	84,24 $\pm 3,62$	53,70 $\pm 5,31$	34,69 $\pm 2,63$	32,69 $\pm 0,82$	38,68 $\pm 1,81$	55,77 $\pm 3,04$	
	XXXV	71,97 $\pm 1,64$	43,71 $\pm 2,92$	32,84 $\pm 0,31$	35,95 $\pm 3,17$	49,85 $\pm 3,84$	76,11 $\pm 4,40$	
	XXXVI	92,31 $\pm 3,82$	39,50 $\pm 0,18$	29,22 $\pm 3,01$	30,18 $\pm 2,40$	48,30 $\pm 3,77$	73,37 $\pm 0,73$	
	XXXVII	25,15 $\pm 3,19$	20,04 $\pm 0,93$	19,67 $\pm 1,11$	22,63 $\pm 0,79$	28,40 $\pm 2,88$	35,95 $\pm 2,61$	
	Średnia Czarnoziem		64,69 $\pm 3,20$	50,40 $\pm 2,59$	34,65 $\pm 1,95$	34,81 $\pm 1,87$	40,78 $\pm 2,97$	59,51 $\pm 2,93$
	Referencyjny	REF	26,04 $\pm 2,74$	42,97 $\pm 3,45$	35,87 $\pm 3,37$	37,28 $\pm 2,81$	44,38 $\pm 6,09$	58,14 $\pm 7,07$

Tabela S2. Dynamika zmian aktywności keratynazy podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

		Keratynaza [KU cm⁻³]						
Gleba	Szczep	Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Gliniasta (Cambisol)	I	32,77 ± 0,77	57,97 ± 2,18	58,40 ± 1,63	56,17 ± 1,51	70,80 ± 1,75	85,90 ± 2,73	
	II	36,03 ± 1,62	59,90 ± 1,39	55,90 ± 2,07	53,67 ± 2,50	70,90 ± 1,73	57,20 ± 2,50	
	III	54,77 ± 1,68	79,57 ± 1,75	81,03 ± 1,54	80,73 ± 2,78	93,70 ± 1,69	101,83 ± 1,28	
	IV	33,53 ± 1,97	56,40 ± 3,55	46,93 ± 2,69	50,43 ± 1,94	60,20 ± 1,77	69,70 ± 0,57	
	V	28,20 ± 0,93	58,87 ± 1,89	58,53 ± 1,52	53,80 ± 2,01	63,07 ± 2,01	76,07 ± 1,60	
	VI	27,07 ± 3,64	34,97 ± 2,10	41,87 ± 3,31	49,03 ± 1,93	78,77 ± 2,64	66,77 ± 2,15	
	VII	32,10 ± 2,43	56,57 ± 2,18	42,97 ± 1,88	57,20 ± 2,65	56,43 ± 2,44	77,27 ± 0,74	
	VIII	31,47 ± 1,80	48,20 ± 1,84	45,63 ± 1,35	44,67 ± 1,69	48,13 ± 1,47	59,80 ± 0,96	
	IX	31,43 ± 2,50	54,03 ± 1,86	45,70 ± 2,08	52,23 ± 1,75	66,27 ± 1,20	73,80 ± 1,98	
	X	32,77 ± 2,90	44,97 ± 2,61	43,30 ± 1,50	44,23 ± 1,82	58,03 ± 2,11	62,73 ± 2,40	
	XI	39,53 ± 1,51	43,83 ± 3,45	49,90 ± 1,69	46,80 ± 0,57	59,20 ± 3,51	68,10 ± 0,50	
	XII	40,23 ± 2,05	38,53 ± 1,55	48,40 ± 2,27	44,30 ± 2,60	56,97 ± 1,62	72,70 ± 0,95	
	XIII	32,87 ± 2,50	29,03 ± 1,14	44,50 ± 2,33	41,07 ± 2,17	38,40 ± 0,71	50,13 ± 3,38	
	XIV	39,67 ± 2,48	42,87 ± 1,02	49,13 ± 2,52	50,27 ± 1,62	56,80 ± 1,39	78,80 ± 1,07	
	XV	37,83 ± 1,81	41,47 ± 0,76	48,67 ± 2,81	58,97 ± 2,16	61,77 ± 1,64	70,17 ± 1,72	
	XVI	39,10 ± 2,45	46,97 ± 3,10	58,13 ± 2,66	56,23 ± 2,98	65,03 ± 2,93	92,77 ± 2,66	
	XXI	41,23 ± 1,89	46,30 ± 4,36	37,40 ± 2,18	51,03 ± 4,11	61,00 ± 1,93	56,17 ± 1,43	
	XXII	30,27 ± 2,88	40,40 ± 2,02	33,40 ± 4,22	45,50 ± 1,35	60,40 ± 2,45	53,73 ± 2,60	
	XXVIII	34,00 ± 4,03	38,80 ± 3,40	43,30 ± 1,50	48,97 ± 2,82	51,27 ± 2,45	52,70 ± 1,13	
	XXIX	37,37 ± 1,52	42,40 ± 2,58	41,97 ± 4,26	52,10 ± 3,83	57,87 ± 2,27	55,10 ± 2,63	
	Średnia Gleba gliniasta		35,61 ± 2,17	48,10 ± 2,24	48,75 ± 2,30	51,87 ± 2,24	61,75 ± 1,98	69,07 ± 1,75

c.d. Tabeli S2.

		Keratynaza [KU cm ⁻³]						
Gleba	Szczep	Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Czarnoziem	XVII	42,90 ± 2,98	46,07 ± 1,93	44,27 ± 3,52	41,03 ± 1,75	45,70 ± 1,14	59,47 ± 1,90	
	XVIII	37,27 ± 2,55	31,27 ± 3,51	34,07 ± 1,07	30,73 ± 1,68	36,17 ± 2,31	50,00 ± 1,79	
	XIX	36,70 ± 1,77	36,17 ± 1,82	39,17 ± 0,87	37,20 ± 2,35	41,63 ± 2,32	57,67 ± 0,62	
	XX	41,63 ± 1,96	45,30 ± 2,33	51,87 ± 3,82	40,40 ± 4,46	58,13 ± 2,63	70,33 ± 2,47	
	XXIII	32,57 ± 2,90	30,17 ± 2,28	27,00 ± 1,90	40,07 ± 0,61	55,40 ± 3,53	50,53 ± 1,27	
	XXIV	30,03 ± 3,83	38,73 ± 4,06	32,43 ± 2,48	50,33 ± 2,25	54,40 ± 3,05	55,60 ± 2,41	
	XXV	30,23 ± 0,58	36,37 ± 3,11	32,77 ± 1,89	43,93 ± 2,93	55,27 ± 3,72	51,27 ± 2,78	
	XXVI	30,83 ± 0,61	34,67 ± 2,54	34,60 ± 1,53	38,00 ± 3,89	48,27 ± 4,49	49,63 ± 2,66	
	XXVII	40,37 ± 1,18	42,80 ± 1,75	37,40 ± 1,85	53,20 ± 1,99	56,37 ± 2,67	59,67 ± 1,81	
	XXX	32,53 ± 0,66	39,70 ± 1,23	40,17 ± 1,69	50,63 ± 3,32	47,97 ± 1,82	47,37 ± 1,19	
	XXXI	28,27 ± 1,73	39,00 ± 1,10	38,70 ± 1,96	47,10 ± 0,79	50,43 ± 3,69	47,33 ± 2,50	
	XXXII	30,77 ± 1,46	33,83 ± 1,46	54,97 ± 2,50	39,57 ± 3,35	43,70 ± 1,20	38,33 ± 2,92	
	XXXIII	43,60 ± 1,93	58,63 ± 1,97	59,50 ± 1,06	72,17 ± 1,87	81,53 ± 1,89	81,03 ± 2,81	
	XXXIV	34,27 ± 1,52	37,40 ± 2,16	34,43 ± 0,37	45,10 ± 2,52	42,90 ± 1,99	52,13 ± 2,25	
	XXXV	27,03 ± 3,62	32,63 ± 3,38	33,17 ± 2,75	46,53 ± 1,70	44,20 ± 1,23	45,37 ± 0,98	
	XXXVI	28,83 ± 2,95	33,90 ± 3,79	33,10 ± 1,75	41,37 ± 1,24	37,33 ± 2,37	40,73 ± 4,11	
	XXXVII	27,63 ± 2,84	33,20 ± 1,35	27,80 ± 2,68	44,57 ± 1,72	44,80 ± 1,08	47,97 ± 1,33	
	Średnia Czarnoziem		33,85 ± 2,06	38,23 ± 2,34	38,55 ± 1,98	44,82 ± 2,26	49,66 ± 2,42	53,20 ± 2,11
	Referencyjny	REF	9,27 ± 0,71	38,93 ± 1,47	41,37 ± 4,29	43,77 ± 1,56	58,77 ± 1,78	64,13 ± 4,29

Tabela S3. Dynamika zmian stężenia rozpuszczalnych białek i peptydów podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Gleba	Szczep	Rozpuszczalne białka i peptydy [μg białka cm^{-3}]					
		Dni hodowli					
		7	14	21	28	35	42
Gliniasta (Cambisol)	I	255,65 $\pm 13,29$	442,19 $\pm 5,76$	455,09 $\pm 4,72$	479,73 $\pm 4,25$	509,76 $\pm 5,22$	532,67 $\pm 12,99$
	II	272,20 $\pm 2,37$	412,54 $\pm 4,77$	418,70 $\pm 6,24$	431,02 $\pm 3,66$	456,43 $\pm 9,10$	468,56 $\pm 9,30$
	III	297,42 $\pm 5,44$	473,18 $\pm 7,52$	473,37 $\pm 6,33$	509,37 $\pm 7,35$	545,95 $\pm 19,68$	561,54 $\pm 14,38$
	IV	273,74 $\pm 5,36$	379,24 $\pm 0,27$	380,97 $\pm 6,40$	412,16 $\pm 7,33$	442,57 $\pm 8,25$	466,44 $\pm 6,61$
	V	262,58 $\pm 5,47$	409,46 $\pm 19,44$	410,42 $\pm 7,67$	434,68 $\pm 14,44$	459,90 $\pm 13,80$	479,73 $\pm 10,61$
	VI	184,42 $\pm 2,84$	233,32 $\pm 4,03$	347,28 $\pm 19,79$	391,75 $\pm 11,59$	421,20 $\pm 10,01$	440,46 $\pm 11,06$
	VII	172,29 $\pm 19,58$	424,28 $\pm 17,46$	398,30 $\pm 5,19$	403,49 $\pm 6,06$	428,52 $\pm 4,64$	448,54 $\pm 7,37$
	VIII	203,48 $\pm 26,97$	374,23 $\pm 13,43$	362,88 $\pm 6,42$	389,44 $\pm 7,78$	408,11 $\pm 6,82$	431,21 $\pm 4,46$
	IX	211,56 $\pm 18,78$	394,45 $\pm 15,94$	420,82 $\pm 11,18$	444,11 $\pm 16,94$	481,07 $\pm 21,64$	488,77 $\pm 9,94$
	X	266,81 $\pm 4,55$	374,62 $\pm 11,79$	341,12 $\pm 4,07$	348,24 $\pm 6,85$	379,05 $\pm 3,14$	442,77 $\pm 3,93$
	XI	319,75 $\pm 18,20$	410,62 $\pm 9,74$	380,39 $\pm 6,37$	393,87 $\pm 7,26$	423,71 $\pm 9,68$	502,63 $\pm 6,61$
	XII	341,12 $\pm 20,62$	421,78 $\pm 14,01$	387,32 $\pm 9,27$	394,06 $\pm 14,68$	430,25 $\pm 15,16$	514,76 $\pm 18,86$
	XIII	277,79 $\pm 9,00$	413,50 $\pm 9,85$	332,84 $\pm 8,31$	337,66 $\pm 4,65$	358,64 $\pm 6,13$	417,93 $\pm 19,19$
	XIV	308,40 $\pm 7,41$	394,06 $\pm 1,91$	365,19 $\pm 2,37$	378,85 $\pm 6,48$	413,12 $\pm 10,90$	485,12 $\pm 5,25$
	XV	314,17 $\pm 7,07$	406,38 $\pm 5,82$	373,27 $\pm 3,48$	399,64 $\pm 10,85$	431,02 $\pm 8,76$	508,03 $\pm 10,39$
	XVI	281,25 $\pm 11,78$	452,97 $\pm 7,49$	445,08 $\pm 15,66$	452,39 $\pm 25,75$	488,97 $\pm 12,16$	585,41 $\pm 21,16$
	XXI	429,67 $\pm 9,18$	432,37 $\pm 19,52$	440,46 $\pm 6,61$	434,49 $\pm 14,15$	456,63 $\pm 14,32$	505,33 $\pm 9,57$
	XXII	304,35 $\pm 7,04$	388,86 $\pm 4,23$	429,48 $\pm 4,12$	433,14 $\pm 7,14$	448,73 $\pm 14,99$	500,90 $\pm 11,06$
	XXVIII	195,59 $\pm 6,87$	353,06 $\pm 30,38$	415,04 $\pm 29,13$	445,08 $\pm 14,99$	478,96 $\pm 15,90$	509,37 $\pm 16,82$
	XXIX	387,90 $\pm 10,07$	482,42 $\pm 5,00$	484,35 $\pm 3,84$	505,91 $\pm 13,70$	538,63 $\pm 18,20$	585,80 $\pm 23,88$
Średnia Gleba gliniasta		278,01 $\pm 10,59$	403,68 $\pm 10,42$	403,12 $\pm 8,36$	420,95 $\pm 10,29$	450,06 $\pm 11,43$	493,80 $\pm 11,67$

c.d. Tabeli S3.

		Rozpuszczalne białka i peptydy [$\mu\text{g białka cm}^{-3}$]						
Gleba	Szczep	Dni hodowli						
		7	14	21	28	35	42	
Czarnoziem	XVII	304,35 ± 11,15	416,20 ± 12,50	350,94 ± 8,56	357,48 ± 5,10	390,40 ± 6,85	452,20 ± 5,44	
	XVIII	306,28 ± 17,04	346,32 ± 19,07	296,85 ± 10,21	302,81 ± 10,78	327,07 ± 3,54	383,86 ± 8,44	
	XIX	248,33 ± 21,42	407,15 ± 7,85	331,11 ± 2,68	330,92 ± 5,72	364,61 ± 10,61	435,07 ± 16,20	
	XX	347,67 ± 17,47	399,26 ± 6,15	354,79 ± 10,27	357,10 ± 7,40	384,63 ± 18,38	454,12 ± 7,08	
	XXIII	342,85 ± 7,25	360,56 ± 15,13	419,47 ± 14,16	434,49 ± 15,90	463,17 ± 13,48	490,89 ± 15,84	
	XXIV	309,76 ± 10,12	420,05 ± 1,91	476,84 ± 7,25	476,65 ± 2,76	498,78 ± 3,48	544,41 ± 8,45	
	XXV	267,01 ± 3,03	373,85 ± 12,66	417,35 ± 6,37	436,03 ± 4,03	438,53 ± 2,60	480,30 ± 13,10	
	XXVI	378,47 ± 21,57	394,64 ± 3,60	410,04 ± 6,98	406,96 ± 14,62	429,67 ± 14,90	455,47 ± 19,29	
	XXVII	513,99 ± 2,50	477,22 ± 0,98	535,94 ± 4,03	559,42 ± 19,08	590,61 ± 12,56	601,39 ± 13,44	
	XXX	366,34 ± 18,02	403,30 ± 19,16	414,27 ± 25,31	433,72 ± 22,70	463,17 ± 14,71	495,70 ± 15,64	
	XXXI	373,85 ± 30,58	460,28 ± 12,50	446,23 ± 12,59	470,68 ± 14,71	515,53 ± 10,40	548,45 ± 18,36	
	XXXII	413,31 ± 14,97	416,78 ± 1,52	431,02 ± 3,21	431,02 ± 11,64	464,90 ± 14,34	489,35 ± 10,61	
	XXXIII	464,13 ± 11,69	553,26 ± 4,03	554,23 ± 11,63	582,72 ± 36,73	611,98 ± 8,44	643,36 ± 28,19	
	XXXIV	403,88 ± 32,31	435,07 ± 15,60	442,19 ± 5,76	448,54 ± 10,82	475,68 ± 3,31	508,99 ± 14,02	
	XXXV	389,44 ± 15,70	428,52 ± 10,50	432,56 ± 18,41	462,98 ± 12,93	498,21 ± 13,22	542,48 ± 16,48	
	XXXVI	430,44 ± 25,73	443,73 ± 11,33	419,47 ± 19,38	441,42 ± 16,62	472,22 ± 13,22	494,74 ± 22,91	
	XXXVII	334,77 ± 25,52	390,60 ± 7,25	410,23 ± 6,01	433,91 ± 19,06	462,59 ± 16,74	488,97 ± 19,96	
	Średnia Czarnoziem		364,40 ± 18,83	419,22 ± 9,51	420,21 ± 10,16	433,34 ± 13,56	461,87 ± 10,63	500,57 ± 14,91
	Referencyjny	REF	386,36 ± 38,20	443,15 ± 14,21	459,90 ± 32,56	484,15 ± 25,58	515,15 ± 29,02	553,84 ± 13,96

Tabela S4. Dynamika zmian stężenia grup tiolowych podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Gleba	Szczep	Grupy tiolowe [$\mu\text{g} \cdot \text{SH cm}^{-3}$]						
		Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Gliniasta (Cambisol)	I	1,76 $\pm 0,23$	2,40 $\pm 0,23$	2,35 $\pm 0,72$	4,53 $\pm 0,79$	5,65 $\pm 1,13$	21,59 $\pm 1,33$	
	II	2,40 $\pm 0,23$	3,04 $\pm 0,23$	3,47 $\pm 0,59$	4,90 $\pm 0,64$	5,70 $\pm 0,46$	22,87 $\pm 1,51$	
	III	2,35 $\pm 0,15$	2,99 $\pm 0,15$	6,72 $\pm 0,47$	4,69 $\pm 0,15$	3,95 $\pm 0,53$	20,79 $\pm 0,69$	
	IV	2,35 $\pm 0,15$	2,99 $\pm 0,15$	5,49 $\pm 0,27$	4,90 $\pm 0,53$	5,70 $\pm 0,67$	21,81 $\pm 0,33$	
	V	1,97 $\pm 0,40$	2,61 $\pm 0,40$	4,27 $\pm 0,33$	4,80 $\pm 0,47$	5,76 $\pm 0,26$	24,68 $\pm 0,77$	
	VI	2,19 $\pm 0,15$	2,83 $\pm 0,15$	4,21 $\pm 0,54$	1,76 $\pm 0,39$	2,72 $\pm 0,39$	19,30 $\pm 0,75$	
	VII	1,87 $\pm 0,15$	2,51 $\pm 0,15$	7,36 $\pm 0,73$	3,57 $\pm 0,08$	5,54 $\pm 0,27$	21,11 $\pm 0,35$	
	VIII	1,81 $\pm 0,30$	2,45 $\pm 0,30$	6,29 $\pm 0,96$	3,36 $\pm 0,13$	4,74 $\pm 0,20$	20,10 $\pm 0,15$	
	IX	3,04 $\pm 0,60$	3,68 $\pm 0,60$	3,15 $\pm 0,54$	4,05 $\pm 0,77$	5,81 $\pm 1,14$	20,47 $\pm 1,20$	
	X	5,60 $\pm 0,69$	4,53 $\pm 0,74$	3,52 $\pm 0,13$	4,58 $\pm 0,15$	5,92 $\pm 0,68$	8,10 $\pm 1,06$	
	XI	5,54 $\pm 0,42$	8,16 $\pm 0,94$	3,52 $\pm 0,35$	4,96 $\pm 0,39$	6,61 $\pm 0,49$	6,50 $\pm 0,49$	
	XII	5,28 $\pm 0,13$	7,14 $\pm 0,87$	3,73 $\pm 0,40$	4,37 $\pm 0,33$	6,13 $\pm 0,42$	8,00 $\pm 0,73$	
	XIII	5,44 $\pm 0,35$	4,69 $\pm 0,93$	2,93 $\pm 0,27$	3,36 $\pm 0,01$	4,37 $\pm 0,15$	5,38 $\pm 0,33$	
	XIV	4,80 $\pm 0,23$	5,33 $\pm 0,33$	4,53 $\pm 0,87$	4,69 $\pm 0,53$	4,74 $\pm 0,96$	5,60 $\pm 0,57$	
	XV	6,66 $\pm 1,06$	6,02 $\pm 0,27$	3,79 $\pm 0,79$	5,01 $\pm 0,42$	5,49 $\pm 0,49$	6,88 $\pm 0,57$	
	XVI	4,11 $\pm 0,53$	2,93 $\pm 0,49$	3,68 $\pm 0,73$	4,48 $\pm 0,57$	5,12 $\pm 0,35$	7,20 $\pm 0,73$	
	XXI	2,51 $\pm 0,30$	6,18 $\pm 0,40$	5,70 $\pm 0,62$	4,96 $\pm 0,23$	5,60 $\pm 0,39$	6,77 $\pm 0,53$	
	XXII	1,92 $\pm 0,35$	5,12 $\pm 0,69$	9,54 $\pm 0,46$	4,53 $\pm 0,40$	5,33 $\pm 0,46$	7,57 $\pm 0,33$	
	XXVIII	0,48 $\pm 0,13$	5,28 $\pm 0,82$	6,24 $\pm 0,47$	6,98 $\pm 0,77$	9,81 $\pm 0,27$	8,16 $\pm 0,47$	
	XXIX	1,28 $\pm 0,45$	5,54 $\pm 0,83$	4,05 $\pm 0,33$	4,74 $\pm 1,09$	6,13 $\pm 0,83$	3,36 $\pm 0,45$	
	Średnia Gleba gliniasta		3,17 $\pm 0,35$	4,32 $\pm 0,48$	4,73 $\pm 0,53$	4,46 $\pm 0,44$	5,54 $\pm 0,53$	13,31 $\pm 0,67$

c.d. Tabeli S4.

		Grupy tiolowe [$\mu\text{g -SH cm}^{-3}$]						
Gleba	Szczep	Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Czarnoziem	XVII	5,92 $\pm 0,94$	6,08 $\pm 0,91$	3,36 $\pm 0,47$	4,48 $\pm 0,47$	4,74 $\pm 0,53$	6,77 $\pm 0,20$	
	XVIII	9,86 $\pm 0,94$	9,06 $\pm 0,53$	2,99 $\pm 0,15$	4,64 $\pm 0,35$	4,80 $\pm 0,13$	6,50 $\pm 0,20$	
	XIX	6,98 $\pm 0,72$	6,18 $\pm 0,62$	3,52 $\pm 0,45$	4,05 $\pm 0,27$	4,11 $\pm 0,20$	5,81 $\pm 0,30$	
	XX	4,90 $\pm 0,64$	3,57 $\pm 0,46$	3,79 $\pm 0,53$	5,06 $\pm 0,46$	5,70 $\pm 0,54$	6,72 $\pm 0,69$	
	XXIII	3,09 $\pm 0,33$	3,79 $\pm 0,72$	5,01 $\pm 0,46$	3,95 $\pm 0,59$	4,58 $\pm 0,54$	5,97 $\pm 0,93$	
	XXIV	1,23 $\pm 0,27$	3,95 $\pm 0,27$	4,32 $\pm 1,04$	4,16 $\pm 0,13$	5,76 $\pm 0,73$	6,93 $\pm 0,67$	
	XXV	2,40 $\pm 0,57$	9,49 $\pm 0,74$	5,60 $\pm 0,35$	5,86 $\pm 0,49$	6,93 $\pm 0,79$	8,58 $\pm 0,59$	
	XXVI	3,20 $\pm 0,47$	3,57 $\pm 1,00$	5,49 $\pm 0,74$	4,48 $\pm 0,73$	6,13 $\pm 0,83$	7,30 $\pm 0,59$	
	XXVII	1,44 $\pm 0,23$	4,32 $\pm 0,60$	5,28 $\pm 0,79$	6,40 $\pm 0,60$	7,09 $\pm 0,67$	7,68 $\pm 0,13$	
	XXX	1,33 $\pm 0,54$	8,05 $\pm 0,77$	4,96 $\pm 0,60$	6,08 $\pm 0,47$	6,45 $\pm 0,30$	3,41 $\pm 0,53$	
	XXXI	1,17 $\pm 0,20$	2,51 $\pm 0,20$	3,79 $\pm 0,66$	5,49 $\pm 0,72$	6,40 $\pm 0,47$	3,31 $\pm 0,49$	
	XXXII	0,64 $\pm 0,13$	2,56 $\pm 0,69$	3,68 $\pm 0,23$	4,69 $\pm 0,49$	5,33 $\pm 0,87$	3,25 $\pm 0,27$	
	XXXIII	1,39 $\pm 0,27$	6,02 $\pm 0,98$	5,65 $\pm 1,06$	7,62 $\pm 0,72$	14,45 $\pm 0,74$	6,50 $\pm 0,27$	
	XXXIV	1,01 $\pm 0,08$	3,57 $\pm 0,42$	3,41 $\pm 0,46$	4,58 $\pm 0,08$	6,13 $\pm 0,79$	4,27 $\pm 0,87$	
	XXXV	0,48 $\pm 0,13$	2,45 $\pm 0,20$	3,41 $\pm 0,08$	5,81 $\pm 0,59$	5,70 $\pm 0,33$	3,73 $\pm 0,20$	
	XXXVI	0,91 $\pm 0,20$	2,45 $\pm 0,33$	3,15 $\pm 0,46$	4,21 $\pm 0,46$	5,01 $\pm 0,49$	1,44 $\pm 0,13$	
	XXXVII	0,53 $\pm 0,08$	4,16 $\pm 0,35$	1,97 $\pm 0,33$	2,77 $\pm 0,72$	2,99 $\pm 0,64$	0,59 $\pm 0,15$	
	Średnia Czarnoziem		2,73 $\pm 0,40$	4,81 $\pm 0,58$	4,08 $\pm 0,52$	4,96 $\pm 0,49$	6,02 $\pm 0,56$	5,22 $\pm 0,42$
	Referencyjny	REF	1,87 $\pm 0,46$	4,11 $\pm 0,53$	4,16 $\pm 0,13$	3,36 $\pm 0,13$	7,14 $\pm 0,08$	8,90 $\pm 0,66$

Tabela S5. Dynamika zmian stężenia grup aminowych podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

		Grupy aminowe [$\mu\text{g N-NH}_2 \text{ cm}^{-3}$]						
Gleba	Szczep	Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Gliniasta (Cambisol)	I	5,55 $\pm 0,29$	9,85 $\pm 0,17$	10,27 $\pm 0,43$	7,23 $\pm 0,29$	6,51 $\pm 0,57$	8,16 $\pm 0,21$	
	II	4,02 $\pm 0,16$	9,50 $\pm 0,25$	9,21 $\pm 0,23$	6,20 $\pm 0,16$	5,95 $\pm 0,33$	7,28 $\pm 0,47$	
	III	5,78 $\pm 0,43$	10,62 $\pm 0,23$	10,34 $\pm 0,30$	6,16 $\pm 0,33$	6,61 $\pm 0,19$	6,65 $\pm 0,13$	
	IV	5,28 $\pm 0,53$	9,00 $\pm 0,47$	8,68 $\pm 0,29$	5,04 $\pm 0,36$	6,47 $\pm 0,15$	6,55 $\pm 0,38$	
	V	4,47 $\pm 0,21$	10,02 $\pm 0,19$	9,27 $\pm 0,14$	6,94 $\pm 0,15$	6,84 $\pm 0,10$	7,46 $\pm 0,12$	
	VI	1,05 $\pm 0,05$	1,94 $\pm 0,10$	5,96 $\pm 0,37$	6,26 $\pm 0,11$	5,36 $\pm 0,15$	5,51 $\pm 0,20$	
	VII	1,55 $\pm 0,12$	8,51 $\pm 0,21$	8,65 $\pm 0,04$	5,19 $\pm 0,24$	6,11 $\pm 0,18$	7,01 $\pm 0,39$	
	VIII	3,59 $\pm 0,27$	8,89 $\pm 0,33$	8,47 $\pm 0,15$	6,20 $\pm 0,24$	5,31 $\pm 0,22$	6,67 $\pm 0,10$	
	IX	4,96 $\pm 0,36$	9,03 $\pm 0,18$	9,55 $\pm 0,09$	6,51 $\pm 0,42$	5,75 $\pm 0,32$	6,80 $\pm 0,13$	
	X	4,23 $\pm 0,40$	6,56 $\pm 0,09$	7,21 $\pm 0,28$	5,41 $\pm 0,51$	6,22 $\pm 0,15$	7,46 $\pm 0,17$	
	XI	5,96 $\pm 0,24$	9,24 $\pm 0,27$	10,17 $\pm 0,36$	7,62 $\pm 0,14$	8,77 $\pm 0,19$	10,52 $\pm 0,23$	
	XII	7,02 $\pm 0,16$	10,89 $\pm 0,15$	11,98 $\pm 0,31$	12,57 $\pm 0,34$	14,46 $\pm 0,33$	17,35 $\pm 0,15$	
	XIII	3,16 $\pm 0,14$	4,90 $\pm 0,26$	5,39 $\pm 0,24$	4,04 $\pm 0,16$	4,65 $\pm 0,29$	5,58 $\pm 0,23$	
	XIV	5,37 $\pm 0,31$	8,32 $\pm 0,24$	9,15 $\pm 0,28$	7,32 $\pm 0,17$	8,42 $\pm 0,32$	10,52 $\pm 0,24$	
	XV	6,19 $\pm 0,28$	9,59 $\pm 0,43$	10,55 $\pm 0,47$	7,91 $\pm 0,35$	9,10 $\pm 0,40$	10,92 $\pm 0,49$	
	XVI	2,13 $\pm 0,15$	3,30 $\pm 0,24$	3,63 $\pm 0,18$	2,72 $\pm 0,15$	3,13 $\pm 0,29$	3,76 $\pm 0,22$	
	XXI	7,07 $\pm 0,29$	10,05 $\pm 0,35$	11,26 $\pm 0,10$	3,94 $\pm 0,15$	8,91 $\pm 0,46$	9,88 $\pm 0,58$	
	XXII	6,32 $\pm 0,11$	8,53 $\pm 0,19$	9,81 $\pm 0,33$	3,58 $\pm 0,38$	9,14 $\pm 0,51$	8,65 $\pm 0,46$	
	XXVIII	1,62 $\pm 0,18$	8,25 $\pm 0,22$	9,93 $\pm 0,15$	7,14 $\pm 0,40$	9,80 $\pm 0,35$	10,48 $\pm 0,26$	
	XXIX	8,78 $\pm 0,31$	13,63 $\pm 0,29$	12,69 $\pm 0,41$	8,47 $\pm 0,52$	9,60 $\pm 0,50$	12,32 $\pm 0,34$	
	Średnia Gleba gliniasta		4,71 $\pm 0,25$	8,53 $\pm 0,24$	9,11 $\pm 0,26$	6,32 $\pm 0,28$	7,36 $\pm 0,30$	8,48 $\pm 0,28$

c.d. Tabeli S5.

Gleba	Szczep	Grupy aminowe [$\mu\text{g N-NH}_2 \text{ cm}^{-3}$]						
		Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Czarnoziem	XVII	3,73 $\pm 0,05$	5,78 $\pm 0,08$	6,35 $\pm 0,09$	4,76 $\pm 0,07$	5,48 $\pm 0,08$	6,58 $\pm 0,10$	
	XVIII	4,83 $\pm 0,11$	7,49 $\pm 0,17$	8,24 $\pm 0,19$	6,18 $\pm 0,14$	7,11 $\pm 0,16$	8,53 $\pm 0,19$	
	XIX	2,56 $\pm 0,13$	3,97 $\pm 0,21$	4,36 $\pm 0,23$	3,27 $\pm 0,17$	3,76 $\pm 0,20$	4,52 $\pm 0,24$	
	XX	4,65 $\pm 0,20$	7,20 $\pm 0,30$	7,92 $\pm 0,33$	5,94 $\pm 0,25$	6,83 $\pm 0,29$	8,20 $\pm 0,35$	
	XXIII	7,87 $\pm 0,33$	7,74 $\pm 0,21$	9,70 $\pm 0,29$	3,16 $\pm 0,32$	7,96 $\pm 0,41$	10,05 $\pm 0,37$	
	XXIV	4,65 $\pm 0,18$	9,01 $\pm 0,60$	9,39 $\pm 0,76$	3,39 $\pm 0,42$	8,62 $\pm 0,24$	9,81 $\pm 0,42$	
	XXV	4,24 $\pm 0,04$	7,68 $\pm 0,28$	9,20 $\pm 0,17$	2,67 $\pm 0,17$	7,71 $\pm 0,33$	8,61 $\pm 0,10$	
	XXVI	6,14 $\pm 0,15$	9,12 $\pm 0,17$	10,37 $\pm 0,17$	3,17 $\pm 0,13$	9,12 $\pm 0,44$	8,06 $\pm 0,18$	
	XXVII	11,94 $\pm 0,22$	8,04 $\pm 0,25$	12,45 $\pm 0,24$	2,99 $\pm 0,18$	11,10 $\pm 0,08$	10,94 $\pm 0,29$	
	XXX	7,94 $\pm 0,57$	12,32 $\pm 0,27$	10,79 $\pm 0,22$	7,59 $\pm 0,20$	9,56 $\pm 0,47$	10,91 $\pm 0,20$	
	XXXI	4,99 $\pm 0,85$	12,84 $\pm 0,01$	12,62 $\pm 0,26$	7,69 $\pm 0,33$	10,12 $\pm 0,41$	11,06 $\pm 0,39$	
	XXXII	7,67 $\pm 0,81$	12,25 $\pm 0,26$	12,27 $\pm 0,34$	8,03 $\pm 0,36$	10,00 $\pm 0,41$	9,43 $\pm 0,33$	
	XXXIII	9,22 $\pm 0,38$	13,43 $\pm 0,26$	13,38 $\pm 0,27$	8,23 $\pm 0,30$	11,80 $\pm 0,28$	12,99 $\pm 0,44$	
	XXXIV	7,82 $\pm 0,20$	13,34 $\pm 0,23$	11,33 $\pm 0,45$	7,36 $\pm 0,29$	9,21 $\pm 0,22$	11,51 $\pm 0,63$	
	XXXV	7,95 $\pm 0,24$	11,46 $\pm 0,32$	11,19 $\pm 0,74$	7,32 $\pm 0,10$	10,27 $\pm 0,15$	13,55 $\pm 1,03$	
	XXXVI	9,12 $\pm 0,47$	12,68 $\pm 0,64$	11,11 $\pm 0,31$	7,75 $\pm 0,10$	9,98 $\pm 0,39$	12,77 $\pm 0,20$	
	XXXVII	8,00 $\pm 0,70$	11,26 $\pm 0,84$	11,31 $\pm 0,48$	7,48 $\pm 0,26$	10,14 $\pm 0,65$	11,88 $\pm 0,78$	
	Średnia Czarnoziem		6,67 $\pm 0,33$	9,74 $\pm 0,30$	10,12 $\pm 0,33$	5,70 $\pm 0,22$	8,75 $\pm 0,31$	9,96 $\pm 0,37$
	Referencyjny	REF	13,46 $\pm 0,80$	22,19 $\pm 0,37$	22,57 $\pm 0,75$	20,86 $\pm 1,25$	17,87 $\pm 0,11$	23,32 $\pm 0,77$

Tabela S6. Dynamika zmian stężenia jonów amonowych podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

		Jony amonowe [$\mu\text{g NH}_4^+ \text{cm}^{-3}$]						
Gleba	Szczep	Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Gliniasta (Cambisol)	I	330,30 ± 3,16	664,54 ± 15,66	587,36 ± 5,09	546,56 ± 15,12	518,05 ± 17,63	595,93 ± 12,45	
	II	292,06 ± 31,42	602,42 ± 23,34	539,61 ± 27,58	529,64 ± 14,74	519,21 ± 40,01	519,67 ± 9,92	
	III	365,53 ± 7,71	637,65 ± 9,38	620,27 ± 23,04	558,61 ± 7,19	598,95 ± 12,50	636,26 ± 10,33	
	IV	322,42 ± 5,80	553,98 ± 8,50	517,82 ± 11,58	503,22 ± 7,96	557,92 ± 8,84	597,32 ± 9,95	
	V	270,04 ± 4,76	590,60 ± 12,80	588,75 ± 4,96	551,20 ± 11,67	616,10 ± 7,09	582,72 ± 25,12	
	VI	25,50 ± 4,30	107,09 ± 13,10	317,78 ± 11,52	451,76 ± 5,91	536,13 ± 10,24	564,18 ± 18,83	
	VII	113,35 ± 5,42	478,18 ± 7,39	562,55 ± 5,93	539,61 ± 8,48	507,39 ± 8,27	573,91 ± 7,10	
	VIII	258,68 ± 8,92	524,77 ± 5,28	590,37 ± 15,61	479,57 ± 2,91	549,11 ± 7,54	492,32 ± 2,60	
	IX	381,29 ± 8,16	541,46 ± 15,05	615,40 ± 6,69	646,00 ± 8,57	537,29 ± 12,05	560,93 ± 5,74	
	X	257,98 ± 7,42	637,42 ± 7,41	646,23 ± 9,61	507,39 ± 6,56	520,83 ± 12,98	486,76 ± 5,68	
	XI	455,70 ± 9,11	678,22 ± 17,56	626,06 ± 4,03	613,08 ± 6,28	592,22 ± 16,55	543,55 ± 6,28	
	XII	525,24 ± 7,75	687,03 ± 8,92	677,99 ± 5,42	555,37 ± 9,20	593,61 ± 10,50	607,52 ± 12,51	
	XIII	212,78 ± 1,50	577,62 ± 8,08	577,62 ± 2,15	474,24 ± 10,52	504,84 ± 8,36	488,38 ± 1,99	
	XIV	460,33 ± 14,23	646,23 ± 2,29	668,71 ± 11,49	531,49 ± 8,98	578,08 ± 6,02	539,14 ± 9,37	
	XV	501,59 ± 5,12	676,83 ± 16,55	632,79 ± 15,25	557,92 ± 15,20	574,14 ± 9,66	553,98 ± 9,79	
	XVI	115,20 ± 5,09	457,32 ± 7,67	579,01 ± 8,82	527,32 ± 10,50	551,20 ± 6,25	559,31 ± 3,65	
	XXI	296,69 ± 15,42	538,45 ± 8,62	513,18 ± 5,98	503,45 ± 9,29	473,55 ± 15,83	446,20 ± 18,37	
	XXII	332,85 ± 2,68	524,77 ± 9,51	521,06 ± 15,92	490,00 ± 12,25	471,00 ± 6,65	437,39 ± 5,76	
	XXVIII	76,95 ± 7,56	348,38 ± 8,52	464,28 ± 4,73	460,10 ± 10,35	431,82 ± 20,78	441,79 ± 8,27	
	XXIX	384,31 ± 8,43	551,43 ± 7,68	539,38 ± 10,87	511,79 ± 8,57	455,93 ± 10,50	499,51 ± 13,51	
	Średnia Gleba gliniasta		298,94 ± 8,20	551,22 ± 10,66	569,31 ± 10,31	526,92 ± 9,51	534,37 ± 12,41	536,34 ± 9,86

c.d. Tabeli S6.

		Jony amonowe [$\mu\text{g NH}_4^+ \text{ cm}^{-3}$]						
Gleba	Szczep	Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Czarnoziem	XVII	219,04 ± 7,11	622,82 ± 6,56	634,41 ± 2,91	523,38 ± 3,65	570,90 ± 8,25	538,68 ± 6,46	
	XVIII	338,41 ± 7,62	610,30 ± 8,16	601,73 ± 7,19	554,21 ± 7,89	535,43 ± 4,65	521,99 ± 9,02	
	XIX	174,31 ± 13,45	554,21 ± 7,89	545,63 ± 13,16	511,56 ± 12,34	524,54 ± 5,28	483,05 ± 16,75	
	XX	287,88 ± 5,93	601,26 ± 6,33	628,61 ± 6,32	549,81 ± 6,63	519,44 ± 7,42	488,38 ± 3,13	
	XXIII	358,81 ± 8,57	502,29 ± 6,07	477,26 ± 8,43	484,90 ± 6,12	440,17 ± 7,64	445,04 ± 5,93	
	XXIV	232,72 ± 7,56	508,08 ± 7,41	510,17 ± 2,80	480,04 ± 10,10	463,35 ± 7,71	439,47 ± 1,50	
	XXV	236,89 ± 2,36	514,34 ± 3,65	488,15 ± 3,93	459,18 ± 12,25	436,46 ± 7,73	413,98 ± 15,42	
	XXVI	312,45 ± 12,91	490,00 ± 4,41	469,84 ± 3,47	475,17 ± 6,23	433,70 ± 11,15	432,29 ± 16,23	
	XXVII	544,71 ± 10,30	623,52 ± 8,21	507,16 ± 7,75	521,06 ± 6,63	494,18 ± 7,62	484,21 ± 4,26	
	XXX	320,33 ± 5,28	509,94 ± 14,20	496,26 ± 5,80	466,13 ± 7,56	464,97 ± 8,82	457,32 ± 0,87	
	XXXI	180,80 ± 9,85	503,22 ± 6,28	526,16 ± 8,87	484,90 ± 15,34	497,19 ± 11,08	462,42 ± 18,84	
	XXXII	298,78 ± 9,87	487,45 ± 20,21	500,20 ± 11,94	483,28 ± 3,45	451,06 ± 11,07	430,90 ± 5,40	
	XXXIII	294,84 ± 8,81	481,43 ± 4,59	516,43 ± 11,07	501,83 ± 7,01	483,05 ± 4,96	464,04 ± 2,80	
	XXXIV	294,61 ± 7,10	484,67 ± 11,80	478,65 ± 17,38	416,76 ± 6,58	389,18 ± 7,10	421,16 ± 10,72	
	XXXV	286,96 ± 21,07	502,06 ± 8,19	494,18 ± 0,87	477,02 ± 0,57	468,45 ± 7,19	465,20 ± 5,98	
	XXXVI	297,85 ± 4,26	481,89 ± 10,41	449,90 ± 8,40	437,39 ± 9,01	443,65 ± 2,05	442,95 ± 4,09	
	XXXVII	313,84 ± 9,37	486,06 ± 7,09	467,29 ± 13,35	477,72 ± 13,94	465,20 ± 6,55	456,39 ± 4,34	
	Średnia Czarnoziem		293,72 ± 8,91	527,27 ± 8,32	517,18 ± 7,86	488,49 ± 7,96	475,35 ± 7,43	461,62 ± 7,75
	Referencyjny	REF	322,88 ± 12,04	338,41 ± 10,96	314,77 ± 4,83	287,88 ± 7,11	288,81 ± 4,59	317,09 ± 13,06

Tabela S7. Dynamika zmian stężenia siarczanów podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Gleba	Szczep	Siarczany [mg SO ₄ ²⁻ cm ⁻³]						
		Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Gliniasta (Cambisol)	I	0,26 ± 0,02	0,87 ± 0,02	1,07 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,55 ± 0,02	
	II	0,16 ± 0,04	0,77 ± 0,04	0,97 ± 0,04	0,38 ± 0,04	0,48 ± 0,04	0,45 ± 0,04	
	III	0,32 ± 0,03	0,95 ± 0,02	1,15 ± 0,02	0,55 ± 0,03	0,66 ± 0,03	0,62 ± 0,02	
	IV	0,21 ± 0,01	0,82 ± 0,02	1,02 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,50 ± 0,02	
	V	0,35 ± 0,02	0,96 ± 0,04	1,16 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,67 ± 0,04	0,64 ± 0,03	
	VI	0,27 ± 0,03	0,88 ± 0,03	1,08 ± 0,01	0,49 ± 0,03	0,59 ± 0,03	0,56 ± 0,03	
	VII	0,27 ± 0,01	0,88 ± 0,01	1,08 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,59 ± 0,01	0,56 ± 0,01	
	VIII	0,22 ± 0,02	0,83 ± 0,02	1,03 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,55 ± 0,03	0,51 ± 0,02	
	IX	0,27 ± 0,04	0,88 ± 0,04	1,08 ± 0,04	0,49 ± 0,04	0,59 ± 0,04	0,56 ± 0,04	
	X	0,30 ± 0,03	1,19 ± 0,03	0,72 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,72 ± 0,01	
	XI	0,54 ± 0,03	0,96 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,47 ± 0,03	0,74 ± 0,01	
	XII	0,59 ± 0,04	0,96 ± 0,04	0,57 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,53 ± 0,02	0,79 ± 0,01	
	XIII	0,48 ± 0,02	0,77 ± 0,04	0,56 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,75 ± 0,02	1,01 ± 0,06	
	XIV	0,34 ± 0,03	1,00 ± 0,06	0,91 ± 0,01	0,31 ± 0,10	0,60 ± 0,02	0,97 ± 0,04	
	XV	0,42 ± 0,02	1,01 ± 0,03	0,66 ± 0,06	0,35 ± 0,04	0,71 ± 0,02	1,01 ± 0,08	
	XVI	0,14 ± 0,03	0,61 ± 0,03	0,80 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,59 ± 0,04	1,08 ± 0,03	
	XXI	0,41 ± 0,03	0,54 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,26 ± 0,02	
	XXII	0,45 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,59 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,28 ± 0,01	
	XXVIII	0,08 ± 0,01	0,47 ± 0,04	0,57 ± 0,04	0,52 ± 0,03	0,76 ± 0,01	0,62 ± 0,03	
	XXIX	0,36 ± 0,01	0,58 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,48 ± 0,01	0,78 ± 0,02	0,74 ± 0,04	
	Średnia Gleba gliniasta		0,32 ± 0,03	0,83 ± 0,03	0,84 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,66 ± 0,03

c.d. Tabeli S7.

Gleba	Szczep	Siarczany [mg SO ₄ ²⁻ cm ⁻³]						
		Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Czarnoziem	XVII	0,49 ± 0,02	0,78 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,34 ± 0,02	0,60 ± 0,05	0,89 ± 0,03	
	XVIII	0,44 ± 0,04	0,95 ± 0,06	0,82 ± 0,06	0,46 ± 0,01	0,61 ± 0,03	1,15 ± 0,06	
	XIX	0,23 ± 0,02	0,88 ± 0,02	0,62 ± 0,03	0,38 ± 0,03	0,75 ± 0,02	1,22 ± 0,01	
	XX	0,34 ± 0,02	0,95 ± 0,04	0,82 ± 0,01	0,59 ± 0,05	0,69 ± 0,04	1,19 ± 0,03	
	XXIII	0,47 ± 0,03	0,56 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,26 ± 0,01	
	XXIV	0,28 ± 0,02	0,77 ± 0,03	0,69 ± 0,03	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,31 ± 0,02	
	XXV	0,47 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,67 ± 0,03	0,35 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,30 ± 0,02	
	XXVI	0,47 ± 0,03	0,79 ± 0,02	0,70 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,36 ± 0,01	0,32 ± 0,02	
	XXVII	0,54 ± 0,03	0,53 ± 0,01	0,58 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,26 ± 0,02	
	XXX	0,41 ± 0,01	0,68 ± 0,04	0,85 ± 0,04	0,65 ± 0,01	1,08 ± 0,03	0,68 ± 0,02	
	XXXI	0,21 ± 0,01	0,79 ± 0,05	0,68 ± 0,05	0,56 ± 0,02	1,02 ± 0,05	0,67 ± 0,03	
	XXXII	0,45 ± 0,03	0,74 ± 0,01	0,84 ± 0,04	0,65 ± 0,02	1,09 ± 0,03	0,73 ± 0,02	
	XXXIII	0,19 ± 0,02	0,70 ± 0,04	0,87 ± 0,02	0,67 ± 0,04	1,07 ± 0,03	0,71 ± 0,04	
	XXXIV	0,40 ± 0,02	1,15 ± 0,05	0,92 ± 0,05	0,67 ± 0,01	1,16 ± 0,03	0,69 ± 0,01	
	XXXV	0,38 ± 0,01	1,06 ± 0,04	0,62 ± 0,02	0,61 ± 0,04	1,03 ± 0,03	0,70 ± 0,02	
	XXXVI	0,42 ± 0,03	0,85 ± 0,08	0,82 ± 0,06	0,67 ± 0,01	1,24 ± 0,02	0,74 ± 0,02	
	XXXVII	0,32 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,83 ± 0,03	0,53 ± 0,02	1,11 ± 0,04	0,59 ± 0,01	
	Średnia Czarnoziem		0,38 ± 0,02	0,78 ± 0,03	0,73 ± 0,03	0,49 ± 0,02	0,77 ± 0,03	0,67 ± 0,02
	Referencyjny	REF	0,49 ± 0,06	1,20 ± 0,03	1,08 ± 0,03	0,83 ± 0,02	1,40 ± 0,03	1,03 ± 0,04

Tabela S8. Dynamika zmian pH podczas keratynolizy piór kurzych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z gleb uprawnych.

Gleba	Szczep	pH [-log ₁₀ [H ⁺]]						
		Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Gliniasta (Cambisol)	I	7,66 ± 0,07	8,85 ± 0,06	8,82 ± 0,05	8,59 ± 0,02	8,51 ± 0,03	8,41 ± 0,03	
	II	7,33 ± 0,11	8,82 ± 0,02	8,78 ± 0,06	8,56 ± 0,06	8,45 ± 0,04	8,29 ± 0,08	
	III	7,81 ± 0,13	8,90 ± 0,04	8,77 ± 0,01	8,57 ± 0,02	8,39 ± 0,01	8,47 ± 0,14	
	IV	7,69 ± 0,11	8,83 ± 0,02	8,69 ± 0,05	8,51 ± 0,05	8,38 ± 0,08	8,37 ± 0,05	
	V	7,67 ± 0,10	8,79 ± 0,02	8,83 ± 0,01	8,66 ± 0,01	8,58 ± 0,01	8,52 ± 0,05	
	VI	6,38 ± 0,04	7,10 ± 0,02	8,10 ± 0,10	8,51 ± 0,05	8,59 ± 0,03	8,50 ± 0,04	
	VII	6,92 ± 0,08	8,60 ± 0,07	8,75 ± 0,01	8,62 ± 0,01	8,52 ± 0,01	8,36 ± 0,02	
	VIII	7,61 ± 0,02	8,76 ± 0,03	8,78 ± 0,02	8,59 ± 0,01	8,44 ± 0,02	8,40 ± 0,08	
	IX	7,17 ± 0,03	8,81 ± 0,01	8,83 ± 0,04	8,66 ± 0,01	8,57 ± 0,05	8,44 ± 0,05	
	X	7,88 ± 0,14	8,74 ± 0,03	8,57 ± 0,01	8,79 ± 0,11	8,54 ± 0,04	8,37 ± 0,06	
	XI	8,41 ± 0,09	8,78 ± 0,01	8,65 ± 0,02	8,80 ± 0,07	8,63 ± 0,02	8,43 ± 0,03	
	XII	8,55 ± 0,01	8,79 ± 0,02	8,66 ± 0,13	8,71 ± 0,01	8,51 ± 0,02	8,38 ± 0,01	
	XIII	7,56 ± 0,15	8,64 ± 0,01	8,58 ± 0,05	8,77 ± 0,03	8,47 ± 0,05	8,44 ± 0,11	
	XIV	8,44 ± 0,06	8,78 ± 0,05	8,58 ± 0,05	8,82 ± 0,04	8,51 ± 0,04	8,36 ± 0,01	
	XV	8,43 ± 0,07	8,75 ± 0,01	8,66 ± 0,06	8,75 ± 0,11	8,49 ± 0,03	8,35 ± 0,08	
	XVI	7,04 ± 0,21	8,49 ± 0,06	8,51 ± 0,01	8,68 ± 0,06	8,60 ± 0,06	8,48 ± 0,11	
	XXI	7,93 ± 0,08	8,72 ± 0,07	8,83 ± 0,05	8,70 ± 0,05	8,54 ± 0,04	8,46 ± 0,05	
	XXII	8,16 ± 0,16	8,69 ± 0,05	8,81 ± 0,03	8,70 ± 0,02	8,58 ± 0,03	8,44 ± 0,04	
	XXVIII	6,87 ± 0,04	8,42 ± 0,03	8,75 ± 0,02	8,70 ± 0,04	8,60 ± 0,02	8,50 ± 0,04	
	XXIX	8,42 ± 0,05	8,81 ± 0,01	8,82 ± 0,02	8,65 ± 0,04	8,51 ± 0,04	8,41 ± 0,03	
	Średnia Gleba gliniasta		7,70 ± 0,09	8,65 ± 0,03	8,69 ± 0,04	8,67 ± 0,04	8,52 ± 0,04	8,42 ± 0,06

c.d. Tabeli S8.

Gleba	Szczep	pH [-log ₁₀ [H ⁺]]						
		Czas hodowli [dni]						
		7	14	21	28	35	42	
Czarnoziem	XVII	7,60 ± 0,01	8,68 ± 0,04	8,58 ± 0,01	8,95 ± 0,10	8,61 ± 0,03	8,48 ± 0,02	
	XVIII	8,18 ± 0,05	8,72 ± 0,02	8,62 ± 0,04	8,78 ± 0,04	8,59 ± 0,02	8,48 ± 0,02	
	XIX	7,34 ± 0,06	8,61 ± 0,01	8,57 ± 0,03	8,68 ± 0,04	8,53 ± 0,04	8,36 ± 0,02	
	XX	7,93 ± 0,15	8,61 ± 0,09	8,52 ± 0,04	8,71 ± 0,11	8,50 ± 0,11	8,37 ± 0,05	
	XXIII	8,29 ± 0,09	8,78 ± 0,02	8,77 ± 0,04	8,67 ± 0,03	8,57 ± 0,02	8,47 ± 0,03	
	XXIV	7,59 ± 0,09	8,69 ± 0,05	8,80 ± 0,03	8,66 ± 0,04	8,53 ± 0,06	8,40 ± 0,05	
	XXV	7,66 ± 0,08	8,65 ± 0,04	8,73 ± 0,07	8,63 ± 0,04	8,51 ± 0,05	8,37 ± 0,08	
	XXVI	8,00 ± 0,10	8,71 ± 0,03	8,79 ± 0,01	8,66 ± 0,01	8,54 ± 0,01	8,41 ± 0,02	
	XXVII	8,57 ± 0,06	8,84 ± 0,01	8,87 ± 0,02	8,68 ± 0,04	8,53 ± 0,03	8,40 ± 0,04	
	XXX	8,21 ± 0,05	8,77 ± 0,02	8,77 ± 0,02	8,64 ± 0,01	8,51 ± 0,03	8,42 ± 0,02	
	XXXI	7,47 ± 0,17	8,70 ± 0,05	8,80 ± 0,02	8,65 ± 0,03	8,56 ± 0,01	8,50 ± 0,02	
	XXXII	8,03 ± 0,04	8,74 ± 0,03	8,78 ± 0,02	8,65 ± 0,03	8,50 ± 0,01	8,45 ± 0,01	
	XXXIII	8,03 ± 0,28	8,73 ± 0,15	8,77 ± 0,11	8,64 ± 0,11	8,56 ± 0,10	8,38 ± 0,13	
	XXXIV	8,08 ± 0,01	8,73 ± 0,01	8,75 ± 0,02	8,60 ± 0,04	8,50 ± 0,03	8,39 ± 0,03	
	XXXV	8,11 ± 0,06	8,72 ± 0,02	8,76 ± 0,01	8,60 ± 0,03	8,50 ± 0,02	8,44 ± 0,05	
	XXXVI	8,07 ± 0,11	8,73 ± 0,02	8,77 ± 0,01	8,59 ± 0,01	8,46 ± 0,01	8,41 ± 0,01	
	XXXVII	8,20 ± 0,08	8,70 ± 0,05	8,77 ± 0,02	8,66 ± 0,01	8,53 ± 0,01	8,44 ± 0,04	
	Średnia Czarnoziem		7,96 ± 0,09	8,71 ± 0,04	8,73 ± 0,03	8,67 ± 0,04	8,53 ± 0,04	8,42 ± 0,04
	Referencyjny	REF	8,15 ± 0,02	8,70 ± 0,02	8,60 ± 0,02	8,62 ± 0,02	8,55 ± 0,03	8,49 ± 0,01

4. Publikacja 4 [P.4.]

- *Dobór warunków hodowli oraz składu podłoża hodowlanego przyspieszających przebieg procesu rozkładu pierza kurcząt przez wyselekcjonowane szczepy *Trichophyton ajelloi* oraz dostarczających produkt - bionawóz o wysokiej zawartości składników nawożeniowych. W ocenie poszczególnych optymalizowanych parametrów wykorzystywano aktywność enzymów odpowiedzialnych za rozkład piór, ubytek masy tych odpadów i zmiany pH podłoża hodowlanego oraz przede wszystkim zawartość organicznych i mineralnych produktów biodegradacji i biotransformacji azotu i siarki natywnej keratyny.*

[P.4.] Możejko, M., Bohacz, J., 2022. Optimization of conditions for feather waste biodegradation by geophilic *Trichophyton ajelloi* fungal strains towards further agricultural use. International Journal of Environmental Research and Public Health 19, 10858. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710858>

Wydajna mikrobiologiczna solubilizacja keratyny wymaga odpowiedniego, wysokoaktywnego szczepu mikroorganizmu, posiadającego odpowiedni system enzymatyczny, a także zoptymalizowanych warunków prowadzonej hodowli (Liang i in. 2011; Li 2021).

Przeprowadzona w niniejszej pracy optymalizacja warunków hodowli grzybów dotyczyła najpierw wstępnej oceny optymalizacji temperatury wzrostu trzech wytypowanych szczepów *Trichophyton ajelloi* oznaczonych numerami III, XII i XIV, rosnących na dwóch podłożach różniących się stężeniem łatwo dostępnych źródeł węgla i energii, tj. na podłożu Sabourauda i podłożu maltozowym (MEA) oraz określenia uzdolnień hydrolitycznych badanych grzybów (Tabela 1).

Właściwa optymalizacja warunków hodowli i składu podłoża trzech w/w szczepów *Trichophyton ajelloi* dotyczyła zastosowania dodatkowego, łatwo dostępnego źródła węgla i energii (1% glukoza i 1% ksyloza), różnego stężenia piór (1,5% i 2,0%), różnej temperatury hodowli (20°C i 37°C), wyjściowego pH pożywki (6,5 i 8,5) oraz metody hodowli (wytrząsana, statyczna), co sprawdzano w odniesieniu do wyjściowych warunków hodowli obejmujących zastosowanie 1% piór jako jedyne źródła C, N, S i energii, temperatury 28°C, pH pożywki 4,5 i inkubacji w warunkach statycznych. Oceny optymalizacji warunków hodowli i składu podłoża dokonywano mierząc ubytek masy piór i alkalizację płynów pohodowlanych,

aktywność keratynazy, proteazy i słabo poznanej wśród grzybów reduktazy disiarczkowej, a także uwalnianie rozpuszczalnych białek i peptydów, aminokwasów mierzonych stężeniem grup aminowych i tiolowych oraz jonów amonowych i siarczanowych.

Wykazano, że wytypowane geofilne szczepy *Trichophyton ajelloi* w temperaturze 28°C charakteryzowały się o 24% lepszym wzrostem na pożywce Sabourauda bogatej w łatwo dostępne źródło C i energii niż na pożywce MEA oraz nie rosły w temperaturze 37°C i 50°C (Tabela 1). Wstępna ocena uzdolnień hydrolitycznych badanych szczepów *Trichophyton ajelloi*, opisana jako indeks enzymatyczny (I_E) wykazała, że grzyby te charakteryzują się silnymi uzdolnieniami do rozkładu białek, mniejszymi do rozkładu tłuszczu oraz brakiem właściwości amylolitycznych (Tabela 2). Na taką właściwość dermatofitów geofilnych wskazał także Kunert (2000), a Günyar i in. (2020) obserwowali podobne właściwości u grzyba *Chrysosporium keratinophilum*. Kunert (2000) ponadto stwierdził, że o ile uzdolnienia lipolityczne grzybów keratynolitycznych należą do powszechnych, to aktywność amylolityczna jest rzadko spotykana wśród tych grzybów.

Na podstawie uzyskanych wyników badań własnych stwierdzono, że ubytek masy piór, uznany za najbardziej miarodajny wskaźnik biodegradacji pierza kurcząt w optymalizowanych warunkach hodowli szczepów *Trichophyton ajelloi*, był najwyższy (59% utrata masy piór) w hodowlach statycznych z 2,0% dawką piór kurcząt jako jedynym źródłem C, N, S i energii o wyjściowym pH = 4,5 oraz temperaturze inkubacji 28°C (Tabela 4). Zużycie pierza przez *Trichophyton ajelloi* było zbliżone lub niższe w porównaniu do ubytku masy piór rozkładanych przez inne gatunki *keratinomycetes* badane przez Bohacz (2017b) oraz Bohacz i in. (2020a, b). Wykazali oni, że grzyby grupy *Chrysosporium*, tj. *Aphanoascus keratinophilus* i *Chrysosporium tropicum* wyizolowane z wypluwek ptaków drapieżnych oraz wyizolowany z gleby *Aphanoascus fulvescens* w ciągu 42 dni hodowli stacjonarnych na podłożu mineralnym, zawierającym pierze kurcząt, rozkładały 44 - 76% (szczepy z wypluwek) oraz 50 - 65% (szczepy glebowe) masy tego odpadu (Bohacz 2017b; Bohacz i in. 2020a, b).

Rozpatrując wpływ łatwo dostępnych źródeł węgla i energii na aktywność keratynazy i proteazy kazeinolitycznej w hodowlach wszystkich testowanych szczepów (szczepy nr III, XII i XIV) wykazano, że była ona wyższa w obecności glukozy niż ksylozy (Rysunek 1 i 7, Tabela S1). Podobne wyniki uzyskali Anbu i in. (2008), którzy wykazali wysoką aktywność keratynazy w hodowlach *Trichophyton* sp. HA-2 w obecności glukozy, ale całkowite jej zahamowanie w obecności ksylozy. Natomiast Kačínová i in. (2014) dowiedli, że wprowadzenie do podłoża hodowlanego łatwo przyswajalnego źródła węgla w dawce 1,0% stymuluje aktywność keratynolityczną *Trichophyton ajelloi*. Donoszono także (Anbu i in. 2007;

Mini i in. 2015), że aktywność keratynazy spada po wprowadzeniu obu tych cukrów do hodowli grzybów nie-keratynofilnych: *Aspergillus flavus* i *Scopulariopsis brevicaulis* na podłożu zawierającym pióra. Efekt ten Anbu i in. (2007) oraz Singh (2010) przypisują katabolicznej represji enzymów proteolitycznych przez pozakomórkowe węglowodany. Biorąc pod uwagę temperaturę hodowli grzybów w niniejszej pracy wykazano, że jej optimum dla aktywności keratynazy badanych szczepów *Trichophyton ajelloi* wynosiło 28°C (Rysunek 4 i 7, Tabela S4). Zbliżone optimum temperaturowe (30°C) dla maksymalnej aktywności keratynazy *Trichophyton ajelloi* stwierdziła wcześniej Kačínová i in. (2014), odnotowując jednocześnie wysoką jej produkcję w 37°C. Anbu i in. (2008) optymalną aktywność keratynazy bliżej niezidentyfikowanego szczepu *Trichophyton* sp. HA-2 notowali w nieznacznie niższej (35°C) temperaturze. Rozpatrując wpływ koncentracji poprodukcyjnego pierza kurcząt na wzmożenie uwalniania enzymów keratynolitycznych i proteolitycznych El-Ghonemy i Ali (2017) wykazali, że większej produkcji keratynazy i proteazy przez szczep *Aspergillus* sp. DHE7 sprzyjało zwiększenie koncentracji natywnej keratyny piór do 2,0%. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki są zbieżne z tymi danymi, gdyż wydzielaniu aktywnych keratynaz przez *Trichophyton ajelloi* także sprzyjało wyższe stężenie substratu (Rysunek 2 i 7, Tabela S2). Anbu i in. (2007) podają, że ekstremalnie niskie i wysokie pH, odpowiednio 4,5 i 11,0 nie sprzyja produkcji enzymów keratynolitycznych. Jako optymalne dla aktywności keratynazy *Trichophyton* sp. HA-2 Anbu i in. (2008) podają pH = 8,0. Nie jest to zbieżne z wynikami badań własnych, które wykazały, że aktywności keratynazy szczepów *Trichophyton ajelloi* najbardziej sprzyjało wyjściowe pH podłoża wynoszące 4,5 i temperatura inkubacji równa 28°C (Rysunek 3 i 7, Tabela S3). Wiadomo jednak, że *Trichophyton ajelloi* należy do grzybów acidofilnych, preferujących środowiska kwaśne (Hubálek 2000). Proces biodegradacji natywnej keratyny przez enzymy keratynolityczne, limitowany obecnością licznych wiązań disiarczkowych (mostki S-S), umożliwia aktywność reduktazy disiarczkowej, rozkładającej te połączenia (Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011; Łaba i in. 2013; Qiu i in. 2020). Jak podają Rahayu i in. (2012) reduktaza disiarczkowa współdziała synergistycznie z keratynazą, co prowadzi nie tylko do redukcji mostków disiarczkowych, ale także do uwalniania białek zawierających wiązania S-S. W literaturze przedmiotu są nieliczne informacje na temat wytwarzania reduktazy disiarczkowej przez grzyby keratynolityczne. Donoszą o tym Bhari i in. (2021), którzy podają, że reduktaza disiarczkowa jest wydzielana zarówno przez bakterie, promieniowce jak i grzyby keratynolityczne, a jej synteza jest indukowana obecnością substratu keratynowego.

Przeprowadzona w niniejszej pracy statystyczna analiza, wieloczynnikowa ANOVA dla wszystkich trzech badanych szczepów grzybów wykazała, że najbardziej optymalne warunki dla wysokiej aktywności proteazy występują na podłożu hodowlanym z dodatkiem 1% glukozy, 1,0% dawki piór kurcząt, pH = 4,5 w temperaturze inkubacji 28°C oraz bez dodatku glukozy, ale w temperaturze inkubacji 20°C (Rysunek 7, Tabela S1-S5). W tych ostatnich warunkach aktywność proteazy była wyższa, średnio o 79%, od aktywności tego enzymu w płynach pohodowlanych pobranych z hodowli inkubowanych w temperaturze 28°C i 37°C (Tabela S4). Optymalny skład podłoża i warunki hodowli dla aktywności keratynazy, istotnie różne od pozostałych optymalizowanych parametrów, uzyskano stosując hodowle z 1,0%, lub 2,0% koncentracją piór wzbogaconych glukozą, lub bez glukozy o wyjściowym pH = 4,5 i temperaturze inkubacji 28°C (Rysunek 7, Tabela S1-S5). Badane szczepy *Trichophyton ajelloi* syntetyzowały reduktazę disiarczkową, a produkcji tego enzymu sprzyjało wyjściowe pH podłoża równe 4,5, 1,0% stężenie piór i temperatura hodowli wynosząca 28°C (Rysunek 7, Tabela S1-S5).

Podczas biodegradacji natywnej keratyny piór do podłoża przechodzą organiczne i mineralne produkty rozkładu i biotransformacji azotu i siarki tych odpadów (Korniłłowicz-Kowalska 1997a, b; Bohacz 2017b). W obecnej pracy analizowano, rzadko podejmowany przez innych autorów, problem dotyczący oddziaływania różnych parametrów składu podłoża i warunków hodowli na efektywność uwalniania rozpuszczalnych białek i peptydów, aminokwasów oraz jonów amonowych i siarczanowych. Ustalono, że dynamika uwalniania tych bioproduktów była zróżnicowana w zależności od optymalizowanych parametrów, ale także rozpatrywanych wskaźników keratynolizy (Rysunek 1-6, Tabela S1-S5). Uwalnianie oraz nagromadzanie rozpuszczalnych białek i peptydów przebiegało wydajnie w hodowlach stacjonarnych, zawierających 1,0% piór, obecność prostych źródeł węgla, zwłaszcza ksylozy, pH = 4,5 (wyjściowe) i inkubowanych w 28°C. Zwiększenie koncentracji piór do 2,0% w obecności glukozy również przyczyniło się do nasilenia uwalniania łatwo hydrolizujących produktów biodegradacji N-organicznego piór (Rysunek 7). O ponad 2-krotnym wzroście stężenia produktów białkowych w hodowlach *Chrysosporium pannorum* i *Scopulariopsis brevicaulis* zawierających włosy i wzbogaconych glukożą, donosili Kaul i Sumbali (1997). Natomiast El-Ghonemy i Ali (2017) wzrost uwalniania białek podczas keratynolizy pierza odpadowego przez *Aspergillus* sp. DHE7 notowali wraz ze wzrostem stężenia tego substratu oraz temperatury do 37°C.

Rozpuszczalne białka i peptydy, powstałe podczas biodegradacji keratyny, mogą mieć zastosowanie w żywieniu zwierząt (Lasekan i in. 2013), a także w rolnictwie (Kumari i Kumar

2020) z uwagi na towarzyszącą białkom obecność aminokwasów. Näsholm i in. (2009) uważają bowiem, że aminokwasy mogą być przyswajane przez rośliny jako źródło N. Według Galarza i in. (2012) keratynazy podczas keratynolizy uczestniczą w uwalnianiu aminokwasów z wolną grupą tiolową i aminową. Z badań przeprowadzonych w niniejszej pracy wynika, że uwalnianie aminokwasów, oceniane na podstawie stężenia grup $-NH_2$ miało miejsce we wszystkich wariantach modyfikacji podłoża i warunków hodowli, ale najefektywniej przebiegało w hodowlach o wyjściowym pH = 6,5, zawierających 1,0% dawkę piór i inkubowanych w temperaturze 20°C i 28°C (Rysunek 1-5 i 7). Natomiast poziom grup tiolowych, odpowiadających uwalnianym aminokwasom siarkowym był najwyższy w hodowlach zawierających 2,0% piór, bez dodatku prostych cukrów, o pH = 4,5 i temperaturze inkubacji 28°C, a także hodowlach z 1,0% dawką piór ale wzbogaconych glukozą i inkubowanych w 37°C (Rysunek 1-5 i 7). Podobne obserwacje poczynili Mehta i in. (2014) w hodowlach bakterii rozkładających pióra.

Jak wynika z poprzedniej pracy [P.3.] kluczowym produktem mineralizacji N-amonowego odpadów pierza jest jon amonowy. Z badań przeprowadzonych w tej pracy [P.4.] wynika, że akumulacja jonów amonowych w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* była największa w podłożu wyjściowym z 1,0% zawartością piór, o pH = 4,5 i temperaturze inkubacji 28°C, co odpowiadało średniej koncentracji 585,00 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Maksimum uwalniania $N-NH_4^+$ oraz produkcji $S-SO_4^{2-}$ występowało, między 14 i 21 dniem biodegradacji natywnej keratyny piór przez grzyby (Rysunek 1-5 i 7, Tabela S1-S5). Nieznacznie różniące się maksima uwalniania $N-NH_4^+$ w hodowlach innych gatunków dermatofitów geofilnych (*Arthroderma multifidum* i *Arthroderma tuberculatum*) oraz grzybów z grupy *Chrysosporium* (*Aphanoascus keratinophilus* i *Chrysosporium articulatum*) odpowiednio w 28, oraz 12 - 14 dniu rozkładu piór uzyskała Bohacz (2017b) oraz Bohacz i in. (2020a, b) w doświadczeniach prowadzonych na podłożu z 1,0% stężeniem piór, o pH równym 6,5 i temperaturze inkubacji 28°C. Przyczyny tych niewielkich różnic w odniesieniu do wyników badań własnych dotyczących *Trichophyton ajelloi* należy upatrywać w zróżnicowaniu genetycznym grzybów keratynolitycznych. Wysoką akumulację jonów amonowych wykazano także podczas wzrostu badanych szczepów *Trichophyton ajelloi* w podłożu z 1% ksylozą oraz 1,0% i 2,0% koncentracją piór, a także inkubowanych w 20°C (Rysunek 7). We wszystkich analizowanych wariantach optymalizacji podłoża i warunków hodowli uwalnianie jonów amonowych powodowało alkalizację podłoża (Rysunek 6, Tabela 3). Podobny efekt uwarunkowany uwalnianiem amoniaku w hodowlach grzybów keratynolitycznych z grupy *Chrysosporium* i dermatofitów geofilnych obserwowali

wcześniej Kornilłowicz-Kowalska (1997a), Godheja i Shekhar (2014), Bohacz (2017b), a także Bohacz i in. (2020a, b).

Wielu autorów w badaniach nad procesem keratynolizy wykazało, że końcowym produktem transformacji S-keratyny zarówno w hodowlach grzybów (Rajak i in. 1991; Kornilłowicz-Kowalska 1997a, b; Kunert 2000; Bohacz 2017b) jak i bakterii (Łaba i in. 2013) oraz promieniowców są siarczany, których zawartość w podłożu wzrasta w miarę wydłużania czasu hodowli. Z badań własnych wynika, że akumulacja jonów siarczanowych miała miejsce we wszystkich wariantach hodowlanych (z wyjątkiem temperatury 37°C), w szczególności w wariacie z 2,0% dodatkiem pierza kurcząt do podłoża, wyjściowym pH pożywki 4,5 oraz inkubowanym w 28°C (Rysunek 1-5 i 7).

Porównanie efektywności badanych 3 szczepów *Trichophyton ajelloi* w zależności od analizowanych wskaźników aktywności keratynolitycznej, przeprowadzone z zastosowaniem wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), wskazało na istotne różnice między nimi. Istotnie różną ($\alpha = 0,05$), od pozostałych szczepów oraz najwyższą aktywnością proteazy i keratynazy w zoptymalizowanych warunkach keratynolizy cechował się szczep nr III (Tabela 6). Nagromadzenie dużych stężeń rozpuszczalnych białek oraz peptydów i aminokwasów (mierzonych poziomem grup $-NH_2$ i $-SH$) było natomiast istotnie różne dla hodowli szczepu III i XIV. Z kolei najwyższe, istotnie różne od pozostałych szczepów uwalnianie jonów amonowych i wydzielanie siarczanów w większości optymalizowanych warunków hodowlanych dotyczyło szczepu nr XII, co wskazywało, że był to szczep o najwyższym potencjale mineralizacyjnym (Tabela 6). Stało się to podstawą do wskazania tego szczepu do otrzymywania hydrolizatów z piór odpadowych o walorach bionawożeniowych. Według Näsholm i in. (2009) także aminokwasy mogą być pobierane przez rośliny i wykorzystane jako źródło azotu. Pozwala to także sądzić, że ich obecność w hydrolizatach z piór, oprócz mineralnych form azotu i siarki, ma wpływ na wartość nawozową tych preparatów.

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza składu ilościowo-jakościowego aminokwasów, w hydrolizatach piór z 18-dniowych hodowli testowanych wariantów składu podłoża i warunków inkubacji ujawniła 18 aminokwasów, wśród których najwyższe stężenie wykazywał tryptofan. Wyjątek stanowił hydrolizat (płyn pohodowlany) otrzymany z hodowli *Trichophyton ajelloi* (szczep nr III) wzbogaconych 1% glukozą, w których najwyższe stężenie wykazywała prolina. Najwyższe stężenie tryptofanu, ale także metioniny stwierdzono w hydrolizacie otrzymanym z hodowli wzbogaconych 1% ksylozą. Obok wymienionych aminokwasów w analizowanych płynach pohodowlanych zidentyfikowano także znaczne ilości asparagianu oraz aminokwasów siarkowych, oznaczanych jako kwas cysteinowy. Ten ostatni

aminokwas był w największych ilościach uwalniany podczas hodowli *Trichophyton ajelloi* w 20°C. Wytrząsanie hodowli zwiększyło natomiast poziom izoleucyny i histydy. Pula uzyskanych aminokwasów była największa w hydrolizatach inkubowanych w 37°C, a najmniejsza w hodowlach prowadzonych w 20°C (Tabela 5).

5. Publikacja 5 [P.5.]

- *Zbadanie oddziaływania hydrolizatów keratynowych pochodzących z rozkładu odpadów pierza kurcząt przez szczep *Trichophyton ajelloi*, o największych uzdolnieniach do mineralizacji N-organicznego i S-organicznej keratyny piór, na proces kiełkowania i wzrost roślin wrażliwych na niedobór siarki oraz stan funkcjonalny gleby, oceniany na podstawie wskaźników mikrobiologicznych, enzymatycznych i biochemicznych oraz niektórych właściwości chemicznych gleby.*

[P.5.] Możejko, M., Bohacz, J., 2023. Effect of keratin hydrolysates obtained from feather decomposition by *Trichophyton ajelloi* on plant germination, growth and biological activity of selected arable soils under model conditions. *Agronomy* 13, 187.

<https://doi.org/10.3390/agronomy13010187>

Otrzymany na drodze biodegradacji keratyny pierza przez szczep XII *Trichophyton ajelloi* hydrolizat keratynowy, oceniano w doświadczalnym układzie modelowym pod kątem fitotoksycznego działania na wybrane rośliny siarkolubne oraz wpływu na aktywność biologiczną gleby, mierzoną na podstawie liczebności różnych grup drobnoustrojów, aktywności biochemicznej i enzymatycznej, a także oddziaływania na przyrost biomasy roślin.

Na podstawie uzyskanych wyników badań dotyczących siły kiełkowania (Z_K) nasion stwierdzono, że hydrolizat keratynowy zarówno w formie nierozcieńczonej jak i rozcieńczonej (1:2) stymulował kiełkowanie nasion roślin testowych: *Lepidium sativum* L. (pieprzyca siewna) oraz *Brassica napus* L. var. *napus* (rzepak) w próbkach 3 badanych gleb (piaszczystej - Cambisol I, gliniastej - Cambisol II i czarnoziemie) (Tabela 1). W przeciwieństwie do hydrolizatów nierozcieńczonych, trzykrotnie rozcieńczone hydrolizaty pobudzały wzrost korzenia i pędu *Lepidium sativum* L. i *Brassica napus* L. var. *napus* w czarnoziemie, *Lepidium sativum* L. w glebie gliniastej (Cambisol II) oraz *Brassica napus* L. var. *napus* w glebie piaszczystej (Cambisol I) (Tabela 1). Efekt ten należy wiązać z obecnością produktów hydrolizy piór w postaci rozpuszczalnych białek, peptydów i aminokwasów, o czym wiadomo z badań Bhavsar i in. (2016). Natomiast hamowanie wzrostu roślin testowych przez hydrolizaty

nierozcieńczone należy przypisywać zbyt wysokiemu stężeniu osmotycznie czynnych składników hydrolizatów. Bhavsar i in. (2016) podają, że nierozcieńczone hydrolizaty ograniczają kiełkowanie nasion z powodu zbyt wysokiego ciśnienia osmotycznego. O stymulującym wpływie, zwłaszcza w większych dawkach, hydrolizatu keratynowego otrzymanego na drodze alkalicznej hydrolizy wełny owczej na kiełkowanie i wzrost rajgrasu, donosili Nustorova i in. 2006. Bhavsar i in. (2016) wykazali, że rozcieńczony hydrolizat wełny, uzyskany na drodze hydrotermicznej nie oddziaływał fitotoksycznie na kiełkowanie nasion *Lepidium sativum* L. Gousterova i in. (2011) stosując dogłębowo hydrolizat otrzymany przez rozkład pierza w hodowlach promieniowca *Thermoactinomyces* wykazali stymulację kiełkowania nasion życicy (*Lolium* L.) przy niższych oraz hamowanie przy wyższych jego stężeniach. Jain i in. (2016) uzyskali kiełkowanie nasion pszenicy w obecności wszystkich zastosowanych dawek hydrolizatu, otrzymanego po biodegradacji pierza przez promieniowca GS1322 *Streptomyces sampsonii*.

Biorąc pod uwagę wartość indeksu kiełkowania (ang. Germination Index), określającego brak lub obecność fitotoksycznego oddziaływania nawozów organicznych lub organiczno-mineralnych, w niniejszej pracy wykazano, że tylko nierozcieńczone hydrolizaty wprowadzone do gleby piaszczystej (Cambisol I) osiągały wartości G_I poniżej 80% (Tabela 1), wskazujące na oddziaływanie fitotoksyczne, zgodnie z interpretacją zaproponowaną dla kompostów przez Zucconi i in. (1981). W przypadku rozcieńczonych hydrolizatów, wartości indeksu kiełkowania (G_I) przekraczały 80% (Tabela 1) wskazując na brak fitotoksycznego oddziaływania. Stwierdzono przy tym, że indeks kiełkowania osiągał wyższe wartości wobec *Brassica napus* L. var. *napus* niż *Lepidium sativum* L., tj. odpowiednio 101,63 oraz 82,24 w glebie piaszczystej, natomiast 126,55 oraz 113,95 w czarnoziemiu (Tabela 1). Wyliczenia średniego stosunku długości korzenia do długości pędu (K:P), którego właściwa wartość powinna wynosić około 1,0 (Czop i in. 2016) wskazywały na zaburzenie między przyrostem korzeni i pędu rzepaku (K:P = 2,71) pod wpływem rozcieńczonego hydrolizatu wprowadzonego do gleby gliniastej (Cambisol II). W przypadku gleb: piaszczystej i czarnoziemiu stosunek K:P wskazywał na mniejsze dysproporcje we wzroście korzeni i pędu tej rośliny (Tabela 1).

Przeprowadzona w niniejszej części pracy ocena oddziaływania hydrolizatu keratynowego na kiełkowanie i początkowy wzrost roślin w trzech glebach: piaszczystej, gliniastej i czarnoziemiu zdecydowała o wskazaniu dwóch z nich, tj. gleby piaszczystej i czarnoziemiu do dalszych badań, przewidzianych dla określenia wpływu tych hydrolizatów na aktywność biologiczną gleby oraz plon zielonej masy roślin. Na wytypowanie tych dwóch gleb miały także wpływ różnice we właściwościach fizyko-chemicznych.

Aktywność biologiczna gleb mierzona na podstawie szeregu parametrów mikrobiologicznych, enzymatycznych i biochemicznych jest wyznacznikiem przemian substancji organicznej i związków mineralnych w glebie i ma wpływ na plon uprawianych roślin (Mocek-Płóćiniak 2010; Utobo i Tewari 2015; Jain i in. 2016; Joniec 2018). O znaczeniu mikroorganizmów w kształtowaniu żyzności gleb i ich wpływie na wzrost i plonowanie roślin donosiło wielu autorów (Bielińska i in. 2013; Wrońska i in. 2015).

Na podstawie wyników badań własnych uzyskanych w doświadczeniu modelowym stwierdzono, że ogólna liczebność bakterii w badanych glebach: piaszczystej (Cambisol I) i czarnoziemie, wzrastała wraz z czasem trwania doświadczenia. Uwidoczniło się to zarówno wariantach kontrolnych jak i z hydrolizatem (Rysunek 1, Tabela S1). Względem wariantów kontrolnych nawilżanych wodą, wprowadzony do gleby piaszczystej hydrolizat stymulował rozwój bakterii, średnio o 103% w wariacie bez obsady roślin (rzepak) i o 26% w wariacie z rzepakiem. W czarnoziemie hydrolizat spowodował zwiększenie liczebności bakterii o 19% w układzie z rzepakiem, a w kombinacji bez rzepaku wywoływał spadek liczebności bakterii o 7% (Rysunek 1, Tabela S1). Stwierdzono, że ogólna liczebność bakterii w czarnoziemie była istotnie ($\alpha = 0,05$) wyższa niż w glebie piaszczystej. Efekt ten dotyczył wszystkich kombinacji doświadczalnych i był widoczny przez cały okres prowadzenia doświadczenia. W przypadku ogólnej liczebności grzybów, pozytywny efekt oddziaływania hydrolizatu uwidocznił się w wariantach bez obsady roślin, powodując wzrost ich liczebności średnio na poziomie 22% w glebie piaszczystej i 131% w czarnoziemie. W dłuższej perspektywie czasowej liczebność grzybów po dodaniu hydrolizatu do gleby piaszczystej ulegała obniżeniu zarówno w wariacie z rośliną (o 32 %), jak i w wariacie bez rośliny (o 11%) (Rysunek 1, Tabela S1). W czarnoziemie ogólna liczebność grzybów, w wariantach kontrolnych i nawożonych hydrolizatem, była średnio niższa o 10% w stosunku do analogicznych wariantów założonych na glebie piaszczystej (Tabela S1). Liczebność drobnoustrojów proteolitycznych w glebie piaszczystej rosła, we wszystkich wariantach doświadczalnych, do 60 dnia trwania doświadczenia, z wyjątkiem wariantu z dodatkiem hydrolizatu i z obsadą rośliny testowej. Natomiast w czarnoziemie liczebność mikroorganizmów proteolitycznych we wszystkich wariantach doświadczalnych rosła do 30 dnia trwania doświadczenia, a następnie ulegała obniżeniu (Rysunek 1). W ogólnym ujęciu względem nienawożonych kontroli, wprowadzony do czarnoziemiu hydrolizat keratynowy ograniczał rozwój mikroorganizmów proteolitycznych, zarówno w układzie bez obsady jak i z obsadą rzepaku, odpowiednio o 6% i 38% (Rysunek 1, Tabela S1). Liczebność bakterii celulolitycznych we wszystkich badanych wariantach doświadczalnych istotnie ($\alpha = 0,05$) rosła w czasie, z wyjątkiem 30 dnia trwania doświadczenia

założonego na glebie piaszczystej z rośliną i bez rośliny. Stwierdzono też, że wprowadzenie hydrolizatu keratynowego korzystniej wpływało na bakterie celulołityczne zasiedlające czarnoziem niż glebę piaszczystą. W glebie tej liczebność bakterii celulołitycznych była istotnie wyższa o 171% w wariancie bez rzepaku i o 150% z rzepakiem (Rysunek 1, Tabela S1). Wzrost liczebności grzybów celulołitycznych we wszystkich wariantach doświadczalnych badanych gleb uwidocznił się w końcowym okresie trwania doświadczenia (Rysunek 1). Wykazano, że wprowadzenie hydrolizatu keratynowego skuteczniej stymulowało rozwój tych drobnoustrojów w glebie piaszczystej niż w czarnoziemiu (Rysunek 1, Tabela S1). Intensyfikacja wzrostu drobnoustrojów w czarnoziemiu wynikająca ze wzrostu liczebności, szczególnie bakterii celulołitycznych, zwłaszcza w wariancie z hydrolizatem dostarczającym łatwo przyswajalnego azotu najprawdopodobniej była uwarunkowana dużą zawartością węglowej substancji organicznej w tej glebie i związanym z tym nasileniem jej wykorzystania jako źródła C i energii. Stwierdzenie to podtrzymują doniesienia Nustorova i in. (2006) dotyczące oddziaływania hydrolizatu po biodegradacji wełny owczej na mikroorganizmy w glebie. Cytowani autorzy odnotowali stymulację liczebności mikroorganizmów w glebie w obecności tego preparatu oraz przyspieszenie biodegradacji i mineralizacji glebowej materii organicznej, przyczyniające się do wzrostu zawartości dostępnych składników pokarmowych, również dla roślin. Wyniki badań własnych wskazują na podobny przebieg przemian mikrobiologicznych substancji organicznej w glebie po wprowadzeniu hydrolizatu pierza kurcząt. Świadczył o tym spadek zawartości węgla organicznego w badanych glebach po wniesieniu tego wysokoazotowego preparatu, zwłaszcza w kombinacjach z rośliną (Tabela 4) oraz korelacje między liczebnością badanych grup drobnoustrojów, tj. bakterii ogółem, drobnoustrojów celulołitycznych i proteolitycznych oraz zawartością dsDNA, a aktywnością respiracyjną w próbkach analizowanych gleb (Rysunek 4, Tabela 5).

Wprowadzony do gleby hydrolizat keratynowy jest bogaty w niskocząsteczkowe organiczne oraz mineralne formy azotu i siarki. Wśród drobnoustrojów w wykorzystywaniu niskocząsteczkowych organicznych i nieorganicznych form tych pierwiastków bardziej efektywne są bakterie niż grzyby (Griffin 1973). W odniesieniu do niniejszych badań to stwierdzenie ma swoje przełożenie. Świadczy o tym stymulacja wzrostu bakterii ogółem, mikroorganizmów proteolitycznych i bakterii celulołitycznych przez pierwsze 30 dni trwania doświadczenia, po wprowadzeniu hydrolizatu keratynowego do obu badanych gleb (Rysunek 1, Tabela S1). Późniejszy spadek liczebności badanych grup bakterii, zwłaszcza w wariantach z rośliną, mógł być spowodowany wyczerpywaniem łatwo dostępnych związków węgla i azotu, zarówno przez drobnoustroje jak i rośliny. Na szczególną uwagę zasługuje stymulujący wpływ

hydrolizatu na liczebność bakterii celulolitycznych w czarnoziemiu, w przeciwieństwie do jego oddziaływania na liczebność tych bakterii w glebie piaszczystej (Rysunek 1, Tabela S1). Efekt ten najprawdopodobniej był związany z bardziej sprzyjającymi warunkami dla rozwoju tych bakterii, tj. większa zawartość substancji organicznej bogatej w celulozę sprzężona ze zwiększoną dostępnością azotu oraz wyższym pH gleby, sprzyjające wzrostowi tych drobnoustrojów celulolitycznych. Natomiast przeciwnie niż w czarnoziemiu, wyższa ogólna liczebność i stymulacja wzrostu grzybów w glebie piaszczystej po wprowadzeniu hydrolizatu (pierwszy miesiąc) była uwarunkowana niższym pH tej gleby, sprzyjającym rozwojowi tych drobnoustrojów. Obniżenie liczebności grzybów w obydwu glebach w późniejszym czasie (Rysunek 1, Tabela S1), zwłaszcza w glebie piaszczystej z obsadą roślin (rzepak), mogło być wywołane hamującym wzrost grzybów oddziaływaniem wydzielin korzeniowych rzepaku, zawierających substancje przeciwgrzybowe, lub obecnością w ryzosferze antagonistycznych wobec grzybów mikroorganizmów, syntetyzujących inhibitory wzrostu tych drobnoustrojów. Powyższą sugestię podtrzymują doniesienia wskazujące na hamowanie wzrostu grzybów przez wydzieliny korzeniowe rzepaku (Shreiner i Koide 1993; Yasumoto i in. 2011) oraz świadczące o indukcji biosyntezy toksycznych nitrozoamin, pod wpływem nawożenia azotem w wysokich dawkach (Smyk i in. 1989).

Wszystkie procesy przemian substancji organicznej oraz pierwiastków biogennych są katalizowane przez enzymy, a ich przebieg uwarunkowany jest aktywnością enzymów, co wpływa na dostępność składników pokarmowych dla roślin oraz kształtuje żyzność gleby (Bielińska i in. 2013).

Zhu i in. (2016) podają, że aktywność respiracyjna gleb jest pobudzana niskim poziomem azotu, a ograniczana jego wysoką zawartością. Potwierdzają to uzyskane w niniejszej pracy wyniki. Wskazują bowiem, że wysokoazotowy hydrolizat keratynowy spowodował okresowe (o różnym nasileniu) obniżenie wydzielania CO₂ w glebie piaszczystej, w wariacie bez rośliny i w czarnoziemiu w wariacie z rośliną i bez rośliny. W końcowym terminie analiz, tj. w 60 dniu trwania doświadczenia, kiedy zawartość hydrolizatu ulegała wyczerpaniu intensywność oddychania w obu glebach istotnie ($\alpha = 0,05$) wzrosła (Rysunek 2, Tabela S2). Jednak w porównaniu do niewzbogaconej hydrolizatem kontroli (bez rośliny i z rośliną) wprowadzenie hydrolizatu do gleby piaszczystej spowodowało nasilenie oddychania gleby wynoszące, średnio 97% w wariantach bez rzepaku i 37% w wariantach z rzepakiem (Tabela S2). W analogicznym układzie w czarnoziemiu obserwowano natomiast spadek wydzielania dwutlenku węgla po wzbogaceniu tym bionawozem keratynowym, odpowiednio o 34% i 11%

(Rysunek 2, Tabela S2). Tłumaczyć to można większą zawartością N ogólnego w tej glebie w porównaniu z glebą piaszczystą.

Dehydrogenazy należą do enzymów oddechowych, których aktywność jest przyjęta jako miernik intensywności procesów oddychania i mineralizacji substancji organicznej oraz jest uzależniona od dostępności substratów pokarmowych i pH środowiska wzrostu drobnoustrojów (Wolińska i Stępniewska 2012). Enzymy te odznaczają się niską aktywnością w glebach kwaśnych, natomiast wysoką w zasadowych (Wolińska i Stępniewska 2012). W niniejszych badaniach wykazano, że aktywność dehydrogenaz do 60 dnia trwania doświadczenia, we wszystkich wariantach ulegała stopniowemu, istotnemu statystycznie ($\alpha = 0,05$) zmniejszeniu, zarówno w glebie piaszczystej jak i w czarnoziemiu (Rysunek 2). Spadek aktywności tych enzymów w czarnoziemiu był silniejszy, co należy tłumaczyć silniejszym spadkiem pH tej gleby. Taką zależność potwierdzają wyniki analizy PCA, w której wykazano istotną zależność pomiędzy pH gleby, a aktywnością tego enzymu (Rysunek 4). Jednakże rozpatrując wpływ samego hydrolizatu na aktywność dehydrogenaz, w glebie piaszczystej w porównaniu do kontroli (warianty nawadniane wodą) wykazano jej stymulację: niewielką (o 2%) w wariantach bez obsady roślin i znaczną (o 27 %) w wariantach z obsadą roślin (Tabela S2). Natomiast w przypadku wprowadzenia hydrolizatu do czarnoziemiu nie stwierdzono nasilenia aktywności dehydrogenaz tylko jej spadek o 3% w wariantach bez obsady rzepaku i o 11% z tą rośliną (Rysunek 2, Tabela S2). Prawdopodobnie ze względu na ogólnie wyższą aktywność dehydrogenaz w tej glebie (co stwierdzono w pierwszych dniach doświadczenia) szybsze było także zużycie wniesionych z hydrolizatem prostych źródeł C i energii, będących substratem dla tych enzymów. Natomiast w glebie piaszczystej odznaczającej się ogólnie niską aktywnością dehydrogenaz poziom łatwo dostępnych substratów był nie tylko wystarczający, ale i zwiększający aktywność tych enzymów. Świadczyła o tym dodatnia, choć nieistotna korelacja między poziomem substancji organicznej, a aktywnością tego enzymu w kombinacji doświadczalnej wzbogaconej bionawozem (Tabela 5).

Proteazy należą do enzymów kluczowych w przemianach N organicznego, związanych z rozkładem białek do związków prostszych (Greenfield i in. 2021). W niniejszej pracy na ogół stwierdzano, że dodatek hydrolizatu do obu badanych gleb wywoływał spadek aktywności proteazy z wyjątkiem czarnoziemiu z obsadą rzepaku, gdzie zanotowano nieistotny wzrost aktywności tego enzymu (Rysunek 2). Szczególnie znaczny (43%) istotny spadek aktywności proteazy, spowodowany wniesieniem hydrolizatu, wystąpił po 60 dniach trwania doświadczenia założonego na glebie piaszczystej z obsadą rzepaku (Rysunek 2, Tabela S2). W ujęciu całościowym hydrolizat keratynowy wprowadzony do gleby powodował istotne ($\alpha =$

0,05) obniżenie aktywności proteazowej w porównaniu z kontrolą. W przypadku czarnoziem wynosiło ono 21% i 19% odpowiednio, w wariantach bez rzepaku i z rzepakiem. W glebie piaszczystej ten efekt był podobny i wynosił 21% w kombinacji z rośliną (Rysunek 2, Tabela S2). Jedynie w przypadku wariantu bez rośliny, odnotowano korzystne działanie hydrolizatu na aktywność proteaz, równoznaczne z niewielkim (o 4%) wzrostem ich średniej aktywności (Rysunek 2, Tabela S2). Jak podają Vranova i in. (2013) aktywność proteaz jest zależna zarówno od zawartości C organicznego jak i azotu. Obecność organicznych i mineralnych związków azotu w otrzymanym hydrolizacie determinowała więc aktywność tego enzymu. Odnotowany w omawianej pracy spadek aktywności proteazy (Rysunek 2) mógł być spowodowany represją kataboliczną pod wpływem prostych połączeń węglowych, uwalnianych w trakcie hydrolizy węglowej materii organicznej, natomiast stymulacja aktywności tego enzymu wtedy, gdy wyczerpują się łatwo dostępne źródła C organicznego. Niemniej ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za hamowanie aktywności proteazy po wprowadzeniu hydrolizatu keratynowego mogła być wysoka koncentracja jonów amonowych w tym preparacie, uznawanych (Vranova i in. 2013) za inhibitory biosyntezy proteaz mikroorganizmów glebowych. Wyczerpywanie substratów bogatych w C organiczny w glebie jest powiązane z procesami oddychania glebowego, mierzonego ilością wydzielonego CO₂. Vranova i in. (2013) wykazała wpływ wydzielania CO₂, jako wskaźnika aktywności oddechowej, na dynamikę aktywności proteaz. Wyczerpywanie przez drobnoustroje bogatych w węgiel organiczny związków stwarza konieczność wykorzystywania „gorszych” źródeł C organicznego, jakimi są organiczne połączenia azotu, co stymuluje wzrost aktywności proteazowej. Znajduje to potwierdzenie w niniejszych wynikach badań, w których aktywność proteazy spadała wtedy, gdy aktywność oddechowa rosła. Dowodzą tego wyniki analizy PCA, która ujawniła, że spadek aktywności proteazowej w badanych glebach był sprzężony ze wzrostem aktywności oddechowej i odwrotnie (Rysunek 4).

Do enzymów ważnych w funkcjonowaniu gleby oraz wzroście i rozwoju roślin należą fosfatazy, które uprzystępniają fosfor mikroorganizmom i korzeniom roślin ze źródeł bezpośrednio niedostępnych.

Enzymy te odgrywają istotną rolę w przemianach organicznych form fosforu w rozpuszczalne, nieorganiczne formy, przyswajalne przez rośliny i mikroorganizmy glebowe, a ich aktywność zależna jest przede wszystkim od pH gleby i od dostępności N (Bielińska 2005; Sun i in. 2020). W niniejszych badaniach wykazano, że w przeciągu pierwszych 30 dni prowadzenia doświadczenia, we wszystkich wariantach doświadczalnych w obu badanych

glebach, aktywność fosfatazy kwaśnej ulegała istotnemu statystycznie ($\alpha = 0,05$) osłabieniu, a po tym czasie wzrastała (Rysunek 2).

Ogólnie odnotowano, że wpływ hydrolizatu keratynowego na aktywność fosfatazy kwaśnej miał odmienny przebieg w glebie piaszczystej niż w czarnoziemiu. W przypadku gleby piaszczystej stwierdzono 6-procentową stymulację tego enzymu w wariancie bez rośliny, w porównaniu z nienawożoną kontrolą oraz 3-procentowy spadek jego aktywności, w wariancie z rośliną (Rysunek 2, Tabela S2). Natomiast wprowadzenie hydrolizatu keratynowego do czarnoziemiu bez obsady roślin, skutkowało obniżeniem aktywności fosfatazy kwaśnej o 7%, a w przypadku gleby z obsadą rzepaku wystąpił 7% wzrost aktywności tego enzymu (Rysunek 2, Tabela S2).

Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej po wprowadzeniu hydrolizatu do gleby piaszczystej bez rośliny i do czarnoziemiu z rośliną, można tłumaczyć zwiększaniem się łatwo dostępnych połączeń azotu. Caballero i in. (2020) wykazali, że dodatek do gleby zdenaturowanego pierza kurcząt zwiększał aktywność fosfatazy, co potwierdzało obserwowany w niniejszej pracy korzystny wpływ łatwo dostępnych połączeń N na aktywność fosfatazy kwaśnej. Obserwowany spadek aktywności fosfatazy kwaśnej, po wprowadzeniu hydrolizatu do gleby piaszczystej z rośliną oraz czarnoziemiu bez rośliny, mógł być z kolei spowodowany silniejszym obniżeniem pH w tych wariantach oraz szybszym wyczerpywaniem przyswajalnych związków N, co sugerowała obniżka poziomu N ogólnego (Tabela 4).

Aktywność fosfatazy zasadowej jest uznawana za bardzo dobry wskaźnik aktywności i wielkości populacji mikroorganizmów glebowych oraz czynnik wspierający fosfatazy kwaśne w udostępnianiu fosforu roślinom (Bielińska 2005; Chen i in. 2019). Uzyskane wyniki badań własnych wskazują na niższą aktywność tej fosfatazy, w porównaniu do aktywności fosfatazy kwaśnej (Rysunek 2, Tabela S2). W toku trwania doświadczenia aktywność fosfatazy alkalicznej miała zróżnicowany przebieg. W glebie piaszczystej hydrolizat keratynowy stymulował aktywność tego enzymu o 12% i 52%, odpowiednio w wariancie bez obsady i z obsadą rzepaku, względem nienawożonych wariantów kontrolnych, a w czarnoziemiu w analogicznych kombinacjach ograniczał aktywność tego enzymu odpowiednio o 26% i 9% (Rysunek 2, Tabela S2). Uzyskane wyniki nie znajdują jednoznacznego odniesienia w literaturze przedmiotu. Z badań Kwiatkowskiego i in. (2020) wynika, że nawozy organiczno-mineralne oddziałują negatywnie na aktywność fosfatazy zasadowej. Podobnie oddziałują nawozy czysto mineralne, o czym donosili Chang i in. (2007). W świetle wyników badań własnych wydaje się, że wpływ mineralno-organicznego hydrolizatu pierza na aktywność

fosfatazy alkalicznej był zależny przede wszystkim od parametrów fizyko-chemicznych gleby (Tabela 5).

Wśród wskaźników dotyczących oddziaływania hydrolizatu keratynowego na aktywność biologiczną gleby, uwzględniono także poziom dsDNA. Ogólnie odnotowano, że w całym okresie badawczym, zarówno w glebie piaszczystej jak i czarnoziemie ilość dsDNA istotnie rosła ($\alpha = 0,05$) we wszystkich wariantach doświadczalnych, z wyjątkiem gleby piaszczystej bez obsady rzepaku (kontrola 1), w której zanotowano nieistotny spadek stężenia dsDNA w 30 dniu badań (Rysunek 3). Stwierdzono, że hydrolizat keratynowy silniej stymulował wzrost stężenia dsDNA w glebie piaszczystej niż czarnoziemie. Średni, istotny przyrost zawartości dsDNA w tej glebie wynosił 23% i 15%, odpowiednio w wariantcie bez obsady i z obsadą rzepaku (Tabela S3). W czarnoziemie wpływ hydrolizatu na zawartość dsDNA był słabszy. Spowodował on jedynie 8% wzrost całkowitej puli dsDNA w wariantcie bez rośliny, a w wariantcie z rośliną (względem wariantów kontrolnych) jego 9% spadek (Rysunek 3, Tabela S3).

Wymiernym efektem wpływu hydrolizatu keratynowego jest plon masy roślinnej. Wykazano, że hydrolizat zastosowany do gleby piaszczystej i czarnoziemiu spowodował prawie 2-krotny wzrost biomasy rzepaku (Tabela 2). Podobne wyniki, wykazujące wzrost biomasy *Lolium perenne* L. oraz *Vigna radiata* L., uzyskali inni autorzy po wprowadzeniu hydrolizatu otrzymanego po chemicznej i biologicznej transformacji pierza (Nustorova i in. 2006; Kaur i in. 2021).

Obok badań dotyczących oceny oddziaływania hydrolizatu keratynowego na aktywność biologiczną gleby oraz przyrost biomasy roślin (rzepak), w prezentowanej pracy śledzono zmiany zawartości kluczowych dla drobnoustrojów i wzrostu roślin parametrów chemicznych (Tabela 4).

Stwierdzono, że pH w obu badanych glebach we wszystkich kombinacjach, czyli zawierających hydrolizat keratynowy i nie wzbogaconych tym preparatem, na ogół podlegało istotnemu ($\alpha = 0,05$) spadkowi, za wyjątkiem 30 dnia doświadczenia założonego na glebie piaszczystej (Tabela 3). W pierwszych 3 dniach od wprowadzenia hydrolizatu keratynowego, w glebie piaszczystej nastąpił wzrost pH w stosunku do kontroli (kontrola 1 i 2), natomiast w czarnoziemie jego spadek (Tabela 3). Jednakże, w dłuższym okresie czasu, co szczególnie uwidoczniło się po 2 miesiącach trwania doświadczenia w obu badanych glebach, zarówno w wariantcie wzbogaconym jak i niewzbogaconym hydrolizatem keratynowym, pH gleby ulegało obniżeniu. Spadek pH (wartości średnie) po wprowadzeniu hydrolizatu był statystycznie istotny

jedynie w czarnoziemiu (obie kombinacje, tj. z rośliną i bez rośliny). W przypadku gleby piaszczystej korelacja ta była nieistotna (Tabela 3).

Jak podaje Borymski (2019) przyczyną obniżania pH gleby obok wytwarzanego podczas oddychania korzeni kwasu węglowego, wydzielania kwasów organicznych przez korzenie i drobnoustroje podczas rozkładu materii organicznej w glebie, jest także pobieranie jonów amonowych i wymiana jonowa. Dane te pozwalają sądzić, że wprowadzenie do badanych gleb hydrolizatu pierza, zawierającego duże ilości jonów amonowych mogło aktywizować pobieranie tych jonów przez drobnoustroje i rośliny oraz nasilać nityfikację. Przypuszczenie to znajduje potwierdzenie w zmniejszeniu zawartości azotu ogólnego w wariantach z rzepakiem w obu badanych glebach (Tabela 4). W konsekwencji powodowałyby to zwiększenie nie tylko zakwaszenia gleby, ale i rozwoju wielu populacji mikroorganizmów glebowych. Sprzężenie, między obniżeniem pH oraz wzrostem liczebności większości badanych grup drobnoustrojów w poszczególnych kombinacjach doświadczalnych ujawniła analiza PCA (Rysunek 4). Obok tego, jak wynika z analizy korelacji liniowej r-Pearsona zakwaszenie gleby mogło mieć także wpływ na zwiększenie dostępności fosforu. Wykazano bowiem istotnie ujemną korelację pomiędzy pH, a zawartością P przyswajalnego we wszystkich wariantach doświadczalnych (Tabela 5). Pierwiastek ten (Ahemad i in. 2009) jest niezbędny do prawidłowego rozwoju wegetatywnych i generatywnych organów rośliny. Obok połączeń organicznych, fosfor w glebie występuje w postaci nieorganicznych i nierozpuszczalnych dla roślin soli, tj. fosforanów żelaza, wapnia, czy glinu. Do uwalniania fosforu z tych niedostępnych dla roślin źródeł przyczyniają się drobnoustroje, poprzez produkcję, m.in. kwasów organicznych, czy sideroforów, tj. związków kompleksujących żelazo (Kurek i Jaroszuk 1993; Hartmann i in. 2009; Borymski 2019). Z badań przeprowadzonych w niniejszej pracy wynika, że zawartość fosforu przyswajalnego była istotnie skorelowana z ogólną pulą dsDNA, która była (średnio) wyższa po wzbogaceniu badanych gleb hydrolizatem keratynowym (Tabela 5). Szczególnie wysoką zawartość P przyswajalnego w obu badanych glebach, stwierdzono pod koniec doświadczenia w wariantach z hydrolizatem i obsadą roślin (Tabela 4). Zjawisko to może świadczyć o uwalnianiu fosforu z niedostępnych źródeł i stymulacji ogólnej puli mikroorganizmów glebowych.

Przeprowadzona analiza korelacji, celem uchwycenia zależności między parametrami mikrobiologicznymi, enzymatycznymi i chemicznymi wskazała, że wprowadzony doglebowo hydrolizat keratynowy zwiększał aktywność biologiczną badanych gleb, przyczyniając się do nasilenia związków z nią przemian C organicznego oraz N, P i K w glebie, zwłaszcza piaszczystej (Cambisol I). Wyrażało się to zwiększeniem liczby istotnych korelacji, między

liczebnością badanych grup drobnoustrojów, aktywnością enzymów związanych z przemianami organicznych połączeń węgla, azotu i fosforu, a parametrami chemicznymi, tj. C-organicznym, N-ogólnym i P-przyswajalnym (Tabela 5). Przeprowadzona analiza korelacji w szczególności dowiodła, że najbardziej znaczący, istotny ($\alpha = 0,05$) wpływ na biochemiczne i mikrobiologiczne wskaźniki nienawożonych i nawożonych hydrolizatem gleb: piaszczystej i czarnoziemu wywierał fosfor (Rysunek 4, Tabela 5). Ponadto, w przypadku obu gleb dodatek hydrolizowanego pierza wzmacniał ujemną korelację między zasobnością gleby w przyswajalny fosfor, a pH, przyczyniając się do zwiększenia jego dostępności (Tabela 4).

V. Ważniejsze wyniki i wnioski

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy podjęto ze względu na wzrastające w ostatnich latach zainteresowanie stosowaniem w uprawie roślin bezpiecznych dla środowiska biopreparatów mikrobiologicznych oraz nielicznych danych literaturowych dotyczących pozyskiwania takich biopreparatów na drodze zagospodarowania odpadowego pierza z udziałem grzybów keratynolitycznych.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników badań sformułowano ogólne stwierdzenia i wnioski:

1. Przeprowadzone w przedstawionym opracowaniu badania, stanowiące cykl powiązanych tematycznie i wynikających z siebie publikacji potwierdziły nadrzędnie postawioną hipotezę badawczą, zakładającą zależność pomiędzy licznym występowaniem grzybów keratynofilnych w glebach uprawnych, a ich wysoką aktywnością keratynolityczną. Przedłożyło się to na realne podstawy służące wykorzystaniu wybranych szczepów tych grzybów dla celów przetwarzania odpadowej natywnej keratyny piór w wysokoazotowe i wysokosiarkowe hydrolizaty keratynowe, które następnie poddano ocenie, w doświadczeniu modelowym, pod kątem wpływu na wzrost roślin o wysokim zapotrzebowaniu na te składniki oraz jako środki poprawiające aktywność biologiczną gleb.
2. Uzyskane wyniki badań potwierdziły także postawioną pierwszą szczegółową hipotezę badawczą, gdyż wykazały powiązanie występowania grzybów keratynofilnych z różnymi właściwościami fizyko-chemicznymi gleb, ze szczególnym uwzględnieniem słabo rozpoznanego składu granulometrycznego.
3. Stosując rozdrobnione pióra kurcząt jako przynętę keratynową w próbkach czterech badanych gleb, tj. gleby I typu Cambisol umownie określonej jako gleba piaszczysta, gleby II typu Cambisol umownie określanej jako gleba gliniasta, czarnoziem (gleba III typu Chernozem) oraz gleby IV, typu Leptosol opisywanej jako rędzina, stwierdzono występowanie grzybów keratynofilnych i towarzyszących im grzybów niekeratynofilnych o gatunkowej przynależności i różnorodności uwarunkowanej typem gleby. Zgromadzony materiał szczepowy na podstawie cech fenotypowych sklasyfikowano do 5 rodzajów w obrębie 7 gatunków (grzyby keratynofilne), 19

rodzajów i 19 gatunków (grzyby nie-keratynofilne) oraz 7 rzędów Ascomycota: Capnodiales, Erysiphales, Eurotiales, Glomerellales, Hypocreales, Onygenales i Thelebolales oraz jednego (Mucorales) Zygomycota.

4. Występowaniu grzybów keratynofilnych jako grupy ekologiczno-fizjologicznej sprzyjały gleby o dużej zawartości frakcji pyłu ($\text{Ø} = 0,05 - 0,002 \text{ mm}$) i iłu ($\text{Ø} < 0,002 \text{ mm}$), a niskiej frakcji piasku ($\text{Ø} = 2,0 - 0,05 \text{ mm}$). Znalazło to odzwierciedlenie w parametrach wzrostu grzybów keratynofilnych, które były najsłabsze w glebie piaszczystej o najwyższej frakcji piasku i najniższej frakcji pyłu i iłu oraz najwyższe w czarnoziemiu odznaczającym się najniższą zawartością frakcji piasku oraz najwyższą pyłu i iłu.
5. Dominującymi gatunkami wśród keratynofilnych grzybów wytypowanych na podstawie wyliczonego współczynnika dominacji gatunkowej w glebie piaszczystej, gliniastej i czarnoziemiu był *Trichophyton ajelloi* z grupy dermatofitów geofilnych, natomiast w rędzinie *Ctenomyces serratus* z grupy Chrysosporium, a wśród grzybów nie-keratynofilnych *Metacordyceps chlamydosporia* w glebie gliniastej, czarnoziemiu i rędzinie. Za czynniki determinujące występowanie różnych dominujących gatunków grzybów keratynofilnych w badanych glebach uznano głównie pH tych gleb, zawartość węgla wapnia oraz frakcji granulometrycznych.
6. Wykazano, że frekwencja najliczniejszego wśród grzybów keratynofilnych gatunku, tj. *Trichophyton ajelloi* zależała głównie od pH gleb, zawartości kationów alkalicznych (magnezu i wapnia) oraz fosforu przyswajalnego i była wysoka w glebach o niskiej zawartości frakcji iłu. Gatunek ten wyraźnie dominował w glebach od silnie kwaśnych (piaszczysta) do kwaśnych (gliniasta i czarnoziem) pozbawionych CaCO_3 .
7. Wytypowane, spośród najliczniejszej populacji grzybów keratynofilnych, 37 szczepów *Trichophyton ajelloi* wykazywało uzdolnienia do biodegradacji odpadowego pierza kurcząt. Stwierdzono, że aktywność keratynolityczna tych szczepów zależała od typu gleby, z której pochodziły i ich właściwości fizjologicznych, co potwierdziło postawioną drugą szczegółową hipotezę badawczą.
8. Średnie wartości parametrów stanowiących wskaźniki aktywności keratynolitycznej grzybów, tj. aktywność proteazy, stężenie rozpuszczalnych białek, peptydów i

aminokwasów, mierzonych stężeniem grup aminowych oraz stężenie siarczanów były wyższe w hodowlach szczepów *Trichophyton ajelloi* wyizolowanych z czarnoziem niż z gleby gliniastej. W hodowlach szczepów wyizolowanych z gleby gliniastej wyższe średnie wartości dotyczyły takich wskaźników aktywności keratynolitycznej jak stężenie jonów amonowych, aktywność keratynazy, uwalnianie grup tiolowych i ubytek masy piór.

9. Intensywność procesu biodegradacji pierza przez szczepy grzybów *Trichophyton ajelloi* uwarunkowana była nie tylko pochodzeniem szczepów, ale także ich zdolnością do wydzielania pigmentu. Wykazano bowiem istotne różnice w aktywności keratynolitycznej (mierzonej na podstawie większości wskaźników keratynolizy) pomiędzy szczepami pigmentującymi i niepigmentującymi, w każdej z badanych gleb (gleba gliniasta i czarnoziem) osobno oraz pomiędzy szczepami pigmentującymi i niepigmentującymi z obu badanych gleb.
10. W niniejszej pracy po raz pierwszy udowodniono, że pigmentujące szczepy *Trichophyton ajelloi*, zwłaszcza wyizolowane z gleby gliniastej wykazują silniejszą aktywność keratynolityczną, mierzoną różnymi jej parametrami niż szczepy niepigmentujące. Wśród nich, ze względu na wyższe średnie wskaźniki keratynolizy, ważne z nawozowego punktu widzenia, tj. stężenie jonów amonowych i siarczanowych do najaktywniejszych należały szczepy oznaczone nr XII i III oraz XIV/XV. Szczepy te zostały wytypowane do badań nad optymalizacją warunków hodowli i składu podłoża pod kątem pozyskania hydrolizatu keratynowego o największej zawartości tych jonów.
11. Badania nad oddziaływaniem różnych parametrów składu podłoża i warunków hodowli grzybów *Trichophyton ajelloi* w celu przyspieszenia zagospodarowania odpadowego pierza kurcząt przez te grzyby i pozyskania preparatów nawożeniowych zweryfikowały kolejną, trzecią postawioną szczegółową hipotezę badawczą.
12. Optymalizacja warunków hodowli i składu podłoża, która obejmowała różne źródła węgla i azotu (1,0%, 1,5% i 2,0% pierza odpadowego, 1% ksylozę i 1% glukozę), pH podłoża hodowlanego (4,5; 6,5 i 8,5), temperaturę inkubacji (20°C, 28°C i 37°C) oraz napowietrzanie hodowli (hodowle stacjonarne i wytrząsane) doprowadziła do wskazania najlepszych parametrów hodowlanych, wpływających na poziom poszczególnych analizowanych wskaźników keratynolizy, tj. aktywność keratynazy,

proteazy i reduktazy disiarczkowej, uwalniania rozpuszczalnych białek i peptydów, aminokwasów, jonów amonowych i siarczanowych oraz ubytek masy piór i alkalizację podłoża.

13. Stwierdzono, że jony amonowe przyjęte jako jeden z najważniejszych, obok siarczanów, składników nawozowych hydrolizatu keratynowego, najwyższe stężenie (wartości średnie) osiągały podczas hodowli szczepów *Trichophyton ajelloi* prowadzonych w wyjściowym podłożu mineralnym z 1,0% dawką piór jako jedynym źródłem C, N, S i energii, o pH = 4,5 i inkubowanych w 28°C. Maksimum uwalniania jonów amonowych oraz produkcji siarczanów miało miejsce między 14 i 21 dniem biodegradacji natywnej keratyny piór przez badane grzyby. Szczepem najwydajniejszym pod tym względem okazał się szczep *Trichophyton ajelloi* nr XII.
14. Przeprowadzone doświadczenie modelowe wykazało, że otrzymany na drodze grzybowej biodegradacji hydrolizat keratynowy, z uwagi na wysoką zawartość rozpuszczalnych białek i peptydów oraz mineralnych form siarki i azotu jest szczególnie przydatny do zastosowania, jako bionawóz pod uprawę roślin, o wysokim zapotrzebowaniu na siarkę oraz do poprawy aktywności biologicznej gleby, co potwierdziło czwartą postawioną szczegółową hipotezę badawczą.
15. Wykazano, że wprowadzone do gleby piaszczystej, gliniastej i czarnoziemiu hydrolizaty keratynowe, zarówno nierozcieńczone jak i rozcieńczone (1:2) nie hamowały kiełkowania nasion roślin testowych *Brassica napus* L. var. *napus* oraz *Lepidium sativum* L.
16. Stwierdzono, że rozcieńczony hydrolizat (1:2) korzystniej oddziaływał na wzrost i rozwój rzeżuchy (*Lepidium sativum* L.) i rzepaku (*Brassica napus* L. var. *napus*) niż hydrolizat nierozcieńczony i nie wykazywał fitotoksycznego oddziaływania wobec tych roślin. Silniejszą stymulację wzrostu i rozwoju roślin po zastosowaniu hydrolizatu obserwowano w przypadku rzepaku.
17. Aktywność biologiczna gleby mierzona w warunkach modelowych intensywnością rozwoju mikroorganizmów oraz aktywnością respiracyjną i aktywnością enzymów odpowiedzialnych za przemiany azotowej i bezazotowej substancji organicznej była zróżnicowana w zależności od użytej gleby (gleba piaszczysta, czarnoziem), czasu

oddziaływania i wariantu doświadczalnego (z hydrolizatem i bez hydrolizatu, z rzepakiem i bez rzepaku).

18. Wprowadzony do gleby piaszczystej i czarnoziemiu hydrolizat, pomimo okresowego hamowania rozwoju określonych grup mikroorganizmów, w ogólnym ujęciu zwiększał pulę glebowego dsDNA skorelowaną z liczebnością większości badanych zespołów drobnoustrojów, powodował wzrost ogólnej liczebności bakterii i grzybów oraz bakterii i grzybów celulolitycznych, zwłaszcza w wariacie z rośliną, z pominięciem drobnoustrojów proteolitycznych.
19. Wprowadzenie hydrolizatu keratynowego do gleby piaszczystej na ogół stymulowało aktywność respiracyjną, aktywność dehydrogenaz i alkalicznej fosfatazy w wariacie z rzepakiem i bez rzepaku oraz aktywność proteazy i fosfatazy kwaśnej w wariantach bez rzepaku. W czarnoziemiu wprowadzony hydrolizat powodował na ogół w obu wariantach: z rośliną i bez rośliny spadek aktywności oddychania i enzymów, z wyjątkiem fosfatazy kwaśnej, dla której zanotowano wzrost aktywności w wariacie z rośliną.
20. Wprowadzony do obu gleb hydrolizat keratynowy powodował istotny, prawie 2-krotny wzrost biomasy rzepaku (*Brassica napus* L. var. *napus*).
21. Na odrębną uwagę zasługuje stwierdzenie istotnie ujemnej ($\alpha = 0,05$) korelacji pomiędzy pH, a zawartością P przyswajalnego we wszystkich wariantach doświadczalnych oraz spadek pH, po wprowadzeniu hydrolizatu do gleby. W tym kontekście szczególnie wysoki, widoczny pod koniec doświadczenia wzrost poziomu przyswajalnego fosforu w badanych glebach, wzbogaconych hydrolizatem i z obsadą roślin mógł świadczyć o uwalnianiu fosforu z jego niedostępnych źródeł oraz stymulującym jego wpływie na rozwój mikroorganizmów glebowych, a także roślin.
22. Niepatogenne keratynolityczne glebowe grzyby *Trichophyton ajelloi* wykazujące wysoki potencjał hydrolityczny wobec pierza odpadowego, stanowią nie tylko naturalny czynnik bionawożeniowy, ale także dostarczają cenne nawozowo hydrolizaty keratynowe/bionawozy pod uprawę roślin siarkolubnych. Otrzymane na drodze grzybowej biodegradacji pierza biopreparaty, bogate w rozpuszczalne białka i peptydy

oraz łatwo dostępne formy siarki i azotu, wpisują się w zasady gospodarki w obiegu zamkniętym, zrównoważonego rozwoju i działań proekologicznych.

VI. Bibliografia

1. Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Hilda, A., LakshmiPriya, T., Annadurai, G., **2007**. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. Bioresource Technology 98, 1298-1303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.047>
2. Anbu, P., Hilda, A., Sur, H.W., Hur, B.K., Jayanthi, S., **2008**. Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. International Biodeterioration and Biodegradation 62, 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.07.017>
3. Aharonowitz, Y., Av-Gay, Y., Schreiber, R., Cohen, G., **1993**. Characterization of a broad-range disulfide reductase from *Streptomyces clavuligerus* and its possible role in β -lactam antibiotic biosynthesis. Journal of Bacteriology 175, 623-629. <https://doi.org/10.1128/jb.175.3.623-629.1993>
4. Ahemad, M., Zaidi, A., Khan, S., Oves, M., **2009**. Biological importance of phosphorus and phosphate solubilizing microbes-An overview. W: Phosphate Solubilizing Microbes for Crop Improvement, Edycja 1, Tom 1: Khan, M.S., Zaidi, A. (red.). Nova Science Publishers, Inc., New York, NY, USA, str. 1-14.
5. Ajello, L., **1956**. Soil as a natural reservoir for human pathogenic fungi. Science 123, 876-879. <https://doi.org/10.1126/science.123.3203.87>
6. Alahyaribeik, S., Sharifi, S.D., Tabandeh, F., Honarbakhsh, S., Ghazanfari, S., **2020**. Bioconversion of chicken feather wastes by keratinolytic bacteria. Process Safety and Environmental Protection 135, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.01.014>
7. Al-Musallam, A.A., **1989**. Distribution of keratinophilic fungi in desert soil of Kuwait. Mycoses 32, 296-302. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1989.tb02247.x>
8. Al-Musallam, A.A., Al-Gharabally, D.H., Vadakkancheril, N., **2013**. Biodegradation of keratin in mineral-based feather medium by thermophilic strains of a new *Coprinopsis* sp. International Biodeterioration and Biodegradation 79, 42-48. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.11.011>
9. Anson, M.L., **1938**. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. Journal of General Physiology 22, 79-89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
10. Bielińska, E.J., **2005**. Oznaczenie aktywności fosfatyz. Acta Agrophysica, Rozprawy i Monografie 2005, 3, 63-74.
11. Bielińska, E.J., Futa, B., Bik-Mołodzińska, M., Szewczuk, C., Sugier, D., **2013**. The impact of fertilizing agents on the enzymatic activity of soils. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering 58, 15-19.
12. Bhari, R., Manpreet, K., Singh, R.S., **2021**. Chicken feather waste hydrolysate as a superior biofertilizer in agroindustry. Current Microbiology 78, 2212-2230. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02491-z>
13. Bhavsar, P.S., Zoccola, M., Patrucco, A., Montarsolo, A., Mossotti, R., Rovero, G., Giansetti, M., Tonin, C., **2016**. Superheated water hydrolysis of waste wool in a semi-industrial reactor to obtain nitrogen fertilizers. ACS Sustainable Chemistry and Engineering 4, 6722-6731. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01664>
14. Bohacz, J., **2017a**. Lignocellulose-degrading enzymes, free-radical transformations during composting of lignocellulosic waste and biothermal phases in small-scale reactors. Science of The Total Environment 580, 744-754. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.021>

15. Bohacz, J., **2017b**. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, 13. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2177-2>
16. Bohacz, J., **2018**. Microbial strategies and biochemical activity during lignocellulosic waste composting in relation to the occurring biothermal phases. *Journal of Environmental Management* 206, 1052-1062. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.077>
17. Bohacz, J., **2019**. Changes in mineral forms of nitrogen and sulfur and enzymatic activities during composting of lignocellulosic waste and chicken feathers. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 10333-10342. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04453-2>
18. Bohacz, J., Kornilowicz-Kowalska, T., **2009**. Changes in enzymatic activity in composts containing chicken feathers. *Bioresource Technology* 100, 3604-3612. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.042>
19. Bohacz, J., Kornilowicz-Kowalska, T., **2012**. Species diversity of keratinophilic fungi in various soil types. *Central European Journal of Biology* 7, 259-266. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0008-5>
20. Bohacz, J., Kornilowicz-Kowalska, T., **2019**. Fungal diversity and keratinolytic activity of fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. *Process Biochemistry* 80, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.012>
21. Bohacz, J., Kornilowicz-Kowalska, T., Kitowski, I., Ciesielska, A., **2020a**. Degradation of chicken feathers by *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* strains from pellets of predatory birds and its practical aspect. *International Biodeterioration and Biodegradation* 151, 104968. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104968>
22. Bohacz, J., Możejko, M., Kitowski, I., **2020b**. *Arthroderma tuberculatum* and *Arthroderma multifidum* isolated from soils in rook (*Corvus frugilegus*) colonies as producers of keratinolytic enzymes and mineral forms of N and S. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17, 9162. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249162>
23. Borymski, S., **2019**. Charakterystyka bioróżnorodności zespołów mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę metalofitów w glebach skażonych metalami ciężkimi. Praca Doktorska, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Katowice, Polska.
24. Böhme, H., Ziegler, H., **1969**. The distribution of geophilic dermatophytes and other keratinophilic fungi in relation to the pH of the soil. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 38, 247-255. <https://doi.org/10.1007/BF02052677>
25. Brandelli, A., Sala, L., Kalil, S.J., **2015**. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International* 73, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.015>
26. Caballero, P., Macías-Benítez, S., Revilla, E., Tejada, M., Parrado, J., Castaño, A., **2020**. Effect of subtilisin, a protease from *Bacillus* sp., on soil biochemical parameters and microbial biodiversity. *European Journal of Soil Biology* 101, 103244. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103244>
27. Cano, J., Solé, M., Pitarch, L.B., Guarro, J., **2002**. *Castanedomyces australiensis*, gen. nov., sp. nov., a keratinophilic fungus from Australian soil. *Studies in Mycology* 47, 165-172.

28. Caretta, G., Mangiarotti, A.M., Piontelli, E., **1992**. Keratinophilic fungi isolated from soil of Italian parks in the Province of Pavia. *European Journal of Epidemiology* 8, 330–339. <https://doi.org/10.1007/BF00158564>
29. Carvalho Neves, L., de Souza, J.B., de Souza Vidal, C.M., Herbert, L.T., de Souza, K.V., Martins, K.G., Young, B.J., **2020**. Phytotoxicity indexes and removal of color, COD, phenols and ISA from pulp and paper mill wastewater post-treated by UV/H₂O₂ and photo-Fenton. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 202, 110939. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110939>
30. Cavello, I.A., Bezus, B., Cavalitto, S.F., **2021**. The keratinolytic bacteria *Bacillus cytotoxicus* as a source of novel proteases and feather protein hydrolysates with antioxidant activities. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19, 107. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00207-1>
31. Cavello, I.A., Cavalitto, S.F., Hours, R.A., **2012**. Biodegradation of a keratin waste and the concomitant production of detergent stable serine proteases from *Paecilomyces lilacinus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 945-958. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9650-7>
32. Călin, M., Constantinescu-Aruxandei, D., Alexandrescu, E., Răut, I., Badea Doni, M., Arsene, M.L., Oancea, F., Jecu, L., Lazăr, V., **2017**. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. *Electronic Journal of Biotechnology* 28, 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.05.007>
33. Chang, E.H., Chung, R.S., Tsai, Y.H., **2007**. Effect of different application rates of organic fertilizer on soil enzyme activity and microbial population. *Soil Science and Plant Nutrition* 53, 132-140. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00122.x>
34. Chen, X., Jiang, N., Condron, L.M., Dunfield, K.E., Chen, Z., Wang, J., Chen, L., **2019**. Soil alkaline phosphatase activity and bacterial *phoD* gene abundance and diversity under long-term nitrogen and manure inputs. *Geoderma* 349, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.04.039>
35. Chitte, R.R., Nalawade, V.K., Dey, S., **1999**. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Letters in Applied Microbiology* 28, 131-136. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00484.x>
36. Chmel, L., Vláčiliková, A., **1975**. The ecology of keratinophilic fungi in different depths of soil. *Sabouraudia* 13, 185-191. <https://doi.org/10.1080/00362177585190331>
37. Choińska, A., Łaba, W., Rodziewicz, A., Bogacka, A., **2011**. Proteoliza keratyny piór kurzych z wykorzystaniem pozakomórkowych enzymów proteolitycznych szczepu *Bacillus cereus* B5E/SZ. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 6, 204–213.
38. Ciesielska, A., Bohacz, J., Kornilowicz-Kowalska, T., Stączek, P., **2014**. Microsatellite-primed PCR for intra-species genetic relatedness in *Trichophyton ajelloi* strains isolated in Poland from various soil samples. *Microbes and Environments* 29, 178-183. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me13160>
39. Ciesielska, A., Kornilowicz-Kowalska, T., Kitowski, I., Bohacz, J., **2017**. The dispersal of rodent-borne strains of *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* by pellets of predatory birds. *Avian Biology Research* 10, 218-230. <https://doi.org/10.3184/175815617X15036806293529>
40. Czop, M., Żorawik, K., Grochowska, S., Kulkińska, L.; Januszewska, W., **2016**. Badanie fitotoksyczności wybranych odpadów górniczych na danej grupie roślin. *Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska* 18, 33-44.

41. Dasgupta, D., Kumar, K., Miglani, R., Mishra, R., Panda, A.K., Bisht, S.S., **2021**. Microbial biofertilizers: Recent trends and future outlook. W: Recent Advancement in Microbial Biotechnology, Agricultural and Industrial Approach, Tom 1: Manda, S.D., Passari, A.K., (red.). Academic Press, Cambridge, MA, USA, str. 1-26.
42. da Silva, R.R., **2011**. Enzymatic synthesis of protein hydrolysates from animal proteins: Exploring microbial peptidases. *Frontiers in Microbiology* 9, 735. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00735>
43. Dawson, C.O., Gentles, J.C., **1959**. Perfect stage of *Keratinomyces ajelloi*. *Nature* 183, 1345-1346. <https://doi.org/10.1038/1831345a0>
44. de Jong, R., Campbell, C.A., Nicholaichuk, W., **1983**. Water retention equations and their relationship to soil organic matter and particle size distribution for disturbed samples. *Canadian Journal of Soil Science* 63, 291-302. <https://doi.org/10.4141/cjss83-029>
45. de Lima, G.G., Schoenherr, Z.C.P., Magalhães, W.L.E., Tavares, L.B.B., Helm, C.V., **2020**. Enzymatic activities and analysis of a mycelium– based composite formation using peach palm (*Bactris gasipaes*) residues on *Lentinula edodes*. *Bioresources and Bioprocessing* 7, 58. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00346-2>
46. Deshmukh, S.K., **2002**. Incidence of dermatophytes and other keratinophilic fungi in the glacier bank soils of Kashmir valley, India. *Mycologist* 16, 165-167. [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(02\)00407-X](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(02)00407-X)
47. Deshmukh, S.K., Verekar, S.A., **2014**. Isolation of keratinophilic fungi from selected soils of Sanjay Gandhi National Park, Mumbai (India). *Journal de Mycologie Médicale* 24, 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.08.004>
48. Deshmukh, S.K., Verekar, S.A., Chavan, Y.G., **2017**. Incidence of keratinophilic fungi from the selected soils of Kaziranga National Park, Assam (India). *Mycopathologia* 182, 371-377.
49. Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H., **2007**. *Compendium of Soil Fungi*, Edycja 2. IHW-Verlag, Eching, Niemcy.
50. Dziennik Ustaw, **2013**. Pozycja 21. Ustawa o Odpadach z dnia 14 grudnia 2012 r. Rządowe Centrum Legislacji, Warszawa, Polska.
51. El-Ghonemy, D.H., Ali, T.H., **2017**. Optimization of physico-chemical parameters for hyper keratinase production from a newly isolated *Aspergillus* sp. DHE7 using chicken feather as substrate - Management of biowaste. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 7, 171-178. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70923>
52. Ellman, G.L., **1959**. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70-77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
53. Espersen, R., Huang, Y., Falco, F.C., Hägglund, P., Gernaey, K.V., Lange, L., Svensson, B., **2021**. Exceptionally rich keratinolytic enzyme profile found in the rare actinomycetes *Amycolatopsis keratiniphila* D2^T. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105, 8129-8138. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11579-2>
54. Filipello-Marchisio, V., **2000**. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. W: *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, Tom 17: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (red.). *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, Hiszpania, str. 86-92.

55. Galarza, B., Cavello, I., Garro, L., Gortari, C., Hours, R., Cantera, C., **2012**. Evaluation of increase at the production of keratinolytic enzymes. *Journal of Ageic* 63, 70-74.
56. Garg, A.P., Gandotra, S., Mukrji, K.G., Pugh, G.J.F., **1985**. Ecology of keratinophilic fungi. *Proceedings / Indian Academy of Sciences* 94, 149-163. <https://doi.org/10.1007/BF03053134>
57. Gerard, P.J., **2002**. The digestive system of keratin-feeding larvae of *Hofmannophila pseudospretella* (Lepidoptera: Oecophoridae). *New Zealand Journal of Zoology* 29, 15-22. <https://doi.org/10.1080/03014223.2002.9518285>
58. Główny Urząd Statystyczny, **2021**. Rocznik Statystyczny Rolnictwa. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa, Polska, str. 178-180.
59. Główny Urząd Statystyczny, **2022**. Mały Rocznik Statystyczny Polski. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa, Polska, str. 281-282.
60. Godheja, J., Shekhar, S.K., **2014**. Biodegradation of keratin from chicken feathers by fungal species as a means of sustainable development. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* 5, 1000232. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000232>
61. Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Lakshmi priya, T., Tang, T.H., Chen, Y., Hashim, U., Ruslinda, A.R., Arshad, M.K.M., **2015**. Biotechnological aspects and perspective of microbial keratinase production. *Biomed Research International* 2, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/140726>
62. Gousterova, A., Braikova, D., Goshev, I., Christov, P., Tishinov, K., Vasileva-Tonkova, E., Haertlé, T., Nedkov, P., **2005**. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated *Thermoactinomyces* or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology* 40, 335-340. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x>
63. Gousterova, A., Nustorova, M., Paskaleva, D., Naydenov, M., Neshev, G., Vasileva-Tonkova, E., **2011**. Assessment of feather hydrolysate from thermophilic actinomycetes for soil amendment and biological control application. *International Journal of Environmental Research* 5, 1065-1070. <https://doi.org/10.22059/IJER.2012.515>
64. Gradišar, H., Friedrich, J., Križaj, I., Jerala, R., **2005**. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: Comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3420-3426. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3420-3426.2005>
65. Greenfield, L.M., Puissant, J., Jones, D.L., **2021**. Synthesis of methods used to assess soil protease activity. *Soil Biology and Biochemistry* 158, 108277. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108277>
66. Griffin, D.M., **1973**. *Ecology of Soil Fungi*, Edycja 1. Chapman and Hall, Londyn, Wielka Brytania, str. 1-193.
67. Groth, D.A., Sokólski, M., Jankowski, K.J., **2020**. A multi-criteria evaluation of the effectiveness of nitrogen and sulfur fertilization in different cultivars of winter rapeseed-Productivity, economic and energy balance. *Energies* 2020, 13, 4654. <https://doi.org/10.3390/en13184654>
68. Günyar, O.A., Kıracı, S., Aldı, B., Ergin, C., **2020**. Isolation and identification of keratinophilic fungi in soil samples from excavation area of ancient city of Stratonikeia, Turkey and determination of its enzyme potentials. *Journal of Environmental Biology* 41, 1521-1525. <https://doi.org/10.22438/JEB/41/6/MRN-1053>

69. Hamm, P.S., Mueller, R.C., Kuske, C.R., Porras-Alfaro, A., **2020**. Keratinophilic fungi: Specialized fungal communities in a desert ecosystem identified using cultured-based and Illumina sequencing approaches. *Microbiological Research* 239, 126530. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126530>
70. Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., Berg, G., **2009**. Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil* 321, 235-257. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>
71. Hayette, M.P., Sacheli, R., **2016**. Unusual species of dermatophytes: Rarely identified or new? *Mycopathologia* 182, 203-213. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0066-8>
72. Holmgren, A., **1977**. Bovine thioredoxin system: Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *The Journal of Biological Chemistry* 252, 4600–4606.
73. Huang, Y., Łężyk, M., Herbst, F.A., Busk, P.K., Lange, L., **2020**. Novel keratinolytic enzymes, discovered from a talented and efficient bacterial keratin degrader. *Scientific Reports* 10, 10033. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66792-2>
74. Hubálek, Z., **2000**. Keratinophilic fungi associated with free living mammals and birds. W: *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*, Tom 17: Kushwaha, R., Guarro, J., (red.). *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, Hiszpania, str. 93-103.
75. IUSS Working Group WRB, **2015**. World Reference Base of Soil Resources. International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps, Update 2015. *World Soil Recourses Reports No. 106*, FAO, Rzym, Włochy.
76. Jahan, Z., Khan, S.N., Mozammel Hoq, M., **2010**. Screening of keratinolytic bacteria from poultry wastes. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* 45, 261-266. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v45i3.6535>
77. Jain, N., Sharma, M., **2012**. A descriptive study of keratinophilic fungal flora of animal and bird habitat, Jaipur, Rajasthan. *African Journal of Microbiology Research* 6, 6973-6977. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.897>
78. Jain, R., Jain, A., Rawat, N., Nair, M., Gumashta, R., **2016**. Feather hydrolysate from *Streptomyces sampsonii* GS 1322: A potential low cost soil amendment. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 121, 672-677. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.11.003>
79. Jakubus, M., **2006**. Siarka w środowisku. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań, Polska, str. 1-48.
80. Javoreková, S., Labuda, R., Maková, J., Novák, J., Medo, J., Majerčíková, K., **2012**. Keratinophilic fungi isolated from soils of long-term fold-grazed, degraded pastures in National Parks of Slovakia. *Mycopathologia* 174, 239-245. <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9543-x>
81. Jayalakshmi, T., Krishnamoorthy, P., Ramesh Kumar, G., Sivamani, P., **2010**. Isolation and screening of a feather degrading keratinolytic Actinomycetes from *Actinomyces* sp. *Journal of American Science* 6, 45-48.
82. Joniec, J., **2018**. Enzymatic activity as an indicator of regeneration processes in degraded soil reclaimed with various types of waste. *International Journal of Environmental Science and Technology* 15, 2241-2252. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1602-x>

83. Kačínová, J., Tančinová, D., Labuda, R., **2013**. Keratinophilic fungi in soils stressed by occurrence of animals. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2, 1436-1446.
84. Kačínová, J., Tančinová, D., Medo, J., **2014**. Production of extracellular keratinase by *Chrysosporium tropicum* and *Trichophyton ajelloi*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 3, 103-106.
85. Kaul, S., Sumbali, G., **1997**. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. *Mycopathologia* 139, 137-140. <https://doi.org/10.1023/a:1006896030739>
86. Kaur, M., Bhari, R., Singh, R.S., **2021**. Chicken feather waste-derived protein hydrolysate as a potential biostimulant for cultivation of mung beans. *Biologia* 76, 1807-1815. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00724-x>
87. Kitowski, I., Kornilłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J., Ciesielska, A., **2022**. Dispersal of *Aphanoascus keratinophilus* by the rook *Corvus frugilegus* during breeding in East Poland. *Scientific Reports* 12, 2142. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06227-2>
88. Kornilłowicz, T., **1992**. Studies on mycoflora colonizing raw keratin wastes in arable soil. *Acta Mycologica* 27, 231-245. <https://doi.org/10.5586/am.1992.022>
89. Kornilłowicz, T., **1993**. Częstość występowania i rozmieszczenie grzybów keratynofilnych w wybranych glebach uprawnych. *Acta Mycologica* 28, 3-17. <https://doi.org/10.5586/am.1993.001>
90. Kornilłowicz, T., **1994**. Methods for determining keratinolytic activity of saprophytic fungi. *Acta Mycologica* 29, 169-178. <https://doi.org/10.5586/am.1994.017>
91. Kornilłowicz-Kowalska, T., **1997a**. Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. *Acta Mycologica* 32, 51-79. <https://doi.org/10.5586/am.1997.006>
92. Kornilłowicz-Kowalska, T., **1997b**. Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. II. Sulphur and nitrogen balance. *Acta Mycologica* 32, 81-93. <https://doi.org/10.5586/am.1997.007>
93. Kornilłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J., **2010**. Dynamics of growth and succession of bacterial and fungal communities during composting of feather waste. *Bioresource Technology* 101, 1268-1276. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.053>
94. Kornilłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J., **2002**. Some correlations between the occurrence frequency of keratinophilic fungi and selected soil properties. *Acta Mycologica* 37, 101-116. <https://doi.org/10.5586/am.2002.009>
95. Kornilłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J., **2011**. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management* 31, 1689-1701. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024>
96. Kornilłowicz-Kowalska, T., Kitowski, I., Bohacz, J., Kwiatkowska, E., **2018**. Fungal frequency and diversity in the nests of wetland birds from Poland: relationships between birds, nest properties and inhabiting fungi. *Avian Biology Research* 11, 245-262. <https://doi.org/10.3184/175815618X15360537405342>
97. Kornilłowicz-Kowalska, T., Wojdyło-Kotwica, B., Bohacz, J., Mozejko, M.T., **2020** Bioróżnorodność saprotroficznych grzybów strefy korzeniowej traw i koniczyn łąki trwałej w siedlisku pobagiennym przy uwzględnieniu sezonu wegetacyjnego oraz nawożenia (Zakłęśłość Sosnowicka, Polesie Zachodnie). W:

- Polesie - Środowisko, Melioracje, Tom 3: Mażajski, J.A., Rokoczyński, A.N., Wołczek, A.A., Mieszuk, O.P., Jeznach, J. (red.). Polesie Polskie: Urban, D., Dobrowolski, R., Jeznach, J. (red.). Międzynarodowa Monografia Naukowa. Brześć, Białoruś; Równe, Ukraina; Warszawa, Polska; Riazan, Rosja, str. 485-538.
98. Kozłowska-Strawska, J., Badora, A., **2013**. Selected problems of sulfur management in crops. Polish Journal of Natural Sciences 28, 309-316.
 99. Krebs, C.J., **1994**. Ecology. The Experimental Analysis of Distribution and Abundance, Edycja 4. Harper Collins, New York, NY, USA.
 100. Kumari, M., Kumar, J., **2020**. Chicken feather waste degradation by *Alternaria tenuissima* and its application on plant growth. Journal of Applied and Natural Science 12, 411-414.
<https://doi.org/10.31018/jans.v12i3.2345>
 101. Kunert, J., **2000**. Physiology of Keratinophilic Fungi. W: Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi, Tom 17: Kushwaha, R., Guarro, J. (red.). Revista Iberoamericana de Micologia, Bilbao, Hiszpania, str. 77-85.
 102. Kurek, E., Jaroszuk, J., **1993**. Siderofory i ich rola w środowisku glebowym. Postępy Mikrobiologii 32, 71-81.
 103. Kwaśna, H., Chełkowski, J., Zajkowski, P., **1991**. Flora Polska. Grzyby (Mycota), (Deuteromycetes), (Hyphomycetales), (Fusarium), Tom 22. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa-Kraków, Polska.
 104. Kwiatkowski, C.A., Harasim, E., Feledyn-Szewczyk, B., Antonkiewicz, J., **2020**. Enzymatic activity of loess soil in organic and conventional farming systems. Agriculture 10, 135.
<https://doi.org/10.3390/agriculture10040135>
 105. Ladd, J.N., Butler, J.H.A., **1972**. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. Soil Biology and Biochemistry 4, 19-30.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90038-7)
 106. Lasekan, A., Abu Bakar, F., Hashim, D., **2013**. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. Waste Management 33, 552-565. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.001>
 107. Li, Q., **2019**. Progress in microbial degradation of feather waste. Frontiers in Microbiology 10, 2717.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02717>
 108. Li, Q., **2021**. Structure, application, and biochemistry of microbial keratinases. Frontiers in Microbiology 12, 674345. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.674345>
 109. Liang, J.D., Han, Y.F., Zhang, J.W., Du, W., Liang, Z.Q., Li, Z.Z., **2011**. Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. Journal of Applied Microbiology 110, 871-880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04949.x>
 110. Liu, D., Paterson, R.R.M., **2011**. *Chryso sporium*. W: Molecular Detection of Human Fungal Pathogens, Edycja 1: Liu, D. (red.). CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA, str. 197-200.
 111. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., **1951**. Protein measurement with Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
 112. Łaba, W., Choińska, A., Rodziewicz, A., **2013**. The release of sulfur compounds during degradation of feather keratin by two *Bacillus* strains. Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia 12, 29-40.

113. Łaba, W., Rodziewicz, A., **2004**. Biodegradacja odpadów keratynowych z przemysłu drobiowego przy udziale bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Sarcina*. *Acta Scientiarum Polonorum Biotechnologia* 3, 109-120.
114. Łaba, W., Żarowska, B., Chorążyk, D., Pudło, A., Piegza, M., Kancelista, A., Kopeć, W., **2018**. New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste. *AMB Express* 8, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0538-y>
115. Marazzi, C., Städler, E., **2004**. Influence of plant sulphur nutrition on oviposition and larval performance of the diamondback moth. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 111, 225-232. <https://doi.org/10.1111/j.0013-8703.2004.00172.x>
116. Maruthi, A.Y., Lakshmi, A.K., Rao, R.S., Chaitanya, A.D., **2011**. Degradation of feather and hair by *Chrysosporium tropicum*: A potent keratinophilic fungus. *African Journal of Biotechnology* 10, 3579-3584. <https://doi.org/10.5897/AJB10.432>
117. Mehta, R.S., Jholapara, R.J., Sawant, C.S., **2014**. Isolation of a novel feather-degrading bacterium and optimization of its cultural conditions for enzyme production. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6, 194-201.
118. Mercantini, R., Marsella, R., Caprilli, F., Dovgiallo, G., **1980**. Isolation of dermatophytes and correlated species from the soil of public gardens and park of Roma. *Sabouraudia* 18, 123-128. <https://doi.org/10.1080/00362178085380201>
119. Mercantini, R., Marsella, R., Cervellati, M.C., **1989**. Keratinophilic fungi isolated from antarctic soil. *Mycopathologia* 106, 47-52. <https://doi.org/10.1007/BF00436926>
120. Mini, K.D., George, S.M., Mathew, J., **2015**. Screening and selection of fungus for keratinase production by solid state fermentation and optimization of conditions of SSF and formulation of low cost medium for the production of keratinase by *Aspergillus flavus* S125. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4, 535-548.
121. Moallaei, H., Zaini, F., Pihet, M., Mahmoudi, M., Hashemi, J., **2006**. Isolation of keratinophilic fungi from soil samples of forests and farm yards. *Iranian Journal of Public Health* 35, 62-69.
122. Mocek-Płóciniak, A., **2010**. Wykorzystanie aktywności enzymatycznej do oceny wpływu antropogenicznych zmian wywołanych przez metale ciężkie w środowisku glebowym. *Nauka Przyroda Technologie* 4, 86.
123. Możejko, M., Bohacz, J., **2021**. Mikroorganizmy i enzymy keratynolityczne. W: Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa: Babicz, M., Nowakowicz-Dębek, B. (red.). Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Lublin, Polska, str. 96-103. <https://doi.org/10.24326/mon.2021.10>
124. Możejko, M., Bohacz, J., **2022**. Optimization of conditions for feather waste biodegradation by geophilic *Trichophyton ajelloi* fungal strains towards further agricultural use. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, 10858. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710858>
125. Nam, G.W., Lee, D.W., Lee, H.S., Lee, N.J., Kim, B.C., Choe, E.A., Hwang, J.K., Suhartono, M.T., Pyun, Y.R., **2002**. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives in Microbiology* 178, 538-547. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0489-0>
126. Näsholm, T., Kielland, K., Ganeteg, U., **2009**. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* 182, 31-48. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02751.x>

127. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Morasas, W.F.O., **1983**. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA.
128. Nustorova, M., Braikova, D., Gousterova, A., Vasileva-Tonkova, E., Nedkov, P., **2006**, Chemical, microbiological and plant analysis of soil fertilized with alkaline hydrolysate of sheep's wool waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 383-390. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9045-9>
129. OECD-FAO, **2017**. *Agricultural Outlook 2017-2026*. OECD Publishing, Paryż, Francja, str. 131-132.
130. Ogórek, R., Suchodolski, J., Piecuch, A., Przywara, K., Višňovská, Z., **2022**. Keratinophilic and keratinolytic fungi in cave ecosystems: A culture-based study of Brestovská cave and Demänovská Ľadová and Slobody caves (Slovakia). *Applied Sciences* 12, 1455. <https://doi.org/10.3390/app12031455>
131. Olson, N.D., Morrow, J.B., **2012**. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes* 5, 668. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-668>
132. Omran, R., **2017**. Production of antimicrobial and anticancer fom feather–keratinolytic *Nocardioopsis* sp. 28ROR as a novel strain using feather meal medium. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 9, 175-179. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i3.16426>
133. Onifade, A.A., Al-Sane, N.A, Al-Musallam, A.A., Al-Zarban, S., **1998**. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology* 66, 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00033-9)
134. Otčenášek, M., Dvořák, J., **1975**. Ecological classification of dermatophytes. *Mycoses* 18, 425-434. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1975.tb03521.x>
135. Otčenášek, M., Dvořák, J., Kunert, J., **1967**. Geographic distribution of the geophilic dermatophytes in the soil. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 31, 151-162. <https://doi.org/10.1007/BF02051220>
136. Owczarzak, W., Dębicki, R., Mocek, A., **2015**. *Właściwości fizyczne gleby*. W: *Gleboznawstwo*, Edycja 1: Mocek, A. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Polska, str. 131-188.
137. Parihar, P., Kushwaha, R.K.S., **2000**. A survey of keratinophilic fungi as a tool for hen feather utilization. *Mycoscience* 41, 645–649. <https://doi.org/10.1007/BF02460932>
138. Peddu, J.L., Chitturi, C.M.K., Lakshmi, V.V., **2009**. Purification and characterization of keratinase from feather degrading *Bacillus* sp. *Internet Journal of Microbiology* 8, 1-9.
139. Pontes, Z.B.V.S., Oliveira, A.C., Guerra, F.Q.S., Pontes, L.R.A., Santos, J.P., **2013**. Distribution of dermatophytes from soils of urban and rural areas of cities of Paraíba State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 55, 377-383. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000600002>
140. Pylak, M., Oszust, K., Fraç, M., **2019**. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 18, 597-616. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09500-5>
141. Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K., Meyer, A.S., **2020**. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology Advances* 44, 107607. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107607>

142. Rahayu, S., Syah, D., Suhartono, M.T., **2012**. Degradation of keratin by keratinase and disulfide reductase from *Bacillus* sp. MTS of Indonesian origin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.02.001>
143. Rajak, R.C., Parwekar, S., Malviya, H., Hasija, S.K., **1991**. Keratin degradation by fungi isolated from the grounds of a gelatin factory in Jabalpur, India. *Mycopathologia* 114, 83-87. <https://doi.org/10.1007/BF00436426>
144. Riffel, A., Brandelli, A., **2002**. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29, 255-258. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000307>
145. Rodziewicz, A., Łaba, W., **2006**. Keratyny i ich biodegradacja. *Biotechnologia* 2, 130-147.
146. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego), **2009**. W: Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, Urząd Oficjalnych Publikacji, Luksemburg, Luksemburg, str. 1-33.
147. Rühling, Å., Tyler, G., **1973**. Heavy metal pollution and decomposition of spruce needle litter. *Oikos* 24, 402-416. <https://doi.org/10.2307/3543816>
148. Sharma, R., Swati, K., **2014**. Prevalence of keratinophilic fungi at various pH in different areas of Jaipur, Rajasthan. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 4, 17-21.
149. Shreiner, R.P., Koide, R.T., **1993**. Antifungal compounds from the roots of mycotrophic and non-mycotrophic plant species. *New Phytologist* 123, 99-105. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb04535.x>
150. Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., **2010**. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a000414, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
151. Simpanya, M.F., **2000**. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. W: *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*, Tom 12: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (red.). *Revista Iberoamericana de Micología: Bilbao, Hiszpania*, str. 1-12.
152. Singh, C.J., **2010**. Extracellular protease expression in *Microsporium gypseum* complex, its regulation and keratinolytic potential. *Mycoses* 54, 183-188. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01871.x>
153. Smyk, B., Barabasz, W., Różycki, E., **1989**. Wpływ stosowania mineralnych nawozów azotowych (N i NPK) na występowanie nitrozoamin i mikotoksyn w glebach górskich i nizinnych ekosystemów trawiastych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 380, 150-158.
154. Srivastava, A., Sharma, A., Suneetha V., **2011**. Feather waste biodegradation as a source of amino acids. *European Journal of Experimental Biology* 1, 56-63.
155. Sun, Y., Goll, D.S., Ciais, P., Peng, S., Margalef, O., Asensio, D., Sardans, J., Peñuelas, J., **2020**. Spatial pattern and environmental drivers of acid phosphatase activity in Europe. *Frontiers in Big Data* 2, 51. <https://doi.org/10.3389/fdata.2019.00051>
156. Szewczyk, W., **2007**. Soil fungi communities from young Scots pine plantations affected with root rot. *Acta Mycologica* 42, 239-244. <https://doi.org/10.5586/am.2007.027>

157. Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., **1969**. Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1, 301-307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)
158. Taghipour, S., Abastabar, M., Piri, F., Aboualigalehdari, E., Jabbari, M.R., Zarrinfar, H., Nouripour-Sisakht, S., Mohammadi, R., Ahmadi, B., Ansari, S., Katirae, F., Niknejad, F., Didehdar, M., Nazeri, M., Makimura, K., Rezaei-Matehkolaei, A., **2021**. Diversity of geophilic dermatophytes species in the soils of Iran; the significant preponderance of *Nannizzia fulva*. *Journal of Fungi* 7, 345. <https://doi.org/10.3390/jof7050345>
159. Takiuchi, I., Sei, Y., Takagi, H., Negi, M., **1984**. Partial characterization of the extracellular keratinase from *Microsporium canis*. *Sabouraudia* 22, 219-224. <https://doi.org/10.1080/00362178485380351>
160. Tamreihao, K., Mukherjee, S., Khunjamayum, R., Devi, L.J., Asem, R.S., Ningthoujam, D.S., **2019**. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production. *Journal of Basic Microbiology* 59, 4-13. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800434>
161. Thalmann, A., **1968**. Zur methodik der bestimmung der dehydrogenaseaktivität im boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtschaftliche Forschung* 21, 249-258.
162. Thys, R.C.S., Lucas, F.S., Riffel, A., Heeb, P., Brandelli, A., **2004**. Characterization of protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Letters in Applied Microbiology* 39, 181-186. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01558.x>
163. Trojan, P., **1975**. *Ekologia ogólna*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, Polska.
164. Ulfig, K., Płaza, G., Terakowski, M., Worsztynowicz, A., **2002**. Keratinolytic fungi in an acidic petroleum waste lagoon at a petroleum refinery. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 53, 267-276.
165. Ulfig, K., Płaza, G., Worsztynowicz, A., Mańko, T., Tien, A.J., Brigmon, R.L., **2003**. Keratinolytic fungi as indicators of hydrocarbon contamination and bioremediation progress in a petroleum refinery. *Polish Journal of Environmental Studies* 12, 245-250.
166. Utobo, E.B., Tewari, L., **2015**. Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. *Applied Ecology and Environmental Research* 13, 147-169. https://doi.org/10.15666/aeer/1301_147169
167. van Oorschot, C.A.N., **1980**. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. *Studies in Mycology* 20, 1-89.
168. Vavrova, K., Wimmerova, L., Knapek, J., Weger, J., Keken, Z., Kastanek, F., Solcova, O., **2022**. Waste feathers processing to liquid fertilizers for sustainable agriculture-LCA, economic evaluation, and case study. *Processes* 10, 2478. <https://doi.org/10.3390/pr10122478>
169. Volleková, A., **1985**. Keratinophilic fungi in rodents' burrows and in their adjoining surroundings. *Czech Mycology* 39, 97-105.
170. Vranova, V., Rejsek, K., Formanek, P., **2013**. Proteolytic activity in soil: A review. *Applied Soil Ecology* 70, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.04.003>
171. Wang, L., Qian, Y., Cao, Y., Huang, Y., Chang, Z., Huang, H., **2017**. Production and characterization of keratinolytic proteases by a chicken feather-degrading thermophilic strain, *Thermoactinomyces* sp. YT06. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 2190-2198. <https://doi.org/10.4014/jmb.1705.05082>
172. Wolińska, A., Stepińska, Z., **2012**. Dehydrogenase activity in the soil environment. W: *Dehydrogenases*, Edycja 1, Tom 8: Canuto, R.A. (red.). IntechOpen: Londyn, Wielka Brytania, str. 183-210. <https://doi.org/10.5772/48294>

173. Wrońska, I., Onyszko, M., Cybulska, K., Telesiński, A., Mahdi-Oraibi, S., **2015**. Zawartość biomasy żywych mikroorganizmów oraz ich liczebność w glebie ogrodniczej wzbogaconej biopreparatem. Proceedings of ECOpole 9, 795-801. [https://doi.org/10.2429/proc.2015.9\(2\)090](https://doi.org/10.2429/proc.2015.9(2)090)
174. Yasumoto, S., Suzuki, K., Matsuzaki, M., Hiradate, S., Oose, K., Hirokane, H., Okada, K., **2011**. Effects of plant residue, root exudate and juvenile plants of rapeseed (*Brassica napus* L.) on the germination, growth, yield, and quality of subsequent crops in successive and rotational cropping systems. Plant Production Science 14, 339-348. <https://doi.org/10.1626/pps.14.339>
175. Youssef, Y.A., Karam El-Din, A.A., Hassanein, S.M., **1992**. Occurrence of keratinolytic fungi and related dermatophytes in soils in Cairo, Egypt. Zentralblatt für Mikrobiologie 147, 80-85. [https://doi.org/10.1016/S0232-4393\(11\)80367-7](https://doi.org/10.1016/S0232-4393(11)80367-7)
176. Yu, R.J., Harmon, S.R., Blank, F., **1968**. Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. Journal of Bacteriology 96, 1435-1436. <https://doi.org/10.1128/jb.96.4.1435-1436.1968>
177. Zaki, S.M., Mikami, Y., Karam El-Din, A.A., Youssef, Y.A., **2005**. Keratinophilic fungi recovered from muddy soil in Cairo vicinities, Egypt. Mycopathologia 160, 245–251. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0143-x>
178. Zhu, C., Ma, Y., Wu, H., Sun, T., La Pierre, K.J., Sun, Z., Yu, Q., **2016**. Divergent effects of nitrogen addition on soil respiration in a semiarid grassland. Scientific Reports 6, 33541. <https://doi.org/10.1038/srep33541>
179. Zucconi, F., Forte, M., Monaco, A., De Bertoldi, M., **1981**. Biological evaluation of compost maturity. Biocycle 22, 27-29

**VII. Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład cyklu
publikacji**

1. Publikacja 1 [P.1.]

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa

Środowisko - Roślina - Zwierzę - Produkt

WUP

Mikroorganizmy i enzymy keratynolityczne

Keratinolytic microorganisms and their enzymes

Keratyna jest białkiem włókiennkowym będącym rezerwuarem cennych biologicznie pierwiastków, jak C, N i S [Gupta i Ramnani 2006, Rodziejewicz i Łaba 2006]. Odpady keratynowe oraz możliwości ich utylizacji, zagospodarowania i aplikacji przemysłowej stanowią cieszącą się dużym zainteresowaniem tematykę badawczą [Onifade i in. 1998, Gupta i Ramnani 2006, Rodziejewicz i Łaba 2006, Kornilłowicz-Kowalska i Bohacz 2011, Staroń i in. 2011]. Z danych literaturowych wynika, że duży udział pośród odpadów keratynowych stanowi pierze [Parihar i Kushwaha 2000, Sobolczyk i in. 2008, Choińska i in. 2011]. Keratyna tworzy również takie struktury, jak pazury, kopyta, rogi oraz wełna i włosie, a więc występuje u większości organizmów wyższych [Jayalakshmi i in. 2010].

Z aplikacyjnego punktu widzenia dużym zainteresowaniem cieszą się prace badawcze dotyczące badania uzdolnień keratynolitycznych mikroorganizmów [Łaba i Rodziejewicz 2004, Gopinath i in. 2015]. Ich przedstawiciele należą do bakterii i promieniowców [Chao i in. 2007, Peddu i in. 2009], a także grzybów [Parihar i Kushwaha 2000, Bohacz 2017, Bohacz i Kornilłowicz-Kowalska 2019, Bohacz i in. 2020]. Kontrolowana mikrobiologiczna biodegradacja odpadowej keratyny niweluje jej niekorzystny wpływ na środowisko naturalne, m.in. poprzez ograniczenie wydzielania toksycznych gazów, takich jak siarkowodór (H_2S) czy amoniak (NH_3) [Kornilłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Ponadto mikrobiologiczna obróbka keratyny stwarza nowe możliwości jej zagospodarowania [Lasekan i in. 2013].

W celu komercjalizacji mikroorganizmów keratynolitycznych i syntetyzowanych przez nie enzymów prowadzone są badania dotyczące ich modyfikacji genetycznych, które obejmują technologie rekombinacji DNA, a także klonowania genów odpowiedzialnych za kodowanie keratynaz [Gupta i Ramnani 2006]. Częściej wykorzystuje się keratynazy pochodzenia grzybowego, ze względu na to, iż na ogół są bardziej aktywne i tańsze w otrzymywaniu [Gopinath i in. 2015]. W pełni uzasadnione staje się zatem poszukiwanie mikroorganizmów, które w sposób bezpieczny i efektywny ograniczą ilości zalegających w środowisku odpadów keratynowych z jednoczesnym pozyskaniem cennych bioproduktów [Cao i in. 2007, Choińska i in. 2011].

Celem niniejszej pracy było zestawienie i opisanie najważniejszych mikroorganizmów keratynolitycznych i ich enzymów uczestniczących w biodegradacji białka keratynowego. W sposób syntetyczny przedstawiono także mechanizm mikrobiologicznej biodegradacji keratyny oraz wyjaśniono znaczenie tego biorozkładu dla środowiska.

¹ Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Wydział Agrobiotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, michal.mozejko@up.lublin.pl

Mikroorganizmy keratynolityczne

Mikroorganizmami keratynolitycznymi nazywamy drobnoustroje, u których udowodniono uzdolnienia do rozkładu keratyny [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Enzymatyczne trawienie keratyny możliwe jest dzięki sekrecji specyficznych substratów wobec tego białka enzymów nazywanych keratynazami [Gopinath i in. 2015]. Pośród mikroorganizmów keratynolitycznych można wyróżnić przedstawicieli bakterii, w tym promieniowców, oraz grzybów strzępkowych i drożdży [Chao i in. 2007, Choińska i in. 2011, Godheja i Shekhar 2014]. Występują tutaj zarówno saprofity, jak i drobnoustroje pasożytnicze, zamieszkujące zróżnicowane środowiska [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Drobnoustroje te można znaleźć w środowiskach bogatych w keratynę, tj. glebie, ptasich gniazdach, czy bezpośrednio na strukturach keratynowych, jak pierze, sierść, czy wełna [Gupta i Ramnani 2006, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Pod względem wymagań temperaturowych mikroorganizmy keratynolityczne najczęściej zaliczane są do mezofili i termofili [Srivastava i in. 2011], natomiast po względem zapotrzebowania na tlen są zarówno tlenowcami, jak i mikroorganizmami beztlenowymi [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Uzdolnienia do lizy keratyny mają również organizmy wyższe, takie jak larwy moli *Hofmannophila pseudospretella* [Gerard 2002] oraz *Tineola bisselliella* (Hummel) [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Jednakże z uwagi na ochronę środowiska przed zaleganiem odpadowej materii organicznej, a jednocześnie przed marnotrawieniem wartościowych pod względem zawartości N i S odpadów bogatych w keratynę przy zastosowaniu biologicznych metod przyjaznych środowisku to właśnie mikroorganizmy powinny być poszukiwane, badane i wykorzystywane przez człowieka do celów praktycznych [Jahan i in. 2010].

Bakterie keratynolityczne

Dominującą grupę mikroorganizmów keratynolitycznych stanowią bakterie [Rodziewicz i Łaba 2006], które ze względu na szybkie tempo wzrostu i rozwoju (w porównaniu z grzybami) cieszą się zainteresowaniem pod kątem ich przemysłowego wykorzystania [Gopinath i in. 2015]. Keratyna jest przez nie przetwarzana jako źródło C, N i energii w celu budowy ich własnej biomasy [Łaba i Rodziewicz 2004]. Należą tutaj przedstawiciele laseczek tlenowych z rodzaju *Bacillus* sp., tj. *Bacillus cereus* i *Bacillus licheniformis* [Jahan i in. 2010, Choińska i in. 2011] oraz rzadziej szczepy *Bacillus pumilis*. Bakterie z rodzaju *Bacillus* sp. izolowane są często ze struktur keratynowych, takich jak pierze [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Pośród keratynolitycznych bakterii można spotkać także szczepy z rodzaju *Fervidobacterium* sp., takie jak *Fervidobacterium islandicum* czy *Fervidobacterium pannavorans* [Nam i in. 2002, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Właściwościami keratynolitycznymi charakteryzują się również bakterie z rodzaju *Sarcina* sp. [Łaba i Rodziewicz 2004].

W obrębie bakterii keratynolitycznych możemy wyszczególnić zarówno bakterie Gram-ujemne (G⁻), jak i Gram-dodatnie (G⁺) zróżnicowane pod względem budowy ściany komórkowej i właściwości fizjologicznych [Rodziewicz i Łaba 2006, Silhavy i in. 2010]. Pośród bakterii Gram-ujemnych (G⁻) znanych z uzdolnień do rozkładu keratyny wymienia się tlenowe i beztlenowe bakterie z rodzajów *Chrysobacterium* sp., *Fervidobacterium* sp., *Stenotrophomonas* sp. oraz *Vibrio* sp. [Riffel i Brandelli 2002, Rodziewicz i Łaba 2006, Gopinath i in. 2015].

Pośród mikroorganizmów Gram-dodatnich (G+) wymienić można przedstawicieli rodzaju *Bacillus* sp., tj. wcześniej wspomniane gatunki *Bacillus licheniformis* i *Bacillus subtilis*, oraz rodzaje *Kocuria* sp., *Lysobacter* sp. i *Microbacterium* sp. [Thys i in. 2004, Gopinath i in. 2015]. Bakteriami najliczniej izolowanymi z odpadowej keratyny, w tym odpadowego pierza, są laseczki *Bacillus licheniformis* [Rodziewicz i Łaba 2006]. Zasiadają one 80-90% pierza różnych gatunków ptaków [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Enzymy keratynolityczne laseczek *Bacillus* sp. charakteryzują się wysoką trwałością podczas przechowywania [Peddu i in. 2009]. Cytowani autorzy zauważyli, że keratynazy tych drobnoustrojów po zamrożeniu na okres jednego miesiąca wykazywały 90% swojej pierwotnej aktywności, natomiast po 2 miesiącach ich aktywność spadła dwukrotnie do ok. 50%.

Promieniowce keratynolityczne

Promieniowce stanowią specyficzną grupę tlenowych bakterii Gram-dodatnich (G+), które dzięki tworzeniu *pseudomycelium*, tj. rozgałęziających się i splatających wzajemnie strzępek przypominają morfologicznie grzyby strzępkowe [Sharma 2014]. Dodatkowo cytowany autor zaznacza, że ich kwasy nukleinowe są bogate w cytozynę i guaninę.

Promieniowce zasiedlają różne środowiska, w tym natlenione gleby w liczebności ok. 1 000 000 komórek w 1 gramie gleby [Jayalakshmi i in. 2010]. W przypadku obecności keratyny w środowisku swojego bytowania promieniowce przeprowadzają jej enzymatyczną degradację, czym przyczyniają się do oczyszczania środowiska naturalnego poprzez utylizację zalegających w nim odpadów keratynowych [Jayalakshmi i in. 2010]. Właściwości lityczne względem keratyny posiadają szczególnie promieniowce z rodzaju *Streptomyces* sp., pośród których można wymienić szczepy *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces graminofaciens* [Gopinath i in. 2015], *Streptomyces pactum* [Godheja i Shekhar 2014] i *Streptomyces thermoviolaceus* [Chitte i in. 1999]. Również w obrębie rodzaju *Thermoactinomyces* sp. spotykani są przedstawiciele o uzdolnieniach do rozkładu keratyny [Gousterova i in. 2005].

Promieniowce keratynolityczne są wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłu, takich jak biomedycyna, przemysł farmaceutyczny, garbarski, a także w rolnictwie [Syed i in. 2009, Jayalakshmi i in. 2010]. Przykładem mogą być termotolerancyjne szczepy *Streptomyces gulbargensis* znajdujące zastosowanie w garbowaniu skór oraz podnoszeniu wartości pokarmowej odpadowej keratyny [Syed i in. 2009]. Z tego też powodu prowadzone są liczne badania dotyczące pozyskiwania i wykorzystania promieniowców [Jayalakshmi i in. 2010].

Grzyby keratynolityczne

Grzyby stanowią grupę eukariotycznych mikroorganizmów keratynolitycznych zasiedlających różne środowiska bogate w materię keratynową [Parihar i Kushwaha 2000, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Większość grzybów rozkładających keratynę należy do mezofili, jednakże występują tu również gatunki termotolerancyjne, takie jak *Chrysosporium* sp. czy *Microsporium gypseum*. Możemy tutaj wyróżnić grzyby o charakterze patogennym, tzw. dermatofity, oraz grzyby niepatogenne, czyli saprotrofy [Onifade i in. 1998, Rodziewicz i Łaba 2006, Godheja i Shekhar 2014]. Pośród grzybów keratynofilnych, tj. zasiedlających środowiska zasobne w keratynę [Kunert 2000], szczególne zna-

czenie mają rodziny *Arthrodermataceae* i *Onygenaceae* oraz klasy *Ascomycetes* i *Onygenales* [Godheja i Shekhar 2014]. Wśród rodziny *Arthrodermataceae* uzdolnienia keratynolityczne mogą posiadać m.in. gatunki należące do rodzaju *Arthroderma* sp., takie jak *Arthroderma tuberculatum* i *Arthroderma multifidum* [Bohacz i in. 2020].

W obrębie dermatofitów można wyróżnić 3 grupy ekologiczne uwarunkowane środowiskiem, w którym bytują, tj. zasiedlające glebę dermatofity geofilne oraz zasiedlające skórę i jej struktury u zwierząt i u ludzi odpowiednio dermatofity zoofilne i antropofilne [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Dermatofity są zatem w dużej mierze pasożytami organizmów wyższych, zasiedlając ich struktury keratynowe [Onifade i in. 1998].

Występowanie grzybów w środowisku glebowym uwarunkowane jest pH i wilgotnością gleby [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Dermatofity geofilne oraz inne grzyby keratynolityczne zasiedlają zarówno gleby kwaśne (*Trichophyton ajelloi*), obojętne (*Trichophyton terrestre*), jak i o odczynie zbliżonym do zasadowego (*Chrysosporium* sp.) [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2002, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Pod względem wilgotności grzyby te obecne są w środowiskach zarówno suchych (gatunki kserofilne), jak i wilgotnych (gatunki hydrofilne). Wśród kserofili można wyszczególnić *Trichophyton terrestre*, natomiast w obrębie hydrofili *Chrysosporium keratinophilum* [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Do zasiedlających struktury zwierząt, a nawet ludzi dermatofitów zoofilnych oraz antropofilnych można zaliczyć przedstawicieli rodzaju *Trichophyton* sp., takich jak *Trichophyton gallinae* oraz *Trichophyton mentagrophytes* [Tsuboi i in. 1987, Wawrzekiewicz i in. 1987, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Korniłowicz-Kowalska i Bohacz [2011] zaznaczają, iż mimo że zoofilne dermatofity są w stanie atakować organizm człowieka, w przypadku dermatofitów antropofilnych rzadko zdarza się, aby były aktywne wobec zwierząt. Dermatofity geofilne to natomiast w dużej mierze grzyby niepatogenne, saprotroficzne, zasiedlające środowiska bogate w białko keratynowe, takie jak gleba, odpady i ścieki komunalne oraz ich osady [Ulfig 1984, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Zdarza się jednak, że niektóre szczepy *Microsporium* sp., szczególnie *Microsporium gypseum*, mogą infekować również organizmy wyższe [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011].

Kolonizacja keratyny przez dermatofity związana jest z wrastaniem specyficznych strzępek, np. organów perforacyjnych, do wnętrza keratyny [Gopinath i in. 2015]. Rozkład keratyny związany z pozyskaniem C, N, S i energii dla wzrostu i rozwoju grzybów jest zatem możliwy na drodze mechanicznej oraz enzymatycznej [Onifade i in. 1998]. W zależności od poziomu aktywności enzymatycznej rozkład keratyny może odbywać się w sposób częściowy bądź całkowity [Parihar i Kushwaha 2000].

Poza dermatofitami wśród grzybów keratynolitycznych można wyszczególnić także grzyby z grupy *Chrysosporium*, do której zalicza się rodzaj *Chrysosporium* sp. oraz *Myceliophthora* sp., w tym jej teleomorfa *Ctenomyces* sp. [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011, Gopinath i in. 2015, Bohacz 2017]. W obrębie grzybów keratynolitycznych można wyróżnić typowe grzyby keratynolityczne oraz tzw. pleśnie ubikwistyczne, do których zalicza się keratynolityczne szczepy *Aspergillus fumigatus* zróżnicowane pod względem aktywności keratynolitycznej [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Grzyby rozkładające poniżej 40% keratyny są określane mianem słabo keratynolitycznych, natomiast szczepy trawiące poniżej 20% keratyny – niekeratynolitycznych. Pleśnie ubikwistyczne w hodowli płynnej cechuje rozkład keratyny, np. w postaci pierza, rzędu 20–40%, natomiast typowe grzyby keratynolityczne przeprowadzają jej kompletną biodegradację [Kunert 2000, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011].

Enzymy keratynolityczne

Mikrobiologiczna, enzymatyczna biodegradacja keratyny zachodzi przy udziale specyficznych proteaz zwanych keratynazami bądź enzymami keratynolitycznymi [Onifade i in. 1998, Srivastava i in. 2020]. W zależności od szczepu i czasu jego hodowli enzymy keratynolityczne produkowane są w zróżnicowanej ilości [Sobolczyk i in. 2008]. Wytwarzane są one głównie podczas logarytmicznej i stacjonarnej fazy wzrostu drobnoustrojów [Gupta i Ramnani 2006]. Cechą, która różnicuje keratynazy na tle tradycyjnych proteaz i peptydaz, jest ich specyficzność substratowa [Onifade i in. 1998]. Są one bowiem aktywne zarówno wobec keratyny, białek włókiennkowych, takich jak elastyna czy kolagen, jak i białek niewłókiennkowych, jak albumina bądź kazeina [Rodziewicz i Łaba 2006]. Ponadto białka te cechują się aktywnością w szerokich zakresach pH i temperatury [Gupta i Ramnani 2006] i mogą być wydzielane w dwojaki sposób, tj. wewnątrzkomórkowo lub zewnątrzkomórkowo [Brandelli i in. 2015]. Jednakże większość keratynaz wydzielana jest poza obszar komórki [Srivastava i in. 2011]. Ponadto pośród keratynaz wyróżniamy enzymy, których sekrecja indukowana jest obecnością substratu keratynowego [Rodziewicz i Łaba 2006] oraz enzymy konstytutywne wydzielane pomimo braku keratyny w środowisku [Korniłłowicz-Kowalska i Bohacz 2011].

Keratynazy zróżnicowane są pod względem charakteru centrum aktywnego, na którego podstawie zaliczamy je do proteaz aspartylowych, metaloproteaz, proteaz serynowych i tiolowych [Peddu i in. 2009]. Wśród enzymów keratynolitycznych największy udział stanowią enzymy z grupy proteaz serynowych i metaloproteaz [Gupta i Ramnani 2006] oraz proteaz obojętnych lub zasadowych [Brandelli i in. 2015]. Do głównych producentów keratynaz zaliczane są m.in. mezofilne grzyby i promieniowce oraz termofilne laseczki tlenowe z rodzaju *Bacillus* sp., ze szczególnym uwzględnieniem przemysłowym keratynaz *Bacillus licheniformis* [Jahan i in. 2010]. Z danych literaturowych wynika, że aktywność keratynolityczną wykazują enzymy z grupy metaloproteaz syntetyzowane przez *Flavobacterium* sp. KR6 [Riffel i Brandelli 2002] i *Microbacterium* sp. KR10 [Thys i in. 2004]. Aktywność keratynolityczną o charakterze alkalicznej proteazy wykazywał także *Streptomyces* sp. MG104 [Mohamedin 1999].

Mechanizm biodegradacji keratyny

Dokładny mechanizm keratynolizy nie jest jeszcze poznany, co stwarza potencjał badawczy [Korniłłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Wiadomo, iż keratyna inaczej rozkładana jest przez mikroorganizmy należące do *Procaryota* i *Eucaryota* [Sobolczyk i in. 2008]. Grzyby obok hydrolizy enzymatycznej związanej z wytwarzaniem egzoproteaz cechuje poprzedzająca je biodegradacja mechaniczna przy użyciu strzępek perforacyjnych [Onifade i in. 1998]. Mechanizm keratynolizy jest złożony z dwóch zachodzących równorzędnie procesów, tj. rozkładu hydrolitycznego i sulfitolizy [Gupta i Ramnani 2006]. Rozkład enzymatyczny związany jest z rozerwaniem podtrzymujących strukturę keratyny mostków disiarczkowych cystyny w procesie sulfitolizy [Onifade i in. 1998, Gopinath i in. 2015]. Dzięki rozbiciu zwartej struktury keratyny zwiększa się powierzchnia aktywnego oddziaływania enzymów proteolitycznych na to białko [Łaba i Rodziewicz 2004, Gopinath i in. 2015]. Rozkład enzymatyczny na drodze sulfitolizy wpływa na wzrost pH środowiska i na emisję amoniaku z odpadowej keratyny [Korniłłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Rozerwanie disiarczkowych mostków cystynowych jest zatem jednym z potencjalnych mechanizmów keratynolizy [Onifade i in. 1998, Rodziewicz

i Łaba 2006]. Jednakże z uwagi na to, że proces ten wymaga dokładnego poznania prowadzone są stale badania w tym zakresie.

Podsumowanie

Keratyna doprowadzana jest do środowiska w postaci odpadów z szeregu gałęzi przemysłu, w którym duże znaczenie odgrywa przemysł drobiarski. Z racji, iż jest to białko trudnoodegradowalne, w dużej mierze odporne na rozkład fizykochemiczny i enzymatyczny konieczne jest zastosowanie różnych metod jej przetwarzania. Przyjazną środowisku szansę przetwarzania odpadowej keratyny stwarzają mikroorganizmy o uzdolnieniach keratynolitycznych.

Drobnoustroje keratynolityczne, zasiedlając zróżnicowane środowiska, przyczyniają się do naturalnej biodegradacji zalegającej w nich keratyny. W ich obrębie wyróżniamy przedstawicieli różnych taksonomicznie grup mikroorganizmów, tj bakterii, promieniowców, grzybów strzępkowych oraz drożdży. Pośród nich występują zarówno mikroorganizmy saprotroficzne, jak i potencjalnie patogenne. Liza keratyny przez te drobnoustroje możliwa jest dzięki syntezie specyficznych substratowo wobec tego białka enzymów proteolitycznych i keratynolitycznych. Charakter takich enzymów uwarunkowany jest ściśle budową ich centrum aktywnego.

Mikrobiologiczny rozkład keratyny nie jest jednak do końca poznany, a ze względu na ograniczenie zagrożeń, z jakimi wiąże się niekontrolowana keratynoliza, konieczne jest dokładne poznanie mechanizmu tego procesu. W zależności od przynależności taksonomicznej mikroorganizmy wykształciły liczne sposoby na biodegradację keratyny, w których znaczącą rolę odgrywa eliminacja mostków disiarczkowych cystyny. Taki zabieg wiąże się ze zwiększeniem podatności keratyny na rozkład proteolityczny. Ważne zatem staje się poszerzenie badań dotyczących keratynolitycznych uzdolnień mikroorganizmów.

Bibliografia

- Bohacz J., 2017. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World J. Microb. Biot.* 33, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2177-2>
- Bohacz J., Korniłowicz-Kowalska T., 2019. Fungal diversity and keratinolytic activity of fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. *Proc. Biochem.* 80, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.012>
- Bohacz J., Możejko M., Kitowski I., 2020. *Arthroderma tuberculatum* and *Arthroderma multifidum* isolated from soils in Rook (*Corvus frugilegus*) colonies as producers of keratinolytic enzymes and mineral forms of N and S. *Int. J. Env. Res. Pub. He.* 17, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249162>
- Brandelli A., Sala L., Kalil S. J., 2015. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Res. Int.* 73, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.015>
- Cao L., Tan H., Liu Y., Xue X., Zhou S., 2007. Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 389–394. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02327.x>

- Chao Y., Xie F., Yang J., Lu J., Qian S., 2007. Screening for a new *Streptomyces* strain capable on efficient keratin degradation. *J. Environ. Sci.* 19, 1125–1128. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60183-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60183-1)
- Chitte R.R., Nalawade V.K., Dey S., 1999. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 131–136. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00484.x>.
- Choińska A., Łaba W., Rodziewicz A., Bogacka A., 2011. Proteoliza keratyny piór kurzych z wykorzystaniem pozakomórkowych enzymów proteolitycznych szczepu *Bacillus cereus* B5E/SZ. *Żywn. Nauka Technol. Jakość* 6, 204–213.
- Gerard P.J., 2002. The digestive system of keratin-feeding larvae of *Hofmannophila pseudospretella* (Lepidoptera: Oecophoridae). *New Zel. J. Zool.* 29, 15–22. <https://doi.org/10.1080/03014223.2002.9518285>
- Godheja J., Shekhar S.K., 2014. Biodegradation of keratin from chicken feathers by fungal species as a means of sustainable development. *J. Bioremed. Biodeg.* 5, 1–5. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000232>
- Gopinath S.C.B., Anbu P., Lakshmi Priya T., Tang T., Chen Y., Hashim U., Ruslinda A.R., Arshad M.K.M., 2015. Biotechnological aspects and perspective of microbial keratinase production. *J. Biomed. Biotechnol.* 2, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/140726>
- Gousterova A., Braikova D., Goshev I., Christov P., Tishinov K., Vasileva-Tonkova E., Haertlé T., Nedkov P., 2005. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated *Thermoactinomyces* or by alkaline hydrolysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 335–340. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x>
- Gupta, R., Ramnani, P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol. Biot.* 70, 21–33. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0239-8>
- Jahan Z., Khan S.N., Mozammel Hoq M., 2010. Screening of keratinolytic bacteria from poultry wastes. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 45, 261–266. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v45i3.6535>.
- Jayalakshmi T., Krishnamoorthy P., Ramesh Kumar G., Sivamani P., 2010. Isolation and screening of a feather degrading keratinolytic *Actinomyces* from *Actinomyces* sp. *J. Am. Sci.* 6, 45–48.
- Korniłowicz-Kowalska T., Bohacz J., 2002. Some correlations between the occurrence frequency of keratinophilic fungi and selected soil properties. *Acta Mycol.* 37, 101–116. <https://doi.org/10.5586/am.2002.009>
- Korniłowicz-Kowalska T., Bohacz J., 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manage.* 31, 1689–1701, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024>.
- Kunert J., 2000. Physiology of keratinophilic fungi. W: *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, R.K.S. Kushwaha, J. Guarro (red.). *Rev. Iberoam. Micol. (Suppl.)*, Bilbao, 77–85.
- Lasekan A., Abu Bakar F., Hashim D., 2013. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Manag.* 33, 552–565. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.001>.
- Łaba W., Rodziewicz A., 2004. Biodegradacja odpadów keratynowych z przemysłu drobiowego przy udziale bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Sarcina*. *Acta Sci. Polon. Biotechnologia* 3, 109–120.
- Mohamedin A.H., 1999. Isolation, identification and some cultural conditions of a protease-producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate. *Int. Biodeter. Biodegr.* 43, 13–21. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00061-4)
- Nam G.W., Lee D.W., Lee H.S., Lee N.J., Kim B.C., Choe E.A., Hwang J.K., Suhartono M.T., Pyun Y.R., 2002. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch. Microbiol.* 178, 538–547. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0489-0>

- Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Musallam A.A., Al-Zarban S., 1998. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technol.* 66, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00033-9).
- Parihar P., Kushwaha R.K.S., 2000. A survey of keratinophilic fungi as a tool for hen feather utilization. *Mycoscience* 41, 645–649. <https://doi.org/10.1007/BF02460932>
- Peddu J., Chitturi C., Lakshmi V., 2009. Purification and characterization of keratinase from feather degrading *Bacillus* sp. *Internet J. Microbiol.* 8, 1–9.
- Riffel A., Brandelli A., 2002. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 29, 255–258. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000307>.
- Rodziewicz A., Łaba W., 2006. Keratyny i ich biodegradacja. *Biotechnologia* 2, 130–147.
- Silhavy T. J., Kahne D., Walker S., 2010. The bacterial cell envelope. *CSH Perspect. Biol.* 2, 1–16, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Sobolczyk J., Rodziewicz A., Łaba W., Baranowska K., 2008. Bioutylizacja odpadów keratynowych z przetwórstwa drobiowego przez mezo- i termofilne bakterie. W: *Ekotoksykologia w ochronie środowiska*, B. Kołwzan, K. Grabas (red.). *Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych*, Wrocław, 397–402.
- Srivastava A., Sharma A., Suneetha V., 2011. Feather waste biodegradation as a source of amino acids. *Euro. J. Exp. Bio.* 1, 56–63.
- Srivastava B., Khatri M., Singh G., Kumar Arya S., 2020. Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. *J. Clean. Prod.* 252, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119847>
- Staroń B., Banach M., Kowalski Z., 2011. Keratin – origin, properties, application. *Chemik* 65, 1019–1026.
- Sharma M., 2014. *Actinomycetes*: Source, identifications, and their applications. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3, 801–832.
- Syed D.G., Lee J.C., Li W., Kim C., Agasar D., 2009. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technol.* 100, 1868–1871. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.047>.
- Thys R.C.S., Lucas F.S., Riffel A., Heeb P., Brandelli A., 2004. Characterization of protease of a feather-degrading Microbacterium species. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 181–186, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01558.x>
- Tsuboi R., Ko I.J., Matsuda K., Ogawa H., 1987. A new keratinolytic proteinase from clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Dermatol.* 14, 506–508. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1987.tb03616.x>
- Ulfing K., 1983. A preliminary study on the occurrence of Dermatophytes and other keratinophilic fungi in bottom sediments of rivers and lakes. *Acta Mycol.* 19, 331–340. <https://doi.org/10.5586/am.1983.026>
- Wawrzekiewicz K., Łobarzewski J., Wolski T., 1987. Intracellular keratinase of *Trichophyton galilinae*. *J. Med. Vet. Mycol.* 25, 261–268. <https://doi.org/10.1080/02681218780000601>

2. Publikacja 2 [P.2.]



Article

Impact of Ecological Factors on the Occurrence and Spatial-Taxonomic Structure of Keratinophilic Fungi and Their Co-Occurrence in Arable Soils

Justyna Bohacz, Michał Możejko, Teresa Kornilowicz-Kowalska and Grzegorz Siebielec



Article

Impact of Ecological Factors on the Occurrence and Spatial-Taxonomic Structure of Keratinophilic Fungi and Their Co-Occurrence in Arable Soils

Justyna Bohacz ¹, Michał Mozejko ^{1,*}, Teresa Kornilowicz-Kowalska ¹ and Grzegorz Siebielec ²

- ¹ Department of Environmental Microbiology, Faculty of Agrobioengineering, University of Life Sciences in Lublin, Leszczyńskiego 7 Street, 20-069 Lublin, Poland; justyna.bohacz@up.lublin.pl (J.B.); teresa.kornilowicz@up.lublin.pl (T.K.-K.)
- ² Department of Soil Science Erosion and Land Protection, Institute of Soil Science and Plant Cultivation—State Research Institute, Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Poland; gs@iung.pulawy.pl
- * Correspondence: michal.mozejko@up.lublin.pl; Tel.: +48-815248104

Abstract: Fungi that decompose keratinized animal remains are an important component of the arable soil microbiome. The aim of the study is to characterize the communities of keratinophilic and co-inhabiting (non-keratinophilic) fungi in four cultivated soils that differ in physico-chemical properties, with particular emphasis on granulometric fractions, which have so far been omitted from studies concerning the ecology of these micromycetes. Fungi were isolated using the keratin-baiting method. Fungal species identification was carried out on the basis of their macro- and micromorphological features. The Simpson diversity index and Marczewski–Steinhaus similarity index were calculated for precise determination of the relationships between fungal communities. In the studied soils, *Trichophyton ajelloi* and *Ctenomyces serratus* dominated among keratinophilic fungi, while *Purpureocillium lilacinum* and *Metacordyceps chlamydosporia*, from the orders Eurotiales and Hypocreales, were dominant among non-keratinophilic fungi. The frequency of keratinophilic fungi was significantly positively correlated with pH and the content of two granulometric fractions, as opposed to non-keratinophilic fungi. This was reflected in the higher growth rates of keratinomycetes in loamy soil, chernozem, and rendzina, i.e., soils with a higher content of silt and clay fractions compared to sandy soil characterized by a high content of sand fractions. The species composition of both groups of fungi was most similar between loamy soil and chernozem, whereas the greatest differences were found for sandy soil and rendzina. Chernozem was characterized by the highest diversity of fungal species from both groups of fungi. The study, in addition to providing information about ecological factors, provided a collection of keratinomycete strains that can be used as a starting material for subsequent research stages regarding keratinolytic activity of these fungi and their potential use in agricultural practices.

Keywords: biodiversity of fungi; keratinolytic fungi; ecological factors; arable soils



Citation: Bohacz, J.; Mozejko, M.; Kornilowicz-Kowalska, T.; Siebielec, G. Impact of Ecological Factors on the Occurrence and Spatial-Taxonomic Structure of Keratinophilic Fungi and Their Co-Occurrence in Arable Soils. *Agriculture* **2022**, *12*, 194. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020194>

Academic Editor: MATEVŽ LIKAR

Received: 2 December 2021

Accepted: 26 January 2022

Published: 31 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fungi that colonize and decompose animal remains rich in keratin, i.e., proteins with high nitrogen and sulfur content, are present in various environments. Surface and deep soil layers containing keratin matter, most often the hair of small mammals (mainly rodents), bird feathers, and other keratinized animal remains, are the largest reservoirs and natural habitats of these fungi [1–8]. An additional source of native keratin in cultivated soils are organic fertilizers, e.g., manure containing keratin residues (bristles, hair, and feathers) of farm animals and domestic birds. Native keratin-decomposing fungi are involved in the circulation of elements, mainly nitrogen and sulfur, in natural ecosystems and agroecosystems [3,9]. Keratinophilic fungi play a key role among these organisms. This ecological Ascomycota group specializes in the decomposition of native keratin. The group

comprises the so-called geophilic dermatophytes and related fungi from the *Chrysosporium* group [10,11]. They are saprotrophs, but some, e.g., *Microsporium gypseum* (*Nannizzia gypsea*), are potentially pathogenic to humans and animals as they can cause skin mycoses [10]. However, as reported by Simpanya [12], soil isolates of this dermatophyte, compared to those originating from animals, have low pathogenicity and only very virulent strains are able to cause infections. In addition to keratinophilic fungi, keratin residues in soils are colonized by various less-substrate-specialized fungi, which are conventionally referred to as non-keratinophilic species [13]. Their presence is associated with the heterogeneous composition of keratin residues, which, in addition to various forms of pure keratin, also contain various organic compounds, mainly non-keratin proteins [3]. The criterion for discriminating between keratinolytic and non-keratinolytic fungi was specified by Kunert [14] as the degree of degradation of native keratin (hair) used as the only source of C, N, S, and energy in 8-week liquid cultures. Fungi that decomposed at least 40% of native keratin in these conditions were classified as keratinolytic fungi, and the rest were referred to as non-keratinolytic species. Kornilowicz-Kowalska [15] showed that typically keratinolytic fungi, such as the geophilic dermatophytes *Arthroderma quadrifidum* (*Trichophyton terrestre* teleomorph) and *Chrysosporium keratinophilum* (*Aphanoascus keratinophilus* teleomorph), decomposed 80–90% of the substrate in 8-week liquid cultures, incubated at 20 °C, containing chicken feathers as the only source of C, N, S, and energy. In turn, non-keratinolytic fungi, e.g., *Paecilomyces lilacinus*, decomposed slightly more than 20% of the feather mass [15]. In a study on the decomposition of waste feathers by geophilic fungi from the *Chrysosporium* group (*Aphanoascus fulvescens* and *Chrysosporium articulatum*), Bohacz [16] reported that approximately 20% of total nitrogen from feather keratin was released in the form of peptides and amino acids, and 26% to 46% was released in the form of ammonium ions in the cultures of all fungal strains.

The ability of keratinophilic fungi to biodegrade native keratin is determined by the secretion of substrate-specific proteases called keratinases [9,17,18] and the ability to break keratin disulfide bridges responsible for its resistance to “normal” proteolytic enzymes [14]. In contrast to non-keratinophilic species, keratinophilic fungi produce specific morphological structures composed of vegetative mycelium, which is responsible for the mechanical destruction of native keratin, and secrete lytic factors involved in keratinolysis [3].

Keratin residues, which are the only source of C, N, and S for keratinophilic fungi, not only provide these fungi with nutrients and energy, but also create a less competitive environment facilitating their survival [18]. The distribution and diversity of keratinolytic mycobiota in soil depends not only on the presence of keratinized animal remains, but also on many other ecological factors [2,19,20]. Garg et al. [19] included here: (i) climatic factors such as temperature and light, especially UV radiation and seasonal variations, (ii) soil factors, i.e., soil pH, abundance of carbonate, nitrogen and sulfur, moisture, humus, presence of heavy metals, fatty acids and fats, salts and agrochemicals, and (iii) biotic factors, i.e., birds and animals—the source of keratin substrate. CaCO₃ and available phosphorus are listed among other ecological factors determining the growth of keratinomycetes, including geophilic dermatophytes in cultivated soils [18,21]. Soil pH is one of the most important of the aforementioned factors [12,18–20,22–26]. The research conducted so far has shown that humus-rich soils with neutral pH are characterized by the highest keratinomycete species richness, while humus-poor acidic soils are colonized by fungal biota with a low diversity of species composition [2,18,25]. Studies on the ecological determinants of the community structure of fungi colonizing and decomposing keratinized animal remains in cultivated soils (arable soils) have rarely been conducted [12,26].

Since there is a lack of in-depth information on this subject, the main aim of the present study is to carry out a comprehensive assessment of the diversity of fungi inhabiting keratinized biomass in cultivated soils differing in their physico-chemical properties, i.e., granulometric composition, organic matter and nitrogen content, pH, and several other parameters. The adopted hypothesis assumes that the presence of keratinophilic fungi and

co-occurrence of non-keratinophilic fungi in arable soils was determined by chemical and physical soil properties, especially the granulometric composition. Several indicators of the frequency and diversity of organisms colonizing the environment were used to achieve the research objectives. Correlation analysis was performed to determine their relationships with soil environmental parameters. An analysis of variance was also performed to show significant differences between individual soils in a wider spectrum. Additionally, as part of the study, a collection of keratinomycete strains was obtained that can be used as a starting material for further research concerning keratinolytic activity of these fungi and their potential applications in agricultural practices.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of Soil Samples

The experimental material consisted of four soils with different physico-chemical properties. They were sampled in the Lublin province (south-eastern Poland) on two private farms in Sobieszyn (soil I: 51°59'85.73 N, 22°13'34.30 E and II: 51°59'68.00 N, 22°13'46.96 E) and Żulice (soil III: 50°53'57.20 N, 23°78'26.85 E) and on a farm in Bezek (soil IV: 51°19' N, 23°25' E) belonging to the University of Life Sciences in Lublin. Soil samples were collected in early autumn in 2018 (at the turn of the month from September to October). A representative sample from each soil was collected into sterile foil bags from 10 evenly distributed sites of a given field, from a depth of 0–20 cm, and mixed. Each soil was placed in a separate bag. The final mass of the collected representative sample from each soil was approx. 10 kg. After transfer to the laboratory, the soil was sieved through a 2 mm mesh and mixed.

2.2. Chemical Determinations

Air-dried soil samples were ground in a porcelain mortar, sieved through a ϕ 2 mm mesh, milled, homogenized, and stored in paper bags at 20 °C. Chemical determinations were performed according to certified reference materials (CRM) and internal laboratory standards.

Soil pH was measured in H₂O using a combined glass electrode in both water and 1 M KCl slurry at a soil/solution ratio of 1:2 (*v/v*). Total carbon (C tot.) and nitrogen (N tot.) were analyzed by combustion using a CN analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). Total organic C (C org.) was determined after sulfochromic oxidation, followed by titration of excess K₂Cr₂O₇ with [FeSO₄(NH₄)₂SO₄] 6H₂O (PN-ISO 14235, 2003).

Soil texture was determined using a Mastersizer 2000 laser diffraction particle size analyzer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Total P, K, Mg, and Ca contents were measured after sample digestion in a 3:1 mixture of concentrated HNO₃:HCl in Teflon PFA vessels in a microwave accelerated reaction system (MarsXpress; CEM Corp., Matthews, NC, USA), followed by elemental analysis in the extracts using ICP-MS (Agilent 7500ce).

Assimilable phosphorus was measured using the Egner-Riehm colorimetric method after extraction with calcium lactate (0.02 M) in diluted HCl (0.01 M). Subsequently, colorimetric measurements, based on reaction with ammonium molybdate, were carried out in a Perkin Elmer Lambda 45 spectrometer. Assimilable potassium (K) was measured after the same extraction by AAS using AAnalyst 800 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Carbonates in the soils were determined by dissolving it with hydrochloric acid and measuring CO₂ production.

Soil type and agricultural usability complex were determined using a digital soil map at a scale of 1:25,000, managed by the Institute of Soil Science and Plant Cultivation-State Research Institute, Poland, based on soil sampling location. The soil type derived from the national map was then translated into World Reference Base (WRB) classification (IUSS Working Group WRB [27]). Soil I and II were classified as Cambisols with particle size distribution of light loamy sand and sandy loam, respectively. In the text, these soils are

conventionally defined as sandy and loamy soil, respectively. Soil III was classified as Chernozem with the texture of silt loam, while soil IV was identified as Leptosol with particle size distribution of silt loam. According to the data of the IUSS Working Group WRB [27], Leptosols on a limestone substrate are called Rendzina; therefore, Leptosol in this study was referred to as rendzina or calcareous soil.

In terms of the agricultural use classification, soil I represented poor rye complex 6, and soil III represented very good wheat complex 1, whereas soils II and IV belonged to defective wheat complex 3. The detailed characterization of the soils is presented in Table 1.

Table 1. Particle size distribution and chemical characterization of the analyzed soils.

Parameter	Soil Type/Particle Size Distribution			
	Cambisol/Loamy Sand	Cambisol/Sandy Loam	Chernozem/Silt Loam	Leptosol/Silt Loam
C org. [%]	0.59	1.02	1.45	3.16
Organic matter [%]	1.01	1.76	2.5	5.44
N tot. [%]	0.059	0.107	0.154	0.301
C tot. [%]	0.665	1.196	1.692	10.289
CaCO ₃ [%]	0.00	0.00	0.00	57.96
P ₂ O ₅ [mg kg ⁻¹]	102.00	67.00	114.00	212.00
K ₂ O [mg kg ⁻¹]	80.00	140.00	207.00	472.00
pH _{KCl}	3.4	5.4	5.0	6.9
P [mg kg ⁻¹]	500.88	481.44	773.73	994.65
Mg [mg kg ⁻¹]	575.68	2851.90	2214.59	19,300.12
K [mg kg ⁻¹]	1079.87	5158.00	3886.99	7562.13
Ca [mg kg ⁻¹]	578.78	2422.73	3604.02	170,000.50
Ø 2–0.05 mm [%]	84.08	54.57	17.37	31.93
Ø 0.05–0.002 mm [%]	14.69	39.83	75.58	58.07
Ø < 0.002 mm [%]	1.23	5.61	7.04	9.99

2.3. Mycological Analyses

2.3.1. Substrate

Broiler chicken feathers supplied by a poultry processing plant (Superdrob) in Lublin, Poland, were used as a substrate for the isolation of keratinophilic fungi. Feathers were thoroughly washed to remove any residual post-slaughter waste. Feathers were subsequently dried and shredded into fragments <5 mm. Feathers were sterilized by gassing to maintain the tertiary structure of keratin proteins (disulfide bridges).

2.3.2. Isolation of Keratinophilic Fungi

Keratinophilic fungi were isolated using the keratin bait method [2]. For each soil sample, 50 Petri dishes with a diameter of 180 mm were filled with approx. 30 g of soil, which corresponded to approx. 1/3 of the plate volume. In total, 1500 g portions of each soil were transferred onto the Petri dishes. Then, an even layer of chicken feathers was laid over the entire surface. The dishes were placed in a humid chamber, and the soil was periodically moistened as needed. Incubation was carried out at room temperature.

After 3–4 weeks of incubation in a humid chamber, the degree of fungal colonization of feathers was assessed. Mycelium visible to the naked eye was collected from each Petri dish, containing soil sampled from six randomly selected zones located at a distance, and transferred onto a plate with a Sabouraud medium for keratinolytic fungi (g dm^{-3}): glucose (40), peptone (10), agar (20), 30 mg dm^{-3} streptomycin and 2 mg dm^{-3} chlortetracycline, and 500 mg dm^{-3} actidione (an antifungal antibiotic). The fungi were cultured in an incubator at $26 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1–2 weeks (fast-growing fungi) or 2–3 weeks (slow-growing fungi). After this time, the mycelium was transferred to slants with Sabouraud medium without antibiotics and actidione and re-incubated at $26 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2–3 weeks to obtain pure cultures, which were identified based on their macro- and micromorphological traits.

2.3.3. Identification of Fungi

The fungal genera and species were identified microscopically using an Olympus BS-41 microscope equipped with a CVIII4 camera with Cell-A software, and macroscopically by observing fungal growth on plates and slants. Microscopic evaluation consisted of the preparation of microcultures of pure fungal cultures and the observation of the shape and size of spores and other reproductive structures, e.g., fruiting bodies, and the ability to produce chlamydozoospores. Macroscopic evaluation was based on the observation of colony size and structure, color of the obverse and reverse, and the ability to release pigments into the substrate. In both cases, the systematic studies conducted by Domsch et al. [28], Kwaśna et al. [29], Nelson et al. [30], and van Oorschot [11] were used for final identification. The current nomenclature of the analyzed fungi was verified in the Index Fungorum: www.indexfungorum.org.

2.4. Result Analysis

The number of colonized soil samples, number of fungal genera, species and strains isolated from each soil sample, as well as the number of species per plate/soil sample were included in the analysis of the frequency of fungal occurrence. It was assumed that one soil sample was colonized by only one strain of a given species. To determine dominant species, the species dominance coefficients were calculated from the formula [31]:

$$D = 100 (S_a / S)$$

where S is the sum of isolates in a soil sample, and S_a is the sum of isolates of a given species.

The Simpson diversity index (D) [32] and the Marczewski–Steinhaus similarity index (S) [33] were calculated to precisely determine the relationships between fungal communities colonizing the analyzed soils.

The Simpson index, based on the probability theory, was calculated using the following formula:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S (p_i^2)$$

where p_i is the proportion of isolates of species “ i ” in a given fungal community, with $p_i = n_i/N$ (n_i is the number of isolates (strains) of species “ i ”, and N is the total number of strains). The values of the Simpson index can range from 0 (low diversity) to $1-1/S$, where S is the number of species in the community. The greater the diversity, the greater the value of the Simpson index.

The index of species similarity of fungal communities was calculated using the formula:

$$S(1,2) = w / (a + b - w)$$

where a is the number of species in community 1, b is the number of species in community 2, and w is the number of species common to both communities

The spatial and taxonomic structure of fungal communities was also estimated, assuming, as in Kornilowicz-Kowalska et al. [34], that the taxonomic structure of fungal communities is a proportional number of species from a given taxonomic group (orders) in relation to the total number of species expressed in %. In turn, the spatial structure is a proportional number of records (= number of strains) per representatives of the same taxonomic group (orders) in relation to the total number of records (strains) expressed in %. The following scale was used to assess the frequency of fungi (strains, species, genera, and orders): <1% is sporadic, 1–5% is rare; 6–10% is common, 11–25% is very common, 26–50% is abundant, and >50% is very abundant.

2.5. Statistical Analyses

Pearson's r -correlation analysis was performed to determine the interrelationships between the studied indices, i.e., the number of isolates, species, orders, groups of microorganisms, and the physicochemical parameters of the soils. The data were correlated at three levels of significance: $\alpha = 0.05$, 0.01, and 0.001 using Arstat (University of Life Sciences, Lublin, Poland) and Statistica software ver.13.3 (StatSoft, Kraków, Poland). One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test, with a significance level of $\alpha = 0.05$, was carried out to demonstrate the differences between the soils in terms of the frequency of occurrence of keratinophilic and non-keratinophilic fungi using Statistica software ver.13.3 (StatSoft, Kraków, Poland).

3. Results

3.1. Growth Indices of Keratinophilic and Non-Keratinophilic Fungi in the Analyzed Soils

The degree of colonization of the plates/soil samples by fungi growing on fragmented chicken feathers reached 95.5%, indicating that 191 out of 200 plates were colonized. Keratinophilic (= keratinolytic) fungi were detected in 76% of the samples (152 plates). Sandy soil exhibited the lowest degree of colonization by these fungi, i.e., only 24%. The other soils, i.e., loamy soil, chernozem, and rendzina, exhibited a very high degree of colonization by keratinophilic fungi in the range of 90–98%, with the highest value recorded for chernozem samples. Sandy soil, loamy soil and chernozem were characterized by a predominance of geophilic dermatophytes, which accounted for 22%, 90%, and 92%, respectively, of which 4%, 2%, and 64% were *Chrysosporium* representatives, respectively. In turn, keratinophilic fungal biota in rendzina samples was represented only by a monoculture of non-dermatophytic fungi constituting 90% of the colonizing species (Table 2). Chernozem samples were characterized by the highest richness of keratinophilic fungal taxa, as five genera and seven species were identified. These samples also showed the greatest abundance of keratinophilic species per one plate/soil sample. In contrast, the lowest abundance of keratinophilic mycobiota was found in sandy soil (Table 2). In comparison to other soil types, loamy soil was characterized by a higher taxon richness (genera and species) of non-keratinophilic fungi co-occurring with keratinomycetes (Table 2). Analysis of the variance of the number of isolated strains of keratinophilic fungi showed that the frequency of these fungi in rendzina was significantly different from that in chernozem and sandy soil, but not from that in loamy soil. The lowest frequency of occurrence of these fungi was recorded in sandy soil and the highest in chernozem. With respect to non-keratinophilic fungi, all four arable soils were found to be significantly different from each other. Among them, rendzina had the significantly lowest frequency of these fungi, while loamy soil the highest (Table 2).

Table 2. Growth indices of keratinophilic and non-keratinophilic fungi in the analyzed soils and the analysis of variance (ANOVA) and homogenous groups (HSD–Tukey test) in the studied arable soils, including frequency of keratinophilic and non-keratinophilic isolates; the same letters (a, b, c and d) indicate means that do not differ significantly from each other (at the significance level of $\alpha = 0.05$); means of the compared pairs with different letters (e.g., a and b) differ significantly (at the same significance level of $\alpha = 0.05$).

Growth Indices	Soil			
	Sandy	Loamy	Chernozem	Rendzina
Number of Plates/Samples Colonized by:				
Keratinophilic fungi	12	46	49	45
Including geophilic dermatophytes	11	45	46	0
Chrysosporium group	2	1	32	45
Non-keratinophilic fungi	41	50	49	46
Total	41	50	50	50
Number of Isolated				
Genera				
Keratinophilic	2	3	3	1
Non-keratinophilic	12	15	11	14
Total	14	18	16	15
Species				
Geophilic dermatophytes	1	2	2	0
Chrysosporium group	2	1	5	1
Non-keratinophilic	14	16	14	15
Total	17	19	21	16
Strains				
Geophilic dermatophytes	18	20 ^b	131	132 ^a
Chrysosporium group	2		103	154 ^c
Non-keratinophilic			51	124 ^a
Total	135 ^b	192 ^d	172 ^c	71 ^a
Total	155	324	326	195
Number of Species per Plate/Sample				
Geophilic dermatophytes	0.36	2.62	2.06	0
Chrysosporium group	0.04	0.02	1.02	2.48
Total	0.4	2.64	3.08	2.48
Non-keratinophilic	2.7	3.84	3.44	1.42

3.2. General Characteristics of Keratinophilic and Non-Keratinophilic Species Composition

Table 3 presents the characteristics of the species composition (including the number of isolates) of keratinophilic and non-keratinophilic fungi isolated from the analyzed soils. In total, 1000 isolates of keratinophilic and non-keratinophilic fungi were obtained from the four studied soils; 430 isolates, constituting 43% of all isolated fungi, were keratinophilic species (20 isolates from sandy soil, 132 from loamy soil, 154 from chernozem, and 124 from calcareous soil). The percentage of keratinomycetes in fungal biota colonizing native feather keratin was 13%, 41%, 47.5%, and 64%, respectively. Based on phenotypic characteristics, the fungi were classified into five genera and seven species. Non-keratinophilic fungi (570 isolates) were represented by 19 genera and 19 species, and 106 isolates were not identified. Of the total number of isolated micromycetes, non-keratinophilic fungi accounted for 87%, 59%, 58%, and 36% in sandy soil, loamy soil, chernozem, and rendzina, respectively. Assuming that only one strain of a given species was isolated from one soil sample, we estimated that the overall frequency of keratinophilic fungi per 1 kg of fresh

soil was 13 colony-forming units (CFU) in sandy soil, 89 CFU in loamy soil, 103 CFU in chernozem, and 83 CFU in rendzina. According to the same estimation principle, the values for non-keratinophilic fungi colonizing native keratin were 90, 128, 115, and 47 CFU kg⁻¹ soil fresh weight, respectively.

Table 3. List of species and number of records of keratinophilic and non-keratinophilic fungi isolated from the analyzed soils.

No.	Fungal Species		Soil				Total
			Sandy	Loamy	Chernozem	Rendzina	
	Species Name Acc. to Index Fungorum	Species Name	Number of Records (Isolates)				
Keratinophilic fungi							
Chrysosporium group							
1.	<i>Chrysosporium</i> sp. (Onygenales)	<i>Chrysosporium</i> sp. (Onygenales)	1	0	3	0	4
2.	<i>Chrysosporium tropicum</i> J.W. Carmich. (Onygenales)	<i>Chrysosporium tropicum</i> J.W. Carmich. (Onygenales)	1	0	5	0	6
3.	<i>Ctenomyces serratus</i> Eidam (Onygenales)	<i>Ctenomyces serratus</i> Eidam (Onygenales)	0	1	41	124	166
4.	<i>Ctenomyces vellereus</i> (Sacc. & Speg.) P.M. Kirk (Onygenales)	<i>Myceliophthora vellerea</i> (Sacc. & Speg.) Oorschot (Sordariales)	0	0	1	0	1
5.	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis & D.L. Lindner (Thelebolales)	<i>Chrysosporium pannorum</i> (Link) S. Hughes (Onygenales)	0	0	1	0	1
Geophilic dermatophytes							
6.	<i>Microsporium gypseum</i> (E. Bodin) Guiart & Grigoraki (Onygenales)	<i>Microsporium gypseum</i> (E. Bodin) Guiart & Grigoraki (Onygenales)	0	2	10	0	12
7.	<i>Trichophyton ajelloi</i> (Vanbreus.) Ajello (Onygenales)	<i>Trichophyton ajelloi</i> (Vanbreus.) Ajello (Onygenales)	18	129	93	0	240
Total keratinophilic			20	132	154	124	430
Non-keratinophilic fungi							
1.	<i>Acremonium rutilum</i> W. Gams (Hypocreales)	<i>Acremonium rutilum</i> W. Gams (Hypocreales)	1	0	0	1	1
2.	<i>Akanthomyces lecanii</i> (Zimm.) Spatafora, Kepler & B. Shrestha (Hypocreales)	<i>Verticillium lecanii</i> (Zimm.) Viégas (Glomerellales)	1	2	0	0	3
3.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries (Capnodiales)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries (Capnodiales)	0	0	0	1	1
4.	<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams (Hypocreales)	<i>Gliocladium roseum</i> Bainier (Hypocreales)	2	5	6	2	15

Table 3. Cont.

No.	Fungal Species		Soil				Total
			Sandy	Loamy	Chernozem	Rendzina	
	Species Name Acc. to Index Fungorum	Species Name	Number of Records (Isolates)				
5.	<i>Cunninghamella elegans</i> Lendn. (Mucorales)	<i>Cunninghamella elegans</i> Lendn. (Mucorales)	1	48	2	2	53
6.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl. (Hypocreales)	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl. (Hypocreales)	0	2	20	0	22
7.	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. (Hypocreales)	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. (Hypocreales)	0	0	7	11	18
8.	<i>Fusarium</i> sp. (Hypocreales)	<i>Fusarium</i> sp. (Hypocreales)	0	5	7	6	18
9.	<i>Gliocladium</i> sp. (Hypocreales)	<i>Gliocladium</i> sp. (Hypocreales)	0	3	0	0	3
10.	<i>Lecanicillium psalliotae</i> (Treschew) Zare & W. Gams (Hypocreales)	<i>Verticillium psalliotae</i> Treschew (Glomerellales)	11	1	17	2	31
11.	<i>Metacordyceps chlamydosporia</i> (H.C. Evans) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Hypocreales)	<i>Verticillium chlamydosporium</i> Goddard (Glomerellales)	1	49	58	21	129
12.	<i>Metarhizium marquandii</i> (Masse) Kepler, S.A. Rehner & Humber (Hypocreales)	<i>Paecilomyces marquandii</i> (Masse) S. Hughes (Eurotiales)	2	11	0	8	21
13.	<i>Oidiodendron griseum</i> Robak (Erysiphales)	<i>Oidiodendron griseum</i> Robak (Erysiphales)	1	0	0	0	1
14.	<i>Paecilomyces</i> sp. (Eurotiales)	<i>Paecilomyces</i> sp. (Eurotiales)	3	1	1	1	6
15.	<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling (Eurotiales)	<i>Penicillium frequentans</i> Westling (Eurotiales)	1	0	0	0	1
16.	<i>Penicillium simplicissimum</i> (Oudem.) Thom (Eurotiales)	<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge (Eurotiales)	27	0	0	0	27
17.	<i>Penicillium</i> sp. (Eurotiales)	<i>Penicillium</i> sp. (Eurotiales)	55	4	8	3	70
18.	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson (Hypocreales)	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson (Eurotiales)	18	54	27	2	101
19.	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. (Mucorales)	<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenb. (Mucorales)	0	2	0	0	2

Table 3. Cont.

No.	Fungal Species		Soil				Total
			Sandy	Loamy	Chernozem	Rendzina	
	Species Name Acc. to Index Fungorum	Species Name	Number of Records (Isolates)				
20.	<i>Sarocladium kiliense</i> (Grütz) Summerb. (Hypocreales)	<i>Acremonium kiliense</i> Grütz (Hypocreales)	0	1	0	0	1
21.	<i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb. (Hypocreales)	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams (Hypocreales)	0	0	0	1	1
22.	<i>Talaromyces purpureogenus</i> Samson, N. Yilmaz, Houbraken, Spierenb., Seifert, Peterson, Varga & Frisvad (Eurotiales)	<i>Penicillium purpureogenum</i> Stoll (Eurotiales)	11	1	5	9	26
23.	<i>Trichoderma</i> sp. (Hypocreales)	<i>Trichoderma</i> sp. (Hypocreales)	1	0	3	1	5
24.	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (Hypocreales)	<i>Gliocladium virens</i> J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster (Hypocreales)	0	0	10	0	10
25.	<i>Verticillium</i> sp. (Glomerellales)	<i>Verticillium</i> sp. (Glomerellales)	0	3	1	0	4
Total non-keratinophilic			135	192	172	71	570
TOTAL			155	324	326	195	1000

Trichophyton ajelloi from the geophilic dermatophyte group and *Ctenomyces serratus* from the Chrysosporium group were the dominant keratinophilic fungi. *Trichophyton ajelloi* accounted for 90–93% of the isolated dermatophytic fungi (240 isolates in total). The highest number of isolates of this species was recorded in loamy soil (129 isolates), while sandy soil was colonized by the lowest number, i.e., 18 isolates. This species was not detected in rendzina samples. Another geophilic dermatophyte, *Microsporium gypseum*, was isolated from loamy soil and chernozem and constituted 1.5% and 6.5% of the isolates, respectively (Table 3).

Ctenomyces serratus was found in a total number of 166 isolates, which corresponded to 93% of Chrysosporium group representatives; it almost exclusively colonized calcareous soil samples (124 isolates), where it accounted for 100% of all keratinophilic fungi isolated from this soil. The lowest abundance of *Ctenomyces serratus* was noted in loamy soil (single isolate), and it did not occur in sandy soil (Table 3). Three other species from the Chrysosporium group, i.e., *Chrysosporium tropicum*, *Ctenomyces vellereus*, and *Pseudogymnoascus pannorum* (formerly *Chrysosporium pannorum*), and an unidentified Chrysosporium sp. were isolated from the tested soils. All these fungi represented approx. 7% of the Chrysosporium group.

In the group of non-keratinophilic (co-occurring) fungi, *Metacordyceps chlamydosporia* strains (formerly *Verticillium chlamydosporium*) were isolated most frequently. Populations of this species represented 23% and 13% of non-keratinophilic and all fungi, respectively (Table 3). *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) also occurred with a high frequency (101 isolates) and accounted for 18% of non-keratinophilic fungi and 10% of all fungi isolated from the soils. *Fusarium* spp. (10%) and *Penicillium* sp. (17%) belonged to frequently or very frequently detected non-keratinophilic fungi. Single isolates

of five species, i.e., *Acremonium rutilum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium glabrum*, *Sarocladium kiliense*, and *Sarocladium strictum*, were also isolated (Table 3).

3.3. Species Dominance Coefficients and the Taxonomic and Spatial Structure of Fungi Colonizing Native Keratin

Species identification of fungal strains isolated from the soils (Table 3) and species dominance coefficients calculated based on these data (Figure 1A) indicated that *Penicillium simplicissimum* was the most abundant fungus colonizing native feather keratin in sandy soil samples. This soil was colonized by 27 isolates of this fungus. They constituted 17% of all fungi in total and 20% of non-keratinophilic fungi. In comparison to other isolates, *Trichophyton ajelloi* and *Purpureocillium lilacinum* had a high frequency (18 isolates), accounting for 12% of total fungal isolates obtained from sandy soil. According to the adopted frequency scale, these species can be considered as very common. At the same time, *Trichophyton ajelloi* was a dominant species with 90% frequency in the group of keratinophilic fungi (Figure 1A). *Lecanicillium psalliotae* and *Talaromyces purpureogenus* were classified as common (8% frequency) in the group of non-keratinophilic fungi isolated from this soil (Figure 1A).

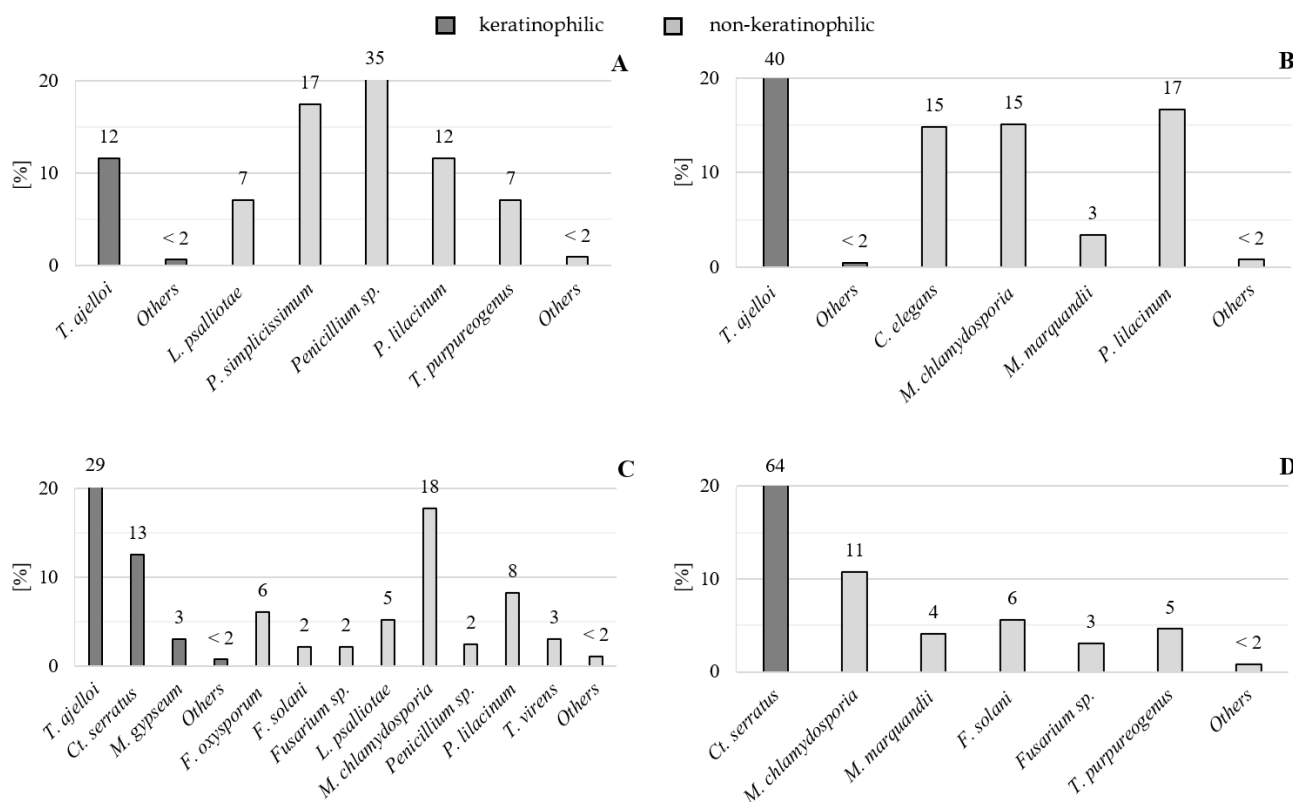


Figure 1. Species dominance coefficients [%] of keratinophilic and non-keratinophilic fungi in the analyzed soils (A) sandy soil; (B) loamy soil; (C) chernozem; (D) rendzina); explanations: *Ct. serratus* (*Ct. serratus*), *F. oxysporum* (*Fusarium oxysporum*), *F. solani* (*Fusarium solani*), *L. psalliotae* (*Lecanicillium psalliotae*), *M. chlamydosporia* (*Metacordyceps chlamydosporia*), *M. gypseum* (*Microsporium gypseum*), *M. marquandii* (*Metarhizium marquandii*), *P. lilacinum* (*Purpureocillium lilacinum*), *P. simplicissimum* (*Penicillium simplicissimum*), *T. ajelloi* (*Trichophyton ajelloi*), *T. purpureogenus* (*Talaromyces purpureogenus*), *T. virens* (*Trichoderma virens*), other fungi (fungi with dominance below 2).

In loamy soil, 48% of all fungi isolated from native feather keratin (132 isolates) belonged to keratinophilic fungi (Figure 1B, Table 3). The dominant species was *Trichophyton ajelloi* (129 isolates), which accounted for 98% of the keratinomycete population and 40% of all fungi colonizing feathers on this soil (Figure 1B). In the group of non-keratinophilic fungi,

a high frequency was recorded for three species, i.e., *Purpureocillium lilacinum* (54 isolates), *Metacordyceps chlamydosporia* (49 isolates), and *Cunninghamella elegans* (48 isolates). They represented 17%, 15%, and 15% of the total number of isolates, and 28%, 26%, and 25% of non-keratinophilic fungi, respectively (Figure 1B).

Similar to loamy soil, chernozem was the richest environment in terms of the number of species colonizing native feather keratin (Figure 1C). In total, 326 fungal isolates were isolated from this soil. Keratinophilic fungi accounted for almost half of the isolates (47%) and *Trichophyton ajelloi* was the dominant species. The *Trichophyton ajelloi* population constituted 29% of the fungal community colonizing feathers in chernozem samples. It represented 60% of the keratinomycete group, which classified this species as very abundant. The frequency of *Ctenomyces serratus* from the Chrysosporium group was also high (Figure 1C). The frequency of this species of all fungi isolated from feathers was 13% and 27% in the group of keratinophilic fungi; therefore, it could be considered an abundant species in the analyzed chernozem. *Metacordyceps chlamydosporia* was a non-keratinophilic species with the highest frequency in chernozem samples. It represented 18% of all fungi isolated from feathers and 38% of non-keratinophilic fungi (Figure 1C).

Rendzina was the only soil in which keratinophilic fungi dominated as a group (Figure 1D). This was evidenced by the fact that they accounted for over 64% of micromycete biota colonizing feathers. In addition, this calcareous soil was the only soil that was not colonized by geophilic dermatophytes. The samples contained only non-dermatophytic keratinophilic fungi represented by a *Ctenomyces serratus* monoculture (Figure 1D). In the group of non-keratinophilic fungi, *Metacordyceps chlamydosporia* was the most frequent species isolated from this soil, as in chernozem samples. The isolates of this fungus accounted for 11% of the total number of isolates and 30% in the group of non-keratinophilic fungi (Figure 1D).

The data in Figures 2 and 3 show that the fungal communities colonizing and decomposing native feather keratin in the analyzed soils represent seven Ascomycota orders: Capnodiales, Erysiphales, Eurotiales, Glomerellales, Hypocreales, Onygenales, and Thelebolales, and one order of Zygomycota (Mucorales). The order Onygenales was represented by keratinophilic fungi and the remaining orders were represented by non-keratinophilic fungi. In terms of the taxonomic structure, the order Hypocreales was characterized by the highest species richness, whereas Capnodiales, Erysiphales, and Thelebolales were represented by the lowest number of species (Figure 2). The species richness of the orders Eurotiales and Onygenales was lower, but not as low as the three orders mentioned above. Chernozem samples were found to have the richest taxonomic structure of native keratin-colonizing fungi. This was manifested by the presence of 15 species from six orders, including nine species from the order Hypocreales and six representatives of Onygenales. Other remaining soil samples contained keratin-colonizing species from five orders. Rendzina samples (12 species) showed the lowest species richness (Figure 2). In terms of the spatial structure, the largest number of records was recorded for Hypocreales from the group of non-keratinophilic fungi and Onygenales from the group of keratinomycetes (Figure 3). The highest number of records (orders) of keratinophilic and non-keratinophilic fungi was found in loamy soil and chernozem (324 and 326 isolates, respectively). They were mainly represented by Hypocreales and Onygenales. The spatial structure of mycobiota colonizing and decomposing native feather keratin in sandy soil and calcareous soil was dominated by Eurotiales and Onygenales, respectively (Figure 3).

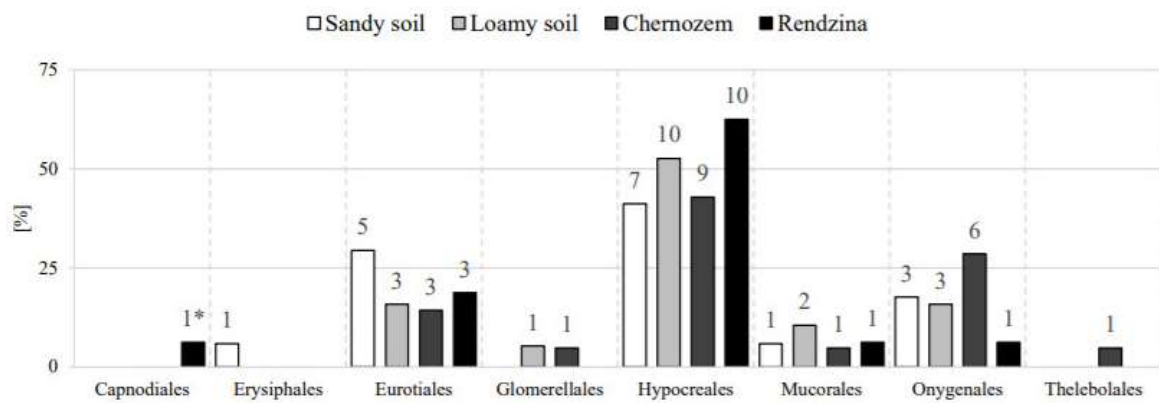


Figure 2. Taxonomic structure [%] of keratinophilic and non-keratinophilic fungi in cultivated soils; explanations: * number of species.

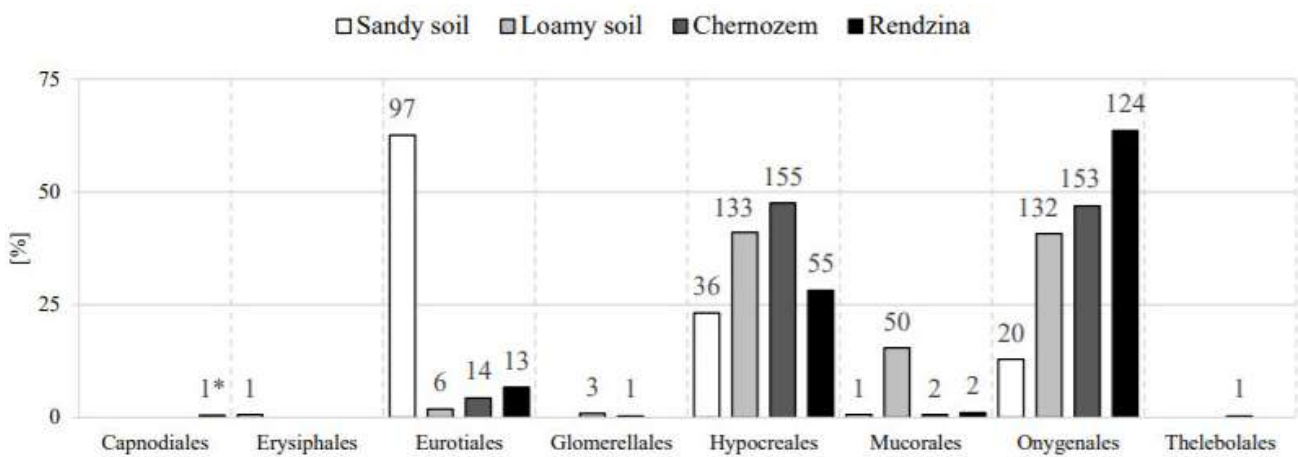


Figure 3. Spatial structure [%] of keratinophilic and non-keratinophilic fungi in cultivated soils; explanations: * number of isolates.

3.4. Species Similarity and Diversity in the Analyzed Fungal Communities

The calculated value of the Marzewski–Steinhaus species similarity index (S) provided information on the similarity between the analyzed environments in terms of fungal species occurrence. It indicated that the species similarity in the group of fungi colonizing native feather keratin in the analyzed soils was relatively low, as it exceeded 50% in only one case. The highest number of common species was recorded for loamy soil and chernozem (53.80%), while the lowest (43.50%) was found for sandy soil and rendzina (Table 4).

Table 4. Values of the Marzewski–Steinhaus species similarity index (S) calculated for the keratinophilic and non-keratinophilic (co-occurring) fungi in the analyzed soils; explanations: soil I, sandy soil; soil II, loamy soil; III, chernozem; and IV, rendzina.

Compared Habitats	Marzewski–Steinhaus Similarity Index (S)
Soil I–Soil II	44.00%
Soil I–Soil III	46.20%
Soil I–Soil IV	43.50%
Soil II–Soil III	53.80%
Soil II–Soil IV	45.80%
Soil III–Soil IV	48.00%

Species diversity was analyzed using the Simpson index, taking into account species frequency. The lower the value of the Simpson species diversity index (D), the lower the diversity of the fungal community with the dominance of a single species. The values of this coefficient in the communities of keratinophilic and non-keratinophilic (co-occurring) fungi in the analyzed soils are listed in Table 5. Considering all micromycetes (both groups of fungi) colonizing native feather keratin, sandy soil and chernozem exhibited the greatest species diversity ($D = 0.8057$ and $D = 0.8533$, respectively), and the lowest value was observed for calcareous soil samples ($D = 0.5753$). Chernozem samples in the group of keratinophilic fungi were characterized by the greatest species diversity, whereas the lowest value of this coefficient was again obtained for rendzina samples ($D = 0.5587$ and $D = 0.00$, respectively) (Table 5). Rendzina and chernozem samples in the communities of non-keratinophilic fungi were characterized by greater species diversity than sandy and loamy soils (Table 5). In contrast to keratinophilic fungi, the values of the Simpson coefficient in this fungal group were high and ranged from 0.7617 to 0.8467 (Table 5).

Table 5. Values of the Simpson species diversity index (D) calculated for the communities of keratinophilic and non-keratinophilic fungi in the analyzed soils.

Sandy Soil	Loamy Soil	Chernozem	Rendzina
Keratinophilic and non-keratinophilic fungi (total)			
0.8057	0.7667	0.8533	0.5753
Keratinophilic fungi			
0.1850	0.0447	0.5587	0.000
Non-keratinophilic fungi			
0.7617	0.7873	0.8269	0.8467

3.5. Correlations between the Frequency of Occurrence of Fungi and Soil Properties

The analysis was performed based on the frequency of all keratinophilic fungi with a dominant species and all non-keratinophilic fungi.

The presence of the ecological group of keratinophilic fungi was significantly correlated with soil pH and its granulometric composition (Table 6). This was evidenced by an increase in the frequency of these fungi at higher pH values and in soils with silt (ϕ 0.05–0.002 mm) and clay ($\phi < 0.002$ mm) fractions, while it decreased with increasing sand fraction content (ϕ 2.0–0.05 mm). Moreover, potassium content was found to significantly stimulate the frequency of this fungal group in soil. Non-keratinophilic fungi were more abundant in soils with a wider spectrum of macronutrients, i.e., total P, Ca, and Mg, and assimilable forms of P and K. Their occurrence in the soils was not supported by increased content of organic carbon compounds, organic carbon, total N and C, or the presence of CaCO_3 .

Correlation analysis of the effect of soil properties on the occurrence frequency of the most abundant keratinomycete species, i.e., *Ctenomyces serratus* from the Chrysosporium group and *Trichophyton ajelloi*, representing geophilic dermatophytes, revealed that the frequency of the former species was more strongly correlated with certain edaphic factors than the frequency of the latter species. The frequency of *Ctenomyces serratus* population increased with increasing pH, organic matter content, total C and N, assimilable phosphorus and potassium forms, CaCO_3 accumulation, and clay fractions. In turn, the occurrence of this species was low in soils with a high proportion of sand fraction ($r = -0.604^*$). Unfavorable factors affecting *Trichophyton ajelloi* occurrence included the presence of CaCO_3 (negative correlation) and an increase in total carbon content ($r = -0.603^*$). Additionally, high content of assimilable phosphorus and potassium in soil adversely affected the occurrence of this geophilic dermatophyte (negative correlation). This effect was demonstrated by correlation analyses between the frequency of *Trichophyton ajelloi* and total Mg and Ca content. Although no significant correlation was found between the frequency of *Trichophyton ajelloi*

and soil pH, organic carbon, organic matter, and total N, as well as the negative values of the r coefficient calculated for these parameters (Table 6), suggested that the frequency of this fungus decreased with increasing pH and organic matter and nitrogen contents.

Table 6. Correlation coefficients (r) between the total frequency of keratinophilic fungi, non-keratinophilic fungi, and some keratinophilic species and soil properties; significance level α : 0.05 (*), 0.01 (**), and 0.001 (***)

Parameters	Keratinophilic	Non-keratinophilic	Geophilic dermatophytes	Chrysosporium group	Trichophyton ajelloi	Ctenomyces serratus
C org.	0.460	−0.758 **	−0.453	0.976 ***	−0.463	0.986 ***
Organic matter	0.461	−0.759 **	−0.452	0.975 ***	−0.462	0.985 ***
N tot.	0.509	−0.721 **	−0.408	0.974 ***	−0.420	0.980 ***
C tot.	0.267	−0.864 ***	−0.603 *	0.938 ***	−0.603 *	0.962 ***
pH KCl	0.698 *	−0.450	−0.073	0.801 **	−0.072	0.818 **
P ₂ O ₅	0.133	−0.924 ***	−0.738 **	0.948 ***	−0.752 **	0.955 ***
K ₂ O	0.446	−0.770 **	−0.469	0.978 ***	−0.478	0.988 ***
CaCO ₃	0.184	−0.895 ***	−0.657 *	0.913 ***	−0.653 *	0.942 ***
P	0.464	−0.720 **	−0.460	0.981 ***	−0.490	0.965 ***
Mg	0.281	−0.841 ***	−0.571	0.918 ***	−0.567	0.946 ***
K	0.695 *	−0.415	−0.037	0.757 **	−0.031	0.778 **
Ca	0.197	−0.889 ***	−0.648 *	0.914 ***	−0.644 *	0.942 ***
ø 2–0.05	−0.897 ***	−0.064	−0.250	−0.651*	−0.208	−0.604 *
ø 0.05–0.002	0.891 ***	−0.020	0.282	0.605 *	0.238	0.554
ø < 0.002	0.798 **	−0.409	−0.032	0.856 ***	−0.049	0.849 ***

Correlation coefficients between the properties of the analyzed soils and the frequency of Onygenales, as a taxonomic group of keratinomycetes, confirmed the relationships observed for keratinophilic fungi as an ecological group (Table 7). It was found that the frequency of these fungi in soil was positively correlated with soil pH and silt and clay fractions, while negatively correlated with sand fraction content. Moreover, the abundance of Onygenales in soil increased with increasing in potassium content.

The occurrence of Hypocreales, i.e., the order represented by the majority of the isolated non-keratinophilic fungi colonizing native feather keratin, was positively correlated with silt fraction content and negatively correlated with sand fraction content. The occurrence of Eurotiales, i.e., the second most frequent order of non-keratinophilic fungi in the soils, was positively correlated with sand fraction levels, while negatively correlated with silt and clay fractions and soil pH.

Table 6 does not show values of the correlation coefficients (r) for the remaining keratinophilic fungal species because of the low number of records. Similarly, the values of taxonomic units (orders) with low frequency of occurrence are not included in Table 7.

Table 7. Correlation coefficients (r) between the frequency of some taxonomic units (orders) and soil properties. significance level α : 0.05 (*), 0.01 (**), and 0.001 (***)

Parameters	Capnodiales	Erysiphales	Eurotiales	Glomerellales	Hypocreales	Mucorales	Onygenales	Thelebolales
C org.	0.672 *	−0.570	−0.530	−0.343	−0.174	−0.302	0.460	−0.062
Organic matter	0.693 *	−0.573	−0.533	−0.335	−0.171	−0.302	0.463	−0.061
N tot.	0.694 *	−0.612 *	−0.570	−0.307	−0.112	−0.292	0.510	−0.008
C tot.	0.729 **	−0.407	−0.373	−0.417	−0.375	−0.318	0.270	−0.257
pH _{KCl}	0.613 *	−0.821 **	−0.808 **	0.086	0.132	0.119	0.702 *	−0.081
P ₂ O ₅	0.723 **	−0.232	−0.177	−0.638 *	−0.452	−0.597 *	0.133	−0.104
K ₂ O	0.656 *	−0.557	−0.517	−0.349	−0.184	−0.312	0.449	−0.068
CaCO ₃	0.718 **	−0.333	−0.301	−0.447	−0.453	−0.323	0.188	−0.333
P	0.609 *	−0.508	−0.446	−0.485	−0.089	−0.544	0.464	0.234
Mg	0.699 *	−0.430	−0.401	−0.363	−0.363	−0.245	0.285	−0.306
K	0.543	−0.824 ***	−0.817 **	0.143	0.145	0.199	0.701 *	−0.132
Ca	0.746 **	−0.346	−0.313	−0.441	−0.440	−0.320	0.200	−0.322
ø 2–0.05	−0.239	0.848 ***	0.805 **	−0.048	−0.604*	0.155	−0.891 ***	−0.677 *
ø 0.05–0.002	0.218	−0.827 ***	−0.780 **	0.047	0.639*	−0.165	0.882 ***	0.729 **
ø < 0.002	0.533	−0.865 ***	−0.833 ***	−0.009	0.266	−0.044	0.796 **	0.196

4. Discussion

Most studies on the occurrence of keratinophilic fungi have focused on the epidemiological aspect [8,24,35–37], as soil is regarded as one of the reservoirs of pathogenic dermatophytes and other related fungal pathogens with keratinolytic properties [38]. However, from the perspective of soil environmental function, the fungal biota with the ability to decompose keratin proteins and other less assimilable fibrous proteins, such as elastin or collagen, is an important component of soil communities. It is involved in transformations of N and organic S, as well as in providing easily available forms of these elements for the microbiome of soil and plant roots.

The experiments conducted in this study showed the lowest frequency of keratinophilic fungi in sandy soil and the highest frequency in chernozem. Similarly, the highest fungal richness and diversity were observed in chernozem. This was confirmed by an analysis of variance, sandy soil, and chernozem that differed significantly from each other and from two other soils (loamy soil and rendzina—insignificant differences) in relation to the keratinomycetes inhabiting them. With respect to non-keratinophilic fungi, all soils were found to be significantly different from each other. As reported by Kornilowicz-Kowalska and Bohacz [2], this was associated with the so-called animalization of this soil (concept introduced by Garg et al. [19]). This was indicated by the presence of numerous traces of animals living in this soil, e.g., rodent burrows, mole corridors, etc. Animalization contributes to the enrichment of chernozem soil with native keratin. Furthermore, the pH of these soils, usually slightly acidic or neutral, enhances the growth of most species of keratinophilic fungi [2,13,18,26]. This was confirmed in the present study by the positive correlation between the occurrence of these fungi and soil pH, as the frequency of the fungi increased with increasing soil pH. Additionally, it was demonstrated for the first time that the frequency of keratinomycetes was correlated with the content of sand, silt, and clay fractions. The total frequency of keratinomycetes was found to be higher with increasing content of silt ($\phi = 0.05\text{--}0.002$) and clay ($\phi < 0.002$ mm) fractions, but it decreased with an increase in the sand fraction proportion ($\phi = 2.0\text{--}0.05$). Data in Table 1 demonstrated that sandy soil had the highest content of sand fractions and the lowest of clay and silt fractions. The lowest frequency of occurrence and low species diversity (Simpson's coefficient = 0.1850) of keratinomycetes corresponded to these data. In turn

(Table 1), chernozem was characterized by the lowest content of sand fractions, the highest of clay fractions, and the highest of silt. The highest frequency and species diversity (Simpson's coefficient = 0.5587) of keratinophilic fungi were recorded in this soil. This suggests that the growth of keratinophilic fungi, as an ecological-physiological group, is enhanced in soils with a particle size distribution associated with an increased sorption capacity (clay fractions) and water-holding capacity (silt and clay fractions). Consequently, soil richness in nutrients, e.g., cations sorbed by clay minerals, and soil water retention are increased. The influence of granulometric fractions on the physico-mechanical and physico-chemical properties of soils has been well-described in numerous publications [39,40]. In contrast, the growth and species diversity of keratinomycetes are not promoted by excessively permeable and airy soils (sandy soils) because of their high levels of sand fractions and the weak sorption complex (very low content of clay minerals), and thus low nutrient levels. Similar preferences for the physical and chemical properties of soils were indicated by positive correlation coefficients for Onygenales-Ascomycota, i.e., a taxonomic group comprising all isolated species of dermatophytes and the *Chrysosporium* group (except for *Pseudogymnoascus pannorum*). The growth rates of keratinophilic fungi in the other two soil types, loamy soil and rendzina, were lower than in chernozem, but higher than in sandy soil, except for the fungal species richness and diversity in calcareous soil samples. The growth rates of these fungi in the latter soil were lower than in sandy soil (species monoculture). Therefore, it could be assumed that the nutritional and air-water conditions were generally favorable for keratinomycetes in both of these soil types because of the higher content of silt and clay fractions and lower of sand fractions compared to sandy soil. These observations are supported by the results of Bohacz and Korniłowicz-Kowalska [18], who showed a positive correlation of the frequency of keratinophilic fungi in the soil containing fractions with a diameter less than 0.02 mm, i.e., silt and clay fractions. However, with regard to rendzina, the CaCO_3 content and pH of this soil were of decisive importance for the occurrence of keratinomycetes, as presented later in the chapter.

The results of the present study indicated selection within the keratinomycete community. This was reflected in the dominance of two of seven recorded species of fungi: *Trichophyton ajelloi* from the group of geophilic dermatophytes and *Ctenomyces serratus* from the *Chrysosporium* group. Both of these species are characteristic of the temperate and cool climate zones. These mesophilic fungi do not grow at temperatures above 37 °C [28]. The frequency of occurrence of *Trichophyton ajelloi* and *Ctenomyces serratus* populations in the analyzed soils showed an opposite trend. The *Trichophyton ajelloi* population dominated in sandy soil, loamy soil, and chernozem, but was absent in rendzina samples. In turn, the *Ctenomyces serratus* population was the only keratinophilic species colonizing rendzina samples. It was abundant in chernozem samples, appeared occasionally in loamy soil, and was absent in sandy soil. A similar phenomenon was previously reported by Korniłowicz [13] and Korniłowicz-Kowalska and Bohacz [2]. Based on the significant negative correlation between the frequency of *Trichophyton ajelloi* and *Ctenomyces serratus* populations in 17 cultivated soils, the authors [2] indicated a potential antagonism between these fungi based on their different soil pH preferences. *Trichophyton ajelloi* is an acidophilic and acid-tolerant species, whereas *Ctenomyces serratus* is an alkaliphilic and alkali-tolerant species [19,41]. This has also been confirmed by the results of the present study. The correlation analysis proved that the frequency of *Ctenomyces serratus* increased with increasing soil pH and was significantly positively correlated with the content of CaCO_3 and mineral colloids, organic matter levels, and total N, i.e., clay and silt fractions. The highest levels of these components were mainly determined in rendzina samples. It was the only soil with a CaCO_3 content and a neutral pH value and the highest level of clay minerals, organic matter, and nitrogen, as well as assimilable phosphorus and potassium forms. Hence, we believe that *Ctenomyces serratus* prefers neutral or slightly alkaline macroelement-rich soils with a good sorption complex. In contrast, highly acidic, barren, excessively permeable, and airy soils with a high content of sand fractions and low content of organic matter and silt and clay fractions do not support the growth of this species of keratinomycetes.

However, these soil properties did not limit the occurrence and growth of *Trichophyton ajelloi* populations in the soils tested. This species was clearly dominant in strongly acidic (sandy) to acidic (loamy soil and chernozem) soils with no CaCO₃ content, and its occurrence did not depend significantly on the level of organic matter and nitrogen, but was positively influenced by macronutrient contents (P, Mg, Ca, and K).

Microsporium gypseum deserves attention in the group of the remaining five species of keratinophilic fungi, which accounted for only 5.6% in this group. This potentially pathogenic geophilic dermatophyte was isolated almost exclusively from chernozem samples. The presence of this fungus in this type of soil and its absence in other types of arable soil was previously reported by Kornilłowicz [13], as well as by Kornilłowicz-Kowalska and Bohacz [2]. These authors found that the presence of this fungus in chernozem was primarily determined by its animalization, as this fungal species often colonizes hair and habitats containing this type of native keratin. The abundance of *Microsporium gypseum* in soils containing animal hair was also demonstrated by Kačínová et al. [5].

Non-keratinophilic fungi, co-occurring in the soils with keratinomycetes on native keratin “debris”, represented a diverse microbiome in terms of abundance and taxonomy. In most of the analyzed soils, except for rendzina samples, non-keratinophilic mycobiota constituted a more abundant community of native keratin colonizers than the population of keratinomycetes colonizing this substrate. A greater number of non-keratinophilic fungi, as a group, compared to keratinophilic fungi, colonizing keratin residues in soils was previously reported by Moallaei et al. [7] and Zarrin and Haghgoo [42]. In this study, the overall frequency of non-keratinophilic fungi and the number of species per soil sample were in the following order: loamy soil > chernozem > sandy soil > rendzina. This distribution was slightly different in terms of the total species richness, i.e., chernozem > loamy soil > sandy soil > rendzina. Higher contents of phosphorus and monovalent and divalent cations (K, Mg, and Ca) were the only edaphic factors that exerted the most favorable effect on the overall abundance of these fungi. Other soil parameters, i.e., the level of organic nitrogen, CaCO₃, or assimilable P and K forms, were significantly negatively correlated with the frequency of these fungi. These correlations were clearly different from the relationships observed in the group of keratinophilic fungi. In contrast to keratinomycetes, this group comprised mainly ubiquitous substrate-unspecialized fungi, widespread in various soil types. The species composition of these fungi was similar to that reported by Kornilłowicz [13] in a study on native keratin colonization in cultivated soils with different properties. Most of the genera and species of non-keratinophilic fungi detected on keratin residues in the soils tested in the present study, i.e., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., and *Purpureocillium lilacinum*, were also isolated by Moallaei et al. [7].

The present study demonstrated that edaphic factors had a more significant impact on the frequency (spatial structure) of the dominating taxonomic groups, i.e., Hypocreales and Eurotiales-Ascomycetes, in comparison to the overall frequency of non-keratinophilic fungi. The spatial structure (colonization frequency) of Eurotiales was reduced with an increase in soil fertility parameters (negative correlation with organic matter, silt and clay fractions, total N, and assimilable potassium) and soil pH. In contrast, the frequency of Eurotiales increased with increasing soil acidification and deterioration of soil fertility properties, e.g., trophic and air-water conditions (greater soil airiness and permeability related to a higher percentage of sand fractions). This corresponded to the accumulation of Eurotiales in sandy soil, mainly of the genera *Penicillium* and *Purpureocillium*. This can be explained by the fact that they mostly belong to acidophilic and xerophilic drought-resistant fungi (low water activity coefficient—aw) [28,43]. The spatial structure of Hypocreales showed a frequency shift toward the other studied soils: loamy soil, chernozem, and rendzina. In terms of the edaphic conditions, this was reflected in a significantly higher frequency with increasing silt fractions and decreasing sand fraction contents. The occurrence of these fungi was also favored by a higher level of such macronutrients as K, Mg, and Ca. This group included the genera *Fusarium* and *Verticillium*, which have higher nutritional and water requirements (higher aw values) compared to *Penicillium* and *Purpureocillium* [28,43].

In the species structure, the highest dominance coefficients in the group of 19 recorded non-keratinophilic species were obtained for *Metacordyceps chlamydosporia* (formerly *Verticillium chlamydosporium*) from the order Hypocreales-Ascomycota and *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) representing Eurotiales-Ascomycota. These species more frequently colonized native keratin in loamy soil and chernozem than in sandy soil and calcareous soil. Kornilowicz [13], in a study on sandy, loamy, chernozem, and black earth soils, reported a similar tendency in soil population distribution of these non-keratinophilic feather colonizers. These fungi were also frequently isolated from keratin waste (chicken feathers) with damaged keratin structures [44]. Considering these data and the assumption that population size is an indicator of the metabolic activity of microbial species present in the community [34], we postulate that species co-occurring with keratinomycetes, e.g., *Purpureocillium lilacinum* and *Metacordyceps chlamydosporia*, are involved in native keratin decomposition in the analyzed arable soils. These fungi, especially *Purpureocillium lilacinum*, most likely degraded simpler proteins present in feathers and/or utilized protein products of keratinolysis because of their proteolytic abilities [28]. Most of the remaining non-keratinophilic species [28], less abundantly colonizing native keratin in the analyzed soils, were attributed with proteolytic abilities.

The analysis of species diversity of non-keratinophilic mycobiota using Simpson's diversity indices, assigning particularly high importance to abundant species [32], revealed their high diversity in all soils, but the highest diversity was recorded in chernozem samples (0.8269). Similarly, the highest species diversity of all mycobiota (keratinophilic and non-keratinophilic fungi) colonizing native feather keratin was also found in chernozem. Therefore, this soil showed the greatest potential of its fungal biota involved in the colonization and decomposition of keratinized animal remains. This soil shared the highest number of species with loamy soil, as evidenced by the highest value of the Marczewski–Steinhaus similarity index for these soils compared to other soil pairs. The least common species were found by comparing the species composition of fungi colonizing native keratin in sandy soil and rendzina. The differences in pH, organic matter content, total N, fraction proportions, and macronutrients between loamy soil and chernozem were substantially smaller than between sandy soil and rendzina.

Therefore, we conclude that fungal communities colonizing and decomposing native keratin in different soils exhibit greater similarity when differences in soil properties are smaller, and vice versa: the larger the differences in soil properties, the lower the species similarity.

Considering the present results indicating a low degree of colonization of sandy soils by keratinophilic fungi, we propose that fertilization with composts containing keratin waste may be one of the methods of improving the condition of these soils. Bohacz and Kornilowicz-Kowalska [45] and Bohacz [46,47] have demonstrated that composts produced from such keratin waste as chicken feathers together with plant material are rich in keratinophilic fungi and have a high content of assimilable nitrogen and sulfur forms, high humus-forming potential, and properties ensuring good air-water relations in soils. Moreover, as demonstrated by Bohacz [16], keratinophilic fungi can also serve as natural bio-fertilization agents. Since sandy soils, and especially loamy sands, constitute a large proportion (16.2%) of the structure of arable land in Poland [48], the use of such composts would not only improve their fertility, but also activate native keratinomycete biota, as in the case of natural soil "animalization". Furthermore, it would also be a rational disposal method for insufficiently or improperly managed chicken-feather waste.

The collection of keratinophilic fungal strains obtained in this study also can be used as starting material for research regarding keratinolytic activity of these fungi and their potential use in agricultural practices.

Author Contributions: Conceptualization, J.B. and T.K.-K.; methodology, J.B., T.K.-K., M.M. and G.S.; validation, J.B., T.K.-K. and M.M.; formal analysis, M.M. and J.B.; investigation, M.M., J.B., T.K.-K. and G.S.; resources, J.B., T.K.-K., M.M. and G.S.; data curation, M.M. and J.B.; writing—original draft preparation, J.B. and M.M.; writing—review and editing, J.B., M.M. and T.K.-K.; visualization, M.M.

and J.B.; project administration, J.B. and M.M.; funding acquisition, J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by subsidies from the Ministry of Science and Higher Education for the maintenance and development of research potential (research task RKM/S/21/2021).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data is contained within the article.

Acknowledgments: Research financed by subsidies from the Ministry of Science and Higher Education for the maintenance and development of research potential (research task RKM/S/21/2021).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Chmel, L.; Vláčilíková, A. The ecology of keratinophilic fungi in different depths of soil. *Sabouraudia* **1975**, *13*, 185–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Korniłowicz-Kowalska, T.; Bohacz, J. Some correlations between the occurrence frequency of keratinophilic fungi and selected soil properties. *Acta Mycol.* **2002**, *37*, 101–116. [[CrossRef](#)]
- Korniłowicz-Kowalska, T.; Bohacz, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manag.* **2011**, *31*, 1689–1701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Javoreková, S.; Labuda, R.; Maková, J.; Novák, J.; Medo, J.; Majerčíková, K. Keratinophilic fungi isolated from soils of long-term fold-grazed, degraded pastures in National Parks of Slovakia. *Mycopathologia* **2012**, *174*, 239–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kačínová, J.; Tančinová, D.; Labuda, R. Keratinophilic fungi in soils stressed by occurrence of animals. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **2013**, *2*, 1436–1446.
- Volleková, A. Keratinophilic fungi in rodents' burrows and in their adjoining surroundings. *Czech Mycol.* **1985**, *39*, 97–105.
- Moallaei, H.; Zaini, F.; Pihet, M.; Mahmoudi, M.; Hashemi, J. Isolation of keratinophilic fungi from soil samples of forests and farm yards. *Iran. J. Public Health* **2006**, *35*, 62–69.
- Deshmukh, S.K.; Verekar, S.A.; Chavan, Y.G. Incidence of Keratinophilic fungi from the selected soils of Kaziranga National Park, Assam (India). *Mycopathologia* **2017**, *182*, 371–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Filipello-Marchisio, V. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. In *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*; Kushwaha, R.K.S., Guarro, J., Eds.; Revista Iberoamericana de Micología: Bilbao, Spain, 2000; Volume 17, pp. 86–92.
- Otčenášek, M.; Dvořák, J. Ecological classification of dermatophytes. *Mycoses* **1975**, *18*, 425–434. [[CrossRef](#)]
- Van Oorschot, C.A.N. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. *Stud. Mycol.* **1980**, *20*, 1–89. [[CrossRef](#)]
- Simpanya, M.F. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. In *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*; Kushwaha, R.K.S., Guarro, J., Eds.; Revista Iberoamericana de Micología: Bilbao, Spain, 2000; Volume 12, pp. 1–12.
- Korniłowicz, T. The frequency of occurrence and distribution of keratinophilic fungi in some arable soils. *Acta Mycol.* **1993**, *28*, 3–17. [[CrossRef](#)]
- Kunert, J. Physiology of keratinophilic fungi. In *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*; Kushwaha, R.K.S., Guarro, J., Eds.; Revista Iberoamericana de Micología: Bilbao, Spain, 2000; Volume 17, pp. 77–85.
- Korniłowicz-Kowalska, T. Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. *Acta Mycol.* **1997**, *32*, 51–79. [[CrossRef](#)]
- Bohacz, J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *33*, 13. [[CrossRef](#)]
- Takiuchi, I.; Sei, Y.; Takagi, H.; Negi, M. Partial characterization of the extracellular keratinase from *Microsporum canis*. *Sabouraudia* **1984**, *22*, 219–224. [[CrossRef](#)]
- Bohacz, J.; Korniłowicz-Kowalska, T. Species diversity of keratinophilic fungi in various soil types. *Cent. Eur. J. Biol.* **2012**, *7*, 259–266. [[CrossRef](#)]
- Garg, A.P.; Gandotra, S.; Mukrji, K.G.; Pugh, G.J.F. Ecology of keratinophilic fungi. *Proc. Plant Sci.* **1985**, *94*, 149–163. [[CrossRef](#)]
- Al-Musallam, A.A. Distribution of keratinophilic fungi in desert soil of Kuwait. *Mycoses* **1989**, *32*, 296–302. [[CrossRef](#)]
- Ciesielska, A.; Bohacz, J.; Korniłowicz-Kowalska, T.; Stączek, P. Microsatellite-primed PCR for intra-species genetic relatedness in *Trichophyton ajelloi* strains isolated in Poland from various soil samples. *Microbes Environ.* **2014**, *29*, 178–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Böhme, H.; Ziegler, H. The distribution of geophilic dermatophytes and other keratinophilic fungi in relation to the pH of the soil. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **1969**, *38*, 247–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sharma, R.; Swati, K. Prevalence of keratinophilic fungi at various pH in different areas of Jaipur, Rajasthan. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* **2014**, *4*, 17–21.

24. Kumawat, T.K.; Sharma, A.; Sharma, V.; Chandra, S.; Bhadauria, S. A study on the prevalence of keratinophilic fungal biota of semi-arid region of Rajasthan, India. *J. King Saud Univ. Sci.* **2020**, *32*, 1014–1020. [[CrossRef](#)]
25. Chmel, L.; Hasilíková, A.; Hraško, J.; Vláčilíková, A. The influence of some ecological factors on keratinophilic fungi in the soil. *Sabouraudia* **1972**, *10*, 26–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Korníłowicz, T. Studies on mycoflora colonizing raw keratin wastes in arable soil. *Acta Mycol.* **1992**, *27*, 231–245, In Polish. [[CrossRef](#)]
27. IUSS Working Group WRB. *World Reference Base of Soil Resources. International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps*; Update 2015; World Soil Recourses Reports No. 106; FAO: Rome, Italy, 2015.
28. Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T.H. *Compendium of Soil Fungi*, 2nd ed.; IHW: Eching, Germany, 2007.
29. Kwaśna, H.; Chełkowski, J.; Zajkowski, P. *Polish Flora. Fungi (Mycota) v.22 (Deuteromycetes), (Hyphomycetales), (Fusarium)*; Polish Scientific Publishing House: Warsaw-Krakow, Poland, 1991. (In Polish)
30. Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Morasas, W.F.O. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*; The Pennsylvania State University Press: University Park, PA, USA, 1983.
31. Trojan, P. *General Ecology*; Polish Scientific Publishing House: Warsaw, Poland, 1975. (In Polish)
32. Krebs, C.J. *Ecology. The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*, 4th ed.; Harper Collins: New York, NY, USA, 1994.
33. Szcwycyk, W. Soil fungi communities from young Scots pine plantations affected with root rot. *Acta Mycol.* **2007**, *42*, 239–244. [[CrossRef](#)]
34. Korníłowicz-Kowalska, T.; Wojdyło-Kotwica, B.; Bohacz, J.; Możejko, M.T. Biodiversity of saprotrophic fungi of the root zone of grasses and clovers in a permanent meadow in a post-bog habitat in relation to the growing season and fertilization (Zaklesłość Sosnowicka, Western Polesye). In *Environmental Engineering in Polesye, Polish Polesye*; Urban, D., Dobrowolski, R., Jeznach, J., Eds.; International Scientific Publications: Brest, Belarus; Rivne, Ukraine; Warsaw, Poland; Ryazan, Russia, 2020; pp. 485–538. (In Polish)
35. Anane, S.; Hashim, M.; Al-Yasiri, Y.; Normand, A.C.; Ranque, S. Distribution of keratinophilic fungi in soil across Tunisia: A descriptive study and review of the literature. *Mycopathologia* **2015**, *180*, 61–68. [[CrossRef](#)]
36. Anbu, P.; Hilda, A.; Gopinath, S.C.B. Keratinophilic fungi of poultry and feather dumping soil in Tamil Nadu, India. *Mycopathologia* **2004**, *158*, 303–309. [[CrossRef](#)]
37. Agrawal, S.; Nandeibam, J.; Devi, I. Danger of exposure to keratinophilic fungi and other dermatophytes in recreational place in the northeast region of India. *Aerobiologia* **2021**, *37*, 755–766. [[CrossRef](#)]
38. Ajello, I. Soil as a natural reservoir for human pathogenic fungi. *Science* **1956**, *123*, 876–879. [[CrossRef](#)]
39. De Jong, R.; Campbell, C.A.; Nicholaichuk, W. Water retention equations and their relationship to soil organic matter and particle size distribution for disturbed samples. *Can. J. Soil Sci.* **1983**, *63*, 291–302. [[CrossRef](#)]
40. Owczarzak, W.; Dębicki, R.; Mocek, A. Physical properties of soils. In *Soil Science*, 1st ed.; Mocek, A., Ed.; Polish Scientific Publishing House: Warsaw, Poland, 2015; pp. 131–188. (In Polish)
41. Hubálek, Z. Keratinophilic fungi associated with free living mammals and birds. In *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*; Kushwaha, R.K.S., Guarro, J., Eds.; Revista Iberoamericana de Micología: Bilbao, Spain, 2000; Volume 17, pp. 104–108.
42. Zarrin, M.; Haghgoo, R. Survey of keratinophilic fungi from soils in Ahvaz, Iran. *Jundishapur J. Microbiol.* **2011**, *4*, 191–194.
43. Grant, C.; Hunter, C.A.; Flannigan, B.; Bravery, A.F. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int. Biodeterior.* **1989**, *25*, 259–284. [[CrossRef](#)]
44. Korníłowicz, T. Studies on the mycoflora colonizing keratin-bark-urea manure. *Acta Mycol.* **1993**, *28*, 19–30. [[CrossRef](#)]
45. Bohacz, J.; Korníłowicz-Kowalska, T. Fungal diversity and keratinolytic activity of fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. *Process. Biochem.* **2019**, *80*, 119–128. [[CrossRef](#)]
46. Bohacz, J. Changes in mineral forms of nitrogen and sulfur and enzymatic activities during composting of lignocellulosic waste and chicken feathers. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *26*, 10333–10342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Bohacz, J. Composts and water extracts of lignocellulosic composts in the aspect of fertilization, humus-forming, sanitary, phytosanitary and phytotoxicity value assessment. *Waste Biomass Valorization* **2019**, *10*, 2837–2850. [[CrossRef](#)]
48. Krasowicz, S.; Oleszek, W.; Horabik, J.; Dębicki, R.; Jankowiak, J.; Stuczyński, T.; Jadczyński, J. Racjonalne gospodarowanie środowiskiem glebowym Polski. *Pol. J. Agron.* **2011**, *7*, 43–58. (In Polish)

3. Publikacja 3 [P.3.]

1 Biodegradation of feather keratin by pigmented and non-pigmented fungal strains of
2 *Trichophyton ajelloi* from two soils with different physical and chemical properties

3
4 Justyna Bohacz ^a, Michał Możejko ^{a,*}

5
6 ^a Department of Environmental Microbiology, Faculty of Agrobiotechnology, University of
7 Life Sciences in Lublin, Leszczyńskiego 7 Street, 20-069, Lublin, Poland

8
9 E-mail address: justyna.bohacz@up.lublin.pl / michal.mozejko@up.lublin.pl

35 **Abstract**

36

37 The search for the most environmentally friendly methods of feather waste management
38 is associated, among others, with the acquisition of microorganisms that show strong ability for
39 native keratin mineralization. The aim of the study was to evaluate the keratinolytic activity of
40 37 *Trichophyton ajelloi* strains, both pigmenting and non-pigmenting, isolated from loamy soil
41 and chernozem, and to identify strains with the highest efficiency of converting feather waste
42 into easily assimilable forms of nitrogen and sulfur for plants. The keratinolytic activity of the
43 tested fungal strains was determined based on the measurements of protease and keratinase
44 activity, concentration of soluble proteins and peptides, amino acids, ammonium and sulfate
45 ions, loss of feather mass, and pH of culture fluids. The study showed that among *Trichophyton*
46 *ajelloi* strains isolated from loamy soil, pigmenting strains were more capable of biodegrading
47 native feather keratin, while among the strains isolated from chernozem, non-pigmenting
48 strains showed better abilities. Three pigment-producing strains (No. III, XII, and XIV/XV)
49 were among the most active in releasing large amounts of ammonium and sulfate ions.

50

51 **Keywords:** *Trichophyton ajelloi*, pigments, keratin biodegradation, feathers, enzymatic
52 activity, mineral form N and S

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69 1. Introduction

70

71 Keratin wastes, which include feathers, hooves, horns, fur, as well as other keratinized
72 skin products, are generated as a by-product in slaughterhouses and poultry processing plants
73 (Korniłowicz–Kowalska and Bohacz 2011). Over the past five years, there has been a
74 significant increase in the consumption of poultry meat in Poland, rising by 6%, and globally
75 by 32%. Consequently, there has been a substantial increase in the amount of feather waste,
76 primarily from chickens (Możejko and Bohacz 2022). According to Korniłowicz–Kowalska
77 and Bohacz (2011), the amount of broiler chicken feather waste in Poland reached 77,000 tons
78 in 2011, while the annual production of such waste in the USA was 1 million tons. In 2021, the
79 annual production of live poultry in Poland amounted to 3578 thousand tons (Statistics Poland
80 2022). Assuming that feathers constitute 5–7% of the body weight of domestic poultry (Onifade
81 et al. 1998), it can be estimated that 173.9–243.5 thousand tons of feather waste are currently
82 generated in Poland (2021) annually, while globally, it is about 9 million tons (Vavrova et al.
83 2022).

84 Keratin matter is also a natural component of the soil environment. It enters the soil due
85 to the natural activity of many small mammals, mainly rodents, as well as birds. Superficial as
86 well as deep layers of soils are supplied with keratin material in the form of feathers, hair and
87 other keratinized animal remains (Bohacz et al. 2022). Another source of keratin residues are
88 bird nests and pellets, i.e. undigested food remains of birds of prey and corvids (Ciesielska et
89 al. 2017; Korniłowicz–Kowalska et al. 2018; Kitowski et al. 2022). In arable soils, organic
90 fertilizers, such as manure from livestock and domestic poultry containing keratin residues
91 (bristles, hair, feathers), are also an additional source of native keratin (Bohacz et al. 2022).
92 This is determined by the presence of specialized groups of microorganisms capable of keratin
93 biodegradation. Microorganisms that degrade keratin residues include bacteria from the genera
94 *Kocuria*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Geobacillus* (Łaba et al. 2018; Li et al. 2019; Alahyaribeik et
95 al. 2020; Huang et al. 2020; Covella et al. 2021), actinomycetes of the genera *Streptomyces*,
96 *Amycolatopsis*, *Actinomadura*, *Nocardiosis*, *Thermoactinomyces* (Omran 2017; Wang et al.
97 2017; Tamreihao et al. 2019; Espersen et al. 2021), and fungi belonging to dermatophytes and
98 Chrysosporium group called keratinophilic fungi (Korniłowicz–Kowalska and Bohacz 2011).
99 In the literature, fungal genera such as *Penicillium*, *Aspergillus*, *Doratomyces*, *Scopulariopsis*,
100 *Fusarium*, *Trichoderma* and *Cladosporium* are also mentioned as having the ability to degrade
101 keratin (Gradišar et al. 2005; Călin et al. 2017). However, as reported by Filipello Marchisio
102 (2000), these fungi colonize keratinous material but are not able to degrade native keratin; they

103 only utilize products of its partial biodegradation by specialized fungi or use various readily
104 available substances naturally occurring on the surface or inside the tissues of these animal
105 remains. Fungi belonging to dermatophytes are divided into anthropophilic (*Trichophyton*
106 *rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii*), zoophilic (*Trichophyton*
107 *mentagrophytes*, *Microsporum canis*) and geophilic types (*Microsporum gypseum*,
108 *Trichophyton ajelloi*, *Trichophyton terrestre*), while non-dermatophytic keratinophilic fungi
109 are represented by the so-called Chrysosporium group, which includes species such as
110 *Aphanoascus keratinophilus*, *A. fulvescens*, *Chrysosporium tropicum*, *Ch. articulatum*,
111 *Arthroderma tuberculatum*, *A. multifidum* and *Ctenomyces serratus* (van Oorschot 1980;
112 Hayette and Sacheli 2016; Bohacz 2017; Bohacz et al. 2020a,b). As reported by Bohacz (2017),
113 geophilic dermatophytes can be divided into non-pathogenic species, represented by
114 *Trichophyton terrestre* and *Trichophyton georgiae*, typically pathogenic (*Microsporum*
115 *gypseum*, *Microsporum fulvum*) and sporadically pathogenic organisms (*Microsporum cookei*,
116 *Trichophyton ajelloi*). *Trichophyton ajelloi*, along with *Microsporum cookie*, belongs to soil
117 dermatophytes of low pathogenicity (Otčenášek and Dvořák 1975). From reviews of the
118 available literature, it is known that keratinolytic fungi occur on different continents. In South
119 America, Pontes et al. (2013) isolated keratinolytic fungi from soils in urban and rural areas,
120 while in North America, they were isolated from arable soils (Otčenášek et al. 1969; Hamm et
121 al. 2020). In European countries, geophilic dermatophytes were isolated in Italy from soils in
122 urban parks and gardens (Mercantini et al. 1980; Caretta et al. 1992), while in Poland, they were
123 found in arable soils and even in acidic waste lagoons in the petroleum refinery areas, as well
124 as soils subjected to long-term exposure to refinery wastes (Ulfig et al. 2002; Ulfig et al. 2003).
125 In Slovakia, these fungi were isolated from soils exposed to the presence of livestock and from
126 sediments and soils collected in caves (Kačínová et al. 2013; Ogórek et al. 2022). In Asian
127 countries such as India, these fungi have been identified in forests and agricultural soils,
128 roadside areas, public gardens, poultry and cattle farms, garbage dumps and lakes, as well as in
129 soils at the edges of glaciers (Deshmukh 2002; Deshmukh 2014; Jain and Sharma 2012). In the
130 Middle East, Kachuei et al. (2012) isolated keratinophilic fungi from soils located in similar
131 locations to those in Asian countries. These fungi were also often isolated from various soil
132 environments in Africa. For example, Zaki et al. (2005) isolated keratinolytic fungi in Egypt
133 from muddy soil, and Youssef et al. (1992) from soils of sport fields, university campuses,
134 elementary schools, public markets, where vegetables, fruits, and pets are sold, public and
135 zoological gardens, animal enclosures, as well as from agricultural soils and bird pens. In
136 Australia, these fungi were isolated from soils of mountainous regions (Cano et al. 2002).

137 Mercantini et al. (1989) isolated keratinophilic fungi from soils in Antarctica. Among geophilic
138 dermatophytes isolated from various environmental sources around the world, *Trichophyton*
139 *ajelloi* is quite rare, especially in agricultural soils. Taghipour et al. (2021) reported that
140 between 1992 and 2015, *Trichophyton ajelloi* and its teleomorph *Arthroderma uncinatum* were
141 mainly isolated from animal habitats, park soils, and arable soils, mainly in Poland.

142 The occurrence of keratinophilic fungi, including geophilic dermatophytes, in soils is
143 influenced by many physical and chemical factors (Korniłowicz–Kowalska and Bohacz 2002;
144 Bohacz and Korniłowicz–Kowalska 2012; Bohacz et al. 2022). Recent studies by Bohacz et
145 al. (2022) have shown that factors limiting the growth of *Trichophyton ajelloi* in agricultural
146 soils include high concentrations of CaCO₃ and an increase in total carbon content. Soils rich
147 in assimilable phosphorus, potassium, and magnesium were also found to be unfavorable for
148 the occurrence of this geophilic dermatophyte. It has also been shown that the frequency of
149 occurrence of *Trichophyton ajelloi* increases with decreasing pH and soil organic matter and
150 nitrogen levels (Bohacz et al. 2022). Earlier work by Bohacz and Korniłowicz–Kowalska
151 (2012) demonstrated that this species could also grow in soils with a pH close to neutral. Bohacz
152 and Korniłowicz–Kowalska (2012) indicated that the populations of this keratinolytic soil
153 fungus were characterized by genetic variability conditioned by the environment, which was
154 confirmed in subsequent studies of this fungus populations. Ciesielska et al. (2014) showed,
155 based on RAPD–PCR analysis, interspecific genetic diversity among *Trichophyton ajelloi*
156 strains, which was associated, among other factors, with soil type from which the strains
157 originated. The keratinolytic activity of *T. ajelloi* present in arable soils is also determined by
158 temperature, environmental pH, readily available carbon sources, and the application of
159 agrochemicals (Pugh and Agrawal 1983; Kačínová et al. 2014; Możejko and Bohacz 2022).

160 The presence of keratin residues in soil stimulates the keratinolytic activity of
161 microorganisms specialized in keratin degradation. *Trichophyton ajelloi* degrades feather
162 keratin using extracellular protease, keratinase, and disulfide reductase, leading to the release
163 of mineral forms of nitrogen and sulfur (Korniłowicz–Kowalska 1997a,b; Możejko and
164 Bohacz 2022). Korniłowicz–Kowalska (1997a,b) demonstrated that soil strains of
165 *Trichophyton ajelloi* degraded native feather keratin with the release of a large amounts of
166 ammonium and sulfate ions as end products. Możejko and Bohacz (2022) optimized
167 *Trichophyton ajelloi* culture conditions to obtain hydrolysates with high concentrations of these
168 mineral forms of nitrogen and sulfur, important from a fertilizer perspective, especially for
169 plants with high sulfur requirements. As demonstrated by Korniłowicz–Kowalska (1997a),
170 fungi belonging to *Trichophyton ajelloi* could degrade native chicken feathers by 48–76%

171 already after 21 days of culture. According to studies by Możejko and Bohacz (2022) and
172 Janda–Ulfing et al. (2007) *Trichophyton ajelloi* strains, in addition to proteolytic activity, were
173 also characterized by lipolytic activity, the presence or absence of starch degradation capacity,
174 and developed most optimally in the temperature range of 20–28°C.

175 The earlier work of Bohacz et al. (2022) demonstrated that *Trichophyton ajelloi* was a
176 dominant keratinolytic species in many types of arable soils. The research hypothesis of the
177 present study assumed that *Trichophyton ajelloi* strains differ in keratinolytic activity and that
178 this characteristic could be related to soil type and pigment production by these fungi.

179 The main objective of the study was to evaluate the keratinolytic activity of
180 *Trichophyton ajelloi* strains, most commonly found in agricultural soils classified according to
181 WRB (2015) as Cambisol and Chernozem (Bohacz et al. 2022), based on enzymatic activity,
182 mineral and organic products of keratinolysis, and feather weight loss. The analyses also aimed
183 to identify *Trichophyton ajelloi* strains with the highest keratinolytic potential, with a focus on
184 obtaining keratin hydrolysates with a high content of nitrogen and sulfur mineral forms,
185 valuable from a fertilizer point of view. Additionally, the aim was to investigate the relationship
186 between the keratinolytic activity of *Trichophyton ajelloi* strains and the secretion, or lack
187 thereof, of soluble pigments by these fungi.

188

189 **2. Material and methods**

190

191 *2.1. Origin of Trichophyton ajelloi soil strains and Trichophyton ajelloi reference strain*
192 *CBS119779.*

193

194 Isolation of all strains of keratinolytic fungi from four arable soils, differing in physical
195 and chemical properties, was carried out by the keratin bait method, using waste chicken
196 feathers as bait, as described in the work of Bohacz et al. (2022). Three soils (I, II, and III) were
197 obtained from individual farms, while the fourth soil (IV) was collected from the experimental
198 farm of the University of Life Sciences in Lublin, all located in southeastern Poland (Lublin
199 Voivodeship). Soils I and II were classified as Cambisols with a particle size distribution of
200 loamy sand and sandy loam, respectively. These soils are conventionally referred to in the text
201 as sandy soil and loamy soil, respectively. Soil III was classified as Chernozem with a particle
202 size distribution of silt loam, while soil IV was classified as Rendzina with a particle size of silt
203 loam (Bohacz et al. 2022). The detailed location of the soils, soil sampling method, physical

204 and chemical parameters, and the description of the isolation method were presented in the
205 previous study of Bohacz et al. (2022).

206 Among the keratinophilic fungi isolated from the examined soils (Bohacz et al. 2022)
207 *Trichophyton ajelloi*, which belongs to geophilic dermatophytes, was the most frequently
208 isolated fungus. In sandy soil, this species accounted for 4.2% of all isolated keratinophilic
209 fungi, while in loamy soil, it was 30%, in Chernozem 22%, while it was not detected in
210 Rendzina (Bohacz et al. 2022). For the determination of *Trichophyton ajelloi* keratinolytic
211 activity, a total of 37 strains derived from the soils richest in this fungus were selected: 20 from
212 loamy soil and 17 from Chernozem. A principle was assumed that only one strain of this species
213 was applied onto each Petri dish containing soil and keratin bait. *Trichophyton ajelloi* strains
214 isolated from loamy soil were labeled as I–XVI and XXI, XXII, XXVIII, XXIX, and from
215 Chernozem as XVII–XX, XXIII–XXVII, XXX–XXXVII.

216 The reference strain of *Trichophyton ajelloi* var. *ajelloi* CBS119779 was obtained from the
217 collection of Centraalbureau voor Schimmelcultures (The Netherlands).

218

219 2.2. Identification of *Trichophyton ajelloi* soil strains

220

221 Species identification of the selected 37 *Trichophyton ajelloi* strains was carried out
222 using traditional identification methods based on macro– and microscopic observations as well
223 as molecular methods. Macroscopic observations of *Trichophyton ajelloi* strains were
224 performed on Sabouraud agar with the following composition (g dm⁻³): glucose – 40; peptone
225 – 10; agar – 20; distilled water – 1 dm³. After 7 and 14 days of culture, the colony size (growth
226 rate of the tested strains mycelium), coloration of the mycelium (obverse and reverse), and
227 ability to produce soluble pigments were assessed. The evaluation of the micromorphological
228 features of the tested fungi, carried out in microcultures, was based on the observations of the
229 morphology of vegetative hyphae and spores and the presence or absence of fruiting bodies
230 (perfect stages). Microscopic observations of *Trichophyton ajelloi* were performed using an
231 Olympus BX–41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with Cell–A software (Soft
232 Imaging System GmbH, version 1.20, Munster, Germany) and a CVIII4 camera (Olympus,
233 Tokyo, Japan). The final classification was made on the basis of systematic studies by Domsch
234 et al. (2007) and van Oorschot (1980).

235 Species identification based on macro– and micro–morphological characteristics was
236 verified using PCR and nucleotide sequencing method against selected fungal strains (III, XII,
237 and XIV). The identified sequences were deposited in the GenBank under accession numbers

238 ON 461895 for *Trichophyton ajelloi* strain III, ON 468679 for *Trichophyton ajelloi* strain XII,
239 and ON 461993 for *Trichophyton ajelloi* strain XIV.

240 The detailed methodology of identification using PCR and nucleotide sequencing was
241 described in the work by Możejko and Bohacz (2022).

242

243 *2.3. Determining the keratinolytic activity of Trichophyton ajelloi soil strains and a reference*
244 *strain.*

245

246 *2.3.1. Keratin substrate*

247

248 Chicken feather waste from the “SuperDrob” poultry processing plant (Lublin, Poland)
249 was used as keratin substrate. Feathers were thoroughly washed with distilled water, separated
250 from other slaughterhouse waste, dried at 55°C, and mechanically shredded into pieces not
251 exceeding 0.5 cm. To preserve the intact structure of keratin, feathers were sterilized by gas
252 treatment in 1–gram portions in 300 cm³ Erlenmeyer flasks (Bohacz et al. 2020a). The chemical
253 composition of feather waste was presented in the study of Bohacz and Kornilłowicz–Kowalska
254 (2019).

255

256 *2.3.2. Composition of culture medium, spore suspension, fungal culture conditions*

257

258 To investigate the keratinolytic activity of the selected 37 *Trichophyton ajelloi* strains
259 and the reference strain *Trichophyton ajelloi* var. *ajelloi* CBS119779, a mineral substrate with
260 the following composition was prepared (g dm⁻³): KH₂PO₄ – 1.5; NaCl – 0.01; MgCl₂ 6H₂O –
261 0.05, distilled water – 1 dm³, pH = 4.5. The mineral medium was sterilized in 100 cm³ portions
262 and then combined with 1 g of sterile feathers as the sole source of nitrogen, sulfur, carbon, and
263 energy. The composition of the medium, except for pH, was based on the previously developed
264 (Bohacz 2017) medium for keratinolytic fungi of the genus *Chrysosporium*.

265 Two–week–old cultures of *Trichophyton ajelloi* strains were used to prepare spore
266 suspensions in sterile distilled water with the addition of Tween 80. The mycelium grown on
267 the surface of the substrate along with its spores was carefully collected using a sterile needle.
268 The prepared culture media were inoculated with 1 cm³ of spore suspension at a density of 10⁶–
269 10⁸ cfu cm⁻³. The spore suspension was evenly applied on the feathers transferred to the flasks
270 with the medium. The established cultures were incubated at a temperature of 28°C for 42 days
271 under stationary conditions.

272 The activity of keratinolytic enzymes, namely protease and keratinase, as well as the
273 concentration of soluble proteins and peptides, amino and thiol groups, ammonium and sulfate
274 ions, and the pH of the culture medium were periodically measured after 7, 14, 21, 28, 35, and
275 42 days. All these parameters were determined in a clear supernatant obtained by separating it
276 from the mycelial residue and then by using a Millex–HV Syringe Filters Unit (Millipore, pore
277 size – 0.22 µm, PVDF, diam. – 33 mm). Feather weight loss was measured after the completion
278 of the fungal culture.

279

280 *2.3.3. Activity of keratinolytic enzymes*

281

282 Casein protease activity was determined according to the method of Anson (1938),
283 modified by Korniłowicz (1994), in the presence of 1.0% casein solution as substrate,
284 suspended in 28 mM phosphate buffer supplemented with 2 mM MgCl₂, pH = 7.8. Keratinase
285 activity was determined using a modified version of the method described by Yu et al. (1968)
286 as adapted by Anbu et al. (2008) in the presence of substrate in the form of 20 mg sterile chicken
287 feathers in 0.1 M Tris–HCl buffer at pH 8.1. The measurement of protease and keratinase
288 activity was carried out using a UV–VIS–1800 spectrophotometer (Rayleigh, Beijing, China)
289 at a wavelength of 720 nm and 280 nm, respectively.

290

291 *2.3.4. Determination of the concentration of mineral and organic nitrogen and sulfur* 292 *compounds*

293

294 Determinations of soluble proteins and peptides levels in culture fluids were carried out
295 using the method of Lowry (1951), modified by Schacterle and Pollack (1973). The content of
296 amine groups was determined by the ninhydrin method described by Korniłowicz–Kowalska
297 (1997a,b). The ammonium ion content in the culture fluids was determined by the nesslerization
298 method at a wavelength of 400 nm (Korniłowicz–Kowalska 1997a,b), while the nephelometric
299 method (wavelength of 490 nm) was used to determine the content of sulfate ions
300 (Korniłowicz–Kowalska 1997a,b). The concentration of thiol groups in the culture fluids was
301 determined using the method of Ellman (1959) at a wavelength of 412 nm in a microplate
302 spectrophotometer (EPOCHTM, BioTek, Winooski, VT, USA).

303

304 *2.3.5. Medium pH measurements*

305

306 The pH of the culture fluids was measured by potentiometric method using a CP-505
307 pH meter (Elmetron, Zabrze, Poland) equipped with a glass electrode.

308

309 2.3.6. Keratin substrate weight loss

310

311 Feather weight loss was determined after 42 days using a weighing method after
312 previous drying of non-hydrolyzed feathers at 105°C (KBC G-65/250, Promed, Warsaw,
313 Poland)

314

315 2.4. Statistical analysis

316

317 Statistical analysis of the results was performed using Statistica ver. 13.3 (StatSoft,
318 Kraków, Poland) and included a multivariate analysis of variance (ANOVA) and HSD-Tukey
319 post-hoc test ($\alpha = 0.05$) to determine significant differences between *Trichophyton ajelloi*
320 strains isolated from loamy soil and Chernozem, as well as between pigmenting and non-
321 pigmenting strains present in both soils. To investigate the correlation between the tested
322 parameters of fungal keratinolytic activity, i.e. protease activity, keratinase activity, levels of
323 soluble proteins, peptides, amino acids, ammonium and sulfate ions, medium pH, and duration
324 of the experiment, a regression analysis was performed to determine the curvilinear regression
325 function (third-degree polynomial) and the coefficients of determination R^2 (square of the
326 curvilinear correlation coefficient expressed in %).

327 Principal component analysis (PCA) (Nilsson et al. 2016) was conducted to show
328 differences in the biodegradation of feather waste depending on the origin of the fungal strains
329 based on the keratinolytic indicators, i.e. keratinase activity, protease, soluble proteins, peptides
330 and amino acids, concentration of ammonium and sulfate ions, and pH of culture fluids.

331

332 3. Results

333

334 3.1. Characterization of morphological features of colonies of isolated *Trichophyton ajelloi* 335 strains

336

337 The size and coloring of the colonies of 37 *Trichophyton ajelloi* strains varied depending
338 on the time of culture and the soil from which the fungi were isolated. After 7 and 14 days of
339 incubation at 28°C, *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil and Chernozem

340 developed colonies with an average size of 21.58 mm and 45.30 mm, and 17.69 mm and 40.93
341 mm, respectively. This indicated that the colonies of strains isolated from Chernozem were
342 smaller than those from loamy soil, by an average of 18% and 10%, after 7 and 14 days of
343 growth, respectively. With respect to the reference strain, the difference was 8% and 11% (7
344 days), and 25% and 20% (day 14) for strains isolated from loamy soil and Chernozem,
345 respectively (Table 1). Two types of colonies were distinguished based on macroscopic
346 observations: first type was characterized by a creamy color (obverse), while the second by a
347 tan color. Some of the strains were capable of producing dark vinaceous pigment diffusing into
348 the medium. Within the strains from loamy soil, the ability to produce pigment was
349 demonstrated by 10% and 60% of strains after 7 and 14 days of growth, respectively. Among
350 *Trichophyton ajelloi* strains isolated from Chernozem, the proportion of strains capable of
351 secreting pigment was 6% and 29%, respectively (Table 1). With respect to all strains tested,
352 the predominant group were strains incapable of pigment production (54% after 14 days of
353 culture).

354

355 3.2. Protease and keratinase activity

356

357 The activity of caseinian protease in the culture fluids of *Trichophyton ajelloi* strains,
358 growing on a medium containing feather waste as the sole source of C, N, S, and energy,
359 decreased up to day 28 of culture for strains isolated from Chernozem, while it remained at a
360 similar level for strains isolated from loamy soil. After this time, there was an increase in the
361 activity of these enzymes in cultures of all strains tested (Fig. 1). The maximum protease
362 activity (an average of 71.26 $\mu\text{g tyrosine cm}^{-3}$) was observed on day 42 of culture for strains
363 isolated from loamy soil. The activity of this enzyme in cultures of strains isolated from
364 Chernozem was the highest at the beginning of the experiment and averaged 64.69 $\mu\text{g tyrosine}$
365 cm^{-3} . The protease activity secreted by the reference strain of *Trichophyton ajelloi* had a similar
366 dynamic of changes as the strains of *Trichophyton ajelloi* isolated from loamy soil. Strains XXI
367 and III exhibited the highest average protease activity among the strains from loamy soil, while
368 among the strains from Chernozem, strain XXXI showed the highest protease activity (Table 2
369 and 3). Protease activity in cultures of strains isolated from loamy soil was on average 3% lower
370 than that of strains isolated from Chernozem. The protease activity of strains XXI and III from
371 loamy soil was on average 13% and 16% higher, respectively, compared to the reference strain
372 (Table 2 and 3).

373 Considering all examined *T. ajelloi* strains, regardless of their soil origin, it was found
374 that 73% of them showed an increase in protease activity during culture. The highest increase
375 of 793% in the activity of this enzyme over time was recorded in the culture of strain XXVIII
376 (Table S1). The relatively low coefficient of determination calculated for protease activity
377 during the 42-day experiment for *Trichophyton ajelloi* strains isolated from both loamy soil
378 and Chernozem ($R^2 = 32.59\%$ and 26.59% , respectively) indicated a high strain variability in
379 terms of this enzyme activity. Strains isolated from Chernozem showed greater variation in
380 these properties than strains from loamy soil (Fig. 1).

381 From the data presented in Fig. 2, it can be concluded that the keratinolytic activity of
382 all *Trichophyton ajelloi* strains isolated from both tested soils increased between days 7 and 42
383 of culture (Fig. 2). Periodically, i.e. on day 21 of culture, more than half of *Trichophyton ajelloi*
384 strains (54%), regardless of their origin, showed a slight decrease in keratinase activity.
385 *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil had a higher keratinase activity, on
386 average by 22%, compared to strains from Chernozem (Table 2 and 3). The maximum activity
387 of this enzyme in the cultures of the tested strains occurred on day 42 of culture and was on
388 average 69.07 KU cm^{-3} for strains from loamy soil, and 53.20 KU cm^{-3} for strains from
389 Chernozem (Table S2). The highest keratinase activity was shown in the cultures of strain III,
390 isolated from loamy soil, and strain XXXIII isolated from Chernozem. It was 56% and 53%
391 higher, respectively, compared to the average activity of all fungal strains isolated from each of
392 these soils (Table 2 and 3). The highest increase in the activity of this enzyme, as much as
393 170%, was recorded in the culture of strain V isolated from loamy soil (Fig. 2; Table S2).
394 Keratinase activity in cultures of the reference strain was the lowest during the first week of the
395 experiment, after which a significant increase was recorded. Compared to the average activity
396 of this enzyme in cultures of strains isolated from loamy soil and from Chernozem, the average
397 keratinase activity of cultures of the reference strain was 19% and 1% lower respectively (Table
398 2 and 3).

399 The calculated coefficient of determination (Fig. 2) indicated that *Trichophyton ajelloi*
400 strains isolated from loamy soil ($R^2 = 50.44\%$) showed less variation in keratinase activity
401 compared to strains isolated from Chernozem ($R^2 = 38.04\%$).

402

403 3.3. Soluble proteins, peptides and amino acids

404

405 The concentration of soluble proteins and peptides increased with time in the cultures
406 of all tested *Trichophyton ajelloi* strains (Fig. 3). In cultures of strains isolated from Chernozem,

407 it was on average 6% higher than in cultures of strains isolated from loamy soil. In the case of
408 strains isolated from loamy soil, an increase in the release of proteins and peptides was observed
409 up to day 21 of culture, averaging 52%, followed by stabilization and then a new increase in
410 the release of these compounds from day 28. A similar trend was observed in the cultures of
411 strains isolated from Chernozem, however, compared to the initial date, the differences were
412 not large, i.e. only 17% (Table S3). The maximum release of soluble proteins and peptides in
413 cultures of fungi isolated from loamy soil and Chernozem occurred on day 42 of culture and
414 amounted to an average of $493.80 \mu\text{g cm}^{-3}$ and $500.57 \mu\text{g cm}^{-3}$, respectively (Table S3). Among
415 the strains isolated from the examined soils, strains XXIX and III from loamy soil, and strains
416 XXXIII and XXVII from Chernozem, were characterized by the release of the highest amount
417 of soluble proteins and peptides during the biodegradation of chicken feather waste (Table 2
418 and 3). The release of soluble proteins and peptides in cultures of strains XXIX and XXXIII
419 was 22% and 33% higher, respectively, compared to the average levels of these compounds in
420 cultures of all tested fungi isolated from loamy soil and Chernozem (Table 2 and 3). The release
421 of the largest pool of these compounds over the entire experiment was recorded in the culture
422 of the reference strain compared to the quantity of these compounds in cultures of strains
423 isolated from loamy soil and Chernozem; on average, these values were 16% and 9% higher,
424 respectively. (Table 2, 3 and S3).

425 The low coefficient of determination, $R^2 = 29.63\%$, calculated for soluble proteins and
426 peptides in cultures of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from Chernozem indicated large
427 differences in the release of these compounds during feather keratin biodegradation in contrast
428 to the release of these compounds by *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil (R^2
429 = 62.06%) (Fig. 3).

430 Considering the total pool of amino acids, measured by the concentration of amino
431 groups released during biodegradation of chicken feathers by the tested *Trichophyton ajelloi*
432 strains, it was shown that it increased until about day 18 of fungal culture, after which it
433 decreased, and from day 35, it increased again (Fig. 4). The maximum release of amino groups
434 in cultures of strains isolated from loamy soil and Chernozem occurred on days 21 and 42 of
435 the experiment and their average concentrations were $9.11 \mu\text{g cm}^{-3}$ and $8.48 \mu\text{g cm}^{-3}$ and 10.12
436 $\mu\text{g cm}^{-3}$ and $9.96 \mu\text{g cm}^{-3}$, respectively (Table S4). The concentration of amino groups in
437 cultures of strains isolated from Chernozem was overall 14% higher compared to the content
438 of these groups in cultures of strains from loamy soil. The highest number of amine groups was
439 recorded in the culture fluids of the reference strain. Their concentration was more than 1.5–
440 fold higher compared to the cultures of the tested soil strains (Table 2 and 3). Among them,

441 strain XII from loamy soil and strain XXXIII isolated from Chernozem, were characterized by
442 the release of the highest amount of amino groups during biodegradation of chicken feather
443 waste. The release of amino groups in the culture of strains XII and XXXIII was 67% and 36%
444 higher, respectively, compared to the average levels of these compounds in cultures of all tested
445 fungi, isolated from loamy soil and Chernozem (Table 2 and 3).

446 The low regression coefficient for amino groups concentration in the culture fluids of
447 *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil ($R^2 = 25.1\%$) and from Chernozem ($R^2 =$
448 21.1%) indicated a very weak convergence in the level of amino acid release with the free amino
449 group in both groups of strains of the tested species.

450 The data presented in Fig. 5 showed that the content of thiol groups in the culture fluids
451 of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from Chernozem increased over time during the
452 experiment. However, in cultures of strains isolated from loamy soil, the concentration of thiol
453 groups increased until day 14 of the experiment, and subsequently decreased until day 28 to
454 increase again. The highest concentration of thiol groups in 76% of the strains was recorded
455 between days 35 and 42 of culture. The maximum concentration of thiol groups ($13.31 \mu\text{g cm}^{-3}$)
456 was recorded on day 42 of culture of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil,
457 and on day 35 of culture of fungi isolated from Chernozem ($6.02 \mu\text{g cm}^{-3}$) (Table S5). The
458 average concentration of thiol groups in the culture fluids of *Trichophyton ajelloi* strains
459 isolated from loamy soil was 28% higher than the average concentration of these groups in
460 cultures of strains isolated from Chernozem (Table 2 and 3). The highest increase in the
461 concentration of these groups, up to 16-fold, was observed in the culture of strain XXVIII
462 isolated from loamy soil (Fig. 2; Table S2).

463 The release of thiol groups in the culture of the reference strain had a similar pattern of
464 changes as in the cultures of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil. However,
465 the average concentration of thiol groups in the culture of the reference strain was 6% higher
466 and 17% lower than their average content in the cultures of strains isolated from Chernozem
467 and loamy soil, respectively (Table 2, 3 and S5).

468 The highest average concentration of thiols was found in the cultures of strain V isolated
469 from loamy soil and strain XXXIII isolated from Chernozem. This content was 24% and 50%
470 higher, respectively, than the average concentration in the culture fluids of all fungal strains
471 isolated from each of these soils (Table 2 and 3). *Trichophyton ajelloi* strains isolated from
472 Chernozem were characterized by much greater variability in the release of thiol groups from
473 decomposed feathers than strains isolated from loamy soil. This was evidenced by the very low

474 coefficient of determination for strains from this soil ($R^2 = 15.37\%$) compared to that obtained
475 for strains isolated from loamy soil ($R^2 = 49.73\%$) (Fig. 5).

476

477

478 3.4. Ammonium and sulfate ions

479

480 The concentration of ammonium ions in the culture fluids of *Trichophyton ajelloi* strains
481 isolated from both loamy soil and Chernozem increased until day 21 of culture on feathers, with
482 a maximum between days 14 and 21 of culture, after which it decreased and then increased
483 again from day 35. The average concentration of ammonium ions between days 14 and 21 of
484 fungal culture isolated from loamy soil ranged from 551.22 to 569.31 $\mu\text{g cm}^{-3}$ and for
485 chernozem from 517.18 to 527.27 $\mu\text{g cm}^{-3}$, respectively (Fig. 6; Table S6). Between the initial
486 and final analysis time points, there was an increase in the content of ammonium compounds
487 in 95% of the tested strains, while a decrease was observed for the remaining 5%, including the
488 reference strain. The reference strain was characterized by significantly lower release of NH_4^+
489 compared to *Trichophyton ajelloi* soil strains (Fig. 6; Table S6). Throughout the experiment,
490 ammonium ion concentrations were higher in culture fluids of *Trichophyton ajelloi* strains from
491 loamy soil. The average concentration of ammonium ions in the culture fluids of *Trichophyton*
492 *ajelloi* strains isolated from this soil was 9% higher than their average content in the culture
493 fluids of strains isolated from Chernozem. With respect to the reference strain, the concentration
494 of these ions was 61% and 48% higher, respectively (Table 2 and 3). Among the strains tested,
495 strain XII, isolated from loamy soil, and strain XXVII, isolated from Chernozem, showed the
496 highest abilities to mineralize organic nitrogen compounds contained in feathers (Table 2 and
497 3). In relation to the other *Trichophyton ajelloi* strains, the amount of released ammonium ions
498 was on average 21% and 15% higher in cultures of strains XII and XXVII, respectively. In both
499 soils, the release of ammonium ions during feather keratin biodegradation did not differ
500 significantly between the tested strains. This was evidenced by a fairly high coefficient of
501 determination, especially for strains isolated from Chernozem, ($R^2 = 65.21\%$) and loamy soil
502 ($R^2 = 48.73\%$), respectively (Fig. 6).

503 The dynamics of changes in sulfate production, during feather keratin biodegradation,
504 varied depending on the origin of *Trichophyton ajelloi* strains. In the culture fluids of fungal
505 strains isolated from loamy soil, their concentrations increased until approx. day 18 of culture,
506 after which they decreased and increased again from day 35 until the end of the experiment.
507 Sulfate concentration in fungal cultures isolated from Chernozem increased until day 21, then

508 decreased slightly and from day 35 increased again (Fig. 7). The maximum accumulation of
509 sulfate in fungal cultures isolated from loamy soil was recorded on days 14 and 21, i.e. 0.83
510 and 0.84 mg cm⁻³, respectively. In contrast, the highest average sulfate concentrations in fungal
511 cultures isolated from Chernozem were recorded on days 14 and 35 of culture, 0.78 mg cm⁻³
512 and 0.77 mg cm⁻³, respectively (Table S7). Sulfate production by the reference *Trichophyton*
513 *ajelloi* strain was the highest, averaging 1.01 mg cm⁻³. The dynamics of sulfate production in
514 the case of this strain were similar to those observed in fungal cultures isolated from Chernozem
515 (Fig. 7). *Trichophyton ajelloi* strains V and III isolated from loamy soil, and strain XXXIV from
516 Chernozem, showed the greatest ability to produce sulfate. The average content of sulfate in
517 the culture fluids of *T. ajelloi* strains isolated from the two soils was 40% and 37% lower,
518 respectively, than the average content in the culture fluids of the reference strain (Table 2 and
519 3). The average content of sulfates in the culture media of *Trichophyton ajelloi* strains isolated
520 from loamy soil was 6% lower than the average content of sulfates in the culture media of
521 *Trichophyton ajelloi* strains isolated from Chernozem (Table 2 and 3). It was shown for all
522 *Trichophyton ajelloi* strains that 58% of them were characterized by a decrease in sulfate
523 concentration between days 14 and 21 of culture and this decrease affected all fungal strains
524 studied between days 21 and 28 of culture (Table S7).

525 Based on the analysis of the coefficient of determination values, it was found that
526 *Trichophyton ajelloi* strains isolated from Chernozem showed a much greater variation in the
527 level of sulfate production during the biodegradation of feather keratin ($R^2 = 16.68\%$) than
528 strains isolated from loamy soil ($R^2 = 42.38\%$) (Fig. 7).

529

530 3.5. Culture fluids pH

531

532 The process of decomposition of waste feathers by all tested strains of *Trichophyton*
533 *ajelloi* was associated with alkalization of the fungal growth medium. During the experiment,
534 the pH of the medium in fungal cultures isolated from loamy soil ranged from 7.70 to 8.69, and
535 from 7.96 to 8.73 in fungal cultures isolated from Chernozem (Table S8). Stronger
536 alkalization of the medium was caused by strains isolated from Chernozem than from loamy
537 soil, similar to the reference strain (Table S8). Substrate alkalization in cultures of all tested
538 fungi isolated from loamy soil and Chernozem increased intensively during the first three weeks
539 of the experiment, reaching its maximum on day 21 of culture (Fig. 8). After this time, a
540 decrease in the alkalization of the culture medium was recorded.

541

542 3.6. Feather weight loss

543

544 Biodegradation efficiency of chicken feathers, as measured by feather weight loss after
545 42 days of culture, was on average slightly higher in cultures of *Trichophyton ajelloi* strains
546 isolated from loamy soil (31.38%) than from Chernozem (29.60%). Feather weight loss in
547 cultures of strains isolated from Chernozem ranged from 25.83% to 38.93%, while in those
548 isolated from loamy soil from 22.80% to 37.33%. Strain III from loamy soil and strain XXVII
549 from Chernozem caused the highest loss of feather mass, amounting to 37.33% and 38.93%,
550 respectively. The reference strain had 23% and 30% higher feather keratin biodegradation
551 capacity compared to *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil and Chernozem,
552 respectively (Table 4).

553

554 3.7. Keratinolytic activity of pigmenting and non-pigmenting strains among *Trichophyton*
555 *ajelloi* isolates.

556

557 The data in Table 5 showed that the keratinolytic activity of *Trichophyton ajelloi* strains
558 isolated from loamy soil and Chernozem differed significantly between pigmenting and non-
559 pigmenting strains. Of the strains isolated from loamy soil, the pigmenting strains generally
560 showed significantly higher keratinolytic abilities, as measured by keratinase activity, release
561 of soluble proteins, peptides, and amino acids with a free amino group, as well as mineral forms
562 of nitrogen and sulfur, and alkalization of the culture medium. In Chernozem, non-pigmenting
563 strains were characterized by significantly higher average values of keratinolysis indices, with
564 the exception of substrate alkalization, ammonium ion release and -SH groups. With respect
565 to these three indicators, significantly higher values were obtained for pigmenting strains (Table
566 5).

567 Analyzing separately pigmenting and non-pigmenting *Trichophyton ajelloi* strains
568 isolated from the studied soils, it was shown that pigmenting strains from loamy soil differed
569 significantly by higher keratinolytic indices from pigmenting strains from Chernozem, with the
570 exception of the release of soluble proteins and peptides. In contrast, non-pigmenting strains
571 from Chernozem, compared to non-pigmenting strains from loamy soil, showed significantly
572 higher keratin biodegradation capacity, as measured by the release of soluble proteins and
573 peptides, amino groups, sulfate and pH (Table 5). Multivariate ANOVA analysis also showed
574 that the release of ammonium ions, the most fertilizer-relevant indicator of keratinolysis, was
575 significantly higher in cultures of pigmenting strains isolated from the two soils studied than

576 their non-pigmenting counterparts. Significantly more effective in this respect were pigmenting
577 strains from loamy soil (Table 5).

578

579 3.8. Evaluation of keratinolysis by *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil and 580 Chernozem using principal component analysis (PCA)

581

582 PCA analysis was performed to determine the relationship between enzymatic activity
583 and the release of mineral and organic products of chicken feather biodegradation by the
584 *Trichophyton ajelloi* strains tested. The model was based on the activity of keratinase, protease,
585 accumulation of soluble proteins, peptides, amino acid content measured by the level of amino
586 and thiol groups, ammonium ions, sulfate ions and medium pH in cultures of strains isolated
587 from the two tested soils. The model explained 69.16% and 56.26% of the variation in the data
588 (PC1 and PC2), respectively, in cultures of fungal strains isolated from loamy soil and
589 Chernozem.

590 The results of PCA analysis showed that depending on the origin of the strains, the
591 correlations between the studied keratinolytic indicators were slightly different. Among the
592 strains isolated from loamy soil, it was noted that PC1 explained the significant relationship
593 between the release of soluble amino acids, measured by the content of amino groups,
594 concentration of ammonium and sulfate ions, and culture fluid pH, while PC2 explained the
595 relationship between the activity of keratinase, protease, release of soluble proteins and amino
596 acids, determined based on the concentration of thiol groups (PC2). It was shown that keratinase
597 and protease activities were positively correlated with organic and inorganic keratinolytic
598 indicators. The release of amino acids, as measured by the number of amino groups, was mainly
599 significantly correlated with their ammonification, during which ammonium ions were
600 released, which in turn increased the pH of the culture fluids. Keratinase and protease activity
601 determined the release of thiol groups (Fig. 9).

602 In cultures of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from Chernozem, principal
603 component analysis showed that the release of soluble proteins and peptides and, to a lesser
604 extent, amino acids, determined based on the concentration of amino groups, was significantly
605 dependent on keratinase activity, while not significantly on protease activity, as indicated by
606 PC1. During the decomposition of chicken feather keratin by strains isolated from this soil, the
607 release of ammonium ions caused alkalization (a significant relationship), as indicated by
608 PC2, but was not dependent on protease activity. The degradation of sulfur-containing amino
609 acids by *Trichophyton ajelloi* strains isolated from the soil, measured by the concentration of

610 sulfhydryl groups in feather keratin, was not significantly dependent on keratinase and protease
611 activity. Sulfate production, on the other hand, was dependent only on keratinase activity (Fig.
612 9).

613 4. Discussion

614

615 The subject of the study was the evaluation of feather keratin waste biodegradation
616 abilities a wide range of *Trichophyton ajelloi* strains representing populations of this species.
617 These strains were selected from keratinophilic fungal communities in two different agricultural
618 soils: loamy soil and Chernozem. The aim was to isolate fungal strains with strong abilities for
619 keratin biodegradation and mineralization of resulting organic products that could be used to
620 obtain a biofertilizer rich in mineral forms of nitrogen and sulfur. In the context of evaluating
621 the keratinolytic activity of *Trichophyton ajelloi* strains, the premise that guided this analysis
622 was the correlation between this activity and the ability to produce soluble pigments, as well as
623 the fungal habitat environment.

624 Recently, Bohacz and Kornilłowicz–Kowalska (2020), as well as Kornilłowicz–
625 Kowalska (1997a,b) in earlier works on the biodegradation of native keratin by geophilic fungi,
626 have reported that the growth environment of microorganisms significantly affects the
627 enzymatic activity of fungi during the biodegradation of recalcitrant substrates such as lignin
628 or keratin. Similarly, Blechert et al. (2019) analyzed the effect of medium composition and pH
629 on pigment production by the anthropophilic fungus *Trichophyton rubrum*. Kornilłowicz–
630 Kowalska (1997a) showed that keratinophilic fungi from acidic soils had lower keratinolytic
631 activity compared to those isolated from neutral and alkaline soils. The research conducted in
632 this study indicated that the keratinolytic activity, measured by the decrease in feather mass
633 after 42 days of culture, was on average 6% higher in cultures of *Trichophyton ajelloi* fungi
634 isolated from loamy soil (pH = 5.4) than from Chernozem (pH = 5.0). For some individual
635 strains isolated from loamy soil (strain III) and Chernozem (strain XXVII), feather weight loss
636 was up to 19% and 32% higher, respectively, than the average value of this indicator in fungal
637 cultures from these soils. Statistically, populations of *Trichophyton ajelloi* strains from loamy
638 soil and Chernozem differed significantly ($\alpha = 0.05$) in terms of feather weight loss. Significant
639 differences in feather weight loss were also recorded between these populations relative to the
640 reference strain. One of the reasons for the more efficient loss of feather mass in the cultures of
641 *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil compared to those from Chernozem may
642 have been the higher soil pH, which favored the selection of populations with stronger abilities
643 for enzymatic degradation and lysis of native keratin. This would indicate a higher keratinase

644 activity of strains isolated from loamy soil than those obtained from Chernozem. The effect of
645 pH of the habitat environment on the efficiency of feather weight loss in keratinolytic fungal
646 cultures was also previously reported by Bohacz (2017) and Bohacz et al. (2020a), who showed
647 that different species of *Chrysosporium* fungi isolated from environments with higher pH
648 (Phaeozem, pH = 7.28) caused higher feather weight loss than those isolated from more acidic
649 environments (pellets of predatory of birds, pH 4.04 – 6.20). The research conducted by
650 Kornilłowicz–Kowalska (1997a,b) demonstrated that while the ability to biodegrade native
651 keratin was a species–specific trait of keratinophilic fungi, their keratinolytic activity was
652 strain–specific. The predominance of faster–growing strains of *Trichophyton ajelloi* in loamy
653 soil compared to Chernozem may have also had an impact on the faster degradation of native
654 keratin in feathers. This suggestion was supported by the fact that the mycelial proliferation of
655 strains isolated from loamy soil was faster (larger colony diameter), and thus faster colonization
656 and decomposition of the keratin substrate compared to strains isolated from Chernozem. On
657 the other hand, it was found, when keratinolytic indicators other than feather mass loss, such as
658 protease activity, release of soluble proteins, peptides, and amino acids (measured by the release
659 of amino groups), sulfate production, and alkalization of the substrate were considered, that the
660 average keratinolytic activity of strains isolated from loamy soil was higher in relation to strains
661 from Chernozem. It is possible that the higher keratinolytic activity of fungi isolated from
662 Chernozem, measured by proteolytic activity and levels of some released products, may have
663 been influenced by a constant supply of nutrients in the form of native keratin and the associated
664 competition and selection of strains with higher hydrolytic and mineralization efficiency. This
665 suggestion is supported by the genesis of the formation of Chernozems, in which the soil fauna,
666 including macrofauna (*Micromammalia*), such as moles, susliks, hamsters, and other small
667 mammals, are considered very important environmental factors that promote the formation of
668 these soils. Traces of their activity, such as burrows and molehills, are visible even after the
669 formation of Chernozems has ceased. This was pointed out in the work of Kornilłowicz–
670 Kowalska and Bohacz (2002) with regard to differences in the richness of the keratinolytic
671 mycobiota of soils such as Chernozem and Cambisol.

672 According to Kornilłowicz–Kowalska and Bohacz (2011), the mechanism of
673 biodegradation of native keratin such as feathers and hair by keratinolytic fungi occurs through
674 mechanical destruction and enzymatic lysis. In the case of dermatophytes, including
675 *Trichophyton ajelloi*, the process is facilitated by mycelial structures called perforating organs,
676 damaging the keratin structure, making it more susceptible to enzymatic attack. According to
677 Kunert (2000), the mechanism of fungal keratin degradation is a two–step process which

678 includes so-called sulfitolysis and proteolysis. The process of sulfitolysis involves breaking
679 disulfide bonds between polypeptide chains of keratin with the involvement of inorganic sulfite,
680 produced by the fungus, which leads to denaturation of the protein, allowing its degradation by
681 proteolytic enzymes.

682 Considering the involvement of enzymes in keratinolysis, it has been proven that the
683 breakdown of keratin proteins is possible thanks to an enzymatic cascade, ensuring a complete
684 biodegradation (Korniłłowicz–Kowalska 1997a,b; Bohacz 2017). Among these enzymes, a
685 complex of proteolytic enzymes is mentioned, active against both soluble and insoluble proteins
686 (Kunert 2000). One of them is the protease active against soluble casein (caseinian protease).
687 The present study showed that the activity of this enzyme was high for the first 7 days of the
688 experiment after which it decreased, especially in fungal cultures isolated from Chernozem. A
689 similar dynamics of changes in protease activity was observed previously in soil cultures of the
690 fungi *Aphanoascus fulvescens* and *Chrysosporium articulatum* (Bohacz 2017). The present
691 research showed that in cultures of fungi isolated from loamy soil, the activity of caseinian
692 protease remained at a similar level during the first month of keratinolysis, after which it
693 increased, similar to cultures of fungi isolated from Chernozem. Cavello et al. (2012) reported
694 a high protease activity during the first days of feather keratin biodegradation for *Paecilomyces*
695 *lilacinus*, while Galarza et al. (2012) reported similar results in liquid cultures of *Trichophyton*
696 *ajelloi* containing hair as the sole source of C, N, and S. Galarza et al. (2012) showed that the
697 protease activity in cultures of this fungus increased up to day 10 of culture, and then rapidly
698 decreased until day 30 of the experiment. High protease activity in the initial stage of keratin
699 residue biodegradation could result from the breakdown of simple proteins such as cytoplasmic
700 membrane proteins, which leads to the exposure of disulfide bonds and is a factor inducing
701 sulfitolysis of intracellularly located keratin (Korniłłowicz–Kowalska and Bohacz 2011).

702 Preceded by proteolytic activity, keratinases are the next enzymes in the enzymatic
703 cascade involved in the degradation of keratinized structures such as feathers or hair. As
704 reported by Qiu et al. (2020), keratinases are the enzymes that can catalyze the decomposition
705 of keratin after breaking down disulfide bonds, and even act synergistically with disulfide
706 reductases involved in this process. The extracellular keratinase activity in cultures of the tested
707 *Trichophyton ajelloi* fungi isolated from loamy soil and Chernozem increased throughout the
708 experiment, i.e. for 6 weeks, and was higher in cultures of fungi isolated from loamy soil. The
709 results obtained in the present study are consistent with those obtained by Anbu et al. (2008) in
710 cultures of *Trichophyton* sp. HA–2 and Maruthi et al. (2011) in cultures of *Chrysosporium*
711 *tropicum* containing feather keratin as the sole source of C, N, S and energy. These authors

712 showed a successive increase in keratinase activity within 5 and 6 weeks of culture of these
713 fungi, respectively. We believe that one of the reasons for higher keratinase activity in the
714 cultures of fungi isolated from loamy soil compared to strains from Chernozem could be the
715 higher pH of the former, closer to the lower limit of the optimum activity of this enzyme, i.e.
716 6.0 (Korniłowicz–Kowalska and Bohacz 2011). According to Filipello Marchisio (2000), these
717 enzymes are active in both neutral, slightly alkaline (pH = 7.0 – 8.0) and acidic conditions. Li
718 et al. (2019) reported keratinase activity in the pH range from 5.0 to 13.0. The higher activity
719 of keratinase obtained in our study in fungal cultures isolated from loamy soil, poorer in
720 nutrients, could also be determined by the lower content of readily available carbon and energy
721 sources compared to Chernozem because, as reported by Singh (2010), the activity of this
722 enzyme is inhibited in the presence of simple sources of organic C (glucose).

723 The efficiency of feather keratin biodegradation is also measured by the release of
724 soluble proteins, peptides, and amino acids (Wawrzkievicz et al. 1991; Korniłowicz–
725 Kowalska 1997a,b). Kaul and Sumbali (1997) reported that the accumulation of products
726 resulting from the hydrolysis of hair keratin in fungal cultures was associated with concomitant
727 proteolysis and sulfitolysis of these proteins by fungi. The results of PCA analysis obtained in
728 this study showed a similar relationship in cultures of *Trichophyton ajelloi* strains. This was
729 evidenced by the correlation of keratinase and protease activity (correlation for protease was
730 not always significant) with the release of soluble proteins and/or amino groups and soluble
731 proteins and thiol groups. Our study also showed that the release of soluble proteins, peptides
732 and amino acids during the biodegradation of feather keratin by *Trichophyton ajelloi* fungi
733 successively increased, reaching a maximum at the end of the experiment. Similar results were
734 reported by Al–Musallam et al. (2013) in cultures of the basidiomycete *Coprinopsis* sp. with
735 chicken feather meal as the sole source of C, N, S and energy, and Bohacz (2017) and Bohacz
736 et al. (2020a,b) in cultures of various species of keratinolytic fungi on fragmented chicken
737 feathers. In this study, higher concentrations of soluble proteins were observed in the cultures
738 of fungi isolated from Chernozem. The maximum concentration of amino acids, measured by
739 the content of amino groups in the cultures of all fungal strains, was observed after 3 and then
740 6 weeks of growth, while the concentration of thiol groups was mainly observed in the last two
741 weeks of culture (days 35 and 42). Among strains isolated from loamy soil, high concentrations
742 of thiol groups were also recorded earlier, i.e. on day 21, and from Chernozem on day 14 of
743 culture. Similar results were obtained by Godheja and Shekhar (2014), who reported the highest
744 concentration of cysteine on day 20 of culture of fungi from the genera *Trichoderma*,
745 *Gliocladium*, *Fusarium*, and *Mucor* grown on broiler chicken feathers.

746 According to Kornilłowicz–Kowalska and Bohacz (2011), alkalization of the reaction
747 environment is an important factor conditioning the sulfitolysis of native keratin. This involves
748 the process of deamination of simpler proteins contained in the structure of feathers or hair and
749 the release of ammonia. Al–Musallam et al. (2013) attributed the alkalization of the culture
750 medium to the hydrolytic activity of extracellular keratinolytic protease and/or the deamination
751 of amino acids released from feather keratin, especially after day 21 and 28 of fungus culture.
752 Sharma et al. (2011) also observed an increase in pH after 3 weeks of biodegradation of hair
753 keratin by various keratinolytic fungi, including anthropophilic dermatophytes. This study
754 showed that during the biodegradation of feather keratin by *Trichophyton ajelloi* strains, there
755 was an intense increase in pH observed during the first two weeks of the experiment. This was
756 consistent with earlier studies by Bohacz (2017) and Bohacz et al. (2020a) on cultures of
757 *Aphanoascus fulvescens* and *Chrysosporium articulatum*, as well as on cultures of *Aphanoascus*
758 *keratinophilus* obtained from the pellets of birds of prey. PCA analysis performed in this work
759 showed that an increase in pH of the culture fluids was associated with the release of ammonium
760 ions, which caused alkalization of the environment.

761 Fungi in the process of keratinolysis carry out catabolic reactions leading to the
762 conversion of –SH groups of cysteine into mineral forms of sulfur in the form of sulfates,
763 sulfites (Kunert 2000) and NH₂ groups of amino acids with the release of mineral forms of
764 nitrogen in the form of ammonium ions (Kornilłowicz–Kowalska 1997a,b; Bohacz 2017;
765 Możejko and Bohacz 2022). This study showed that in cultures of *Trichophyton ajelloi* strains
766 isolated from loamy soil, the maximum release of ammonium and sulfate ions occurred on day
767 21 of culture, and on day 14 of cultures from Chernozem. The increase in the concentration of
768 these ions, according to data provided by Bohacz (2017) from stationary cultures of
769 *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium articulatum*, reached a maximum on day 28
770 of chicken feather degradation, while in cultures of *Arthroderma multifidum* and *Arthroderma*
771 *tuberculatum* investigated in another study by Bohacz et al. (2020b), it occurred between days
772 12 and 14 of waste biodegradation. Rajak et al. (1991) reported the production of sulfates during
773 feather biodegradation by *Chrysosporium* fungi and atypical keratinolytic strains (*Talaromyces*
774 *trachyspermus*, *Scopulariopsis brevis*, and *Geotrichum candidum*), while Łaba et al. (2013)
775 observed this effect during feather biodegradation by bacteria. The transformation of organic
776 sulfur contained in chicken feathers by keratinophilic fungi from the *Chrysosporium* group,
777 geophilic dermatophytes, as well as non–keratinophilic fungi such as *Paecilomyces lilacinus*,
778 was also described by Kornilłowicz–Kowalska (1997a). The latter author reported that the
779 amounts of secreted sulfates by keratinophilic fungi were several times higher than by non–

780 keratinophilic fungi. Abirami et al. (2020) emphasized that the decomposition of S-keratin was
781 determined not only by the species of keratinolytic fungus but also by the timing of substrate
782 decomposition. These authors showed that the biodegradation of hard keratin from bovine
783 hooves led to the accumulation of a large amount of sulfated only after 5 months.

784 The significant variation in keratin biodegradation rates observed in this study among
785 *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil and Chernozem could result from their
786 genetically determined physiological characteristics. The interspecific genetic diversity of
787 *Trichophyton ajelloi* strains isolated from different soils was reported by Ciesielska et al.
788 (2014). In the present study, based on the analysis of variance, it was shown that the variation
789 in keratinolytic activity between strains resulted not only from the environment of their origin,
790 i.e. different soils, but also significantly depended on such properties as the synthesis of soluble
791 pigments. It was shown that strains producing a dark vinaceous pigment diffusing into the
792 medium, conventionally called pigmenting strains, and strains not possessing these abilities,
793 conventionally called non-pigmenting strains, isolated from the same soil, differed
794 significantly from each other in keratinase and protease activity, soluble proteins, peptide and
795 amino acid production levels, amino and thiol groups, ammonium and sulfate ions, and pH. The
796 joint analysis of pigmenting and non-pigmenting strains from the two studied soils also showed
797 that they differed significantly from each other in most of the studied keratinolytic indicators,
798 with the exception of the release of thiol groups and proteins.

799 Pigments secreted by dermatophytes, produced through secondary metabolism, belong
800 to naphthoquinones and are usually a mixture of different colored compounds (Summerbell
801 2000). According to Kane and Fisher (1975) and Blechert et al. (2019), pigment production by
802 fungi can be influenced by the composition of the medium, especially its salinity and pH.
803 However, as reported by Dawson and Gentles (1959), the production of dark vinaceous pigment
804 by *Trichophyton ajelloi* (formerly *Keratinomyces ajelloi*) was associated with the cleistothecial
805 strains, which represented the sexual stage of this fungus. These authors have also shown that
806 this was a heterothallic species, forming cleistothecia only in a non-sterile soil containing
807 keratin bait and not forming these fruiting bodies in pure cultures on synthetic media. Padhye
808 and Carmichael (1970) also reported that the production of soluble pigments by *Trichophyton*
809 *ajelloi* was correlated with increased fertility. In light of this data, the observed differences in
810 keratinolytic activity between pigmenting and non-pigmenting strains of *Trichophyton ajelloi*
811 could be related to different developmental stages of these fungi. Pigmenting strains of
812 *Trichophyton ajelloi*, i.e. representing the perfect stages (teleomorphs), due to the production
813 of sexual fruiting bodies, undoubtedly require more energy and organic C to build these

814 structures than the non-pigmenting imperfect stages (anamorphs) of this fungus, producing
815 only pleomorphic conidia. Statistically, the differences in keratinolytic activity between these
816 groups of strains were more pronounced in the case of strains isolated from loamy soil than
817 from Chernozem, as they affected a higher number of keratinolytic parameters in favor of the
818 pigmenting strains. However, from the perspective of providing organic carbon and energy
819 sources necessary for mycelial growth and formation of reproductive structures, deamination
820 of feather protein hydrolysis products, measured by the level of NH_4^+ release, is of key
821 importance; this process was significantly higher in both groups of pigmenting strains—those
822 from loamy soil and Chernozem—compared to their non-pigmenting counterparts. On this basis,
823 we believe that it was conditioned by the greater demand of *Trichophyton ajelloi* pigmenting
824 strains for organic carbon and energy sources than non-pigmenting strains of this fungus.

825 Among the pigmenting strains isolated from loamy soil, strains XII, III, and XIV/XV
826 belonged to the most active due to their higher average keratinolytic indices, important from a
827 fertilizer perspective, i.e. high concentration of ammonium and sulfate ions. The selected strains
828 were indicated for use in optimizing cultivation conditions towards the production of
829 biopreparations with a high content of mineral forms of nitrogen and sulfur, as well as for
830 studying the effects of the obtained keratin hydrolysates on plant growth and soil biological
831 activity.

832

833 **5. Conclusions**

834

835 *Trichophyton ajelloi* fungi isolated from agricultural soils, i.e., loamy soil and
836 Chernozem, demonstrated abilities for the biodegradation of waste feather keratin. The intensity
837 of this process was determined by the origin of the strains as well as their ability to secrete
838 pigment. In this study, it was demonstrated for the first time that pigmenting strains of
839 *Trichophyton ajelloi* exhibited stronger abilities for the mineralization of released soluble
840 proteins, peptides, and amino acids during feather keratin biodegradation, with the release of
841 large amounts of ammonium ions, compared to non-pigmenting strains. Pigmenting strains of
842 *Trichophyton ajelloi* isolated from loamy soil were also shown to release more ammonium ions
843 during feather biodegradation than pigmenting strains from Chernozem.

844 The average values of parameters determining the degree of keratin biodegradation by
845 keratinolytic fungi, such as protease activity, concentration of soluble proteins, peptides and
846 amino acids, measured by the concentration of amino groups and sulfate ions, were higher in
847 cultures of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from Chernozem than from loamy soil. In

848 cultures of strains isolated from loamy soil, higher average values were observed for ammonium
849 ions, keratinase activity, and thiol group release. A greater variation in feather keratin
850 biodegradation ability was shown between strains isolated from Chernozem than from loamy
851 soil, as determined by regression coefficient (R^2) values. *T. ajelloi* strains III, XII, and XIV/XV,
852 originating from loamy soil, showed a particular potential for mineralization of soluble proteins,
853 peptides, and amino acids. These strains were selected for the optimization of culture conditions
854 and substrate composition to obtain keratin hydrolysates with a high content of ammonium and
855 sulfate ions.

856 The results of this study can serve as a guide for acquiring fungal strains that can
857 effectively degrade waste keratin and produce both organic and mineral degradation products,
858 as well as highly active keratinolytic and proteolytic enzymes for various practical applications.

859

860 **Funding**

861

862 This research was funded by subsidies from the Ministry of Education and Science,
863 Poland, for the maintenance and development of research potential (research task
864 RKM/S/21/2021)

865

866 **References**

867

- 868 1. Abirami, S., Ragavi, R., Samrot, A.V., 2020. Utilization of keratinolytic *Lichtheimia*
869 *corymbifera* AS1 for degradation of cattle hoove – a slaughter house waste to use in plant
870 growth. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 10, 6417–6426.
871 <https://doi.org/10.33263/BRIAC105.64176426>
- 872 2. Alahyaribeik, S., Sharifi, S.D., Tabandeh, F., Honarbakhsh, S., Ghazanfari, S., 2020.
873 Bioconversion of chicken feather wastes by keratinolytic bacteria. *Process Safety and*
874 *Environmental Protection* 135, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.01.014>
- 875 3. Al-Musallam, A.A., Al-Gharabally, D.H., Vadakkancheril, N., 2013. Biodegradation of
876 keratin in mineral-based feather medium by thermophilic strains of a new *Coprinopsis* sp.
877 *International Biodeterioration & Biodegradation* 79, 42–48.
878 <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.11.011>
- 879 4. Anbu, P., Hilda, A., Sur, H.W., Hur, B.K., Jayanthi, S., 2008. Extracellular keratinase
880 from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. *International*
881 *Biodeterioration and Biodegradation* 62, 287–292.

- 882 <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.07.017>
- 883 5. Anson, M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with
884 hemoglobin. *Journal of General Physiology* 22, 79–89.
- 885 <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
- 886 6. Blechert, O., Zheng, H., Zang, X., Wang, Q., Liu, W., 2019. Influence of the cultivation
887 medium and pH on the pigmentation of *Trichophyton rubrum*. *PloS ONE* 14,
888 e0222333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222333>
- 889 7. Bohacz, J., 2017. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of
890 the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World Journal*
891 *of Microbiology and Biotechnology* 33, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2177-2>
- 892 8. Bohacz, J., Kornilowicz–Kowalska, T., 2012. Species diversity of keratinophilic fungi in
893 various soil types. *Central European Journal of Biology* 7, 259–266.
- 894 <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0008-5>
- 895 9. Bohacz, J., Kornilowicz–Kowalska, T., 2019. Fungal diversity and keratinolytic activity of
896 fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. *Process Biochemistry* 80, 119–
897 128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.012>
- 898 10. Bohacz, J., Kornilowicz–Kowalska, T., 2020. Modification of post–industrial lignin by
899 fungal strains of the genus *Trichoderma* isolated from different composting stages. *Journal*
900 *of Environmental Management* 266, 110573.
- 901 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110573>
- 902 11. Bohacz, J., Kornilowicz–Kowalska, T., Kitowski, I., Ciesielska, A., 2020a. Degradation of
903 chicken feathers by *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* strains from
904 pellets of predatory birds and its practical aspect. *International Biodeterioration and*
905 *Biodegradation* 151, 104968.
- 906 <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104968>
- 907 12. Bohacz, J., Mozejko, M., Kitowski, I., 2020b. *Arthroderma tuberculatum* and *Arthroderma*
908 *multifidum* isolated from soils in rook (*Corvus frugilegus*) colonies as producers of
909 keratinolytic enzymes and mineral forms of N and S. *International Journal of*
910 *Environmental Research and Public Health* 17, 9162.
- 911 <https://doi.org/10.3390/ijerph17249162>
- 912 13. Bohacz, J., Mozejko, M., Kornilowicz–Kowalska, T., Siebielec, G., 2022. Impact of
913 ecological factors on the occurrence and spatial-taxonomic structure of keratinophilic fungi
914 and their co–occurrence in arable soils. *Agriculture* 12, 194.
- 915 <https://doi.org/10.3390/agriculture12020194>

- 916 14. Cano, J., Solé, M., Pitarch, L.B., Guarro, J., 2002. *Castanedomyces australiensis*, gen. nov.,
917 sp. nov., a keratinophilic fungus from Australian soil. *Studies in Mycology* 22, 165–172.
- 918 15. Caretta, G., Mangiarotti, A.M., Piontelli, E., 1992. Keratinophilic fungi isolated from soil
919 of Italian parks in the Province of Pavia. *European Journal of Epidemiology* 8, 330–339.
920 <https://doi.org/10.1007/BF00158564>
- 921 16. Cavello, I., Bezus, B., Cavalitto, S., 2021. The keratinolytic bacteria *Bacillus cytotoxicus* as
922 a source of novel proteases and feather protein hydrolysates with antioxidant activities.
923 *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19, 107. [https://doi.org/10.1186/s43141-
924 021-00207-1](https://doi.org/10.1186/s43141-021-00207-1)
- 925 17. Cavello, I.A., Cavalitto, S.F., Hours, R.A., 2012. Biodegradation of a keratin waste and the
926 concomitant production of detergent stable serine proteases from *Paecilomyces lilacinus*.
927 *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 945–958. [https://doi.org/10.1007/s12010-
928 012-9650-7](https://doi.org/10.1007/s12010-012-9650-7)
- 929 18. Călin, M., Constantinescu-Aruxandei, D., Alexandrescu, E., Răut, I., Badea Doni, M.,
930 Arsene, M.L., Oancea, F., Jecu, L., Lazărb, V., 2017. Degradation of keratin substrates by
931 keratinolytic fungi. *Electronic Journal of Biotechnology* 28, 101–112.
932 <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.05.007>
- 933 19. Ciesielska, A., Bohacz, J., Kornilowicz-Kowalska, T., Stączek, P., 2014. Microsatellite-
934 primed PCR for intra-species genetic relatedness in *Trichophyton ajelloi* strains isolated in
935 Poland from various soil samples. *Microbes and Environments* 29, 178–183.
936 <https://doi.org/10.1264/jsme2.me13160>
- 937 20. Ciesielska, A., Kornilowicz-Kowalska, T., Kitowski, I., Bohacz, J., 2017. The dispersal of
938 rodent-borne strains of *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* by
939 pellets of predatory birds. *Avian Biology Research* 10, 218–230.
940 <https://doi.org/10.3184/175815617X15036806293529>
- 941 21. Dawson, C., Gentles, J., 1959. Perfect stage of *Keratinomyces ajelloi*. *Nature* 183, 1345–
942 1346. <https://doi.org/10.1038/1831345a0>
- 943 22. Deshmukh, S.K., 2002. Incidence of dermatophytes and other keratinophilic fungi in the
944 glacier bank soils of Kashmir valley, India. *Mycologist* 16, 165–167.
945 [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(02\)00407-X](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(02)00407-X)
- 946 23. Deshmukh, S.K., Verekar, S.A., 2014. Isolation of keratinophilic fungi from selected soils
947 of Sanjay Gandhi National Park, Mumbai (India). *Journal de Mycologie Médicale* 24, 319–
948 327. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.08.004>

- 949 24. Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H., 2007. Compendium of soil fungi (2nd ed.).
950 IHW–Verlag, Eching, Germany
- 951 25. Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and
952 Biophysics 82, 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- 953 26. Espersen, R., Huang, Y., Falco, F.C., Hägglund, P., Gernaey, K.V., Lange, L., Svensson,
954 B., 2021. Exceptionally rich keratinolytic enzyme profile found in the rare actinomycetes
955 *Amycolatopsis keratiniphila* D2^T. Applied Microbiology and Biotechnology 105, 8129–
956 8138. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11579-2>
- 957 27. Filipello–Marchisio, V., 2000. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of
958 keratinic substrates. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J., (Eds.), Biology of dermatophytes
959 and other keratinophilic fungi, Vol. 17, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao,
960 Spain, pp. 86–92.
- 961 28. Galarza, B., Cavello, I., Garro, L., Gortari, C., Hours, R., Cantera, C., 2012. Evaluation of
962 increase at the production of keratinolytics enzymes. Journal of Ageic 63, 70–74.
- 963 29. Godheja, J., Shekhar, S.K., 2014. Biodegradation of keratin from chicken feathers by fungal
964 species as a means of sustainable development. Journal of Bioremediation and
965 Biodegradation 5, 232. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000232>
- 966 30. Gradišar, H., Friedrich, J., Križaj, I., Jerala, R., 2005. Similarities and specificities of fungal
967 keratinolytic proteases: Comparison of keratinases of *Paecilomyces*
968 *marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. Applied and
969 Environmental Microbiology 71, 3420–3426. [https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3420-
970 3426.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3420-3426.2005)
- 971 31. Hamm, P.S., Mueller, R.C., Kuske, C.R., Porras–Alfaro, A., 2020. Keratinophilic fungi:
972 Specialized fungal communities in a desert ecosystem identified using cultured–based and
973 Illumina sequencing approaches. Microbiological Research 239, 126530.
974 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126530>
- 975 32. Hayette, M.P., Sacheli, R., 2017. Unusual species of dermatophytes: Rarely identified or
976 new? Mycopathologia 182, 203–213. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0066-8>
- 977 33. Huang, Y., Łężyk, M., Herbst, F.A., Busk, P.K., Lange, L., 2020. Novel keratinolytic
978 enzymes, discovered from a talented and efficient bacterial keratin degrader. Scientific
979 Reports 10, 10033. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66792-2>
- 980 34. Jain, N., Sharma, M., 2012. A descriptive study of keratinophilic fungal flora of animal and
981 bird habitat, Jaipur, Rajasthan. African Journal of Microbiology Research 6, 6973–6977.
982 <https://doi.org/10.5897/AJMR12.897>

- 983 35. Janda-Ulfig, K., Ulfig, K., Płaza, G., 2007. A study of the growth and enzymatic activity of
984 *Microsporium gypseum* and *Trichophyton ajelloi* isolates from sewage sludge. Annals of the
985 National Institute of Hygiene 58, 481–488.
- 986 36. Kachuei, R., Emami, M., Naeimi B., Diba K., 2012. Isolation of keratinophilic fungi from
987 soil in Isfahan province, Iran. Journal de Mycologie Médicale 22, 8–13.
988 <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.11.002>
- 989 37. Kačínová, J., Tančínová, D., Labuda, R., 2013. Keratinophilic fungi in soils stressed by
990 occurrence of animals. Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences 2, 1436–
991 1446.
- 992 38. Kačínová, J., Tančínová, D., Medo, J., 2014. Production of extracellular keratinase
993 by *Chrysosporium tropicum* and *Trichophyton ajelloi*. Journal of Microbiology,
994 Biotechnology and Food Sciences 3, 103–106.
- 995 39. Kane, J., Fischer, J.B., 1975. The effect of sodium chloride on the growth and morphology
996 of dermatophytes and some other keratolytic fungi. Canadian Journal of Microbiology 21,
997 742–749. <https://doi.org/10.1139/m75-110>
- 998 40. Kaul, S., Sumbali, G., 1997. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. Mycopathologia 139,
999 137–140. <https://doi.org/10.1023/A:1006896030739>
- 1000 41. Kitowski, I., Kornilłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J., Ciesielska, A., 2022. Dispersal of
1001 *Aphanoascus keratinophilus* by the rook *Corvus frugilegus* during breeding in East
1002 Poland. Scientific Reports 12, 2142. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06227-2>
- 1003 42. Kornilłowicz, T., 1994. Methods for determining keratinolytic activity of saprophytic
1004 fungi. Acta Mycologica 29, 169–178. <https://doi.org/10.5586/am.1994.017>
- 1005 43. Kornilłowicz-Kowalska, T., 1997a. Studies on the decomposition of keratin wastes by
1006 saprotrophic microfungi. I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. Acta
1007 Mycologica 32, 51–79. <https://doi.org/10.5586/am.1997.006>
- 1008 44. Kornilłowicz-Kowalska, T., 1997b. Studies on the decomposition of keratin wastes by
1009 saprotrophic microfungi. II. Sulphur and nitrogen balance. Acta Mycologica 32, 81–93.
1010 <https://doi.org/10.5586/am.1997.007>
- 1011 45. Kornilłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J., 2002. Some correlations between the occurrence
1012 frequency of keratinophilic fungi and selected soil properties. Acta Mycologica 37, 101–
1013 116. <https://doi.org/10.5586/am.2002.009>
- 1014 46. Kornilłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J., 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and
1015 practical aspects. Waste Management 31, 1689–1701.
1016 <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024>

- 1017 47. Kornilłowicz–Kowalska, T., Kitowski, I., Bohacz, J., Kwiatkowska, E., 2018. Fungal
1018 frequency and diversity in the nests of wetland birds from Poland: relationships between
1019 birds, nest properties and inhabiting fungi. *Avian Biology Research* 11, 245–262.
1020 <https://doi.org/10.3184/175815618X15360537405342>
- 1021 48. Kunert, J., 2000. Physiology of keratinophilic fungi. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J.,
1022 (Eds.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, Vol. 17, *Revista*
1023 *Iberoamericana de Micología*, Bilbao, Spain, pp. 77–85.
- 1024 49. Li, Q., 2019. Progress in microbial degradation of feather waste. *Frontiers in Microbiology*
1025 10, 2717. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02717>
- 1026 50. Lowry, O., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with
1027 Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 93, 265–275.
1028 [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- 1029 51. Łaba, W., Choińska, A., Rodziewicz, A., 2013. The release of sulfur compounds during
1030 degradation of feather keratin by two *Bacillus* strains. *Acta Scientiarum Polonorum*
1031 *Biotechnology* 12, 29–40.
- 1032 52. Łaba, W., Żarowska, B., Chorążyk, D., Pudło, A., Piegza, M., Kancelista, A., Kopec, W.,
1033 2018. New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste. *AMB Express* 8,
1034 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0538-y>
- 1035 53. Maruthi, A.Y., Lakshmi, A.K., Rao, R.S., Chaitanya, A.D., 2011. Degradation of feather
1036 and hair by *Chrysosporium tropicum*: A potent keratinophilic fungus. *African Journal of*
1037 *Biotechnology* 10, 3579–3584. <https://doi.org/10.5897/AJB10.432>
- 1038 54. Mercantini, R., Marsella, R., Caprilli, F., Dovgiallo, G., 1980. Isolation of dermatophytes
1039 and correlated species from the soil of public gardens and park of Roma. *Sabouraudia* 18,
1040 123–128. <https://doi.org/10.1080/00362178085380201>
- 1041 55. Mercantini, R., Marsella, R., Cervellati, M.C., 1989. Keratinophilic fungi isolated from
1042 antarctic soil. *Mycopathologia* 106, 47-52. <https://doi.org/10.1007/BF00436926>
- 1043 56. Możejko, M., Bohacz, J., 2022. Optimization of conditions for feather waste biodegradation
1044 by geophilic *Trichophyton ajelloi* fungal strains towards further agricultural use.
1045 *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, 10858.
1046 <https://doi.org/10.3390/ijerph191710858>
- 1047 57. Nilsson, M., Andreas, L., Lagerkvist, A., 2016. Effect of accelerated carbonation and zero
1048 valent iron on metal leaching from bottom ash. *Waste Management* 51, 97–104.
1049 <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.12.028>

- 1050 58. Ogórek, R., Suchodolski, J., Piecuch, A., Przywara, K., Višňovská, Z., 2022. Keratinophilic
1051 and keratinolytic fungi in cave ecosystems: A culture-based study of Brestovská cave and
1052 Demänovská Ľadová and Slobody caves (Slovakia). *Applied Sciences* 12, 1455.
1053 <https://doi.org/10.3390/app12031455>
- 1054 59. Omran, R., 2017. Production of antimicrobial and anticancer fom feather–keratinolytic
1055 *Nocardiosis* sp. 28ROR as a novel strain using feather meal medium. *International Journal*
1056 *of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 175–179.
1057 <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i3.16426>
- 1058 60. Onifade, A.A., Al-Sane, N.A, Al–Musallam, A.A., Al–Zarban, S., 1998. A review:
1059 Potentials for biotechnological applications of keratin–degrading microorganisms and their
1060 enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed
1061 resources. *Bioresource Technology* 66, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00033-9)
1062 [8524\(98\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00033-9)
- 1063 61. Otčenášek, M., Dvořák, J., 1975 Ecological classification of dermatophytes. *Mycoses* 18,
1064 425–434. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1975.tb03521.x>
- 1065 62. Otčenášek, M., Dvořák, J., Kunert, J., 1967. Geographic distribution of the geophilic
1066 dermatophytes in the soil. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 31, 151–162.
1067 <https://doi.org/10.1007/BF02051220>
- 1068 63. Padhye, A.A., Carmichael, J.W., 1970. Mating reactions of pigmented and non–pigmented
1069 isolates of *Arthroderma uncinatum*. *Sabouraudia* 8, 112–115.
1070 <https://doi.org/10.1080/00362177085190731>
- 1071 64. Pontes, Z.B.V.S., Oliveira, A.C., Guerra, F.Q.S., Pontes, L.R.A., Santos, J.P., 2013.
1072 Distribution of dermatophytes from soils of urban and rural areas of cities of Paraíba State,
1073 Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 55, 377–383.
1074 <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000600002>.
- 1075 65. Pugh, G.J.F., Agrawal, S.C., 1983. Sensitivity of *Trichophyton ajelloi* to some common
1076 agrochemicals. *Mycopathologia* 81, 117–121. <https://doi.org/10.1007/BF00436989>
- 1077 66. Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K., Meyer, A.S., 2020. Microbial enzymes catalyzing keratin
1078 degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology Advances* 44, 107607.
1079 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107607>
- 1080 67. Rajak, R.C., Parwekar, S., Malviya, H., Hasija, S.K., 1991. Keratin degradation by fungi
1081 isolated from the grounds of a gelatin factory in Jabalpur, India. *Mycopathologia* 114, 83–
1082 87. <https://doi.org/10.1007/BF00436426>

- 1083 68. Schacterle, G.R., Pollack, R.L., 1973. A simplified method for the quantitative assay of
1084 small amounts of protein in biologic material. *Analytical Biochemistry* 51, 654–655.
1085 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90523-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90523-x)
- 1086 69. Sharma, A., Chandra, S., Sharma, M., 2011. Difference in keratinase activity of
1087 dermatophytes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to
1088 parasitism. *Mycoses* 55, 410–415. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02133.x>
- 1089 70. Singh, C.J., 2010. Extracellular protease expression in *Microsporium gypseum* complex, its
1090 regulation and keratinolytic potential. *Mycoses* 54, 183–188.
1091 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01871.x>
- 1092 71. Statistics Poland, 2022. Concise Statistical Yearbook of Poland. Publishing Establishment,
1093 Warsaw, Poland, pp. 281–282.
- 1094 72. Summerbell, R.C., 2000. Form and function in the evolution of dermatophytes. In:
1095 Kushwaha, R.K.S., Guarro, J., (Eds.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic*
1096 *fungi*, Vol. 17, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, Spain, pp. 30–45.
- 1097 73. Taghipour, S., Abastabar, M., Piri, F., Aboualigalehdari, E., Jabbari, M.R., Zarrinfar, H.,
1098 Nouripour-Sisakht, S., Mohammadi, R., Ahmadi, B., Ansari, S., Katiraei, F., Niknejad, F.,
1099 Didehdar, M., Nazeri, M., Makimura, K., Rezaei-Matehkolaei, A., 2021. Diversity of
1100 geophilic dermatophytes species in the soils of Iran; the significant preponderance of
1101 *Nannizzia fulva*. *Journal of Fungi* 7, 345. <https://doi.org/10.3390/jof7050345>
- 1102 74. Tamreihao, K., Muhkerjee, S., Khunjamayum, R., Devi, L.J., Asem, R.S., Ningthoujam,
1103 D.S., 2019. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for
1104 sustainable agricultural production. *Journal of Basic Microbiology* 59, 4–13.
1105 <https://doi.org/10.1002/jobm.201800434>
- 1106 75. Ulfig, K., Płaza, G., Terakowski, M., Worsztynowicz, A., 2002. Keratinolytic fungi in an
1107 acidic petroleum waste lagoon at a petroleum refinery. *Annals of the National Institute of*
1108 *Hygiene* 53, 267–276.
- 1109 76. Ulfig, K., Płaza, G., Worsztynowicz, A., Mańko, T., Tien, A.J., Brigmon, R.L., 2003.
1110 Keratinolytic fungi as indicators of hydrocarbon contamination and bioremediation
1111 progress in a petroleum refinery. *Polish Journal of Environmental Studies* 12, 245–250.
- 1112 77. van Oorschot, C.A.N., 1980. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. *Studies in*
1113 *Mycology* 20, 1–89.
- 1114 78. Vavrova, K., Wimmerova, L., Knappek, J., Weger, J., Keken, Z., Kastanek, F., Solcova, O.,
1115 2022. Waste feathers processing to liquid fertilizers for sustainable agriculture—LCA,
1116 economic evaluation, and case study. *Processes* 10, 2478.

- 1117 <https://doi.org/10.3390/pr10122478>
- 1118 79. Wang, L., Qian, Y., Cao, Y., Huang, Y., Chang, Z., Huang, H., 2017. Production and
1119 characterization of keratinolytic proteases by a chicken feather–degrading thermophilic
1120 strain, *Thermoactinomyces* sp. YT06. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27,
1121 2190–2198. <https://doi.org/10.4014/jmb.1705.05082>
- 1122 80. Wawrzekiewicz, K., Wolski, T., Łobarzewski, J., 1991. Screening the keratinolytic activity
1123 of dermatophytes *in vitro*. *Mycopathologia* 114, 1–8. <https://doi.org/10.1007/BF00436684>
- 1124 81. World Reference Base of Soil Resources, 2015. International soil classification system for
1125 naming Soils and Creating Legends for Soil Maps, Update 2015, World Soil Resources
1126 Reports No. 106, FAO, Rome, Italy.
- 1127 82. Youssef, Y.A., Karam El–Din, A.A., Hassanein, S.M., 1992. Occurrence of keratinolytic
1128 fungi and related dermatophytes in soils in Cairo, Egypt. *Zentralblatt für Mikrobiologie*
1129 147, 80–85. [https://doi.org/10.1016/S0232-4393\(11\)80367-7](https://doi.org/10.1016/S0232-4393(11)80367-7)
- 1130 83. Yu, R.J., Harmon, S.R., Blank, F., 1968. Isolation and purification of an extracellular
1131 keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Bacteriology* 96, 1435–1436.
1132 <https://doi.org/10.1128/jb.96.4.1435-1436.1968>
- 1133 84. Zaki, S.M., Mikami, Y., Karam El–Din, A.A., Youssef, Y.A., 2005. Keratinophilic fungi
1134 recovered from muddy soil in Cairo vicinities, Egypt. *Mycopathologia* 160, 245–251.
1135 <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0143-x>

1136

1137 **Figures captions**

1138

1139 **Fig. 1.** Dynamics of changes in protease activity during feather biodegradation by *Trichophyton*
1140 *ajelloi* strains. Explanations: light blue, dark blue and red colors indicate *Trichophyton ajelloi*
1141 strains derived from loamy soil (Cambisol), Chernozem and the reference strain, respectively.
1142 Yellow, green and purple marks detail the strains selected for optimization, i.e., III, XII and
1143 XIV, respectively.

1144 **Fig. 2.** Dynamics of changes in keratinase activity during feather biodegradation by
1145 *Trichophyton ajelloi* strains. Explanations: Same as in Fig. 1.

1146 **Fig. 3.** Dynamics of changes in proteins and peptides concentration during feather
1147 biodegradation by *Trichophyton ajelloi* strains. Explanations: Same as in Fig. 1.

1148 **Fig. 4.** Dynamics of changes in amino groups concentration during feather biodegradation by
1149 *Trichophyton ajelloi* strains. Explanations: Same as in Fig. 1.

1150 **Fig. 5.** Dynamics of changes in thiol groups concentration during feather biodegradation by
1151 *Trichophyton ajelloi* strains. Explanations: Same as in Fig. 1.

1152 **Fig. 6.** Dynamics of changes in ammonium ions concentration during feather biodegradation
1153 by *Trichophyton ajelloi* strains. Explanations: Same as in Fig. 1.

1154 **Fig. 7.** Dynamics of changes in sulfate ions concentration during feather biodegradation by
1155 *Trichophyton ajelloi* strains. Explanations: Same as in Fig. 1.

1156 **Fig. 8.** Dynamics of changes of pH in post culture fluid during feather biodegradation by
1157 *Trichophyton ajelloi* strains. Explanations: Same as in Fig. 1.

1158 **Fig. 9.** Principal component analysis (PCA) of the results of keratinolytic activity of
1159 *Trichophyton ajelloi* strains isolated from loamy soil (Cambisol) and Chernozem.

1160

1161 **Table captions**

1162

1163 **Table 1**

1164 Selected parameters of morphological characteristics of *Trichophyton ajelloi* colonies isolated
1165 from arable soils (loamy soil and Chernozem).

1166 **Table 2**

1167 Feather waste keratinolytic parameters (means \pm standard deviation) in culture fluids of
1168 *Trichophyton ajelloi* isolated from loamy soil (Cambisol).

1169 **Table 3**

1170 Feather waste keratinolytic parameters (means \pm standard deviation) in culture fluids of
1171 *Trichophyton ajelloi* isolated from Chernozem.

1172 **Table. 4**

1173 Degree of feather mass loss (%) after 42 days by *Trichophyton ajelloi* strains isolated from
1174 arable soils.

1175 **Table 5**

1176 Differences in keratinolytic activity of pigmented and non-pigmented strains of *Trichophyton*
1177 *ajelloi*.

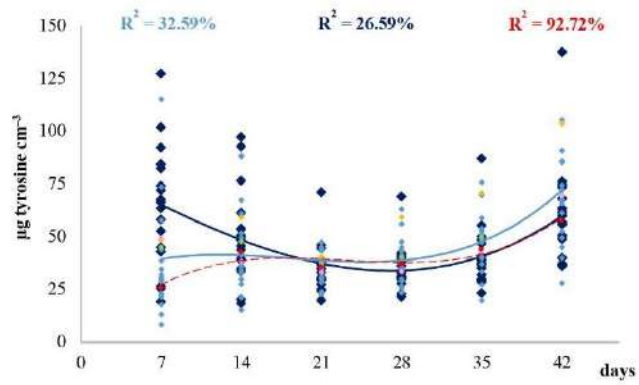


Figure 1.

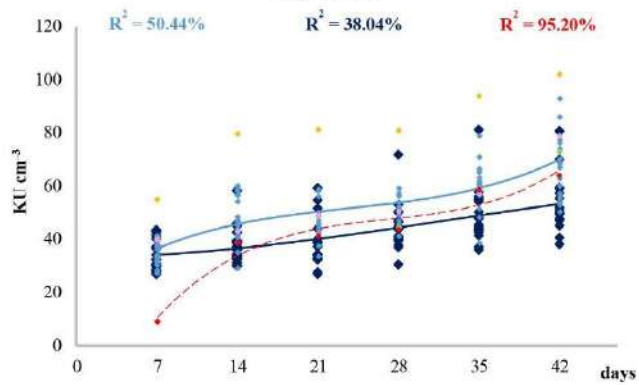


Figure 2.

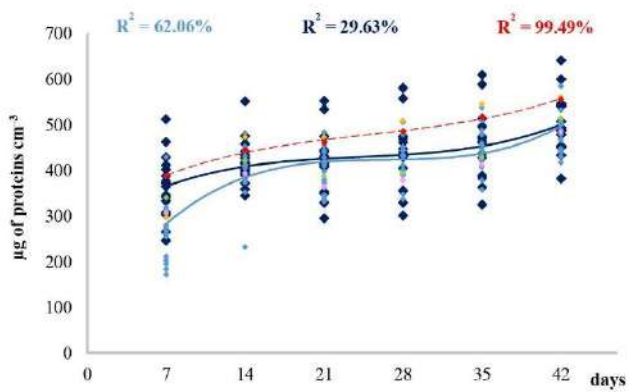


Figure 3

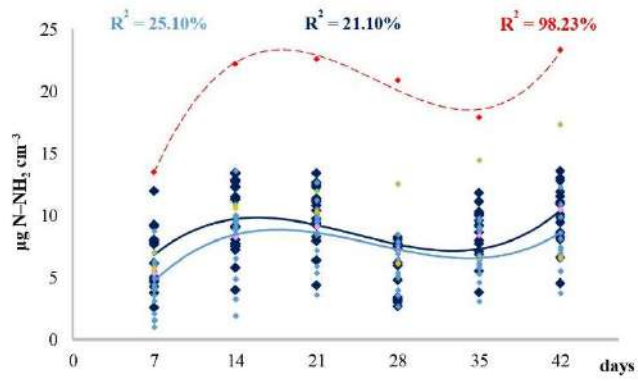


Figure 4.

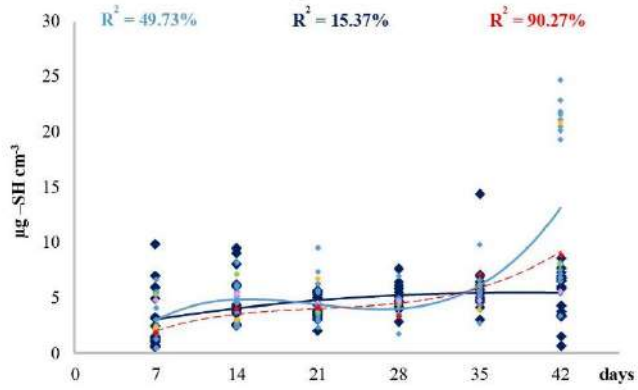


Figure 5.

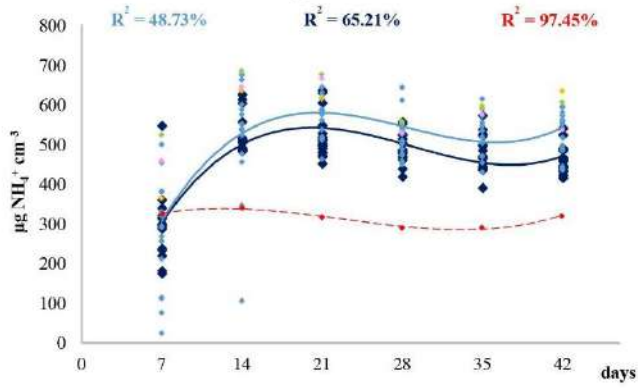


Figure 6.

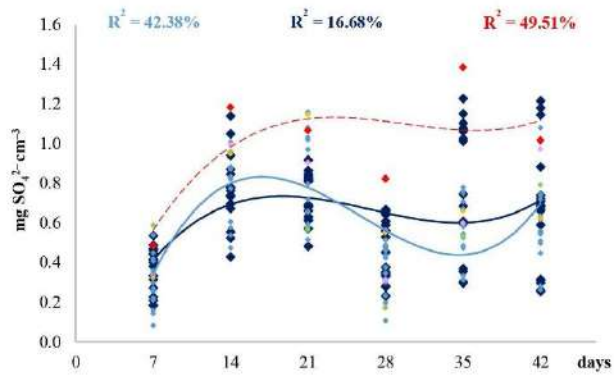


Figure 7.

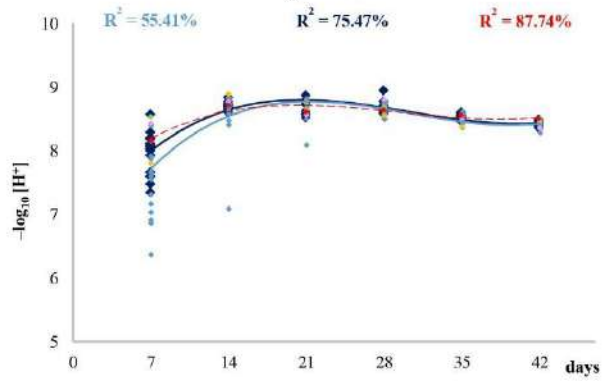


Figure 8.

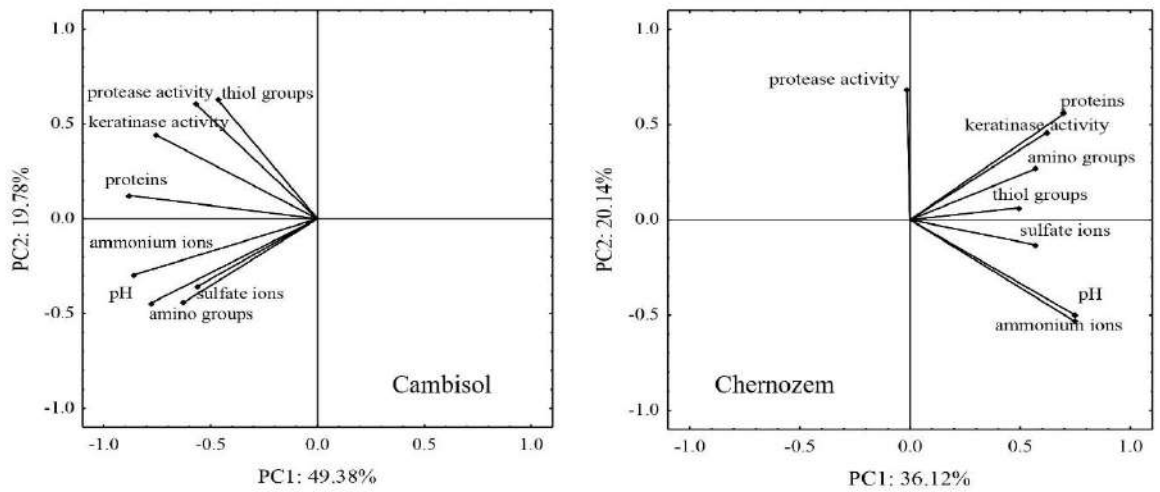


Figure 9.

Table 1

Selected parameters of morphological characteristics of *Trichophyton ajelloi* colonies isolated from arable soils (loamy soil and Chernozem).

Soil	Strain No.	Incubation time [days]							
		7	14						
		Colony diameter [mm]		Colony diameter [mm]		Reverse		Reverse	
		Obverse		Obverse		Reverse		Reverse	
Loamy soil (Cambisol)	I	26.00 ± 1.00	Creamy (edges) Tan (center)	52.50 ± 0.50	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	II	22.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	47.00 ± 1.00	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	III	24.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	45.50 ± 0.50	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	IV	23.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	51.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	V	24.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	47.50 ± 0.50	Tan	Without pigment	Without pigment		
	VI	14.25 ± 0.25	Creamy	30.50 ± 0.50	Creamy	Without pigment	Without pigment		
	VII	19.25 ± 0.25	Creamy	45.50 ± 4.50	Creamy	Without pigment	Without pigment		
	VIII	21.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	46.00 ± 1.00	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	IX	23.50 ± 0.50	Tan	49.25 ± 0.25	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	X	25.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	55.00 ± 2.00	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XI	23.50 ± 0.50	Tan	47.50 ± 0.50	Tan	Dark vinaceous	Without pigment		
	XII	21.25 ± 0.25	Tan	41.50 ± 0.50	Tan	Dark vinaceous	Dark vinaceous		
	XIII	24.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	48.50 ± 0.50	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	XIV	25.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	52.50 ± 0.50	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	XV	26.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	54.00 ± 1.00	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	XVI	16.25 ± 0.25	Creamy	35.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XXI	14.50 ± 0.50	Creamy	27.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XXII	27.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	58.50 ± 0.50	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	XXVIII	9.50 ± 0.50	Creamy	21.00 ± 1.00	Tan	Without pigment	Without pigment		
XXIX	19.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	49.50 ± 0.50	Tan	Without pigment	Dark vinaceous			
Mean Cambisol		21.58 ± 0.38		45.30 ± 0.85					
Chernozem	XVII	22.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	46.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XVIII	17.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	33.50 ± 0.50	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	XIX	24.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	51.50 ± 0.50	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	XX	23.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	47.00 ± 1.00	Tan	Without pigment	Without pigment		
	XXIII	27.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	48.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Dark vinaceous		
	XXIV	21.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	45.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XXV	21.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	46.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XXVI	20.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	42.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XXVII	25.50 ± 0.50	Tan	53.00 ± 1.00	Cream (brzegi) Tan (srodek)	Without pigment	Dark vinaceous		
	XXX	11.25 ± 0.25	Creamy	35.00 ± 1.00	Creamy	Without pigment	Without pigment		
	XXXI	10.50 ± 0.50	Creamy	27.00 ± 2.00	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XXXII	10.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	35.00 ± 1.00	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XXXIII	9.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	32.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XXXIV	15.50 ± 0.50	Creamy	36.00 ± 1.00	Creamy	Without pigment	Without pigment		
	XXXV	13.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	38.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XXXVI	11.50 ± 0.50	Creamy	35.50 ± 0.50	Creamy (edges) Tan (center)	Without pigment	Without pigment		
	XXXVIII	14.25 ± 0.25	Creamy (edges) Tan (center)	42.50 ± 1.50	Tan	Without pigment	Dark vinaceous		
	Mean Chernozem		17.69 ± 0.46		40.93 ± 0.75				
	Reference strain	REF	23.50 ± 0.50	Creamy	51.00 ± 2.00	Creamy	Without pigment	Without pigment	

Table 2
Feather waste keratinolytic parameters (means \pm standard deviation) in culture fluids of *Trichophyton ajelloi* isolated from loamy soil (Cambisol).

Strain No.	Protease [μg tyrosine cm^{-3}]	Keratinase [KU cm^{-3}]	Proteins and peptides [μg proteins cm^{-3}]	Amino-NH ₂ [μg N-NH ₂ cm^{-3}]	Thiol groups [μg -SH cm^{-3}]	Ammonium ions [μg NH ₄ ⁺ cm^{-3}]	Sulfate ions [mg SO ₄ ²⁻ cm^{-3}]	pH [-log ₁₀ [H ⁺]]
I	57.97 \pm 1.63 ^h	60.33 \pm 1.76 ^a	445.85 \pm 7.70 ^g	7.93 \pm 0.33 ^{gh}	6.38 \pm 0.74 ^{ghij}	540.46 \pm 11.52 ⁱ	0.63 \pm 0.02 ^{de}	8.47 \pm 0.04 ^{def}
II	34.29 \pm 1.35 ^{bc}	55.60 \pm 1.97 ^{kl}	409.91 \pm 5.91 ^{ef}	7.03 \pm 0.27 ^{ef}	7.06 \pm 0.61 ^{jk}	500.43 \pm 24.50 ^{gh}	0.54 \pm 0.04 ^b	8.37 \pm 0.06 ^{bc}
III	63.42 \pm 2.77 ⁱ	81.94 \pm 1.79 ^o	476.81 \pm 10.12 ^b	7.69 \pm 0.27 ^g	6.91 \pm 0.36 ^{ijk}	569.55 \pm 11.69 ⁱ	0.71 \pm 0.02 ^g	8.49 \pm 0.06 ^{defgh}
IV	56.93 \pm 3.22 ^h	52.87 \pm 2.08 ^{hijk}	392.52 \pm 5.70 ^{de}	6.84 \pm 0.36 ^{de}	7.21 \pm 0.35 ^{jk}	508.78 \pm 8.77 ^h	0.59 \pm 0.02 ^c	8.41 \pm 0.06 ^{cd}
V	59.60 \pm 2.49 ^{hi}	56.42 \pm 1.66 ^{lm}	409.46 \pm 11.90 ^{ef}	7.50 \pm 0.15 ^{fg}	7.35 \pm 0.44 ^k	533.23 \pm 11.07 ⁱ	0.72 \pm 0.03 ^g	8.51 \pm 0.03 ^{efghi}
VI	50.01 \pm 2.29 ^g	49.74 \pm 2.63 ^{gh}	336.41 \pm 9.89 ^a	4.35 \pm 0.16 ^b	5.50 \pm 0.40 ^{def}	333.74 \pm 10.65 ^b	0.65 \pm 0.02 ^{ef}	7.86 \pm 0.05 ^a
VII	55.76 \pm 2.17 ^h	53.76 \pm 2.05 ^{kl}	379.24 \pm 10.05 ^{cd}	6.17 \pm 0.20 ^c	6.99 \pm 0.29 ^{jk}	462.50 \pm 7.10 ^d	0.65 \pm 0.01 ^{ef}	8.30 \pm 0.03 ^b
VIII	32.62 \pm 1.65 ^b	46.32 \pm 1.52 ^{cde}	361.56 \pm 10.98 ^{bc}	6.52 \pm 0.22 ^{cd}	6.46 \pm 0.34 ^{ghij}	482.47 \pm 7.14 ^{ef}	0.60 \pm 0.02 ^{cd}	8.43 \pm 0.03 ^{cde}
IX	39.26 \pm 2.31 ^d	53.91 \pm 1.90 ^{jkl}	406.80 \pm 15.74 ^{ef}	7.10 \pm 0.25 ^{ef}	6.70 \pm 0.81 ^{hijk}	547.06 \pm 9.38 ⁱ	0.65 \pm 0.04 ^{ef}	8.41 \pm 0.03 ^{cd}
X	56.32 \pm 1.99 ^h	47.67 \pm 2.22 ^{def}	358.77 \pm 5.72 ^b	6.18 \pm 0.27 ^c	5.38 \pm 0.58 ^{hdef}	509.44 \pm 8.28 ^h	0.61 \pm 0.03 ^{cde}	8.48 \pm 0.07 ^{defg}
XI	37.65 \pm 1.97 ^{cd}	51.23 \pm 1.87 ^{ghij}	405.16 \pm 9.64 ^{ef}	8.71 \pm 0.24 ^{jk}	5.88 \pm 0.51 ^{efgh}	584.81 \pm 9.97 ⁱ	0.59 \pm 0.02 ^{cd}	8.62 \pm 0.04 ^k
XII	48.16 \pm 2.27 ^{fg}	50.19 \pm 1.84 ^{ghai}	414.88 \pm 15.43 ^f	12.38 \pm 0.24 ^m	5.78 \pm 0.48 ^{defg}	607.79 \pm 9.05 ^k	0.60 \pm 0.03 ^{cde}	8.60 \pm 0.03 ^{jk}
XIII	31.11 \pm 2.14 ^b	39.33 \pm 2.04 ^a	356.39 \pm 9.52 ^b	4.62 \pm 0.22 ^b	4.36 \pm 0.34 ^a	472.58 \pm 5.43 ^{de}	0.63 \pm 0.03 ^{cde}	8.41 \pm 0.07 ^{cd}
XIV	44.05 \pm 2.31 ^e	52.92 \pm 1.68 ^{hijk}	390.79 \pm 5.72 ^{de}	8.18 \pm 0.26 ^{ai}	4.95 \pm 0.58 ^{ghcd}	570.67 \pm 8.73 ^j	0.69 \pm 0.04 ^{fg}	8.58 \pm 0.04 ^{ijk}
XV	44.27 \pm 1.61 ^{ef}	53.14 \pm 1.82 ^{ijkl}	405.42 \pm 7.73 ^{ef}	9.04 \pm 0.40 ^k	5.64 \pm 0.060 ^{cddefg}	582.87 \pm 11.93 ^j	0.69 \pm 0.04 ^{fg}	8.57 \pm 0.06 ^{ljk}
XVI	48.93 \pm 2.28 ^g	59.71 \pm 2.80 ^{lmn}	451.01 \pm 15.67 ^g	3.11 \pm 0.21 ^a	4.58 \pm 0.57 ^{ab}	464.89 \pm 7.00 ^d	0.61 \pm 0.03 ^{cde}	8.30 \pm 0.09 ^b
XXI	62.51 \pm 1.93 ⁱ	48.86 \pm 2.65 ^{efg}	449.82 \pm 12.23 ^g	8.52 \pm 0.32 ^j	5.29 \pm 0.41 ^{bcd}	461.92 \pm 12.25 ^d	0.39 \pm 0.02 ^a	8.53 \pm 0.06 ^{efghijk}
XXII	22.62 \pm 1.55 ^a	43.95 \pm 2.59 ^{bc}	417.58 \pm 8.10 ^f	7.67 \pm 0.33 ^j	5.67 \pm 0.45 ^{cddefg}	462.85 \pm 8.80 ^d	0.43 \pm 0.02 ^a	8.56 \pm 0.06 ^{ghijk}
XXXVIII	38.92 \pm 2.44 ^d	44.84 \pm 2.56 ^{bed}	399.52 \pm 19.02 ^{ef}	7.87 \pm 0.26 ^{gh}	6.16 \pm 0.49 ^{ghu}	370.55 \pm 10.03 ^c	0.50 \pm 0.03 ^b	8.31 \pm 0.03 ^b
XXIX	38.65 \pm 3.87 ^d	47.80 \pm 2.85 ^{def}	497.50 \pm 12.45 ⁱ	10.92 \pm 0.39 ^l	4.19 \pm 0.66 ^a	490.39 \pm 9.93 ^g	0.60 \pm 0.03 ^{cd}	8.60 \pm 0.03 ^{jk}
Mean Cambisol	46.15 \pm 2.21	52.53 \pm 2.11	408.27 \pm 10.46	7.42 \pm 0.27	5.92 \pm 0.50	502.85 \pm 10.16	0.60 \pm 0.03	8.44 \pm 0.05
Reference	40.78 \pm 4.26 ^{de}	42.71 \pm 2.35 ^b	473.76 \pm 25.59 ^h	20.05 \pm 0.67 ⁿ	4.92 \pm 0.33 ^{abc}	311.64 \pm 8.76 ^a	1.01 \pm 0.04 ^h	8.52 \pm 0.02 ^{efghij}

Explanations: Letters, i.e., a, b, c, etc. denote the means that form homogenous groups (HSD-Tukey post-hoc test for multivariate ANOVA) within loamy soil (Cambisol). When two compared means were assigned the same letter (e.g.: a or ab, ab), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g.: a and b, or ab and cd), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

Table 3

Feather waste keratinolytic parameters (means \pm standard deviation) in culture fluids of *Trichophyton ajelloi* isolated from Chernozem.

Strain No.	Protease [μg tyrosine cm^{-3}]	Keratinase [KU cm^{-3}]	Proteins and peptides [μg proteins cm^{-3}]	Amino groups [μg N-NH ₂ cm^{-3}]	Thiol groups [μg -SH cm^{-3}]	Ammonium ions [μg NH ₄ ⁺ cm^{-3}]	Sulfate ions [mg SO ₄ ²⁻ cm^{-3}]	pH [-log ₁₀ [H ⁺]]
XXVII	52.26 \pm 2.50 ^{fg}	46.57 \pm 2.20 ^{gh}	378.60 \pm 8.27 ^c	5.45 \pm 0.08 ^b	5.22 \pm 0.59 ^f	518.21 \pm 5.82 ^y	0.62 \pm 0.03 ^e	8.48 \pm 0.03 ^{bcd}
XXVIII	44.18 \pm 2.28 ^{cd}	36.58 \pm 2.15 ^{ab}	327.20 \pm 11.51 ^a	7.06 \pm 0.16 ^{cd}	6.31 \pm 0.38 ^f	527.01 \pm 7.42 ^z	0.74 \pm 0.04 ^{fg}	8.56 \pm 0.03 ^{de}
XIX	37.45 \pm 1.92 ^b	41.42 \pm 1.63 ^{def}	352.86 \pm 10.75 ^b	3.74 \pm 0.20 ^a	5.11 \pm 0.43 ^{ef}	465.55 \pm 11.48 ^b	0.68 \pm 0.02 ^{de}	8.35 \pm 0.04 ^a
XX	49.90 \pm 1.85 ^{ef}	51.28 \pm 2.95 ^t	382.93 \pm 11.12 ^{cd}	6.79 \pm 0.29 ^e	4.96 \pm 0.55 ^{ef}	512.56 \pm 5.96 ^t	0.76 \pm 0.03 ^{gh}	8.44 \pm 0.09 ^{bc}
XXIII	27.48 \pm 1.76 ^a	39.29 \pm 2.08 ^{abde}	418.57 \pm 13.63 ^{ef}	7.75 \pm 0.32 ^c	4.40 \pm 0.59 ^{bc}	451.41 \pm 7.13 ^{efg}	0.39 \pm 0.02 ^a	8.59 \pm 0.04 ^{ef}
XXIV	46.73 \pm 1.85 ^{de}	43.59 \pm 3.01 ^{fg}	454.42 \pm 5.66 ^{ijk}	7.48 \pm 0.44 ^{de}	6.48 \pm 0.52 ^{de}	438.97 \pm 6.18 ^{de}	0.46 \pm 0.02 ^b	8.45 \pm 0.06 ^{bc}
XXV	42.68 \pm 2.51 ^{cd}	41.64 \pm 2.50 ^{ef}	402.18 \pm 6.97 ^{de}	6.69 \pm 0.18 ^e	4.39 \pm 0.52 ^{de}	424.83 \pm 7.56 ^{bc}	0.48 \pm 0.02 ^b	8.43 \pm 0.06 ^{bc}
XXXVI	37.08 \pm 2.89 ^b	39.33 \pm 2.62 ^{bcd}	412.54 \pm 13.49 ^{ef}	7.66 \pm 0.20 ^e	5.03 \pm 0.73 ^{ef}	435.58 \pm 9.07 ^{cd}	0.49 \pm 0.03 ^b	8.52 \pm 0.03 ^{cde}
XXXVII	54.60 \pm 2.50 ^g	48.30 \pm 1.86 ^{hi}	546.43 \pm 8.76 ⁱ	9.58 \pm 0.21 ^f	5.37 \pm 0.50 ^f	529.14 \pm 7.46 ^j	0.42 \pm 0.02 ^a	8.65 \pm 0.03 ^f
XXX	52.24 \pm 3.35 ^{fg}	43.06 \pm 1.65 ^f	429.42 \pm 19.26 ^{gh}	9.85 \pm 0.32 ^{fg}	5.05 \pm 0.53 ^{ef}	452.49 \pm 7.09 ^{fg}	0.73 \pm 0.03 ^{fg}	8.55 \pm 0.02 ^{de}
XXXXI	89.29 \pm 4.02 ^b	41.81 \pm 1.96 ^{ef}	469.17 \pm 16.52 ^{ik}	9.89 \pm 0.37 ^{fg}	3.78 \pm 0.46 ^{cd}	442.45 \pm 11.71 ^{def}	0.66 \pm 0.03 ^{cd}	8.45 \pm 0.05 ^{bc}
XXXXII	40.45 \pm 3.61 ^{bc}	40.19 \pm 2.15 ^{def}	441.06 \pm 9.38 ^{gh}	9.94 \pm 0.42 ^{fg}	3.36 \pm 0.45 ^{bc}	441.95 \pm 10.32 ^{def}	0.75 \pm 0.03 ^{gh}	8.52 \pm 0.02 ^{cde}
XXXXIII	53.57 \pm 3.06 ^{fg}	66.08 \pm 1.92 ^j	568.28 \pm 16.78 ^l	11.51 \pm 0.32 ⁱ	6.94 \pm 0.67 ^k	456.94 \pm 6.54 ^{gh}	0.70 \pm 0.03 ^{ef}	8.52 \pm 0.14 ^{cde}
XXXXIV	49.96 \pm 2.87 ^{ef}	41.04 \pm 1.80 ^{def}	452.39 \pm 13.64 ^{ijk}	10.09 \pm 0.34 ^{gh}	3.83 \pm 0.45 ^{cd}	414.17 \pm 10.11 ^b	0.83 \pm 0.03 ⁱ	8.51 \pm 0.02 ^{bcd}
XXXXV	51.74 \pm 2.71 ^{fg}	38.16 \pm 2.28 ^{abcd}	459.03 \pm 14.54 ^{ijk}	10.29 \pm 0.43 ^{gh}	3.60 \pm 0.25 ^{bc}	448.98 \pm 7.31 ^{efg}	0.73 \pm 0.03 ^{fg}	8.52 \pm 0.03 ^{cde}
XXXXVI	52.14 \pm 2.32 ^{fg}	35.88 \pm 2.70 ^g	450.34 \pm 18.20 ^{hij}	10.57 \pm 0.35 ^h	2.86 \pm 0.35 ^{ab}	425.61 \pm 6.37 ^{bc}	0.79 \pm 0.04 ^{hi}	8.51 \pm 0.02 ^{bcd}
XXXXVII	25.31 \pm 1.92 ^a	37.66 \pm 1.83 ^{abc}	420.18 \pm 15.76 ^{efg}	10.01 \pm 0.62 ^{gh}	2.17 \pm 0.38 ^a	444.42 \pm 9.11 ^{defg}	0.64 \pm 0.02 ^{cd}	8.55 \pm 0.04 ^{de}
Mean	47.47 \pm 2.58	43.05 \pm 2.19	433.27 \pm 12.60	8.49 \pm 0.31	4.64 \pm 0.50	460.60 \pm 8.04	0.64 \pm 0.03	8.51 \pm 0.05
Chernozem	40.78 \pm 4.26^{bc}	42.71 \pm 2.35^{ef}	473.76 \pm 25.59^k	20.05 \pm 0.67^j	4.92 \pm 0.33^{ef}	311.64 \pm 8.76^g	1.01 \pm 0.04^j	8.52 \pm 0.02^{cde}

Explanations: Letters, i.e., a, b, c, etc. denote the means that form homogenous groups (HSD-Tukey post-hoc test for multivariate ANOVA) within Chernozem. When two compared means were assigned the same letter (e.g.: a, a or ab, ab), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g.: a and b, or ab and cd), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

Table. 4Degree of feather mass loss (%) after 42 days by *Trichophyton ajelloi* strains isolated from arable soils.

Soil	<i>Trichophyton ajelloi</i> strains No.	Feather mass loss (%)
Loamy soil ^B (Cambisol)	I	34.60 ± 2.05 ^{deIg}
	II	31.70 ± 4.09 ^{bodeIge}
	III	37.33 ± 4.64 ^{fg}
	IV	30.93 ± 1.25 ^{bcddef}
	V	32.90 ± 0.16 ^{cdeIge}
	VI	22.80 ± 0.54 ^a
	VII	32.03 ± 2.51 ^{bodeIge}
	VIII	26.87 ± 1.48 ^{abc}
	IX	35.33 ± 2.11 ^{deIge}
	X	29.90 ± 0.51 ^{abcdeIef}
	XI	33.40 ± 0.57 ^{cdeIge}
	XII	36.90 ± 0.62 ^{efg}
	XIII	25.23 ± 0.60 ^{ab}
	XIV	36.57 ± 1.37 ^{efg}
	XV	35.77 ± 2.68 ^{deIge}
	XVI	29.97 ± 3.29 ^{abcdeIef}
	XXI	28.90 ± 0.22 ^{abcd}
	XXII	29.47 ± 1.48 ^{abcde}
	XXVIII	24.67 ± 0.90 ^{ab}
	XXIX	32.27 ± 0.69 ^{bodeIge}
	Mean Cambisol	31.38 ± 4.58
Chernozem ^A	XVII	29.57 ± 1.16 ^{ab}
	XVIII	31.27 ± 1.00 ^{ab}
	XIX	27.73 ± 1.07 ^{ab}
	XX	32.33 ± 2.60 ^b
	XXIII	29.30 ± 1.04 ^{ab}
	XXIV	29.20 ± 0.79 ^{ab}
	XXV	26.77 ± 2.47 ^{ab}
	XXVI	28.37 ± 2.46 ^{ab}
	XXVII	38.93 ± 0.94 ^c
	XXX	28.30 ± 1.28 ^{ab}
	XXXI	29.73 ± 1.52 ^{ab}
	XXXII	27.07 ± 0.19 ^{ab}
	XXXIII	29.47 ± 0.58 ^{ab}
	XXXIV	25.83 ± 0.59 ^a
XXXV	29.73 ± 0.90 ^{ab}	
XXXVI	29.90 ± 1.24 ^{ab}	
XXXVII	29.70 ± 2.45 ^{ab}	
	Mean Chernozem	29.60 ± 3.17
Reference strain ^C	REF	38.60 ± 1.50 ^{gC}
	Mean Both soils	30.56 ± 4.09

Explanations: Letters, i.e., lowercase (a, b, c, etc.) or capital (A, B, C) denote the means that form homogenous groups (HSD–Tukey post–hoc test for multivariate ANOVA) within each of the tested soils separately. Lowercase and capital letters for reference strain refers to strains isolated from loamy soil (Cambisol) and Chernozem respectively. Capital letters for soils refers to whole *T. ajelloi* isolates populations from these soils. When two compared means were assigned the same letter (e.g.: a, or A), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g.: a and b, or A and B), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

Table 5Differences in keratinolytic activity of pigmenting and non-pigmenting strains of *Trichophyton ajelloi*.

Keratinolysis index	Loamy soil (Cambisol)		Chernozem	
	Pigmenting strains	Non-pigmenting strains	Pigmenting strains	Non-pigmenting strains
Protease [μg tyrosine cm^{-3}]	41.17 ^{ab}	53.62 ^{bd}	37.80 ^{aA}	51.50 ^{bC}
Keratinase [KU cm^{-3}]	53.06 ^{bd}	51.73 ^{aC}	40.65 ^{aA}	44.05 ^{bB}
Proteins and peptides [μg of proteins cm^{-3}]	415.72 ^{bA}	397.09 ^{aB}	413.05 ^{aA}	441.70 ^{bC}
Amino groups [μg N-NH ₂ cm^{-3}]	8.15 ^{bc}	6.32 ^{aA}	7.63 ^{aB}	8.85 ^{bD}
Thiol groups [μg -SH cm^{-3}]	5.83 ^{aB}	6.06 ^{bC}	4.67 ^{aA}	4.62 ^{aA}
Ammonium ions [μg NH ₄ ⁺ cm^{-3}]	534.33 ^{bd}	455.63 ^{aB}	483.51 ^{bC}	451.06 ^{aA}
Sulfate ions [mg SO ₄ ²⁻ cm^{-3}]	0.61 ^{bc}	0.59 ^{aB}	0.57 ^{aA}	0.67 ^{bD}
pH [-log ₁₀ [H ⁺]]	8.51 ^{bc}	8.34 ^{aA}	8.54 ^{bD}	8.49 ^{aB}

Explanations: Letters, i.e., lowercase (a, b) or capital (A, B, C, D) denote the means that form homogenous groups (HSD-Tukey post-hoc test for multivariate ANOVA) within each of the tested soils separately, and within both soil together, respectively. When two compared means were assigned the same letter (e.g.: a, or A), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g.: a and b, or A and B), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

Publikacja 3 [P.3.] - Materiały uzupełniające (S)

Table S1

Dynamics of changes in protease activity of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from arable soils during chicken feathers keratinolysis.

Strain	Days of culture					
	7	14	21	28	35	42
	Protease [$\mu\text{g tyrosine cm}^{-3}$]					
I	43.71 \pm 1.91	51.48 \pm 1.48	47.19 \pm 1.18	55.92 \pm 2.23	58.73 \pm 1.03	90.83 \pm 1.95
II	31.66 \pm 2.10	41.12 \pm 2.04	22.48 \pm 1.38	28.92 \pm 0.91	36.76 \pm 0.86	44.82 \pm 0.83
III	48.15 \pm 3.90	58.87 \pm 3.26	40.24 \pm 0.55	59.02 \pm 3.99	70.56 \pm 1.27	103.70 \pm 3.63
IV	73.52 \pm 3.43	49.41 \pm 3.54	29.22 \pm 1.34	34.54 \pm 1.54	69.67 \pm 8.57	85.21 \pm 0.91
V	57.77 \pm 3.43	67.16 \pm 3.24	28.03 \pm 0.86	29.59 \pm 2.63	69.75 \pm 3.63	105.32 \pm 1.18
VI	17.68 \pm 1.18	15.01 \pm 1.21	43.12 \pm 2.72	62.94 \pm 2.74	75.59 \pm 3.02	85.72 \pm 2.89
VII	22.85 \pm 1.13	88.39 \pm 2.30	44.75 \pm 2.15	40.53 \pm 1.09	52.51 \pm 1.74	85.50 \pm 4.60
VIII	29.59 \pm 0.64	33.80 \pm 1.76	23.59 \pm 0.73	26.33 \pm 1.92	33.21 \pm 2.98	49.19 \pm 1.89
IX	22.19 \pm 0.91	29.66 \pm 2.15	32.54 \pm 1.95	35.35 \pm 1.68	48.37 \pm 3.18	67.45 \pm 3.97
X	38.53 \pm 1.18	87.79 \pm 1.54	44.82 \pm 1.84	40.83 \pm 1.45	53.70 \pm 3.14	72.26 \pm 2.81
XI	29.66 \pm 2.28	36.17 \pm 3.62	32.99 \pm 0.75	34.61 \pm 1.10	40.16 \pm 1.13	52.29 \pm 2.95
XII	44.82 \pm 1.09	47.56 \pm 2.08	37.57 \pm 1.64	40.01 \pm 1.27	49.41 \pm 2.16	69.60 \pm 5.38
XIII	28.48 \pm 2.73	42.23 \pm 3.40	23.59 \pm 0.28	25.59 \pm 0.52	27.07 \pm 1.01	39.72 \pm 4.93
XIV	49.04 \pm 2.54	38.09 \pm 3.02	32.84 \pm 0.79	33.14 \pm 3.26	42.16 \pm 1.57	69.01 \pm 2.68
XV	34.39 \pm 1.09	41.27 \pm 2.44	36.54 \pm 1.21	40.31 \pm 0.73	47.48 \pm 2.38	65.61 \pm 1.83
XVI	12.80 \pm 0.93	32.62 \pm 2.14	44.16 \pm 2.37	47.26 \pm 3.50	53.03 \pm 1.55	103.70 \pm 3.22
XXI	115.16 \pm 1.73	60.95 \pm 2.51	34.54 \pm 1.90	42.90 \pm 1.27	47.26 \pm 1.78	74.26 \pm 2.36
XXII	21.30 \pm 0.83	20.86 \pm 1.19	22.78 \pm 2.27	23.22 \pm 2.16	19.67 \pm 1.62	27.88 \pm 1.21
XXXVIII	8.06 \pm 0.86	27.29 \pm 0.36	30.69 \pm 2.64	44.60 \pm 3.57	50.89 \pm 3.05	71.97 \pm 4.17
XXIX	30.55 \pm 3.07	35.58 \pm 2.55	30.10 \pm 3.47	34.91 \pm 3.25	39.57 \pm 5.36	61.17 \pm 5.56
Mean Cambisol	37.99 \pm 1.85	45.27 \pm 2.29	34.09 \pm 1.60	39.03 \pm 2.04	49.28 \pm 2.55	71.26 \pm 2.95
XVII	52.44 \pm 1.81	92.82 \pm 3.72	34.61 \pm 3.86	30.62 \pm 1.58	34.98 \pm 2.41	68.05 \pm 1.64
XVIII	67.45 \pm 3.92	45.56 \pm 2.34	29.88 \pm 0.42	30.62 \pm 1.55	31.73 \pm 4.49	59.84 \pm 1.00
XIX	19.01 \pm 1.99	48.15 \pm 2.09	27.29 \pm 0.48	29.73 \pm 0.48	37.20 \pm 3.07	63.31 \pm 3.41
XX	58.06 \pm 1.64	76.48 \pm 1.09	30.40 \pm 1.13	31.14 \pm 1.68	46.60 \pm 1.92	56.73 \pm 3.65
XXIII	26.33 \pm 0.73	18.27 \pm 2.43	24.19 \pm 1.27	30.10 \pm 2.19	29.66 \pm 1.34	36.32 \pm 2.60
XXIV	42.75 \pm 2.64	61.17 \pm 1.00	45.86 \pm 2.59	41.20 \pm 1.03	39.05 \pm 1.96	50.37 \pm 1.91
XXV	44.75 \pm 2.84	50.44 \pm 2.54	44.38 \pm 2.02	40.09 \pm 3.40	36.54 \pm 2.63	39.87 \pm 1.63
XXVI	66.27 \pm 4.53	33.43 \pm 2.47	29.36 \pm 1.63	27.66 \pm 1.18	29.14 \pm 3.77	36.61 \pm 3.74
XXVII	127.36 \pm 3.92	38.68 \pm 1.56	36.54 \pm 1.31	38.90 \pm 1.62	37.28 \pm 2.92	48.82 \pm 3.64
XXX	82.40 \pm 1.56	53.33 \pm 2.95	37.65 \pm 3.55	37.94 \pm 4.26	40.61 \pm 2.63	61.54 \pm 5.16
XXXI	74.04 \pm 5.06	97.26 \pm 3.95	70.93 \pm 3.37	68.86 \pm 1.92	86.98 \pm 5.23	137.65 \pm 4.56
XXXII	101.85 \pm 7.89	34.69 \pm 5.21	24.85 \pm 1.10	21.38 \pm 1.76	23.00 \pm 2.82	36.91 \pm 2.91
XXXIII	63.39 \pm 3.52	49.56 \pm 3.27	36.61 \pm 3.36	42.09 \pm 2.00	55.25 \pm 3.03	74.56 \pm 3.21
XXXIV	84.24 \pm 3.62	53.70 \pm 5.31	34.69 \pm 2.63	32.69 \pm 0.82	38.68 \pm 1.81	55.77 \pm 3.04
XXXV	71.97 \pm 1.64	43.71 \pm 2.92	32.84 \pm 0.31	35.95 \pm 3.17	49.85 \pm 3.84	76.11 \pm 4.40
XXXVI	92.31 \pm 3.82	39.50 \pm 0.18	29.22 \pm 3.01	30.18 \pm 2.40	48.30 \pm 3.77	73.37 \pm 0.73
XXXVII	25.15 \pm 3.19	20.04 \pm 0.93	19.67 \pm 1.11	22.63 \pm 0.79	28.40 \pm 2.88	35.95 \pm 2.61
Mean Chernozem	64.69 \pm 3.20	50.40 \pm 2.59	34.65 \pm 1.95	34.81 \pm 1.87	40.78 \pm 2.97	59.51 \pm 2.93
Reference	26.04 \pm 2.74	42.97 \pm 3.45	35.87 \pm 3.37	37.28 \pm 2.81	44.38 \pm 6.09	58.14 \pm 7.07

Table S2

Dynamics of changes in keratinase activity of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from arable soils during chicken feathers keratinolysis.

Strain	Days of culture					
	7	14	21	28	35	42
	Keratinase [KU cm⁻³]					
I	32.77 ± 0.77	57.97 ± 2.18	58.40 ± 1.63	56.17 ± 1.51	70.80 ± 1.75	85.90 ± 2.73
II	36.03 ± 1.62	59.90 ± 1.39	55.90 ± 2.07	53.67 ± 2.50	70.90 ± 1.73	57.20 ± 2.50
III	54.77 ± 1.68	79.57 ± 1.75	81.03 ± 1.54	80.73 ± 2.78	93.70 ± 1.69	101.83 ± 1.28
IV	33.53 ± 1.97	56.40 ± 3.55	46.93 ± 2.69	50.43 ± 1.94	60.20 ± 1.77	69.70 ± 0.57
V	28.20 ± 0.93	58.87 ± 1.89	58.53 ± 1.52	53.80 ± 2.01	63.07 ± 2.01	76.07 ± 1.60
VI	27.07 ± 3.64	34.97 ± 2.10	41.87 ± 3.31	49.03 ± 1.93	78.77 ± 2.64	66.77 ± 2.15
VII	32.10 ± 2.43	56.57 ± 2.18	42.97 ± 1.88	57.20 ± 2.65	56.43 ± 2.44	77.27 ± 0.74
VIII	31.47 ± 1.80	48.20 ± 1.84	45.63 ± 1.35	44.67 ± 1.69	48.13 ± 1.47	59.80 ± 0.96
IX	31.43 ± 2.50	54.03 ± 1.86	45.70 ± 2.08	52.23 ± 1.75	66.27 ± 1.20	73.80 ± 1.98
X	32.77 ± 2.90	44.97 ± 2.61	43.30 ± 1.50	44.23 ± 1.82	58.03 ± 2.11	62.73 ± 2.40
XI	39.53 ± 1.51	43.83 ± 3.45	49.90 ± 1.69	46.80 ± 0.57	59.20 ± 3.51	68.10 ± 0.50
XII	40.23 ± 2.05	38.53 ± 1.55	48.40 ± 2.27	44.30 ± 2.60	56.97 ± 1.62	72.70 ± 0.95
XIII	32.87 ± 2.50	29.03 ± 1.14	44.50 ± 2.33	41.07 ± 2.17	38.40 ± 0.71	50.13 ± 3.38
XIV	39.67 ± 2.48	42.87 ± 1.02	49.13 ± 2.52	50.27 ± 1.62	56.80 ± 1.39	78.80 ± 1.07
XV	37.83 ± 1.81	41.47 ± 0.76	48.67 ± 2.81	58.97 ± 2.16	61.77 ± 1.64	70.17 ± 1.72
XVI	39.10 ± 2.45	46.97 ± 3.10	58.13 ± 2.66	56.23 ± 2.98	65.03 ± 2.93	92.77 ± 2.66
XXI	41.23 ± 1.89	46.30 ± 4.36	37.40 ± 2.18	51.03 ± 4.11	61.00 ± 1.93	56.17 ± 1.43
XXII	30.27 ± 2.88	40.40 ± 2.02	33.40 ± 4.22	45.50 ± 1.35	60.40 ± 2.45	53.73 ± 2.60
XXVIII	34.00 ± 4.03	38.80 ± 3.40	43.30 ± 1.50	48.97 ± 2.82	51.27 ± 2.45	52.70 ± 1.13
XXIX	37.37 ± 1.52	42.40 ± 2.58	41.97 ± 4.26	52.10 ± 3.83	57.87 ± 2.27	55.10 ± 2.63
Mean Cambisol	35.61 ± 2.17	48.10 ± 2.24	48.75 ± 2.30	51.87 ± 2.24	61.75 ± 1.98	69.07 ± 1.75
XVII	42.90 ± 2.98	46.07 ± 1.93	44.27 ± 3.52	41.03 ± 1.75	45.70 ± 1.14	59.47 ± 1.90
XVIII	37.27 ± 2.55	31.27 ± 3.51	34.07 ± 1.07	30.73 ± 1.68	36.17 ± 2.31	50.00 ± 1.79
XIX	36.70 ± 1.77	36.17 ± 1.82	39.17 ± 0.87	37.20 ± 2.35	41.63 ± 2.32	57.67 ± 0.62
XX	41.63 ± 1.96	45.30 ± 2.33	51.87 ± 3.82	40.40 ± 4.46	58.13 ± 2.63	70.33 ± 2.47
XXIII	32.57 ± 2.90	30.17 ± 2.28	27.00 ± 1.90	40.07 ± 0.61	55.40 ± 3.53	50.53 ± 1.27
XXIV	30.03 ± 3.83	38.73 ± 4.06	32.43 ± 2.48	50.33 ± 2.25	54.40 ± 3.05	55.60 ± 2.41
XXV	30.23 ± 0.58	36.37 ± 3.11	32.77 ± 1.89	43.93 ± 2.93	55.27 ± 3.72	51.27 ± 2.78
XXVI	30.83 ± 0.61	34.67 ± 2.54	34.60 ± 1.53	38.00 ± 3.89	48.27 ± 4.49	49.63 ± 2.66
XXVII	40.37 ± 1.18	42.80 ± 1.75	37.40 ± 1.85	53.20 ± 1.99	56.37 ± 2.67	59.67 ± 1.81
XXX	32.53 ± 0.66	39.70 ± 1.23	40.17 ± 1.69	50.63 ± 3.32	47.97 ± 1.82	47.37 ± 1.19
XXXI	28.27 ± 1.73	39.00 ± 1.10	38.70 ± 1.96	47.10 ± 0.79	50.43 ± 3.69	47.33 ± 2.50
XXXII	30.77 ± 1.46	33.83 ± 1.46	54.97 ± 2.50	39.57 ± 3.35	43.70 ± 1.20	38.33 ± 2.92
XXXIII	43.60 ± 1.93	58.63 ± 1.97	59.50 ± 1.06	72.17 ± 1.87	81.53 ± 1.89	81.03 ± 2.81
XXXIV	34.27 ± 1.52	37.40 ± 2.16	34.43 ± 0.37	45.10 ± 2.52	42.90 ± 1.99	52.13 ± 2.25
XXXV	27.03 ± 3.62	32.63 ± 3.38	33.17 ± 2.75	46.53 ± 1.70	44.20 ± 1.23	45.37 ± 0.98
XXXVI	28.83 ± 2.95	33.90 ± 3.79	33.10 ± 1.75	41.37 ± 1.24	37.33 ± 2.37	40.73 ± 4.11
XXXVII	27.63 ± 2.84	33.20 ± 1.35	27.80 ± 2.68	44.57 ± 1.72	44.80 ± 1.08	47.97 ± 1.33
Mean Chernozem	33.85 ± 2.06	38.23 ± 2.34	38.55 ± 1.98	44.82 ± 2.26	49.66 ± 2.42	53.20 ± 2.11
Reference	9.27 ± 0.71	38.93 ± 1.47	41.37 ± 4.29	43.77 ± 1.56	58.77 ± 1.78	64.13 ± 4.29

Table S3

Dynamics of changes in free proteins and peptides concentration in stationary cultures of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from arable soils during chicken feathers keratinolysis.

Strain No.	Days of culture					
	7	14	21	28	35	42
	Proteins and peptides [$\mu\text{g proteins cm}^{-3}$]					
I	255.65 ± 13.29	442.19 ± 5.76	455.09 ± 4.72	479.73 ± 4.25	509.76 ± 5.22	532.67 ± 12.99
II	272.20 ± 2.37	412.54 ± 4.77	418.70 ± 6.24	431.02 ± 3.66	456.43 ± 9.10	468.56 ± 9.30
III	297.42 ± 5.44	473.18 ± 7.52	473.37 ± 6.33	509.37 ± 7.35	545.95 ± 19.68	561.54 ± 14.38
IV	273.74 ± 5.36	379.24 ± 0.27	380.97 ± 6.40	412.16 ± 7.33	442.57 ± 8.25	466.44 ± 6.61
V	262.58 ± 5.47	409.46 ± 19.44	410.42 ± 7.67	434.68 ± 14.44	459.90 ± 13.80	479.73 ± 10.61
VI	184.42 ± 2.84	233.32 ± 4.03	347.28 ± 19.79	391.75 ± 11.59	421.20 ± 10.01	440.46 ± 11.06
VII	172.29 ± 19.58	424.28 ± 17.46	398.30 ± 5.19	403.49 ± 6.06	428.52 ± 4.64	448.54 ± 7.37
VIII	203.48 ± 26.97	374.23 ± 13.43	362.88 ± 6.42	389.44 ± 7.78	408.11 ± 6.82	431.21 ± 4.46
IX	211.56 ± 18.78	394.45 ± 15.94	420.82 ± 11.18	444.11 ± 16.94	481.07 ± 21.64	488.77 ± 9.94
X	266.81 ± 4.55	374.62 ± 11.79	341.12 ± 4.07	348.24 ± 6.85	379.05 ± 3.14	442.77 ± 3.93
XI	319.75 ± 18.20	410.62 ± 9.74	380.39 ± 6.37	393.87 ± 7.26	423.71 ± 9.68	502.63 ± 6.61
XII	341.12 ± 20.62	421.78 ± 14.01	387.32 ± 9.27	394.06 ± 14.68	430.25 ± 15.16	514.76 ± 18.86
XIII	277.79 ± 9.00	413.50 ± 9.85	332.84 ± 8.31	337.66 ± 4.65	358.64 ± 6.13	417.93 ± 19.19
XIV	308.40 ± 7.41	394.06 ± 1.91	365.19 ± 2.37	378.85 ± 6.48	413.12 ± 10.90	485.12 ± 5.25
XV	314.17 ± 7.07	406.38 ± 5.82	373.27 ± 3.48	399.64 ± 10.85	431.02 ± 8.76	508.03 ± 10.39
XVI	281.25 ± 11.78	452.97 ± 7.49	445.08 ± 15.66	452.39 ± 25.75	488.97 ± 12.16	585.41 ± 21.16
XXI	429.67 ± 9.18	432.37 ± 19.52	440.46 ± 6.61	434.49 ± 14.15	456.63 ± 14.32	505.33 ± 9.57
XXII	304.35 ± 7.04	388.86 ± 4.23	429.48 ± 4.12	433.14 ± 7.14	448.73 ± 14.99	500.90 ± 11.06
XXVIII	195.59 ± 6.87	353.06 ± 30.38	415.04 ± 29.13	445.08 ± 14.99	478.96 ± 15.90	509.37 ± 16.82
XXIX	387.90 ± 10.07	482.42 ± 5.00	484.35 ± 3.84	505.91 ± 13.70	538.63 ± 18.20	585.80 ± 23.88
Mean Cambisol	278.01 ± 10.59	403.68 ± 10.42	403.12 ± 8.36	420.95 ± 10.29	450.06 ± 11.43	493.80 ± 11.67
XVII	304.35 ± 11.15	416.20 ± 12.50	350.94 ± 8.56	357.48 ± 5.10	390.40 ± 6.85	452.20 ± 5.44
XVIII	306.28 ± 17.04	346.32 ± 19.07	296.85 ± 10.21	302.81 ± 10.78	327.07 ± 3.54	383.86 ± 8.44
XIX	248.33 ± 21.42	407.15 ± 7.85	331.11 ± 2.68	330.92 ± 5.72	364.61 ± 10.61	435.07 ± 16.20
XX	347.67 ± 17.47	399.26 ± 6.15	354.79 ± 10.27	357.10 ± 7.40	384.63 ± 18.38	454.12 ± 7.08
XXIII	342.85 ± 7.25	360.56 ± 15.13	419.47 ± 14.16	434.49 ± 15.90	463.17 ± 13.48	490.89 ± 15.84
XXIV	309.76 ± 10.12	420.05 ± 1.91	476.84 ± 7.25	476.65 ± 2.76	498.78 ± 3.48	544.41 ± 8.45
XXV	267.01 ± 3.03	373.85 ± 12.66	417.35 ± 6.37	436.03 ± 4.03	438.53 ± 2.60	480.30 ± 13.10
XXVI	378.47 ± 21.57	394.64 ± 3.60	410.04 ± 6.98	406.96 ± 14.62	429.67 ± 14.90	455.47 ± 19.29
XXVII	513.99 ± 2.50	477.22 ± 0.98	535.94 ± 4.03	559.42 ± 19.08	590.61 ± 12.56	601.39 ± 13.44
XXX	366.34 ± 18.02	403.30 ± 19.16	414.27 ± 25.31	433.72 ± 22.70	463.17 ± 14.71	495.70 ± 15.64
XXXI	373.85 ± 30.58	460.28 ± 12.50	446.23 ± 12.59	470.68 ± 14.71	515.53 ± 10.40	548.45 ± 18.36
XXXII	413.31 ± 14.97	416.78 ± 1.52	431.02 ± 3.21	431.02 ± 11.64	464.90 ± 14.34	489.35 ± 10.61
XXXIII	464.13 ± 11.69	553.26 ± 4.03	554.23 ± 11.63	582.72 ± 36.73	611.98 ± 8.44	643.36 ± 28.19
XXXIV	403.88 ± 32.31	435.07 ± 15.60	442.19 ± 5.76	448.54 ± 10.82	475.68 ± 3.31	508.99 ± 14.02
XXXV	389.44 ± 15.70	428.52 ± 10.50	432.56 ± 18.41	462.98 ± 12.93	498.21 ± 13.22	542.48 ± 16.48
XXXVI	430.44 ± 25.73	443.73 ± 11.33	419.47 ± 19.38	441.42 ± 16.62	472.22 ± 13.22	494.74 ± 22.91
XXXVII	334.77 ± 25.52	390.60 ± 7.25	410.23 ± 6.01	433.91 ± 19.06	462.59 ± 16.74	488.97 ± 19.96
Mean Chernozem	364.40 ± 18.83	419.22 ± 9.51	420.21 ± 10.16	433.34 ± 13.56	461.87 ± 10.63	500.57 ± 14.91
Reference	386.36 ± 38.20	443.15 ± 14.21	459.90 ± 32.56	484.15 ± 25.58	515.15 ± 29.02	553.84 ± 13.96

Table S4

Dynamics of changes in amino groups concentration in stationary cultures of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from arable soils during chicken feathers keratinolysis.

Strain	Days of culture					
	7	14	21	28	35	42
	Amino groups [$\mu\text{g N-NH}_2 \text{ cm}^{-3}$]					
I	5.55 ± 0.29	9.85 ± 0.17	10.27 ± 0.43	7.23 ± 0.29	6.51 ± 0.57	8.16 ± 0.21
II	4.02 ± 0.16	9.50 ± 0.25	9.21 ± 0.23	6.20 ± 0.16	5.95 ± 0.33	7.28 ± 0.47
III	5.78 ± 0.43	10.62 ± 0.23	10.34 ± 0.30	6.16 ± 0.33	6.61 ± 0.19	6.65 ± 0.13
IV	5.28 ± 0.53	9.00 ± 0.47	8.68 ± 0.29	5.04 ± 0.36	6.47 ± 0.15	6.55 ± 0.38
V	4.47 ± 0.21	10.02 ± 0.19	9.27 ± 0.14	6.94 ± 0.15	6.84 ± 0.10	7.46 ± 0.12
VI	1.05 ± 0.05	1.94 ± 0.10	5.96 ± 0.37	6.26 ± 0.11	5.36 ± 0.15	5.51 ± 0.20
VII	1.55 ± 0.12	8.51 ± 0.21	8.65 ± 0.04	5.19 ± 0.24	6.11 ± 0.18	7.01 ± 0.39
VIII	3.59 ± 0.27	8.89 ± 0.33	8.47 ± 0.15	6.20 ± 0.24	5.31 ± 0.22	6.67 ± 0.10
IX	4.96 ± 0.36	9.03 ± 0.18	9.55 ± 0.09	6.51 ± 0.42	5.75 ± 0.32	6.80 ± 0.13
X	4.23 ± 0.40	6.56 ± 0.09	7.21 ± 0.28	5.41 ± 0.51	6.22 ± 0.15	7.46 ± 0.17
XI	5.96 ± 0.24	9.24 ± 0.27	10.17 ± 0.36	7.62 ± 0.14	8.77 ± 0.19	10.52 ± 0.23
XII	7.02 ± 0.16	10.89 ± 0.15	11.98 ± 0.31	12.57 ± 0.34	14.46 ± 0.33	17.35 ± 0.15
XIII	3.16 ± 0.14	4.90 ± 0.26	5.39 ± 0.24	4.04 ± 0.16	4.65 ± 0.29	5.58 ± 0.23
XIV	5.37 ± 0.31	8.32 ± 0.24	9.15 ± 0.28	7.32 ± 0.17	8.42 ± 0.32	10.52 ± 0.24
XV	6.19 ± 0.28	9.59 ± 0.43	10.55 ± 0.47	7.91 ± 0.35	9.10 ± 0.40	10.92 ± 0.49
XVI	2.13 ± 0.15	3.30 ± 0.24	3.63 ± 0.18	2.72 ± 0.15	3.13 ± 0.29	3.76 ± 0.22
XXI	7.07 ± 0.29	10.05 ± 0.35	11.26 ± 0.10	3.94 ± 0.15	8.91 ± 0.46	9.88 ± 0.58
XXII	6.32 ± 0.11	8.53 ± 0.19	9.81 ± 0.33	3.58 ± 0.38	9.14 ± 0.51	8.65 ± 0.46
XXVIII	1.62 ± 0.18	8.25 ± 0.22	9.93 ± 0.15	7.14 ± 0.40	9.80 ± 0.35	10.48 ± 0.26
XXIX	8.78 ± 0.31	13.63 ± 0.29	12.69 ± 0.41	8.47 ± 0.52	9.60 ± 0.50	12.32 ± 0.34
Mean Cambisol	4.71 ± 0.25	8.53 ± 0.24	9.11 ± 0.26	6.32 ± 0.28	7.36 ± 0.30	8.48 ± 0.28
XVII	3.73 ± 0.05	5.78 ± 0.08	6.35 ± 0.09	4.76 ± 0.07	5.48 ± 0.08	6.58 ± 0.10
XVIII	4.83 ± 0.11	7.49 ± 0.17	8.24 ± 0.19	6.18 ± 0.14	7.11 ± 0.16	8.53 ± 0.19
XIX	2.56 ± 0.13	3.97 ± 0.21	4.36 ± 0.23	3.27 ± 0.17	3.76 ± 0.20	4.52 ± 0.24
XX	4.65 ± 0.20	7.20 ± 0.30	7.92 ± 0.33	5.94 ± 0.25	6.83 ± 0.29	8.20 ± 0.35
XXIII	7.87 ± 0.33	7.74 ± 0.21	9.70 ± 0.29	3.16 ± 0.32	7.96 ± 0.41	10.05 ± 0.37
XXIV	4.65 ± 0.18	9.01 ± 0.60	9.39 ± 0.76	3.39 ± 0.42	8.62 ± 0.24	9.81 ± 0.42
XXV	4.24 ± 0.04	7.68 ± 0.28	9.20 ± 0.17	2.67 ± 0.17	7.71 ± 0.33	8.61 ± 0.10
XXVI	6.14 ± 0.15	9.12 ± 0.17	10.37 ± 0.17	3.17 ± 0.13	9.12 ± 0.44	8.06 ± 0.18
XXVII	11.94 ± 0.22	8.04 ± 0.25	12.45 ± 0.24	2.99 ± 0.18	11.10 ± 0.08	10.94 ± 0.29
XXX	7.94 ± 0.57	12.32 ± 0.27	10.79 ± 0.22	7.59 ± 0.20	9.56 ± 0.47	10.91 ± 0.20
XXXI	4.99 ± 0.85	12.84 ± 0.01	12.62 ± 0.26	7.69 ± 0.33	10.12 ± 0.41	11.06 ± 0.39
XXXII	7.67 ± 0.81	12.25 ± 0.26	12.27 ± 0.34	8.03 ± 0.36	10.00 ± 0.41	9.43 ± 0.33
XXXIII	9.22 ± 0.38	13.43 ± 0.26	13.38 ± 0.27	8.23 ± 0.30	11.80 ± 0.28	12.99 ± 0.44
XXXIV	7.82 ± 0.20	13.34 ± 0.23	11.33 ± 0.45	7.36 ± 0.29	9.21 ± 0.22	11.51 ± 0.63
XXXV	7.95 ± 0.24	11.46 ± 0.32	11.19 ± 0.74	7.32 ± 0.10	10.27 ± 0.15	13.55 ± 1.03
XXXVI	9.12 ± 0.47	12.68 ± 0.64	11.11 ± 0.31	7.75 ± 0.10	9.98 ± 0.39	12.77 ± 0.20
XXXVII	8.00 ± 0.70	11.26 ± 0.84	11.31 ± 0.48	7.48 ± 0.26	10.14 ± 0.65	11.88 ± 0.78
Mean Chernozem	6.67 ± 0.33	9.74 ± 0.30	10.12 ± 0.33	5.70 ± 0.22	8.75 ± 0.31	9.96 ± 0.37
Reference	13.46 ± 0.80	22.19 ± 0.37	22.57 ± 0.75	20.86 ± 1.25	17.87 ± 0.11	23.32 ± 0.77

Table S5

Dynamics of changes in thiol groups concentration in stationary cultures of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from arable soils during chicken feathers keratinolysis.

Strain	Days of culture					
	7	14	21	28	35	42
	Thiol groups [$\mu\text{g -SH cm}^{-3}$]					
I	1.76 ± 0.23	2.40 ± 0.23	2.35 ± 0.72	4.53 ± 0.79	5.65 ± 1.13	21.59 ± 1.33
II	2.40 ± 0.23	3.04 ± 0.23	3.47 ± 0.59	4.90 ± 0.64	5.70 ± 0.46	22.87 ± 1.51
III	2.35 ± 0.15	2.99 ± 0.15	6.72 ± 0.47	4.69 ± 0.15	3.95 ± 0.53	20.79 ± 0.69
IV	2.35 ± 0.15	2.99 ± 0.15	5.49 ± 0.27	4.90 ± 0.53	5.70 ± 0.67	21.81 ± 0.33
V	1.97 ± 0.40	2.61 ± 0.40	4.27 ± 0.33	4.80 ± 0.47	5.76 ± 0.26	24.68 ± 0.77
VI	2.19 ± 0.15	2.83 ± 0.15	4.21 ± 0.54	1.76 ± 0.39	2.72 ± 0.39	19.30 ± 0.75
VII	1.87 ± 0.15	2.51 ± 0.15	7.36 ± 0.73	3.57 ± 0.08	5.54 ± 0.27	21.11 ± 0.35
VIII	1.81 ± 0.30	2.45 ± 0.30	6.29 ± 0.96	3.36 ± 0.13	4.74 ± 0.20	20.10 ± 0.15
IX	3.04 ± 0.60	3.68 ± 0.60	3.15 ± 0.54	4.05 ± 0.77	5.81 ± 1.14	20.47 ± 1.20
X	5.60 ± 0.69	4.53 ± 0.74	3.52 ± 0.13	4.58 ± 0.15	5.92 ± 0.68	8.10 ± 1.06
XI	5.54 ± 0.42	8.16 ± 0.94	3.52 ± 0.35	4.96 ± 0.39	6.61 ± 0.49	6.50 ± 0.49
XII	5.28 ± 0.13	7.14 ± 0.87	3.73 ± 0.40	4.37 ± 0.33	6.13 ± 0.42	8.00 ± 0.73
XIII	5.44 ± 0.35	4.69 ± 0.93	2.93 ± 0.27	3.36 ± 0.01	4.37 ± 0.15	5.38 ± 0.33
XIV	4.80 ± 0.23	5.33 ± 0.33	4.53 ± 0.87	4.69 ± 0.53	4.74 ± 0.96	5.60 ± 0.57
XV	6.66 ± 1.06	6.02 ± 0.27	3.79 ± 0.79	5.01 ± 0.42	5.49 ± 0.49	6.88 ± 0.57
XVI	4.11 ± 0.53	2.93 ± 0.49	3.68 ± 0.73	4.48 ± 0.57	5.12 ± 0.35	7.20 ± 0.73
XXI	2.51 ± 0.30	6.18 ± 0.40	5.70 ± 0.62	4.96 ± 0.23	5.60 ± 0.39	6.77 ± 0.53
XXII	1.92 ± 0.35	5.12 ± 0.69	9.54 ± 0.46	4.53 ± 0.40	5.33 ± 0.46	7.57 ± 0.33
XXVIII	0.48 ± 0.13	5.28 ± 0.82	6.24 ± 0.47	6.98 ± 0.77	9.81 ± 0.27	8.16 ± 0.47
XXIX	1.28 ± 0.45	5.54 ± 0.83	4.05 ± 0.33	4.74 ± 1.09	6.13 ± 0.83	3.36 ± 0.45
Mean Cambisol	3.17 ± 0.35	4.32 ± 0.48	4.73 ± 0.53	4.46 ± 0.44	5.54 ± 0.53	13.31 ± 0.67
XVII	5.92 ± 0.94	6.08 ± 0.91	3.36 ± 0.47	4.48 ± 0.47	4.74 ± 0.53	6.77 ± 0.20
XVIII	9.86 ± 0.94	9.06 ± 0.53	2.99 ± 0.15	4.64 ± 0.35	4.80 ± 0.13	6.50 ± 0.20
XIX	6.98 ± 0.72	6.18 ± 0.62	3.52 ± 0.45	4.05 ± 0.27	4.11 ± 0.20	5.81 ± 0.30
XX	4.90 ± 0.64	3.57 ± 0.46	3.79 ± 0.53	5.06 ± 0.46	5.70 ± 0.54	6.72 ± 0.69
XXIII	3.09 ± 0.33	3.79 ± 0.72	5.01 ± 0.46	3.95 ± 0.59	4.58 ± 0.54	5.97 ± 0.93
XXIV	1.23 ± 0.27	3.95 ± 0.27	4.32 ± 1.04	4.16 ± 0.13	5.76 ± 0.73	6.93 ± 0.67
XXV	2.40 ± 0.57	9.49 ± 0.74	5.60 ± 0.35	5.86 ± 0.49	6.93 ± 0.79	8.58 ± 0.59
XXVI	3.20 ± 0.47	3.57 ± 1.00	5.49 ± 0.74	4.48 ± 0.73	6.13 ± 0.83	7.30 ± 0.59
XXVII	1.44 ± 0.23	4.32 ± 0.60	5.28 ± 0.79	6.40 ± 0.60	7.09 ± 0.67	7.68 ± 0.13
XXX	1.33 ± 0.54	8.05 ± 0.77	4.96 ± 0.60	6.08 ± 0.47	6.45 ± 0.30	3.41 ± 0.53
XXXI	1.17 ± 0.20	2.51 ± 0.20	3.79 ± 0.66	5.49 ± 0.72	6.40 ± 0.47	3.31 ± 0.49
XXXII	0.64 ± 0.13	2.56 ± 0.69	3.68 ± 0.23	4.69 ± 0.49	5.33 ± 0.87	3.25 ± 0.27
XXXIII	1.39 ± 0.27	6.02 ± 0.98	5.65 ± 1.06	7.62 ± 0.72	14.45 ± 0.74	6.50 ± 0.27
XXXIV	1.01 ± 0.08	3.57 ± 0.42	3.41 ± 0.46	4.58 ± 0.08	6.13 ± 0.79	4.27 ± 0.87
XXXV	0.48 ± 0.13	2.45 ± 0.20	3.41 ± 0.08	5.81 ± 0.59	5.70 ± 0.33	3.73 ± 0.20
XXXVI	0.91 ± 0.20	2.45 ± 0.33	3.15 ± 0.46	4.21 ± 0.46	5.01 ± 0.49	1.44 ± 0.13
XXXVII	0.53 ± 0.08	4.16 ± 0.35	1.97 ± 0.33	2.77 ± 0.72	2.99 ± 0.64	0.59 ± 0.15
Mean Chernozem	2.73 ± 0.40	4.81 ± 0.58	4.08 ± 0.52	4.96 ± 0.49	6.02 ± 0.56	5.22 ± 0.42
Reference	1.87 ± 0.46	4.11 ± 0.53	4.16 ± 0.13	3.36 ± 0.13	7.14 ± 0.08	8.90 ± 0.66

Table S6

Dynamics of changes in ammonium ions concentration in stationary cultures of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from arable soils during chicken feathers keratinolysis.

Strain	Days of culture					
	7	14	21	28	35	42
	Ammonium ions [$\mu\text{g NH}_4^+ \text{ cm}^{-3}$]					
I	330.30 ± 3.16	664.54 ± 15.66	587.36 ± 5.09	546.56 ± 15.12	518.05 ± 17.63	595.93 ± 12.45
II	292.06 ± 31.42	602.42 ± 23.34	539.61 ± 27.58	529.64 ± 14.74	519.21 ± 40.01	519.67 ± 9.92
III	365.53 ± 7.71	637.65 ± 9.38	620.27 ± 23.04	558.61 ± 7.19	598.95 ± 12.50	636.26 ± 10.33
IV	322.42 ± 5.80	553.98 ± 8.50	517.82 ± 11.58	503.22 ± 7.96	557.92 ± 8.84	597.32 ± 9.95
V	270.04 ± 4.76	590.60 ± 12.80	588.75 ± 4.96	551.20 ± 11.67	616.10 ± 7.09	582.72 ± 25.12
VI	25.50 ± 4.30	107.09 ± 13.10	317.78 ± 11.52	451.76 ± 5.91	536.13 ± 10.24	564.18 ± 18.83
VII	113.35 ± 5.42	478.18 ± 7.39	562.55 ± 5.93	539.61 ± 8.48	507.39 ± 8.27	573.91 ± 7.10
VIII	258.68 ± 8.92	524.77 ± 5.28	590.37 ± 15.61	479.57 ± 2.91	549.11 ± 7.54	492.32 ± 2.60
IX	381.29 ± 8.16	541.46 ± 15.05	615.40 ± 6.69	646.00 ± 8.57	537.29 ± 12.05	560.93 ± 5.74
X	257.98 ± 7.42	637.42 ± 7.41	646.23 ± 9.61	507.39 ± 6.56	520.83 ± 12.98	486.76 ± 5.68
XI	455.70 ± 9.11	678.22 ± 17.56	626.06 ± 4.03	613.08 ± 6.28	592.22 ± 16.55	543.55 ± 6.28
XII	525.24 ± 7.75	687.03 ± 8.92	677.99 ± 5.42	555.37 ± 9.20	593.61 ± 10.50	607.52 ± 12.51
XIII	212.78 ± 1.50	577.62 ± 8.08	577.62 ± 2.15	474.24 ± 10.52	504.84 ± 8.36	488.38 ± 1.99
XIV	460.33 ± 14.23	646.23 ± 2.29	668.71 ± 11.49	531.49 ± 8.98	578.08 ± 6.02	539.14 ± 9.37
XV	501.59 ± 5.12	676.83 ± 16.55	632.79 ± 15.25	557.92 ± 15.20	574.14 ± 9.66	553.98 ± 9.79
XVI	115.20 ± 5.09	457.32 ± 7.67	579.01 ± 8.82	527.32 ± 10.50	551.20 ± 6.25	559.31 ± 3.65
XXI	296.69 ± 15.42	538.45 ± 8.62	513.18 ± 5.98	503.45 ± 9.29	473.55 ± 15.83	446.20 ± 18.37
XXII	332.85 ± 2.68	524.77 ± 9.51	521.06 ± 15.92	490.00 ± 12.25	471.00 ± 6.65	437.39 ± 5.76
XXVIII	76.95 ± 7.56	348.38 ± 8.52	464.28 ± 4.73	460.10 ± 10.35	431.82 ± 20.78	441.79 ± 8.27
XXIX	384.31 ± 8.43	551.43 ± 7.68	539.38 ± 10.87	511.79 ± 8.57	455.93 ± 10.50	499.51 ± 13.51
Mean Cambisol	298.94 ± 8.20	551.22 ± 10.66	569.31 ± 10.31	526.92 ± 9.51	534.37 ± 12.41	536.34 ± 9.86
XVII	219.04 ± 7.11	622.82 ± 6.56	634.41 ± 2.91	523.38 ± 3.65	570.90 ± 8.25	538.68 ± 6.46
XVIII	338.41 ± 7.62	610.30 ± 8.16	601.73 ± 7.19	554.21 ± 7.89	535.43 ± 4.65	521.99 ± 9.02
XIX	174.31 ± 13.45	554.21 ± 7.89	545.63 ± 13.16	511.56 ± 12.34	524.54 ± 5.28	483.05 ± 16.75
XX	287.88 ± 5.93	601.26 ± 6.33	628.61 ± 6.32	549.81 ± 6.63	519.44 ± 7.42	488.38 ± 3.13
XXIII	358.81 ± 8.57	502.29 ± 6.07	477.26 ± 8.43	484.90 ± 6.12	440.17 ± 7.64	445.04 ± 5.93
XXIV	232.72 ± 7.56	508.08 ± 7.41	510.17 ± 2.80	480.04 ± 10.10	463.35 ± 7.71	439.47 ± 1.50
XXV	236.89 ± 2.36	514.34 ± 3.65	488.15 ± 3.93	459.18 ± 12.25	436.46 ± 7.73	413.98 ± 15.42
XXVI	312.45 ± 12.91	490.00 ± 4.41	469.84 ± 3.47	475.17 ± 6.23	433.70 ± 11.15	432.29 ± 16.23
XXVII	544.71 ± 10.30	623.52 ± 8.21	507.16 ± 7.75	521.06 ± 6.63	494.18 ± 7.62	484.21 ± 4.26
XXX	320.33 ± 5.28	509.94 ± 14.20	496.26 ± 5.80	466.13 ± 7.56	464.97 ± 8.82	457.32 ± 0.87
XXXI	180.80 ± 9.85	503.22 ± 6.28	526.16 ± 8.87	484.90 ± 15.34	497.19 ± 11.08	462.42 ± 18.84
XXXII	298.78 ± 9.87	487.45 ± 20.21	500.20 ± 11.94	483.28 ± 3.45	451.06 ± 11.07	430.90 ± 5.40
XXXIII	294.84 ± 8.81	481.43 ± 4.59	516.43 ± 11.07	501.83 ± 7.01	483.05 ± 4.96	464.04 ± 2.80
XXXIV	294.61 ± 7.10	484.67 ± 11.80	478.65 ± 17.38	416.76 ± 6.58	389.18 ± 7.10	421.16 ± 10.72
XXXV	286.96 ± 21.07	502.06 ± 8.19	494.18 ± 0.87	477.02 ± 0.57	468.45 ± 7.19	465.20 ± 5.98
XXXVI	297.85 ± 4.26	481.89 ± 10.41	449.90 ± 8.40	437.39 ± 9.01	443.65 ± 2.05	442.95 ± 4.09
XXXVII	313.84 ± 9.37	486.06 ± 7.09	467.29 ± 13.35	477.72 ± 13.94	465.20 ± 6.55	456.39 ± 4.34
Mean Chernozem	293.72 ± 8.91	527.27 ± 8.32	517.18 ± 7.86	488.49 ± 7.96	475.35 ± 7.43	461.62 ± 7.75
Reference	322.88 ± 12.04	338.41 ± 10.96	314.77 ± 4.83	287.88 ± 7.11	288.81 ± 4.59	317.09 ± 13.06

Table S7

Dynamics of changes in sulfate ions concentration in stationary cultures of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from arable soils during chicken feathers keratinolysis.

Strain	Days of culture					
	7	14	21	28	35	42
	Sulfate ions [mg SO₄²⁻ cm⁻³]					
I	0.26 ± 0.02	0.87 ± 0.02	1.07 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.55 ± 0.02
II	0.16 ± 0.04	0.77 ± 0.04	0.97 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.45 ± 0.04
III	0.32 ± 0.03	0.95 ± 0.02	1.15 ± 0.02	0.55 ± 0.03	0.66 ± 0.03	0.62 ± 0.02
IV	0.21 ± 0.01	0.82 ± 0.02	1.02 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.50 ± 0.02
V	0.35 ± 0.02	0.96 ± 0.04	1.16 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.67 ± 0.04	0.64 ± 0.03
VI	0.27 ± 0.03	0.88 ± 0.03	1.08 ± 0.01	0.49 ± 0.03	0.59 ± 0.03	0.56 ± 0.03
VII	0.27 ± 0.01	0.88 ± 0.01	1.08 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.56 ± 0.01
VIII	0.22 ± 0.02	0.83 ± 0.02	1.03 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.55 ± 0.03	0.51 ± 0.02
IX	0.27 ± 0.04	0.88 ± 0.04	1.08 ± 0.04	0.49 ± 0.04	0.59 ± 0.04	0.56 ± 0.04
X	0.30 ± 0.03	1.19 ± 0.03	0.72 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.72 ± 0.01
XI	0.54 ± 0.03	0.96 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.47 ± 0.03	0.74 ± 0.01
XII	0.59 ± 0.04	0.96 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.79 ± 0.01
XIII	0.48 ± 0.02	0.77 ± 0.04	0.56 ± 0.03	0.20 ± 0.01	0.75 ± 0.02	1.01 ± 0.06
XIV	0.34 ± 0.03	1.00 ± 0.06	0.91 ± 0.01	0.31 ± 0.10	0.60 ± 0.02	0.97 ± 0.04
XV	0.42 ± 0.02	1.01 ± 0.03	0.66 ± 0.06	0.35 ± 0.04	0.71 ± 0.02	1.01 ± 0.08
XVI	0.14 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.80 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.59 ± 0.04	1.08 ± 0.03
XXI	0.41 ± 0.03	0.54 ± 0.03	0.52 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.26 ± 0.02
XXII	0.45 ± 0.03	0.61 ± 0.02	0.59 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.28 ± 0.01
XXVIII	0.08 ± 0.01	0.47 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.52 ± 0.03	0.76 ± 0.01	0.62 ± 0.03
XXIX	0.36 ± 0.01	0.58 ± 0.04	0.65 ± 0.03	0.48 ± 0.01	0.78 ± 0.02	0.74 ± 0.04
Mean Cambisol	0.32 ± 0.03	0.83 ± 0.03	0.84 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.66 ± 0.03
XVII	0.49 ± 0.02	0.78 ± 0.04	0.64 ± 0.04	0.34 ± 0.02	0.60 ± 0.05	0.89 ± 0.03
XVIII	0.44 ± 0.04	0.95 ± 0.06	0.82 ± 0.06	0.46 ± 0.01	0.61 ± 0.03	1.15 ± 0.06
XIX	0.23 ± 0.02	0.88 ± 0.02	0.62 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.75 ± 0.02	1.22 ± 0.01
XX	0.34 ± 0.02	0.95 ± 0.04	0.82 ± 0.01	0.59 ± 0.05	0.69 ± 0.04	1.19 ± 0.03
XXIII	0.47 ± 0.03	0.56 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.26 ± 0.01
XXIV	0.28 ± 0.02	0.77 ± 0.03	0.69 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.31 ± 0.02
XXV	0.47 ± 0.01	0.74 ± 0.02	0.67 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.30 ± 0.02
XXVI	0.47 ± 0.03	0.79 ± 0.02	0.70 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.36 ± 0.01	0.32 ± 0.02
XXVII	0.54 ± 0.03	0.53 ± 0.01	0.58 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.26 ± 0.02
XXX	0.41 ± 0.01	0.68 ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.65 ± 0.01	1.08 ± 0.03	0.68 ± 0.02
XXXI	0.21 ± 0.01	0.79 ± 0.05	0.68 ± 0.05	0.56 ± 0.02	1.02 ± 0.05	0.67 ± 0.03
XXXII	0.45 ± 0.03	0.74 ± 0.01	0.84 ± 0.04	0.65 ± 0.02	1.09 ± 0.03	0.73 ± 0.02
XXXIII	0.19 ± 0.02	0.70 ± 0.04	0.87 ± 0.02	0.67 ± 0.04	1.07 ± 0.03	0.71 ± 0.04
XXXIV	0.40 ± 0.02	1.15 ± 0.05	0.92 ± 0.05	0.67 ± 0.01	1.16 ± 0.03	0.69 ± 0.01
XXXV	0.38 ± 0.01	1.06 ± 0.04	0.62 ± 0.02	0.61 ± 0.04	1.03 ± 0.03	0.70 ± 0.02
XXXVI	0.42 ± 0.03	0.85 ± 0.08	0.82 ± 0.06	0.67 ± 0.01	1.24 ± 0.02	0.74 ± 0.02
XXXVII	0.32 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.83 ± 0.03	0.53 ± 0.02	1.11 ± 0.04	0.59 ± 0.01
Mean Chernozem	0.38 ± 0.02	0.78 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.49 ± 0.02	0.77 ± 0.03	0.67 ± 0.02
Reference	0.49 ± 0.06	1.20 ± 0.03	1.08 ± 0.03	0.83 ± 0.02	1.40 ± 0.03	1.03 ± 0.04

Table S8

Dynamics of changes in pH values of stationary cultures of *Trichophyton ajelloi* strains isolated from arable soils during chicken feathers keratinolysis.

Strain	Days of culture					
	7	14	21	28	35	42
	pH [-log ₁₀ [H ⁺]]					
I	7.66 ± 0.07	8.85 ± 0.06	8.82 ± 0.05	8.59 ± 0.02	8.51 ± 0.03	8.41 ± 0.03
II	7.33 ± 0.11	8.82 ± 0.02	8.78 ± 0.06	8.56 ± 0.06	8.45 ± 0.04	8.29 ± 0.08
III	7.81 ± 0.13	8.90 ± 0.04	8.77 ± 0.01	8.57 ± 0.02	8.39 ± 0.01	8.47 ± 0.14
IV	7.69 ± 0.11	8.83 ± 0.02	8.69 ± 0.05	8.51 ± 0.05	8.38 ± 0.08	8.37 ± 0.05
V	7.67 ± 0.10	8.79 ± 0.02	8.83 ± 0.01	8.66 ± 0.01	8.58 ± 0.01	8.52 ± 0.05
VI	6.38 ± 0.04	7.10 ± 0.02	8.10 ± 0.10	8.51 ± 0.05	8.59 ± 0.03	8.50 ± 0.04
VII	6.92 ± 0.08	8.60 ± 0.07	8.75 ± 0.01	8.62 ± 0.01	8.52 ± 0.01	8.36 ± 0.02
VIII	7.61 ± 0.02	8.76 ± 0.03	8.78 ± 0.02	8.59 ± 0.01	8.44 ± 0.02	8.40 ± 0.08
IX	7.17 ± 0.03	8.81 ± 0.01	8.83 ± 0.04	8.66 ± 0.01	8.57 ± 0.05	8.44 ± 0.05
X	7.88 ± 0.14	8.74 ± 0.03	8.57 ± 0.01	8.79 ± 0.11	8.54 ± 0.04	8.37 ± 0.06
XI	8.41 ± 0.09	8.78 ± 0.01	8.65 ± 0.02	8.80 ± 0.07	8.63 ± 0.02	8.43 ± 0.03
XII	8.55 ± 0.01	8.79 ± 0.02	8.66 ± 0.13	8.71 ± 0.01	8.51 ± 0.02	8.38 ± 0.01
XIII	7.56 ± 0.15	8.64 ± 0.01	8.58 ± 0.05	8.77 ± 0.03	8.47 ± 0.05	8.44 ± 0.11
XIV	8.44 ± 0.06	8.78 ± 0.05	8.58 ± 0.05	8.82 ± 0.04	8.51 ± 0.04	8.36 ± 0.01
XV	8.43 ± 0.07	8.75 ± 0.01	8.66 ± 0.06	8.75 ± 0.11	8.49 ± 0.03	8.35 ± 0.08
XVI	7.04 ± 0.21	8.49 ± 0.06	8.51 ± 0.01	8.68 ± 0.06	8.60 ± 0.06	8.48 ± 0.11
XXI	7.93 ± 0.08	8.72 ± 0.07	8.83 ± 0.05	8.70 ± 0.05	8.54 ± 0.04	8.46 ± 0.05
XXII	8.16 ± 0.16	8.69 ± 0.05	8.81 ± 0.03	8.70 ± 0.02	8.58 ± 0.03	8.44 ± 0.04
XXVIII	6.87 ± 0.04	8.42 ± 0.03	8.75 ± 0.02	8.70 ± 0.04	8.60 ± 0.02	8.50 ± 0.04
XXIX	8.42 ± 0.05	8.81 ± 0.01	8.82 ± 0.02	8.65 ± 0.04	8.51 ± 0.04	8.41 ± 0.03
Mean Cambisol	7.70 ± 0.09	8.65 ± 0.03	8.69 ± 0.04	8.67 ± 0.04	8.52 ± 0.04	8.42 ± 0.06
XVII	7.60 ± 0.01	8.68 ± 0.04	8.58 ± 0.01	8.95 ± 0.10	8.61 ± 0.03	8.48 ± 0.02
XVIII	8.18 ± 0.05	8.72 ± 0.02	8.62 ± 0.04	8.78 ± 0.04	8.59 ± 0.02	8.48 ± 0.02
XIX	7.34 ± 0.06	8.61 ± 0.01	8.57 ± 0.03	8.68 ± 0.04	8.53 ± 0.04	8.36 ± 0.02
XX	7.93 ± 0.15	8.61 ± 0.09	8.52 ± 0.04	8.71 ± 0.11	8.50 ± 0.11	8.37 ± 0.05
XXIII	8.29 ± 0.09	8.78 ± 0.02	8.77 ± 0.04	8.67 ± 0.03	8.57 ± 0.02	8.47 ± 0.03
XXIV	7.59 ± 0.09	8.69 ± 0.05	8.80 ± 0.03	8.66 ± 0.04	8.53 ± 0.06	8.40 ± 0.05
XXV	7.66 ± 0.08	8.65 ± 0.04	8.73 ± 0.07	8.63 ± 0.04	8.51 ± 0.05	8.37 ± 0.08
XXVI	8.00 ± 0.10	8.71 ± 0.03	8.79 ± 0.01	8.66 ± 0.01	8.54 ± 0.01	8.41 ± 0.02
XXVII	8.57 ± 0.06	8.84 ± 0.01	8.87 ± 0.02	8.68 ± 0.04	8.53 ± 0.03	8.40 ± 0.04
XXX	8.21 ± 0.05	8.77 ± 0.02	8.77 ± 0.02	8.64 ± 0.01	8.51 ± 0.03	8.42 ± 0.02
XXXI	7.47 ± 0.17	8.70 ± 0.05	8.80 ± 0.02	8.65 ± 0.03	8.56 ± 0.01	8.50 ± 0.02
XXXII	8.03 ± 0.04	8.74 ± 0.03	8.78 ± 0.02	8.65 ± 0.03	8.50 ± 0.01	8.45 ± 0.01
XXXIII	8.03 ± 0.28	8.73 ± 0.15	8.77 ± 0.11	8.64 ± 0.11	8.56 ± 0.10	8.38 ± 0.13
XXXIV	8.08 ± 0.01	8.73 ± 0.01	8.75 ± 0.02	8.60 ± 0.04	8.50 ± 0.03	8.39 ± 0.03
XXXV	8.11 ± 0.06	8.72 ± 0.02	8.76 ± 0.01	8.60 ± 0.03	8.50 ± 0.02	8.44 ± 0.05
XXXVI	8.07 ± 0.11	8.73 ± 0.02	8.77 ± 0.01	8.59 ± 0.01	8.46 ± 0.01	8.41 ± 0.01
XXXVII	8.20 ± 0.08	8.70 ± 0.05	8.77 ± 0.02	8.66 ± 0.01	8.53 ± 0.01	8.44 ± 0.04
Mean Chernozem	7.96 ± 0.09	8.71 ± 0.04	8.73 ± 0.03	8.67 ± 0.04	8.53 ± 0.04	8.42 ± 0.04
Reference	8.15 ± 0.02	8.70 ± 0.02	8.60 ± 0.02	8.62 ± 0.02	8.55 ± 0.03	8.49 ± 0.01

4. Publikacja 4 [P.4.]



Article

Optimization of Conditions for Feather Waste Biodegradation by Geophilic *Trichophyton ajelloi* Fungal Strains towards Further Agricultural Use

Michał Możejko and Justyna Bohacz





Article

Optimization of Conditions for Feather Waste Biodegradation by Geophilic *Trichophyton ajelloi* Fungal Strains towards Further Agricultural Use

Michał Możejko and Justyna Bohacz *

Department of Environmental Microbiology, Faculty of Agrobiotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Leszczyńskiego 7 Street, 20-069 Lublin, Poland

* Correspondence: justyna.bohacz@up.lublin.pl; Tel.: +48-815248105; Fax: +48-815248106

Abstract: The aim of the study was to optimize culture conditions and medium composition to accelerate the biodegradation of chicken feather waste by keratinolytic soil strains of *Trichophyton ajelloi*, which are poorly known in this respect, as well as to propose hitherto unconsidered culture conditions for these fungi in order to obtain a biopreparation with a high fertilization value. Different pH of the medium, incubation temperatures, amounts of chicken feathers, additional carbon sources, and culture methods were tested. The process of optimizing keratin biodegradation was evaluated in terms of measuring the activity of keratinase, protease, disulfide reductase, concentration of released soluble proteins and peptides, total pool of amino acids, ammonium and sulfate ions, changes in medium pH, and feather weight loss. It was found that the studied fungal strains were capable of decomposing and mineralizing keratin from feather waste. Regarding the fertilizer value of the obtained hydrolysates, it was shown that the release of sulfate and ammonium ions was highest in a stationary culture containing 2% feathers with an initial pH of 4.5 and a temperature of 28 °C. Days 14–21 of the culture were indicated as the optimal culture time for these fungi to obtain biopreparations of high fertilizing value.

Keywords: fungal keratinolysis; optimization; *Trichophyton ajelloi*; mineral forms of N and S; enzyme activity; chicken feather; keratin



Citation: Możejko, M.; Bohacz, J. Optimization of Conditions for Feather Waste Biodegradation by Geophilic *Trichophyton ajelloi* Fungal Strains towards Further Agricultural Use. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 10858. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710858>

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 29 July 2022

Accepted: 27 August 2022

Published: 31 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Progressive population growth contributes to increased food demand of both plant and animal origin, but also to the generation of by-products. Many of these include valuable products with significant potential for reuse. The unmanaged masses of these wastes cause environmental pollution through the release of toxic compounds and development of pathogenic microorganisms. Byproducts from poultry production with high recycling potential include keratin waste, i.e., horns, hooves, hair, feathers, etc. [1]. According to statistical data [2,3] the consumption of poultry meat has been growing each year and is estimated to have increased by 6% globally in the last five years, and by 32% in Poland. The resulting keratin waste materials, including feathers, can be reused due to their high protein (90%), nitrogen (12–18%), and organic sulfur (2–5%) content. The current legal regulations in the field of waste management [4,5] oblige local governments and entrepreneurs to act to reduce waste generation or transfer waste materials to recycling institutions [6].

Based on the aforementioned Regulation of the European Parliament and the European Council (EC), feather wastes are classified as category 3 waste materials. These are wastes which pose low risk to human and animal health that can be reused for various purposes. Environmentally friendly technologies dominate among the proposals regarding the possibility of managing this waste, i.e., composting with lignocellulosic waste [6–11], microbial processing to obtain bioproducts with high fertilizer and feed potential [12–14], and obtaining keratinolytic enzymes for medical, pharmaceutical, industrial and bioenergy

applications [15]. Implementing biological methods of keratin waste management is an alternative option to existing physical and chemical methods [1], which have an adverse impact on the environment and generate additional costs from an economic perspective.

Limitations in the widespread use of microbial technologies for processing keratin waste are caused by its low biodegradability. Native keratins are hard-to-degrade proteins, available as a nutritional substrate only to a small number of microorganisms. Among the keratinolytic microorganisms capable of utilizing native keratin as the sole source of C and energy, bacteria of the genera *Bacillus*, *Sarcina*, *Streptomyces*, and fungi from the group of dermatophytes and *Chrysosporium* can be mentioned [12–14,16–22]. In the group of dermatophytes, in addition to pathogenic species, there are saprotrophic species called geophilic dermatophytes, which do not show affinity to higher organisms [23,24]. Saprotrophic keratinomycetes, in addition to cultivated soils [25,26], soils with a constant supply of keratinous matter [14,24], and composts [10], colonize feathers and nests of birds or mammalian hair [27], as well as bottom sediments, sewage, and municipal waste [21,28]. In cultivated soils and keratin-based composts, keratinolytic fungi are considered natural biofertilizers, as they release mineral forms of nitrogen and sulfur during the enzymatic biodegradation of native keratin (feathers, hair, other animal remains), which are assimilable by plants [10,12].

One of the more common soil keratinomycetes is *Trichophyton ajelloi*, which belongs to geophilic dermatophytes [24–26,29]. There is little data in the literature comprehensively describing keratin breakdown by these fungi [20]. For example, Kačínová, et al. [20] showed that *Trichophyton ajelloi* produced significant amounts of keratinolytic enzymes and their biosynthesis was stimulated by limiting the availability of carbon sources in the culture medium, while temperature activated keratinase secretion. According to Kumar and Kushwaha [21], *Trichophyton ajelloi*, in relation to other keratinophilic (=keratinolytic) fungi such as *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium gypseum*, *Myceliophthora vellerea*, *Myceliophthora fergusii*, *Chrysosporium tropicum*, or *Chrysosporium indicum* was characterized by lower activity of keratinolytic enzymes. However, keratinase activity is not the only determinant of fungal keratinolytic potential. Kornilłowicz–Kowalska [30,31] has shown that there are numerous indicators reflecting the level of keratinolytic activity of fungi, which, in addition to proteolytic and keratinolytic activity, include the concentration of released soluble proteins and peptides, (N–NH₂), N–NH₄⁺, and S–SO₄^{2–} amino groups, culture medium alkalization, and feather weight loss. Bohacz [12] identified the latter as the most reliable indicator of the biodegradation process of chicken feathers and described it as an ‘economic coefficient’. The process of S-keratin mineralization was also pointed out by Bohacz, et al. [14] as another important aspect of chicken feather biodegradation. The latter authors pointed out that in addition to nitrogen mineralization, organic sulfur mineralization was the determinant of fungal keratinolysis efficiency. With regard to the economic aspects of waste keratin biodegradation, the time of complete solubilization of this waste is crucial. As reported by Cai and Zheng [32], keratin biodegradation by bacteria and actinomycetes was significantly shorter in comparison to fungi. According to Kornilłowicz–Kowalska [30,31], the complete solubilization of native feather keratin by keratinolytic fungi could even last about two months. However, during the so-called rapid lysis phase, which lasted 14–21 days, the most active strains of keratinolytic fungi were able to break down 65–85% of these waste [30,31].

In view of the presented data and the lack of implemented solutions in the field of environmentally friendly methods of managing keratin waste and recycling of valuable organic matter, there is a need or even an obligation to seek new technologies or optimize already recognized methods of processing this waste. The possibility of obtaining fertilizer preparations can undoubtedly be counted among these solutions. In recent years, there has been increasing interest in developing methods to obtain various microbial biopreparations for their soil application and fertilization and protection of plants [33]. This is particularly important in connection with environmental protection efforts, but is also relevant to harnessing the potential of microorganisms as natural biofertilizers. Considering the alarming

data related to climate change due to mismanagement of natural resources, the timing of sourcing innovative solutions for environmental protection is also becoming important.

The present work addresses contemporary demands for environmental protection. Its primary goal was to optimize culture conditions and substrate composition toward both accelerating the biodegradation of valuable chicken feather waste by keratinolytic strains of *Trichophyton ajelloi*—a soil fungus poorly known in this regard—but also to obtain a biopreparation of high fertilizer value. The activity of enzymes involved in the biodegradation process, feather weight loss and, in particular, the content of organic and mineral forms of nitrogen and sulfur were used as criteria in assessing the impact of individual optimized factors.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation of *Trichophyton ajelloi* Strains

Three strains of *Trichophyton ajelloi*, designated as III, XII, and XIV, were used to study the optimization of culture conditions and medium composition for geophilic keratinolytic fungi. They were selected from 37 strains of this species isolated from 4 different cultivated soils in southeastern Poland (Cambisol, Leptosol, and Chernozem). It was also the dominant species in these soils. All three strains were isolated by the keratin bait method from brown soil with a sandy loam grain size, classified according to the World Reference Base classification [34] as Cambisol. A detailed characterization of the mycobiome of these soils and the relationship between the occurrence of keratinolytic and non-keratinolytic fungi and the physical and chemical properties, in particular grain size, is presented in the study of Bohacz, et al. [26]. In turn, the characteristics of keratinolytic activity of the entire *Trichophyton ajelloi* collection is currently the subject of another study (unpublished data). The *Trichophyton ajelloi* strains selected for the study, based on their preliminarily identified ability to release mineral forms of N and S during biodegradation of feather waste keratin, were classified as highly keratinolytic.

2.2. *Trichophyton ajelloi* Identification

2.2.1. Characteristics of Morphological Features

Species identification in pure fungal cultures was carried out on the basis of macro- and micromorphological characteristics on Petri dishes and agar slants, respectively, with Sabouraud medium with the following composition (g dm⁻³): glucose—40; peptone—10; agar—20, distilled water—1 dm³, and in microcultures, which was described in detail in the study of Bohacz, et al. [26]. Macroscopic identification concerned the colony morphology of these fungi and their ability to produce pigment. Microscopic identification using an Olympus BX-41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a CVIII4 camera (Olympus, Tokyo, Japan) and Cell-A software (Soft Imaging System GmbH, version (v.) 1.20, Münster, Germany) included hyphae structure, the presence and structure of micro- and macroconidia (anamorph), as well as the presence or absence of fruiting bodies (teleomorph). The species classification was based on the systematic keys listed in Bohacz, et al. [26].

2.2.2. Identification Using Molecular Methods

In order to verify the determination on the basis of phenotypic characteristics of the three strains of *Trichophyton ajelloi*, identification by PCR and nucleotide sequencing was carried out at the Institute of Biochemistry and Biophysics (oligo.pl), Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland. The isolation of genetic material (DNA) was carried out from the fungal cultures in Petri dishes using the manual method described in the study of Liu and Paterson [35]. This was followed by PCR reaction and sequencing of the reaction product templates using specific primers: ITS1: '5-TCCGTAGGTGAACCTGGCGG-3' and ITS4: '5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. PCR products were purified and sequencing was performed using the BigDye Terminator Mix v3.1 kit and an ABI3730xl genetic analyzer and the aforementioned primers. The resulting readings were assembled into appropriate contigs, thereby obtaining a consensus sequence. The results were compared with the

UNITE database (<https://unite.ut.ee/> accessed on 9 July 2021). The exact conditions of the PCR reaction and nucleotide sequencing are described in the study of Bohacz [12].

The resulting sequences are available in the GenBank database under accession numbers: *Trichophyton ajelloi* strain ON 461895 designated as III, *Trichophyton ajelloi* strain ON 468679 designated as XII, *Trichophyton ajelloi* strain ON 461993 designated as XIV.

2.3. Preliminary Evaluation of the Effect of Temperature on the Growth of *Trichophyton ajelloi* Fungi

The effect of different temperatures (20, 28, 37, and 50 °C) on the growth of the tested *Trichophyton ajelloi* fungal strains was evaluated by inoculating the mycelium in the center of a Petri dish with Sabouraud and MAE medium (g dm⁻³): malt extract—12.75, glycerin—2.35, dextrin—2.75, peptone—0.78, agar—15.00, and distilled water to a final volume of 1 dm³. After 7 and 14 days of fungal culture, colony size (ø in mm), pigment production capacity, and the color of the obverse and reverse of the colonies were determined. The cultures were incubated in ST 350/350 incubators (Pol-Eko, Wodzisław Śląski, Poland).

2.4. Preliminary Evaluation of Hydrolytic Abilities of *Trichophyton ajelloi* Strains

Testing the ability of the fungal strains to degrade protein, starch and fats was carried out in Petri dishes with an appropriate agar medium. To determine the ability to degrade protein, the fungi were inoculated on a medium with gelatin as the only source of C, N, and energy with the following composition (g dm⁻³): gelatin—6; glucose—0.05; peptone—0.1; NaCl—3; K₂HPO₄—1.5; KH₂PO₄—0.5; agar—20; broth—5 cm³; and distilled water to a final volume of 1 dm³. For the evaluation of amylolytic activity, the plates were prepared with a medium containing starch and sucrose as a source of C and energy with the following composition (g dm⁻³): NaNO₃—3; K₂HPO₄—1; MgSO₄—0.5; KCl—0.5; sucrose—10; starch—20; agar—20; FeSO₄—trace amounts; and distilled water to a final volume of 1 dm³. Assessment of the lipolytic capacity of fungi was carried out on a medium with butyrate with the following composition (g dm⁻³): broth—3; peptone—5; agar—20; butyrate—10 cm³, and distilled water to a final volume of 1 dm³. The established cultures were incubated in an incubator at 28 °C for up to one week. After this time, the ability of fungi to degrade these compounds was analyzed. To demonstrate the ability to degrade starch, the cultures that grew on the medium with starch were poured over with Lugol's iodine, for protein degradation with Frazier's reagent (HgCl₂—15 g; HCl—20 cm³, distilled water to a final volume of 100 cm³). The appearance of the clear zone around the fungus growth indicated the secretion of extracellular amylolytic or proteolytic enzymes by these fungi, respectively. The presence of a clear zone around the growth of these fungi on the medium with fat indicated the ability to decompose fats. Cultures for each strain were prepared in triplicate.

The preliminary assessment of the ability to degrade protein, starch, and fat was presented in the form of the Enzymatic Index (IE) according to the equation described by de Lima, et al. [36].

$$IE = \frac{\text{size of clear zone } (\text{ømm})}{\text{size of colony } (\text{ømm})}$$

2.5. Optimization of Medium Composition and Culture Conditions of *Trichophyton ajelloi* Strains in the Process of Feather Keratin Biodegradation

In order to select optimal culture parameters for the biodegradation of feather waste keratin by *Trichophyton ajelloi*, different carbon and nitrogen sources, medium pH, incubation temperature, and culture aeration were tested. The activity of enzymes involved in the degradation of keratin protein, i.e., protease, keratinase, and disulfide reductase, concentration of keratinolysis products, which included soluble proteins and peptides, amino and thiol groups, ammonium, and sulfate ions, determined in culture fluids, and feather weight loss measured after 42 days of culture, were used as criteria of the effect of individual factors. Clear culture fluid for the determination of the aforementioned

parameters was separated from mycelial residues by centrifugation at 7000 rpm and 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5430 R, Hamburg, Germany).

2.5.1. Fungal Culture

Trichophyton ajelloi cultures were carried out in 300 cm³ Erlenmeyer flasks containing 100 cm³ of liquid sterile basal mineral medium with the following composition (g dm⁻³): KH₂PO₄—1.5; NaCl—0.01; MgCl₂ 6H₂O—0.05, distilled water to a final volume of 1 dm³, pH = 4.5, 1% chicken feather. The basal medium composition (control) was based on data developed for keratinolytic fungi of the *Chrysosporium* group, except for pH [12]. Chicken feather waste was derived from the “Superdrób” Poultry Plant in Lublin, Poland. Chemical composition of chicken feather dry weight (%): N—total—12.83; N—overall—15.17; P—0.10; K—0.10; Ca—0.18; Mg—0.02; organic matter—98.78, and (mg kg⁻¹): S—SO₄—0; S—total—8693; N—NO₃—26; N—NH₄—137 [10]. Preparation of feathers for the experiment and their sterilization, without disturbing the keratin structure, were carried out according to the procedure described by Bohacz, et al. [13]. Feathers were thoroughly rinsed (washed in a poultry slaughterhouse) with running and distilled water. After drying at 55 °C, they were cut into < 1.0 cm sections and placed in 300 cm³ Erlenmeyer flasks. Feathers were then sterilized by the gassing method [13].

To set up different variants of the experiment, each medium with keratin substrate was inoculated with a two-week culture of the test strains. For this purpose, 10 cm³ of sterile distilled H₂O with Tween 80 was added to tubes with *Trichophyton ajelloi* on slants with Sabouraud medium, and, after rinsing the spores and obtaining the starting suspension (10⁻¹ cfu cm⁻³), a series of 1:10 dilutions was prepared. Subsequently, 1 cm³ of the prepared spore suspension with a density of 10⁶–10⁸ cfu cm⁻³ was evenly applied to feather surface in flasks with medium.

2.5.2. Optimization of Substrate Composition

The basal medium with the addition of 1% glucose or xylose was used to select an easily available source of carbon and energy. In order to determine the optimal concentration of keratin substrate, a mineral medium with 1.5% and 2.0% chicken feathers was used as a source of C, N, and S, in addition to the basal variant with 1% feathers. The cultures were carried out at 28 °C under static conditions.

2.5.3. Determination of Optimal Medium pH

The experiment was conducted on the basal medium under static conditions at 28 °C in a liquid mineral medium (with the composition as above), whose pH was adjusted to 4.5, 6.5, and 8.5.

2.5.4. Determination of Optimal Culture Temperature

Culture of three selected *Trichophyton ajelloi* strains was carried out in the basal mineral liquid medium under static conditions with the addition of 1% feather waste using incubation temperature of 20, 28, and 37 °C.

2.5.5. Determination of Optimal Culture Method

The experiment was conducted in two culture variants: static (surface cultures) and agitated (submerged cultures, 180 rpm/min, amplitude 5) (Water Bath Shaker, ELPIN_{SC}+ type 357, ELPIN, Katowice, Poland) using the basal mineral liquid medium with 1% feather addition and a culture temperature of 28 °C.

2.6. Parameters of *Trichophyton ajelloi* Biodegradation Activity

The dynamics of changes in the activity of enzymes involved in the decomposition of waste feather keratin, concentration of mineral and organic forms of nitrogen and sulfur, and medium pH were periodically determined (i.e., after 7, 14, 21, 28, and 35 days) in the culture fluids of individual experimental variants.

2.6.1. Determination of the Activity of Enzymes Involved Feather Keratin Biodegradation

Keratinase activity was measured using the method of Yu, et al. [37], modified by Anbu, et al. [38], in 0.1 M Tris–HCl buffer pH 8.1 using 20 mg of shredded chicken feathers as a substrate. Protease activity was determined by the method of Anson [39], modified by Kornilowicz [40], in 0.028 M phosphate buffer pH 7.8, with the addition of 2 mM magnesium ions and 1% casein as a substrate. Determination of caseinolytic protease and keratinase activities was carried out using a UV–VIS–1800 spectrophotometer (Rayleigh, Beijing, China) at a wavelength of 720 and 280 nm, respectively. Determination of disulfide reductase activity was carried out spectrophotometrically (EPOCH™ microplate spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA) according to Holmgren [41], modified by Aharanowitz, et al. [42], in 50 mM Tris–HCl buffer at pH 8.0, in the presence of NADPH and EDTA and 0.02 mM DTNB in ethanol.

2.6.2. Determination of Organic and Mineral Forms of Nitrogen and Sulfur and pH

Free proteins and peptides in culture fluids were measured according to the method of Lowry [43], modified by Schacterle and Pollack [44]. Amino groups were determined by the ninhydrin method according to Kornilowicz–Kowalska [30]. The content of ammonium ions in the culture fluids was determined by the nesslerization method [31], while sulfate content was determined based on the intensity of turbidity in the reaction with barium chloride (BaCl₂) by nephelometry [31]. The concentration of thiol groups in the culture fluids was determined by color reaction of –SH groups with Ellman’s reagent [45]. The pH of the culture fluids was determined using a CP–505 pH meter (Elmetron, Zabrze, Poland) equipped with a glass electrode.

Amino acid composition, i.e., concentration of aspartate (Asp), threonine (Thr), serine (Ser), glutamate (Glu), proline (Pro), glycine (Gly), alanine (Ala), cysteine (Cys), valine (Val), methionine (Met), isoleucine (Ile), leucine (Leu), tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), histidine (His), lysine (Lys), arginine (Arg), and tryptophan (Trp) of the optimized cultures tested were carried out according to the methodology described in detail by Bohacz, et al. [14]. For this purpose, culture fluids of the fungus strain III from 18-day optimized stationary cultures, with the addition of xylose and glucose, incubated at 20 and 37 °C, and from an agitated culture were selected. Amino acids were determined by ion exchange chromatography using an amino acid analyzer AAA 400 (Ingos, Prague, Czech Republic).

2.6.3. Feather Weight Loss

Weight loss of the keratin substrate (feathers) was determined after 42 days of the experiment using the weighing method after drying at 105 °C.

2.7. Statistical Analysis

The results were statistically analyzed using Statistica ver.13.3 software (StatSoft, Kraków, Poland). A multivariate analysis of variance (ANOVA), followed by a post-hoc HSD–Tukey test was performed to demonstrate significant differences between the tested *Trichophyton ajelloi* strains in terms of changes in the pH of post-culture fluids, degree of keratin substrate degradation and differences in the ability of these strains to biodegrade chicken feather wastes at the $\alpha = 0.05$ level of significance. One-way ANOVA followed by a post-hoc HSD–Tukey test ($\alpha = 0.05$) was used to demonstrate differences in enzymatic indices of the examined *T. ajelloi* strains and differences between the dates of analyses of chicken feather biodegradation parameters.

Principal component analysis (PCA) was conducted, as described in the study of Nilsson, et al. [46], to demonstrate the relationship between keratinolytic activity of *Trichoderma ajelloi* fungal strains No. III, XII, and XIV and the optimized culture parameters. Indicators of keratinolytic activity included keratinase activity, protease, disulfide reductase, release of soluble proteins and peptides, amino and thiol groups, ammonium and sulfate ions, as well as changes in pH and feather weight loss. Optimized culture parameters included readily available carbon and energy source (glucose—G, and xylose—X), different

amounts of feathers (1.0, 1.5 and 2.0% feather waste), culture temperature (20, 28 and 37 °C), baseline pH of the medium (4.5, 6.5, 8.5), culture method (stationary—ST, agitated—AG). The results of the analysis are presented on the score plot and loading plot. The score plot (dots) and loading plot (vectors) should be interpreted simultaneously [46]. Two plots help analyze correlations between observations and variables. The loading plot shows the effect of variables, i.e., keratinase activity, protease, disulfide reductase, concentration of soluble proteins and peptides, amino and thiol groups, ammonium and sulfate ions, as well as pH and feather weight loss in individual principal components and demonstrates the correlation structure relative to the variables. The score plots is a map of observations and represents optimization parameters. If the observation on the score plot (different optimized parameters in cultures of different strains) is in the corresponding part on the loading plot, the influence of the variable on the observation is greater.

Based on the analysis of variance, the optimal conditions for the most effective biodegradation of chicken feather waste by *Trichophyton ajelloi* strains were proposed for all optimized parameters of keratin biodegradation.

3. Results

3.1. Preliminary Evaluation of Temperature Effect on *Trichophyton ajelloi* Growth

A preliminary evaluation of the effect of temperature on the linear growth of the studied *Trichophyton ajelloi* strains on Sabouraud and MAE (maltose medium) at four different temperatures (20, 28, 37, and 50 °C) showed a lack of growth of these fungi at 37 and 50 °C. It was observed that Sabouraud medium (high glucose) promoted the growth of *T. ajelloi* fungi. This was expressed as a 24% larger colony diameter after 7 and 14 days of culture (Table 1). This suggested an introduction of an additional readily available source of carbon and energy for fungal culture into the optimization process.

Table 1. Size of colony diameter [mm] of *Trichophyton ajelloi* strains.

<i>T. ajelloi</i> Strains	Days of Cultivation	Medium	Culture Temperature			
			20 °C	28 °C	37 °C	50 °C
III	7	Sabouraud	27.33 ± 0.47	32.50 ± 1.89	0.00	0.00
		Maltose	16.86 ± 0.37	22.67 ± 1.11	0.00	0.00
	14	Sabouraud	52.17 ± 0.37	55.50 ± 7.46	0.00	0.00
		Maltose	33.83 ± 0.90	43.67 ± 0.75	0.00	0.00
XII	7	Sabouraud	27.33 ± 0.47	34.00 ± 1.15	0.00	0.00
		Maltose	18.00 ± 2.16	24.00 ± 2.89	0.00	0.00
	14	Sabouraud	52.50 ± 1.26	62.67 ± 1.25	0.00	0.00
		Maltose	33.17 ± 2.67	45.00 ± 1.00	0.00	0.00
XIV	7	Sabouraud	22.33 ± 1.25	32.00 ± 1.63	0.00	0.00
		Maltose	14.00 ± 1.41	20.00 ± 0.82	0.00	0.00
	14	Sabouraud	46.83 ± 1.57	64.00 ± 0.82	0.00	0.00
		Maltose	29.33 ± 2.36	41.50 ± 1.80	0.00	0.00

3.2. Preliminary Evaluation of Hydrolytic Abilities of *Trichophyton ajelloi*

The initial assessment of *Trichophyton ajelloi* fungi for the degradation of complex organic matter, i.e., protein, fat, and starch was evaluated on the basis of the calculated enzymatic index (IE). Strain No. III showed the greatest, but not significantly different ($p < 0.05$) fat degradation capacity, while strain No. XIV showed a significantly higher ability to degrade protein in comparison to two other *T. ajelloi* strains (Table 2).

Table 2. Hydrolytic capacity of *Trichophyton ajelloi*.

Strain	Enzymatic Index		
	Proteolytic Activity	Lipolytic Activity	Amylolytic Activity
III	1.55 ± 0.16 ^a	1.35 ± 0.11 ^a	0.0
XII	1.59 ± 0.12 ^a	1.32 ± 0.08 ^a	0.0
XIV	1.94 ± 0.06 ^b	1.20 ± 0.08 ^a	0.0

Explanations: Letters a and b denote means forming homogenous groups, which were determined by one-way ANOVA and HSD–Tukey post-hoc test. If the means are marked with the same letter (e.g., a), they do not differ significantly (at $\alpha = 0.05$). If the means are given different letters (e.g., a and b), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

3.3. Optimization of Culture Conditions and Substrate Composition

In order to select optimal culture parameters for the biodegradation process of native keratin from chicken feather by geophilic strains of *Trichophyton ajelloi*, different medium pH, incubation temperature, different amounts of chicken feathers, additional carbon sources and different culture methods were tested. The process of optimizing keratin biodegradation was evaluated in terms of measuring the activity of keratinase, protease, disulfide reductase, concentration of released soluble proteins and peptides, total pool of amino acids, as measured by the content of amino and thiol groups, as well as ammonium and sulfate ions, changes in medium pH and feather weight loss.

3.3.1. Effect of Carbon and Nitrogen Source on Feather Keratin Biodegradation by *Trichophyton ajelloi* Enzymatic Activity

Protease, keratinase, and disulfide reductase activities were determined in the selection of the optimal carbon source for the biodegradation of native feather keratin by *Trichophyton ajelloi* fungal strains. Based on the results, it was found that all strains tested in the presence of glucose and xylose carry out the process of feather keratin biodegradation. The activity of keratinase and caseinolytic protease in cultures of all strains labeled as III, XII, and XIV was more efficient in the presence of glucose than xylose. Keratinase activity remained high throughout the experiment and gradually increased, especially in strain III cultures. Protease activity increased significantly for the first 2 weeks of the experiment, and subsequently decreased slightly and again significantly increased from day 28 both in cultures with glucose and xylose addition. The maximum activity of this enzyme in cultures with glucose was on day 14 and in cultures with xylose on day 35. Compared to baseline, the activity of this enzyme increased by 311% in cultures with glucose and by 335% in cultures with xylose, respectively. The addition of xylose in the first 14 days had an inhibitory effect on keratinase activity. At the end of the experiment, both xylose and glucose stimulated the activity of this enzyme.

Keratinase activity at the end of the experiment was on average 177% higher compared to the initial time point in the glucose-supplemented cultures and 115% higher in the xylose-supplemented cultures. In cultures of *Trichophyton ajelloi* strain III, keratinase activity was stimulated by the presence of xylose only in the last experimental time point (Figure 1 and Supplementary Table S1). Disulfide reductase activity in *Trichophyton ajelloi* cultures generally declined until day 14, followed by its increase and then another decrease after day 28, especially in cultures with xylose. Disulfide reductase activity was on average higher than the activity of this enzyme in cultures without the addition of a readily available carbon and energy source by an average of 42% and 121% in cultures with glucose and xylose addition respectively, with the exception of strain XII cultures. The highest activity of this enzyme throughout the experiment was recorded in cultures of strain XII (Figure 1 and Supplementary Table S1).

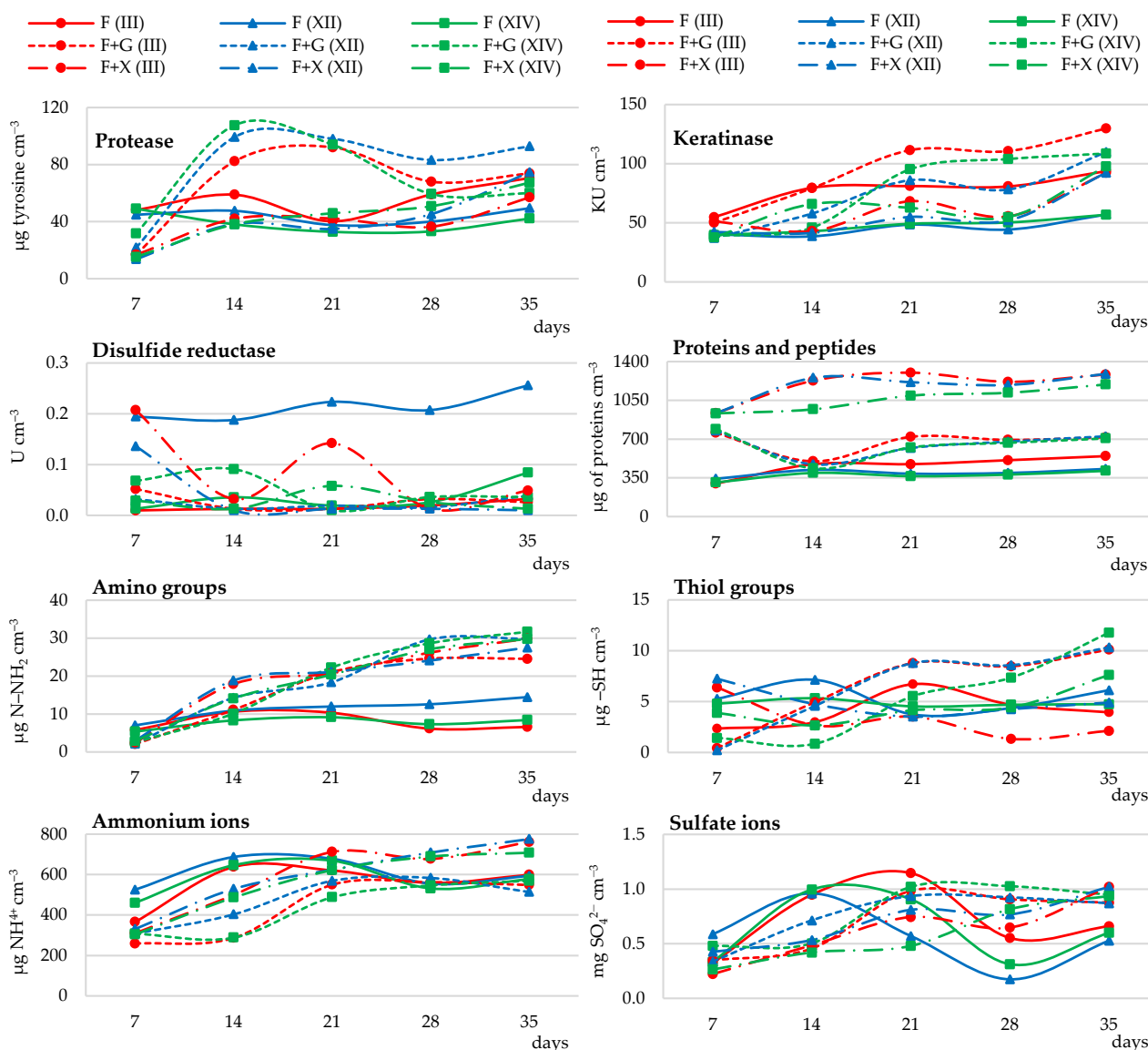


Figure 1. Dynamics of changes in enzymatic activity and released organic and mineral products of keratinolysis in cultures of three *Trichophyton ajelloi* strains III, XII, and XIV, with the addition of various easily available sources of carbon and energy, i.e., glucose (G) and xylose (X).

Release of Soluble Proteins, Peptides and Amino Acids

The introduction of xylose into the culture medium resulted in a higher release of soluble proteins and peptides, on average 43% higher than in the presence of glucose and without the additional carbon and energy source, especially in the culture of strains III and XII. The total pool of amino acids, as measured by the concentration of amino groups, was clearly affected by the addition of both sugars glucose and xylose. The release of amino groups until day 21 of the culture of all tested fungal strains was stimulated by xylose and from day 21 of the culture by glucose. In the cultures without glucose and xylose, amino groups were released in greater quantities during the first week of the experiment. These quantities were on average higher by 169% and by 119% compared to cultures with glucose and xylose, respectively. The number of these groups starting from day 21 of the culture decreased or remained constant. It was shown that the pool of sulfur amino acids, measured by the release of thiol groups, up to day 7 of the culture was induced by the presence of xylose and from day 21 of the experiment by glucose, especially in the cultures of strains III and XII. This was evidenced by the significantly higher concentrations of these

groups in culture fluids on average by 45% compared to culture with xylose (Figure 1 and Supplementary Table S1).

Ammonium Ion Release and Sulfate Ion Generation

The addition of glucose and xylose to the cultivation of all fungi resulted in a gradual increase in the release of ammonium ions. In relation to the whole experiment, 1% xylose was more effective (by 29%) in stimulating the secretion of ammonium ions than 1% glucose. Ammonium ion release during feather biodegradation in cultures without the addition of glucose and xylose remained high for all fungal strains for 21 days of the culture, after which it decreased and increased again after 28 days of the culture. Compared to 21-day cultures with glucose and xylose, the release of these ions was on average 22% and 1% higher, respectively. In the culture fluids of strains XII and XIV, the beneficial effect of the addition of 1% xylose on the release of ammonium ions became apparent after 28 days of analysis. A strong stimulating effect on sulfate release was demonstrated in the cultures with glucose, especially after 21 days of the culture. Compared to the cultures with xylose, sulfate generation after this time was on average higher by 44%. In contrast, it was lower after the application of 1.0% xylose. It was also shown that sulfate release by all tested fungal strains in the cultures not enriched with sugars was high until day 21 of the culture, then decreased by an average of 67% compared to the maximum concentration, and increased again after day 28 of the culture (Figure 1 and Supplementary Table S1).

Effect of Chicken Feather Waste Concentration on Biodegradation Activity of *Trichophyton ajelloi*

Optimization of culture conditions with regard to the content of the hardly accessible source of C, N, and S, i.e., native keratin involved three feather doses of 1, 1.5, and 2%. It was shown that higher feather doses generally stimulated all microbial biodegradation parameters. In particular, 2% content of keratin material, compared to 1% basal feather concentration, resulted in a significant increase in the secretion of soluble proteins and peptides by an average of 69%, sulfates by 89%, and thiol groups by an average of 255% into the medium, as well as keratinase, protease activities, especially in cultures of strains XII and XIV (by an average of 66%, and 41%, respectively). Disulfide reductase activity also increased especially in cultures of strains designated No. III and XIV. Sulfate release was clearly linked to disulfide reductase activity, especially on day 21 of the culture, as well as the release of amino groups (Figure 2 and Supplementary Table S2).

Changes in the pH of Culture Fluids

Measurements of the pH of culture fluids from the cultures enriched with glucose and xylose indicated an increase in pH up to day 28 of the culture and subsequent stabilization. The values of this index in the variant with glucose were in the range of 6.90–8.86 (strain No. III), 7.10–8.93 (strain No. XII), 7.03–8.88 (strain No. XIV), and with xylose in the range of 6.93–8.64 (strain No. III), 7.00–8.64 (strain No. XII), and 6.70–8.61 (strain No. XIV). Increasing the amount of chicken feather waste resulted in an increase in the pH of culture fluids, up to day 14 of the culture and subsequent stabilization. In the cultures with 1.5% feathers, the pH ranged from 8.53 to 9.13 (strain No. III), 8.48–9.21 (strain No. XII), 7.24–8.75 (strain No. XIV), and with 2% feathers from 8.13 to 8.95 (strain No. III), 8.54–9.32 (strain No. XII), and 7.84–8.99 (strain No. XIV) (Table 3).

Table 3. Dynamics of pH changes in *Trichophyton ajelloi* culture medium under different culture conditions and medium composition.

<i>T. ajelloi</i> Strain	Optimized Parameters	Days of Analyses						
		7	14	21	28	35		
III	Cs	F ^B	7.81 ± 0.13 ^{bc}	8.90 ± 0.04 ^f	8.77 ± 0.01 ^{ef}	8.57 ± 0.02 ^{ef}	8.39 ± 0.01 ^{def}	
		F + G ^A	6.90 ± 0.03 ^a	7.41 ± 0.26 ^{ab}	8.86 ± 0.04 ^f	8.82 ± 0.03 ^f	8.76 ± 0.04 ^{ef}	
		F + X ^A	6.93 ± 0.27 ^{ab}	7.94 ± 0.37 ^{bcd}	8.25 ± 0.15 ^{cde}	8.46 ± 0.09 ^{def}	8.64 ± 0.03 ^{ef}	
	Sc [%]	1.0 ^A	7.81 ± 0.13 ^a	8.90 ± 0.04 ^{def}	8.77 ± 0.01 ^{cdef}	8.57 ± 0.02 ^{bcd}	8.39 ± 0.01 ^{bc}	
		1.5 ^C	8.53 ± 0.04 ^{bcd}	9.07 ± 0.01 ^{ef}	9.13 ± 0.04 ^f	9.09 ± 0.01 ^{ef}	8.77 ± 0.02 ^{cdef}	
		2.0 ^B	8.13 ± 0.36 ^{ab}	8.81 ± 0.19 ^{cdef}	8.95 ± 0.11 ^{def}	8.95 ± 0.09 ^{def}	8.67 ± 0.08 ^{cde}	
	pH	4.5 ^A	7.81 ± 0.13 ^a	8.90 ± 0.04 ^{fg}	8.77 ± 0.01 ^{ef}	8.57 ± 0.02 ^{bcd}	8.39 ± 0.01 ^b	
		6.5 ^B	8.94 ± 0.03 ^{fg}	9.24 ± 0.02 ^{hi}	9.22 ± 0.04 ^{hi}	8.42 ± 0.08 ^{bc}	8.70 ± 0.05 ^{de}	
		8.5 ^C	9.08 ± 0.03 ^{gh}	9.32 ± 0.02 ⁱ	9.28 ± 0.01 ⁱ	8.61 ± 0.01 ^{cde}	9.01 ± 0.09 ^g	
	T [°C]	20 ^C	7.76 ± 0.11 ^c	8.93 ± 0.02 ^{fg}	9.08 ± 0.03 ^g	9.10 ± 0.02 ^g	8.90 ± 0.02 ^{fg}	
		28 ^B	7.81 ± 0.13 ^c	8.90 ± 0.04 ^{fg}	8.77 ± 0.01 ^{ef}	8.57 ± 0.02 ^{de}	8.39 ± 0.01 ^d	
		37 ^A	6.39 ± 0.08 ^a	6.48 ± 0.08 ^a	6.72 ± 0.07 ^b	6.88 ± 0.06 ^b	6.92 ± 0.05 ^b	
	Cm	STA ^A	7.81 ± 0.13 ^{bc}	8.90 ± 0.04 ^a	8.77 ± 0.01 ^a	8.57 ± 0.02 ^a	8.39 ± 0.01 ^{ab}	
		AG ^A	7.68 ± 0.45 ^c	8.40 ± 0.27 ^{ab}	8.76 ± 0.12 ^a	8.67 ± 0.10 ^a	8.65 ± 0.12 ^a	
	XII	Cs	F ^C	8.55 ± 0.02 ^{bcd}	8.79 ± 0.01 ^{def}	8.66 ± 0.13 ^{cdef}	8.71 ± 0.01 ^{cdef}	8.51 ± 0.02 ^{bcd}
			F + G ^B	7.10 ± 0.12 ^a	8.36 ± 0.13 ^{bc}	8.93 ± 0.01 ^f	8.92 ± 0.03 ^f	8.87 ± 0.03 ^{ef}
			F + X ^A	7.00 ± 0.24 ^a	8.21 ± 0.12 ^b	8.49 ± 0.08 ^{bcd}	8.53 ± 0.07 ^{bcd}	8.64 ± 0.08 ^{cdef}
		Sc [%]	1.0A ^B	8.55 ± 0.02 ^{bc}	8.79 ± 0.01 ^{bc}	8.66 ± 0.13 ^{bc}	8.71 ± 0.01 ^{bc}	8.51 ± 0.02 ^{bc}
1.5 ^A			8.98 ± 0.49 ^e	9.21 ± 0.28 ^{fg}	9.17 ± 0.19 ^{fg}	8.48 ± 0.12 ^a	8.68 ± 0.06 ^{cd}	
2.0 ^B			9.06 ± 0.21 ^{ef}	9.32 ± 0.16 ^g	9.27 ± 0.06 ^g	8.54 ± 0.03 ^{abc}	8.99 ± 0.04 ^e	
pH		4.5 ^A	8.55 ± 0.02 ^{abc}	8.79 ± 0.01 ^d	8.66 ± 0.13 ^{bcd}	8.71 ± 0.01 ^{cd}	8.51 ± 0.02 ^{ab}	
		6.5 ^B	7.74 ± 0.06 ^a	8.67 ± 0.01 ^{bc}	8.86 ± 0.03 ^{bc}	8.86 ± 0.01 ^{bc}	8.63 ± 0.04 ^{bc}	
		8.5 ^C	8.36 ± 0.02 ^{ab}	8.68 ± 0.02 ^{bc}	9.05 ± 0.01 ^c	9.08 ± 0.03 ^c	8.72 ± 0.06 ^{bc}	
T [°C]		20 ^B	6.99 ± 0.19 ^b	8.57 ± 0.18 ^c	8.88 ± 0.12 ^c	8.92 ± 0.10 ^c	8.75 ± 0.11 ^c	
		28 ^C	8.55 ± 0.02 ^c	8.79 ± 0.01 ^c	8.66 ± 0.13 ^c	8.71 ± 0.01 ^c	8.51 ± 0.02 ^c	
		37 ^A	6.35 ± 0.10 ^a	6.48 ± 0.08 ^a	6.65 ± 0.16 ^{ab}	6.67 ± 0.12 ^{ab}	6.66 ± 0.21 ^{ab}	
Cm		STA ^A	8.55 ± 0.02 ^{abc}	8.79 ± 0.01 ^{ab}	8.66 ± 0.13 ^{abc}	8.71 ± 0.01 ^{ab}	8.51 ± 0.02 ^{ac}	
		AG ^A	8.23 ± 0.11 ^c	8.56 ± 0.35 ^{abc}	8.98 ± 0.06 ^b	8.72 ± 0.11 ^{ab}	8.60 ± 0.07 ^{abc}	
XIV		Cs	F ^C	8.44 ± 0.06 ^{de}	8.78 ± 0.05 ^e	8.58 ± 0.05 ^{de}	8.82 ± 0.04 ^e	8.51 ± 0.04 ^{de}
			F + G ^B	7.03 ± 0.17 ^{ab}	7.62 ± 0.05 ^{bc}	8.79 ± 0.10 ^e	8.84 ± 0.06 ^e	8.88 ± 0.07 ^e
			F + X ^A	6.70 ± 0.23 ^a	7.57 ± 0.37 ^{bc}	8.01 ± 0.42 ^{cd}	8.59 ± 0.04 ^{de}	8.61 ± 0.03 ^{de}
		Sc [%]	1.0 ^A	8.44 ± 0.06 ^{cd}	8.78 ± 0.05 ^{defg}	8.58 ± 0.05 ^{cdef}	8.82 ± 0.04 ^{defg}	8.51 ± 0.04 ^{cdef}
	1.5 ^B		7.24 ± 0.16 ^a	8.35 ± 0.13 ^c	8.70 ± 0.10 ^{cdefg}	8.75 ± 0.10 ^{defg}	8.56 ± 0.10 ^{cdef}	
	2.0 ^A		7.84 ± 0.28 ^b	8.99 ± 0.07 ^g	8.90 ± 0.08 ^{fg}	8.87 ± 0.04 ^{efg}	8.49 ± 0.05 ^{cde}	
	pH	4.5 ^A	8.44 ± 0.06 ^a	8.78 ± 0.05 ^{def}	8.58 ± 0.05 ^{abcd}	8.82 ± 0.04 ^{ef}	8.51 ± 0.04 ^{abc}	
		6.5 ^B	8.92 ± 0.03 ^{fg}	9.18 ± 0.04 ^h	9.17 ± 0.05 ^h	8.45 ± 0.05 ^{ab}	8.67 ± 0.02 ^{bcd}	
		8.5 ^C	9.10 ± 0.12 ^{gh}	9.28 ± 0.02 ^h	9.26 ± 0.03 ^h	8.68 ± 0.12 ^{cde}	9.07 ± 0.10 ^{gh}	
	T [°C]	20 ^C	8.08 ± 0.05 ^b	8.95 ± 0.02 ^e	9.06 ± 0.04 ^e	9.08 ± 0.03 ^e	8.85 ± 0.03 ^{de}	
		28 ^B	8.44 ± 0.06 ^c	8.78 ± 0.05 ^{cde}	8.58 ± 0.05 ^{cd}	8.82 ± 0.04 ^{de}	8.51 ± 0.04 ^{cd}	
		37 ^A	6.05 ± 0.10 ^a	6.09 ± 0.12 ^a	6.19 ± 0.12 ^a	6.20 ± 0.13 ^a	6.16 ± 0.25 ^a	
	Cm	STA ^A	8.44 ± 0.06 ^b	8.78 ± 0.05 ^{cd}	8.58 ± 0.05 ^{ab}	8.82 ± 0.04 ^{cd}	8.51 ± 0.04 ^{ab}	
		AG ^A	8.19 ± 0.04 ^e	8.70 ± 0.05 ^{ac}	8.93 ± 0.02 ^d	8.65 ± 0.04 ^{ac}	8.53 ± 0.11 ^{ab}	

Explanations: Letters, i.e., lowercase (a, b, c) or capital (A, B, C) denote the means that form homogenous groups (HSD–Tukey post-hoc test for multivariate ANOVA). When two compared means were assigned the same letter (e.g., a or A), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g., a and b, or A and B, they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$); Cs—carbon sources, Sc—substrate concentration, T—culture temperature, Cm—culture method; F—cultures with feathers as a sole carbon source; F + G—cultures with feathers and glucose addition; F + X—cultures with feathers and xylose addition; STA—stationary cultures; AG—agitated cultures.

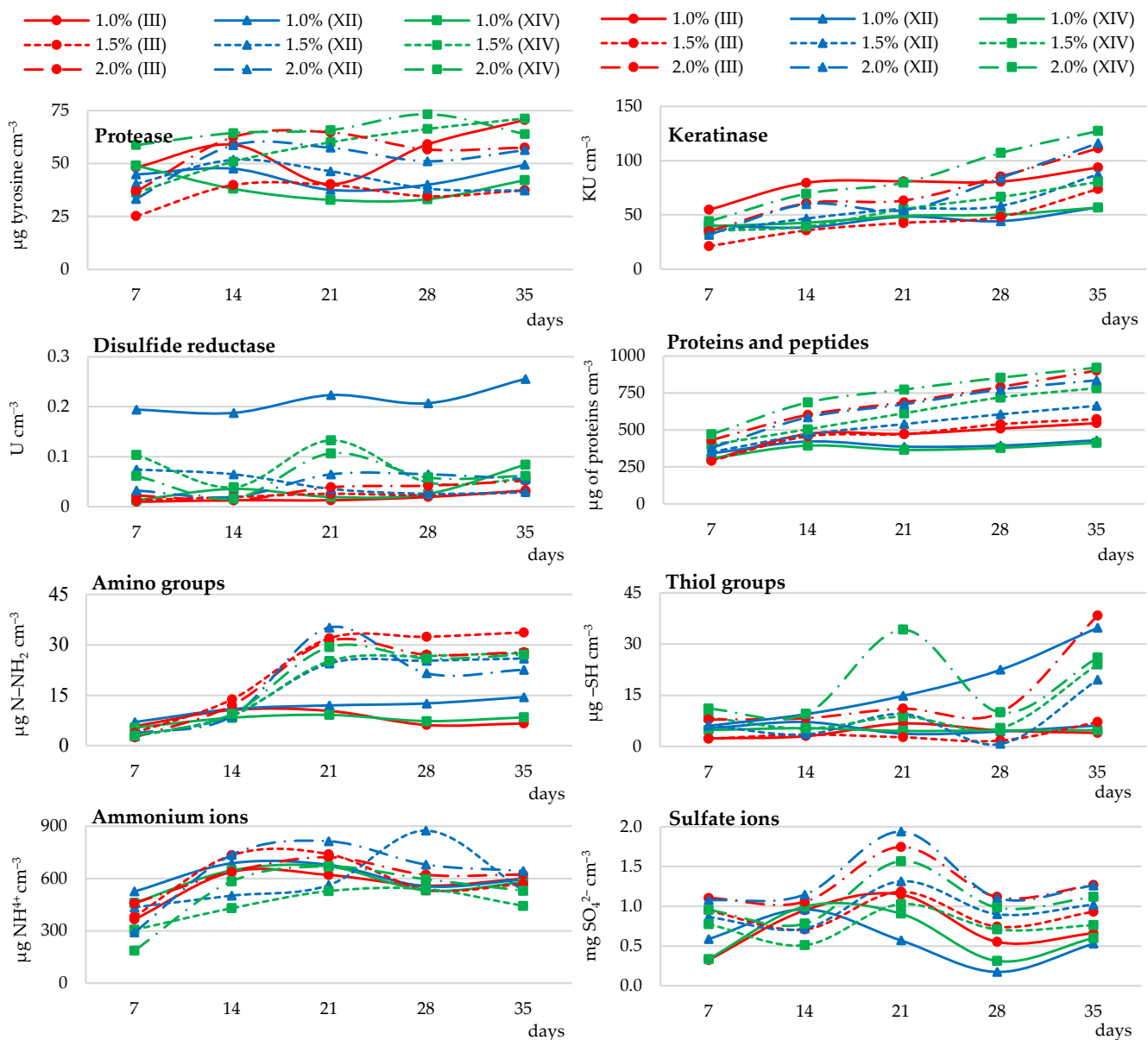


Figure 2. Dynamics of changes in enzymatic activity and released organic and mineral keratinolysis products in different concentrations of feather waste analyzed in cultures of three *Trichophyton ajelloi* strains III, XII, and XIV.

Feather Weight Loss

The addition of glucose to cultures containing native feathers resulted in a reduced degradation rate of this substrate compared to cultures containing feathers as the only carbon and energy sources. This loss in cultures with 1% feather and glucose addition was estimated at 6%. Slowdown in feather biodegradation with respect to 1% feather cultures not enriched with sugars amounted to 83%. The highest feather weight loss (58% on average), significantly higher compared to other conditions (1.0 and 1.5%), was demonstrated in the cultures without the addition of glucose and xylose, containing 2% feather waste (Table 4). An increase in the concentration of chicken feathers in fungal cultures increased the weight loss of this substrate by an average of 64%.

Table 4. Degree of keratin substrate degradation (%) by *Trichophyton ajelloi* fungal strains under various culture conditions and medium composition.

Optimized Parameters	<i>T. ajelloi</i> Strains			
	III ^A	XII ^A	XIV ^A	
Carbon sources	F ^C	37.33 ± 4.64 ^d	36.90 ± 0.62 ^d	36.57 ± 1.37 ^d
	F + G ^A	5.10 ± 0.29 ^a	5.03 ± 1.46 ^a	8.97 ± 1.32 ^{ab}
	F + X ^B	15.50 ± 0.94 ^{bc}	14.77 ± 0.45 ^{bc}	16.63 ± 2.33 ^c
Substrate concentration	1.0% ^A	37.33 ± 4.64 ^a	36.90 ± 0.62 ^a	36.57 ± 1.37 ^a
	1.5% ^A	41.43 ± 3.95 ^{ac}	38.30 ± 7.22 ^a	35.47 ± 4.29 ^a
	2.0% ^B	57.30 ± 5.51 ^b	59.07 ± 3.54 ^b	56.00 ± 5.53 ^{bc}
Initial pH of culture medium	4.5 ^C	37.33 ± 4.64 ^c	36.90 ± 0.62 ^c	36.57 ± 1.37 ^{bd}
	6.5 ^B	32.93 ± 0.29 ^{bcd}	31.47 ± 0.78 ^{abcd}	30.77 ± 1.03 ^{abd}
	8.5 ^A	27.33 ± 0.42 ^{ab}	26.90 ± 0.14 ^a	27.00 ± 0.79 ^{ab}
Culture temperature	20 °C ^B	31.67 ± 1.28 ^{ab}	29.77 ± 2.79 ^a	34.17 ± 0.82 ^{ab}
	28 °C ^C	37.33 ± 4.64 ^b	36.90 ± 0.62 ^{ab}	36.57 ± 1.37 ^{ab}
	37 °C ^A	17.33 ± 0.82 ^c	19.70 ± 1.04 ^c	20.97 ± 2.26 ^c
Culture type	STA ^B	37.33 ± 4.64 ^b	36.90 ± 0.62 ^b	36.57 ± 1.37 ^b
	AG ^A	21.77 ± 1.64 ^a	20.33 ± 1.85 ^a	16.00 ± 0.29 ^a

Explanations: Letters, i.e., lowercase (a, b, c) or capital (A, B, C) denote the means that form homogenous groups (HSD–Tukey post-hoc test for multivariate ANOVA). When two compared means were assigned the same letter (e.g., a or A), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g., a and b, or A and B), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$); F + G—cultures with feathers and glucose addition; F + X—cultures with feathers and xylose addition; STA—stationary cultures; AG—agitated cultures.

3.3.2. Effect of Culture Medium pH on Biodegradation of Chicken Feathers Enzymatic Activity

The dynamics of chicken feather biodegradation by geophilic strains of *Trichophyton ajelloi* were analyzed in the pH range of 4.5 to 8.5 in 1.0 unit increments, using a culture temperature of 28 °C and 1% feather addition. It was found that all strains tested had the ability to biodegrade keratin in the analyzed pH ranges. However, they differed in the intensity of the process. Up to day 21 of the culture, keratinase activity of all fungal strains in each of the tested variants was low, but steadily increased, reaching a maximum on day 28 of the culture, especially at the initial pH of 8.5. At this time point, keratinase activity was on average 85% higher compared to the activity of this enzyme at pH 4.5. On the other hand, protease activities of the tested strains in general decreased until day 21 of the culture and then increased. Protease activity in cultures with lower initial pH was on average 17% and 41% higher compared to cultures with pH 6.5 and 8.5. At the lowest initial pH, i.e., 4.5, keratinase activity increased throughout the experiment and was the highest in the culture of strain III. Disulfide reductase activity increased significantly, starting from day 28 of the culture. This effect became apparent in the cultures of all strains tested and was independent of the initial medium pH. The highest activity of this enzyme was recorded in the culture of strain XII with an initial medium pH of 4.5. It was higher than the activity in the other experimental variants by an average of 80% (Figure 3 and Supplementary Table S3).

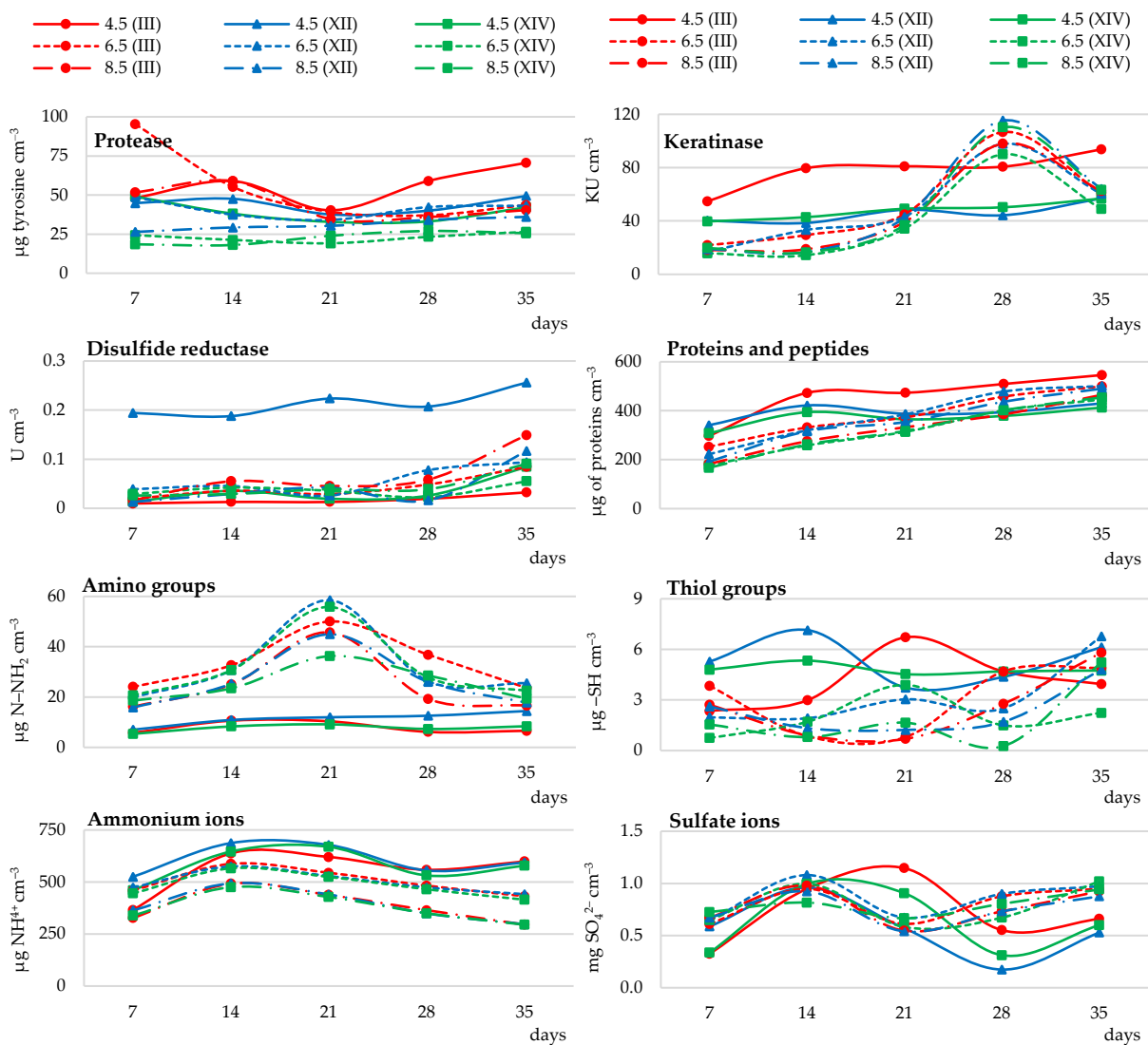


Figure 3. Dynamics of changes in enzymatic activity and released organic and mineral keratinolysis products in different initial medium pH values analyzed in cultures of three *Trichophyton ajelloi* strains III, XII, and XIV.

Release of Soluble Proteins, Peptides, and Amino Acids

The release of soluble proteins and peptides significantly increased in the cultures with higher baseline pH (6.5 and 8.5), while it generally decreased when the initial pH was 4.5, especially in relation to strains XII and XIV. This was an average increase of 122% at pH 6.5 and 160% at pH 8.5 compared to the initial time point. The total pool of amino acids, as measured by N amino (N-NH₂) content, was 88% higher in the cultures with higher baseline pH compared to cultures with initial pH of 4.5. The increase in amino group content was strongest in the cultures with an initial pH of 6.5. The maximum release of amino groups, occurred on day 21 of the culture of the tested fungal strains. Increasing the pH of the culture medium, on the other hand, reduced the release of thiol groups in the cultures of *Trichophyton ajelloi* strains by an average of 42% at pH 6.5 and 52% at pH 8.5, and the dynamics of their release varied depending on the culture time and fungal strain (Figure 3 and Supplementary Table S3).

Ammonium Ion Release and Sulfate Ion Generation

Secretion of mineral forms of nitrogen, i.e., ammonium ions was stimulated most strongly in cultures with an initial medium pH of 4.5 and was the weakest at an initial pH

of 8.5. The content of ammonium ions in cultures with an initial pH of 4.5 was, on average 17% higher compared to the content of these ions at pH 6.5 and by 52% at pH 8.5. By day 14 of the culture, a significant increase in NH_4^+ concentration in the medium was recorded. After this time point, there was a slow but significant decrease in the concentration of ammonium ions in the cultures of all 3 strains, persisting until day 28 of the experiment. Sulfate secretion in the tested pH variants significantly increased until day 14 of the culture of all tested fungi. It was on average higher at baseline pH of 6.5 and 8.5 by 27% and 20%, respectively, compared to 4.5. Between days 14 and 21 of the culture, SO_4^{2-} ion content decreased and then increased significantly until day 35 of the culture. Sulfate production was stimulated most strongly in cultures at pH = 6.5. The exceptions were cultures of fungi III and XVI at pH = 4.5, in which the concentration of these ions increased until day 21 of the culture, transiently decreased, and from day 28 of the culture increased again (Figure 3 and Supplementary Table S3).

Changes in Medium pH

It was shown that pH of the culture media in the first week of the experiment, regardless of the initial pH value, increased to approx. 8.0. Culture fluid pH in the variants with baseline pH of 6.5 and 8.5 was the highest and remained stable until day 21 of the culture, after which it slightly decreased. For variants with an initial pH = 6.5, the pH values ranged from 8.42 to 9.24 (strain No. III), 7.74–8.86 (strain No. XII), 8.45–9.18 (strain No. XIV), and for variants with an initial pH = 8.5—8.61–9.32 (strain No. III), 8.36–9.08 (strain No. XII), 8.68–9.28 (strain No. XIV) (Table 3).

Feather Weight Loss

The degree of chicken feather waste decomposition was the highest when the initial medium pH was the lowest (pH = 4.5). It was 37% in cultures of all fungal strains incubated under these conditions (Table 4). The strongest solubilization of feathers was recorded for strain III. In most experimental variants, the highest but statistically insignificant feather weight loss was recorded in cultures of this *Trichophyton ajelloi* strain. Increasing medium pH to 8.5 reduced the efficiency of decomposition of chicken feather waste by 27% (Table 4).

3.3.3. Effect of Culture Medium Temperature on Chicken Feather Biodegradation

Enzymatic Activity

Trichophyton ajelloi strains at all three temperatures tested differed in the biodegradation activity of chicken feather waste. It was shown that a temperature of 20 °C promoted their proteolytic activity. This activity was higher, on average by 79%, than the activity of this enzyme in culture fluids collected from cultures incubated at 28 °C and 37 °C. Caseinolytic protease activity in each temperature variant increased until day 14 of the culture, after which a gradual decrease was recorded especially in cultures incubated at 20 °C. In cultures incubated at 28 and 37 °C, the activity of this enzyme increased again after day 21 of the culture. Keratinase activity was the highest in strain III cultures at 28 °C and was on average higher by 48% throughout the study period compared to other variants. Increasing the culture temperature did not significantly stimulate an increase in the activity of this enzyme as did disulfide reductase activity. Disulfide reductase activity was the highest in cultures of strain XII growing at 28 °C. This activity was on average 456% and 187% higher than the activity of this enzyme in cultures incubated at 20 °C and 37 °C, respectively. Temperature of 37 °C slightly stimulated disulfide reductase activity starting from day 21 of the culture (Figure 4 and Supplementary Table S4).

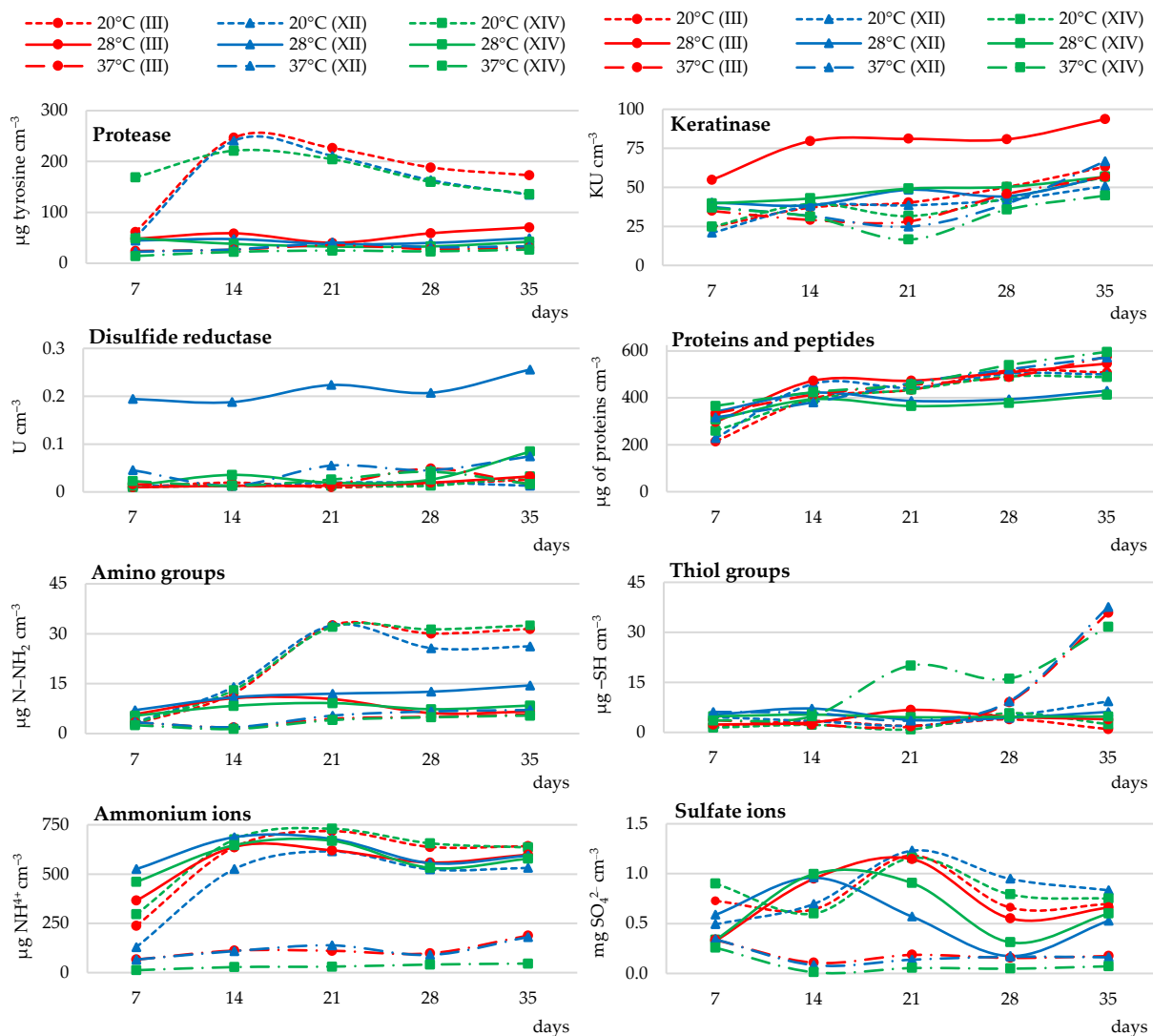


Figure 4. Dynamics of changes in enzymatic activity and released organic and mineral keratinolysis products in different culture temperatures of three *Trichophyton ajelloi* strains III, XII, and XIV.

Release of Soluble Proteins, Peptides, and Amino Acids

The release of soluble proteins and peptides increased steadily throughout the culture of all fungal strains at all temperatures. The lowest concentrations of these feather decomposition products were recorded in cultures incubated at 28 °C, especially after day 14 of culture. The highest accumulation of soluble proteins and peptides was recorded in the last week of the experiment when the incubation temperature was 37 °C. Amino acid content, as measured by the concentration of amino groups, increased until day 21 of the culture at 20 °C and remained at the same, stable level until the end of the experiment. On average, it was 58% higher than the content of these compounds in cultures conducted at 28 °C and 80% higher than at 37 °C. The overall concentration of sulfur amino acids, as measured by the level of thiol groups in the medium, was the highest in cultures incubated at 37 °C especially after day 21 of the culture (Figure 4 and Supplementary Table S4).

Ammonium Ion Release and Sulfate Ion Generation

The concentration of ammonium ions in all fungal cultures, incubated at three different temperatures, increased until day 14 of the culture. After this time, the release of these ions continued to raise in cultures incubated at 20 and 37 °C until day 21 of the culture. At the same time, it was higher than the cultures incubated at 37 °C by an average of 60%.

The concentration of sulfate ions increased for the first 14 days of the culture, reaching the highest level in cultures incubated at 28 °C. Later, only the temperature of 20 °C had a stimulating effect on the secretion of sulfate ions in the cultures of all 3 fungal strains. Accumulation of ammonium and sulfate ions was the lowest in cultures incubated at 37 °C. In comparison to 20 °C, this was on average 84% and 82% lower, respectively (Figure 4 and Supplementary Table S4).

Changes in the pH of Culture Fluids

In all temperature variants, the pH of the cultures increased to values above 6.0 during the first week of the experiment. The increase in pH was the highest in cultures incubated at 20 °C, while the lowest in cultures incubated at 37 °C. This corresponded to pH values ranging for a temperature of 20 °C from 7.76 to 9.10 (strain No. III), 6.99–8.92 (strain No. XII), 8.08–9.08 (strain No. XIV), and 6.39–6.92 (strain No. III), 6.35–6.67 (strain No. XII), and 6.05–6.20 (strain No. XIV) for 37 °C. Slight changes in pH were also recorded in cultures incubated at 28 °C in the range of 7.81–8.90 (strain No. III), 8.51–8.79 (strain No. XII) and 8.44–8.82 (strain No. XIV) (Table 3).

Feather Weight Loss

Significantly higher feather weight loss due to keratin biodegradation, averaging 37%, was recorded in cultures incubated at 28 °C. In fungal cultures incubated at 37 °C, it ranged from 17 to 21%. With respect to the highest feather weight loss, it was an average reduction in biodegradation efficiency of 48% (Table 4).

3.3.4. Effect of Culture Method on Chicken Feather Biodegradation

Enzymatic Activity

It was found that there was a decrease in proteolytic activity in agitated cultures of all strains tested. This trend was evident across all analysis time points. On the other hand, keratinase activity was stimulated by culture agitation, especially up to day 21 of incubation. This particularly concerned strains III and XII. In addition, it was shown that protease activity was the lowest in all cultures on day 21 of fungal growth, when keratinase activity was high. Both activities were significantly the highest in cultures of strain III grown under static conditions in mineral medium with 1% feathers, pH = 4.5 and an incubation temperature of 28 °C. Keratinase and protease activities were higher than the activity of these enzymes in agitated cultures of this fungus strain by an average of 39% and 69%, respectively (Figure 5 and Supplementary Table S5).

Release of Soluble Proteins, Peptides and Amino Acids

Conducting submerged cultures generally had a favorable effect on the release of soluble proteins and peptides by the studied fungi. Their concentration steadily increased during the culture. This was an average increase of 18% in agitated cultures and 47% in stationary cultures compared to the initial time point. Significantly higher content of protein products was recorded in the culture of strain III (Figure 5 and Supplementary Table S5). The content of amino acids in these cultures, measured by amino group concentration, was significantly higher compared to the stationary cultures by an average of 88%. The concentration of NH₂ groups in the cultures of all 3 fungal strains increased until day 35 of culture, reaching a significantly higher level than at earlier time points by an average of 62% and 337% in stationary and agitated cultures, respectively. The stimulating effect of the release of thiol groups in the submerged cultures was detected at the initial and final time points of the culture, i.e., until day 21 and after day 28 for all fungal strains. On the other hand, a reduction in the ability of the tested strains to release –SH groups was noted between days 21 and 28 of incubation with agitation (Figure 5 and Supplementary Table S5).

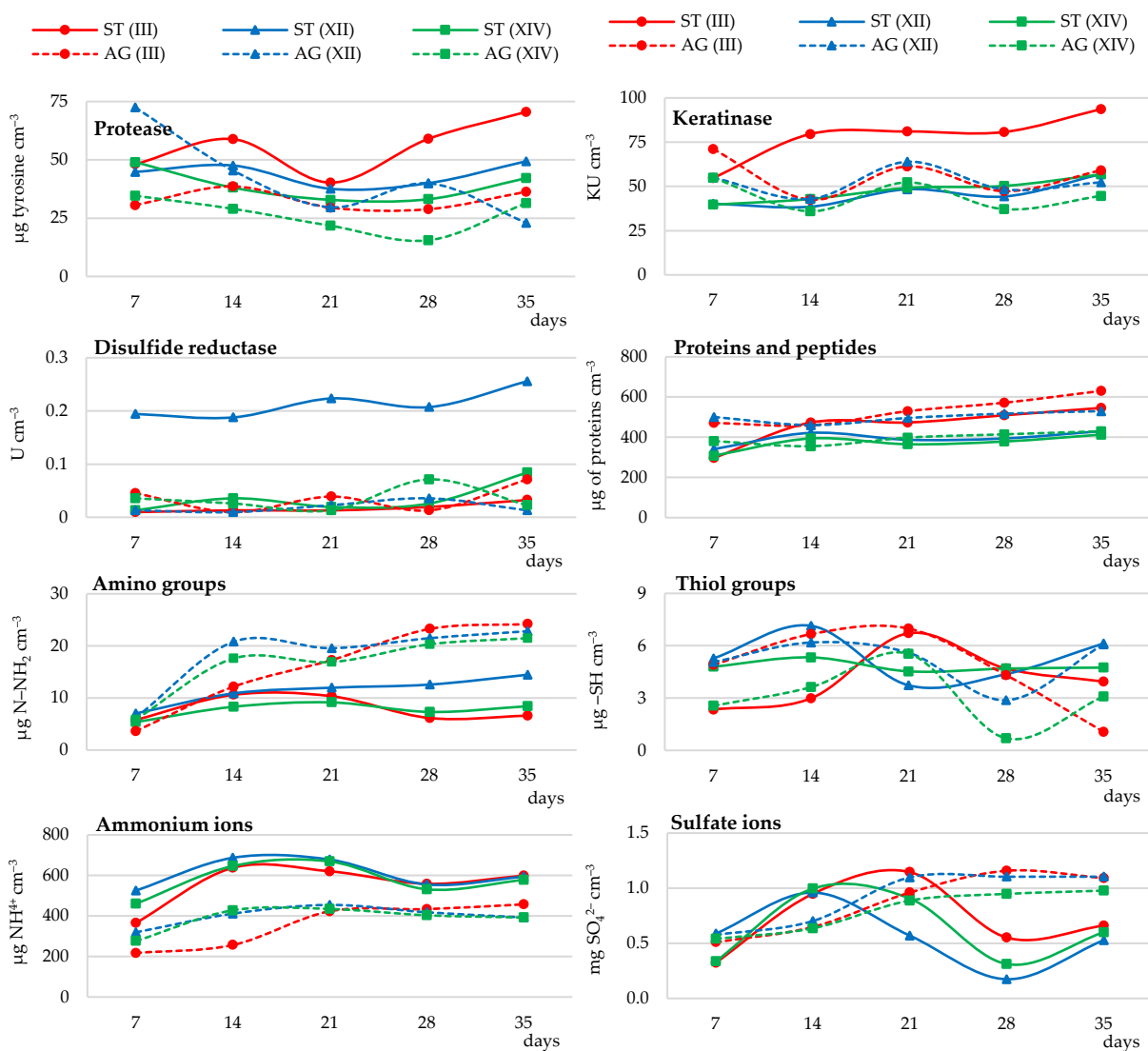


Figure 5. Dynamics of changes in enzymatic activity and released organic and mineral keratinolysis products in different culture methods (agitated—AG and stationary—ST) analyzed for three *Trichophyton ajelloi* strains III, XII, and XIV.

Ammonium Ion Release and Sulfate Ion Generation

The release of ammonium ions in the agitated cultures was significantly lower by an average of 34% compared to the stationary cultures at all experimental time points of the three tested strains. The release of these ions in both culture variants increased until day 21, and then decreased. Their highest concentration was recorded in the culture of strain XII. Accumulation of sulfate ions in the agitated cultures was particularly pronounced after day 21 of the culture. With respect to non-agitated cultures, the concentration of these ions gradually increased until day 21 and after day 28 of the culture (Figure 5 and Supplementary Table S5).

Changes in the pH of Culture Fluids

Culture fluids from agitated cultures had lower pH values by day 21 of the culture. After this time, the pH of the fluids remained constant in both types of the culture. The reported pH values ranged from 7.68 to 8.76 (strain No. III), 8.23–8.98 (strain No. XII), 8.19–8.93 (strain No. XIV) in agitated cultures, and 7.81–8.90 (strain No. III), 8.51–8.79 (strain No. XII), 8.44–8.82 (strain No. XIV) in stationary cultures (Table 3).

Feather Weight Loss

Agitation of the culture caused a significant decrease in the efficiency of chicken feather biodegradation by the tested *Trichophyton ajelloi* strains, on average by 52%. This corresponded to a feather weight loss of 16–22% (Table 4).

3.3.5. Amino Acid Composition in Optimized Cultures

The analysis of amino acid composition of 18-day culture fluids of the *T. ajelloi* strain III showed that tryptophan was the most abundant amino acid in almost all culture fluids, with the exception of culture fluid with 1.0% glucose, where proline was the dominant amino acid. Aspartate and cysteic acid were also abundant. The culture fluid with 1.0% xylose not only had the highest content of tryptophan but also of methionine sulfonate. Of all the culture fluids analyzed, medium from the culture incubated at 37 °C was characterized by increased levels of all tested amino acids except proline, cysteic acid, and methionine sulfonate. The fluid from agitated culture contained a high quantity of isoleucine and histidine in its composition. The richest source of amino acids was determined in the fluid from *Trichophyton ajelloi* cultures incubated at 37 °C, while the poorest was the fluid from cultures at 20 °C (Table 5).

Table 5. Amino acid composition [$\mu\text{g g}^{-1}$] of 18-day culture fluids of *Trichophyton ajelloi* strain III; feathers + glucose (F + G); feathers + xylose (F + X); agitated culture (AG).

Amino Acids	Optimized Parameters					Total
	20 °C	37 °C	F + G	F + X	AG	
Asp	33.30	65.30	39.00	50.10	52.10	239.80
Thr	8.30	31.00	11.60	19.90	20.40	91.20
Ser	25.60	35.80	25.20	31.10	19.80	137.50
Glu	20.60	93.10	31.00	69.60	49.20	263.50
Pro	13.10	18.40	128.00	0.00	12.80	172.30
Gly	18.50	42.30	14.30	30.60	22.60	128.30
Ala	6.00	42.20	10.70	18.40	27.00	104.30
Cyst. acid	63.60	11.00	48.30	32.00	37.80	192.70
Val	2.90	34.10	10.10	21.70	15.40	84.20
Sulf met	4.58	9.45	5.73	9.69	7.04	36.49
Ile	2.20	28.60	8.00	16.00	29.90	84.70
Leu	4.30	46.00	6.80	26.00	18.70	101.80
Tyr	0.00	24.80	5.20	13.50	8.20	51.70
Phe	4.40	23.70	0.00	10.20	10.40	48.70
His	8.00	6.50	5.40	3.80	10.90	34.60
Lys	10.40	44.10	11.90	21.50	28.60	116.50
Arg	5.80	35.30	5.80	14.90	7.80	69.60
Trp	132.00	139.00	87.00	244.00	129.00	731.00
Total	363.58	730.65	454.03	632.99	507.64	

3.4. Statistical Evaluation of Culture Condition Optimization

The obtained results, subjected to principal component analysis in order to explain the relationship between the indicators of fungal biodegradation of post-production chicken feathers and the optimized parameters of fungal culture, showed that the applied model explained 54.31% of the variability by two principal components (PC1: 35.03% and PC2: 19.28%). The loading plot (Figure 6) shows the correlation structure of the analyzed

variables, i.e., protease, keratinase and disulfide reductase activities, concentration of soluble proteins and peptides, amino and thiol groups, and ammonium and sulfate ions, pH changes and feather weight loss. Location of the dots on the score plot grouped optimized breeding conditions, i.e., an easily accessible source of carbon and energy, different amounts of chicken feathers, different initial pH of the medium, temperature, and breeding method in relation to the parameters (variables) tested. The results demonstrated the association of keratinase activity, feather weight loss, and sulfate and ammonium ion concentrations with high content of chicken feather waste (1.5 and 2%) (observation dots). In addition, this analysis indicated significantly positive correlations between these variables. The release of amino groups, changes in pH and protease activity (variables on the loading plot) depended mainly on the higher initial pH, i.e., 6.5 and 8.5, and on culture at 20 °C (dots on the score plot). The concentration of soluble proteins and peptides and thiol groups significantly depended on the presence of an easily available carbon and energy source, i.e., xylose and glucose. The significantly positive correlation between these variables and keratinase activity indicated that this enzyme played a crucial role in the release of organic breakdown products of native keratin (soluble proteins and peptides, as well as amino and thiol groups) and indirectly also inorganic sulfur compounds (sulfates). Based on the presented data, it could be concluded that protease activity, compared to keratinase, was less important in the process of feather keratinolysis by the tested fungal strains, and the temperature of 37 °C was not conducive to their biodegradation activity (Figure 6).

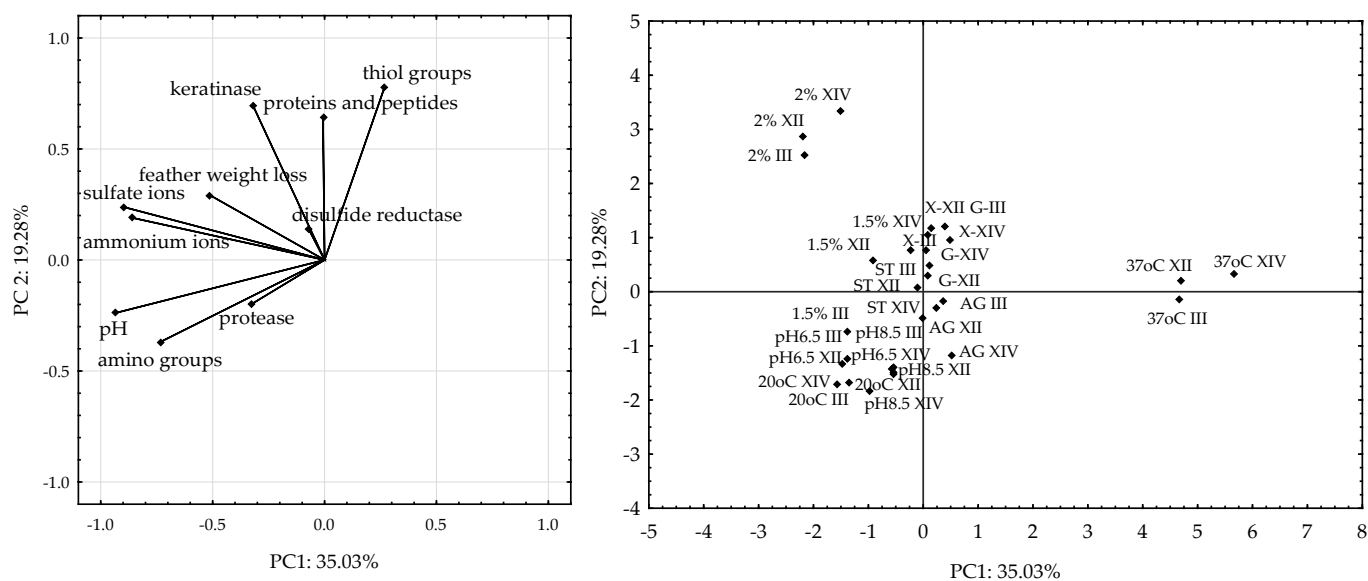


Figure 6. PCA loading plot and score plot demonstrating relationships between fungal keratinolysis indicators, i.e., enzymatic activity, concentration of soluble proteins, peptides, amino acids, ammonium and sulfate ions, as well as feather weight loss, different culture conditions, and medium composition in *Trichophyton ajelloi* cultures.

The multivariate ANOVA (Table 6) showed significant differences between *T. ajelloi* strains in the release dynamics of individual keratinolysis products and keratinolytic enzyme activity in individual optimization variants. Analyzing the results, it can be concluded that the significantly different and highest parameters of keratinolytic activity, measured by keratinase and protease activity under optimized conditions concerned strain No. III (Table 6). The release of high concentrations of keratinolysis organic products, i.e., soluble proteins, peptides, and amino acids, as measured by the content of amino and thiol groups, was significantly different in cultures of strains III and XII. It was also shown that strain XII, in contrast to other *Trichophyton ajelloi* strains, showed the highest mineralization abilities. This was expressed in significantly higher concentrations of ammonium and sulfate ions in most of the optimized cultures compared to the remaining strains. This is

important from a fertilization point of view and translates into the future use of this strain in obtaining feather hydrolysates (biopreparations) with biofertilizer properties (Table 6).

Table 6. Differences in the ability of *Trichophyton ajelloi* strains to biodegrade chicken feather waste.

Parameters	<i>Trichophyton ajelloi</i> Strains		
	III	XII	XIV
Protease [$\mu\text{g tyrosine cm}^{-3}$]	59.14 \pm 5.02 ^b	56.41 \pm 4.73 ^a	54.78 \pm 5.60 ^a
Keratinase [KU cm^{-3}]	58.99 \pm 4.08 ^b	53.41 \pm 3.42 ^a	53.79 \pm 3.85 ^a
Disulfide reductase [U cm^{-3}]	0.04 \pm 0.01 ^a	0.05 \pm 0.01 ^c	0.04 \pm 0.01 ^b
Proteins and peptides [$\mu\text{g proteins cm}^{-3}$]	559.10 \pm 21.58 ^a	551.86 \pm 18.61 ^a	534.88 \pm 23.57 ^b
Amino groups [$\mu\text{g N-NH}_2 \text{ cm}^{-3}$]	18.72 \pm 0.82 ^a	18.65 \pm 0.75 ^a	18.19 \pm 0.60 ^b
Sulphydryl groups [$\mu\text{g -SH cm}^{-3}$]	5.57 \pm 0.58 ^b	7.02 \pm 0.75 ^a	6.80 \pm 0.73 ^a
Ammonium ions [$\text{NH}_4^+ \text{ cm}^{-3}$]	472.47 \pm 24.80 ^a	475.80 \pm 22.31 ^a	441.80 \pm 21.06 ^b
Sulfate ions [$\text{mg SO}_4^{2-} \text{ cm}^{-3}$]	0.76 \pm 0.03 ^b	0.78 \pm 0.03 ^c	0.71 \pm 0.03 ^c
pH [$-\log_{10} [\text{H}^+]$]	8.41 \pm 0.09 ^a	8.41 \pm 0.10 ^a	8.32 \pm 0.09 ^b

Explanations: Letters, i.e., a, b, and c denote means forming homogenous groups (HSD–Tukey post–hoc test for multivariate ANOVA). When two compared means were assigned the same letter (e.g., a), they did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means were given different letters (e.g., a and b or A and B, then they differed significantly from each other ($\alpha = 0.05$)).

Testing different culture conditions and medium composition to increase the efficiency of *T. ajelloi* strains regarding the biodegradation of post-production chicken feathers for practical purposes led to several concluding observations: • For all fungal strains tested, the most optimal conditions for high protease activity occurred in culture medium with 1% glucose, 1% chicken feathers, pH 4.5, incubation temperature of 28 °C, and without glucose but at 20 °C; • For keratinase activity, the most optimal conditions, significantly different from the other optimized parameters, were provided by cultures with and without glucose with 1% chicken feathers, pH 4.5, and an incubation temperature of 28 °C, as well as in the presence of 2% chicken feathers; • Disulfide reductase activity was significantly the highest in stationary cultures with 1% chicken feathers, pH 4.5 and an incubation temperature of 28 °C; • Release and accumulation of soluble proteins and peptides in stationary cultures with the addition of 1% feathers and initial pH of 4.5 was enhanced by the addition of simple C and energy sources, mainly xylose, and incubation temperature of 28 °C; • Increasing feather concentration to 2% and glucose addition stimulated the release of higher amounts of these readily hydrolyzable N organic bonds; The release of amino acids, as measured by the concentration of amino groups, was generally favored by all culture conditions and medium composition, but most highly by starting pH of 6.5, 1% feathers, and incubation temp. of 20 and 28 °C; • Thiol groups were released efficiently in cultures without glucose and xylose with 2% feathers at substrate pH of 4.5 and an incubation temp. of 28 °C, and with the addition of glucose and 1% feathers at 37 °C; • Sulfate ion release was stimulated by all culture conditions (except 37 °C), in particular the addition of 2% chicken feathers, temperature of 28 °C and an initial medium pH of 4.5; Concentration of these compounds was recorded at an average of 1.21 mg cm^{-3} ; • Ammonium ions accumulated in the highest concentration in cultures conducted in the basal control medium (average 0.58 mg cm^{-3}); • Feather decomposition, as measured by the loss of this substrate, was the highest in the medium with the addition of 2% feathers, pH 4.5 and incubation temperature of 28 °C (Figure 7).

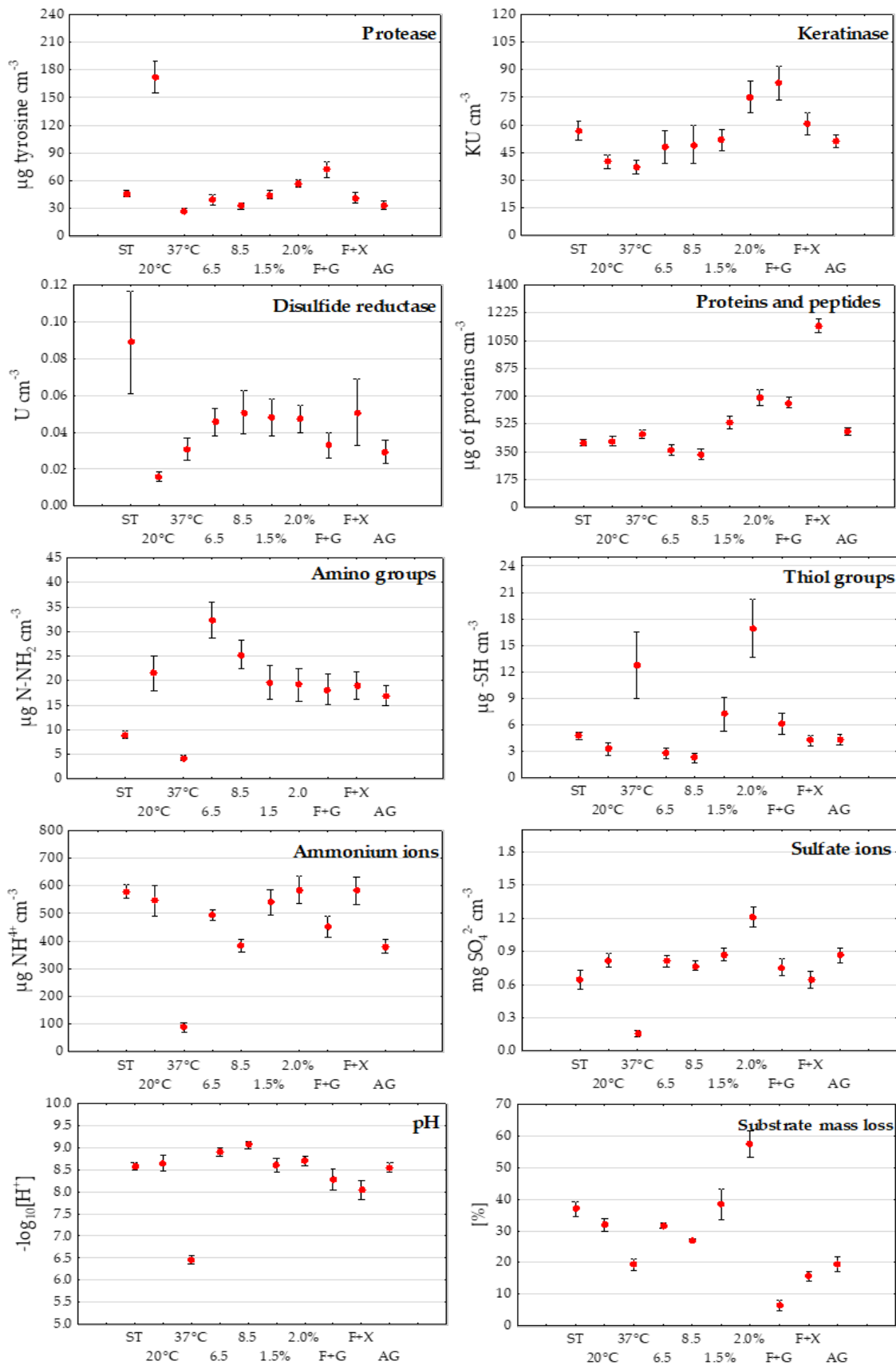


Figure 7. Summary of significant differences within the analyzed cultivation conditions of *Trichophyton ajelloi*; $\alpha = 0.05$.

4. Discussion

The subject of this study concerned the assessment of geophilic *Trichophyton ajelloi* strains, little known in terms of native keratin decomposition, for their utilization in feather waste management, along with a proposal to optimize the biodegradation conditions of these wastes, enabling obtaining biopreparations of high fertilizing quality.

The optimized medium composition and culture conditions involved the use of an additional readily available carbon and energy source, different feather concentrations, different temperature and pH of the medium, and the culture method. These included optimization of the secretion of enzymes active in keratinolysis, i.e., protease, keratinase and disulfide reductase, products of native keratin decomposition, i.e., soluble proteins and peptides, the total pool of amino acids, sulfate and ammonium ions, and the loss of feather mass.

According to Liang, et al. [47], the composition of the medium and culture conditions were very important in the process of keratinolytic enzyme production by fungi. In our preliminary experiments, the selected geophilic fungal strains of *Trichophyton ajelloi* showed better growth at 28 °C on Sabouraud medium rich in readily available C and energy than MEA medium, while they did not grow at 37 and 50 °C. Preliminary characterization of the hydrolytic properties of *Trichophyton ajelloi* fungi, expressed as the enzymatic index, has demonstrated that these fungi have a high protein degradation capacity, lower fat degradation capacity and a lack of amylolytic abilities, similar to other keratinolytic fungi from the dermatophyte group [48] and *Chrysosporium keratinophilum* [49]. Kunert [48] have reported, however, that while lipolytic abilities of keratinomycetes are common, there are exceptions with regard to amylolytic activity and some dermatophytes also show such abilities. However, they are considered rudimentary [48].

4.1. Feather Weight Loss

Bohacz [12] defined the loss of feather waste as a reliable indicator of the management and biodegradation of post-production feathers by environmentally friendly approach, i.e., biological methods using microorganisms, and defined it as an “economic coefficient.” Optimization of culture conditions showed that the tested *Trichophyton ajelloi* strains most effectively degraded feather waste at its 2.0% concentration. Moreover, temperature of 28 °C, an initial medium pH = 4.5, static culture conditions, and a lack of readily available carbon sources were favorable conditions for this substrate decomposition. Substrate degradation after 42 days of growth in these cultures was 57, 59, and 56% for strains No. III, XII, and XVI, respectively. Biodegradation efficiency of native feather keratin by the tested strains of *Trichophyton ajelloi*, as measured by keratin substrate weight loss, was similar or lower than that of other keratinolytic fungal species previously studied by Bohacz, et al. [14] and Bohacz [12]. The cited works showed that fungi of the species *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum*, isolated from pellets of predatory birds, decomposed in static cultures containing native feather waste as the only source of C and energy, during the same time (42 days), from 44 to 76% of native feather keratin mass, while *Aphanoascus fulvescens*, isolated from soil, 50–65% of the mass of this substrate. Some keratinolytic fungi, such as those isolated from soils in rook colonies (*Arthroderma tuberculatum* and *Arthroderma multifidum*), decomposed from 27 to 34% of the weight of native chicken feathers already after 28 days of growth in stationary cultures [14]. Kornilłowicz–Kowalska [30] noted that the environment of origin may be one reason for the differences in keratinolytic activity of fungi. The latter author showed that fungi derived from acidic soils were characterized by a relatively lower keratinolytic activity than fungi isolated from neutral and alkaline soils. Perhaps the reason for the slightly lower keratinolytic activity of *T. ajelloi* strains compared to the strains of *Aphanoascus* spp. and *Chrysosporium* spp. was their habitat: Cambisol pH = 5.4 for *Trichophyton ajelloi* strains [26], and Phaeozem pH = 7.28 for *Aphanoascus fulvescens* and *Chrysosporium articulatum* strains [12], and pellets of birds of prey with a pH in the range of 5.93–7.50 for *Aphanoascus fulvescens* and *Chrysosporium tropicum* [13].

Modification of breeding conditions may accelerate or limit the weight loss of feather waste. Călin, et al. [50] reported that the average weight loss of feathers subjected to additional high-temperature thermal exposure, i.e., containing denatured keratin, in cultures of fungi of the genera *Trichophyton* and *Chrysosporium* was about 75% after 21 days. In turn, in this study, the biodegradation of feather keratin, measured by the loss of feather mass, was significantly limited by the addition of glucose to fungal cultures. The weight loss of feathers in these conditions was on average 5%, which could be explained by the utilization of an easily accessible source of C and energy to build mycelial biomass, which was very abundant in these cultures. In addition, agitated cultures (submerged growth) reduced the rate of chicken feather degradation by *Trichophyton ajelloi* strains by an average of 49%, and it ranged from 16.0 to 22.0%. Research by Muhsin and Hadi [51] showed that during 21 days of agitated cultures, *Trichophyton mentagrophytes* decomposed about 22% of feathers, *Microsporium gypseum* 7%, *Chrysosporium pannicola* 18%, and *Aspergillus flavus* as much as 32%.

4.2. Enzymatic Activity under Optimized Culture Conditions

According to Li [52], complete biodegradation of keratin requires an appropriate microorganism strain, properly optimized culture conditions and a keratinase-degrading system, which includes an enzyme mixture.

Considering the influence of easily available carbon and energy sources, i.e., glucose and xylose, on the overall keratinolysis process, including proteolysis, sulfitolysis, and keratinolytic attack, it was shown that the addition of glucose mainly stimulated protease and keratinase activity in the cultures of the three *Trichophyton ajelloi* strains. Similar results were obtained by Anbu, et al. [38], who showed high keratinase activity in cultures of *Trichophyton* sp. HA-2 in the presence of glucose, but complete inhibition in the presence of xylose. Kačínová, et al. [20] proved that introducing an easily digestible carbon source into the culture medium at a dose of 1.0% stimulated keratinolytic activity of *T. ajelloi*. The stimulating effect on glucose was significantly higher than that of sucrose, fructose and mannitol used by these scientists. The addition of easily digestible carbon and energy sources in the form of glucose or xylose to culture does not always increase keratinase activity. This applies in particular to the activity of these enzymes in cultures of non-keratinophilic strains, i.e., those not belonging to dermatophytes and fungi of the genus *Chrysosporium* specialized in native keratin degradation. This was demonstrated by Mini, et al. [53] and Anbu, et al. [54] in cultures of *Aspergillus flavus* and *Scopulariopsis brevicaulis* strains, who reported a decrease in keratinase activity in the presence of glucose and xylose, respectively. Anbu, et al. [54] and Singh [55] explained this effect by the catabolic repression of proteolytic enzymes by exogenous carbohydrates. Anbu, et al. [56] reported the accumulation of organic sulfur-containing end products as another reason for the inhibition of keratinase activity in fungal cultures. The temperature and pH of the culture, as well as substrate concentration were significant factors influencing the activity of keratinase and protease involved in the decomposition of native feather keratin. Optimization of keratinase and protease activity occurs at different temperatures and pH, as well as with different amounts of feather waste. Considering the effect of the concentration of chicken feather waste on the increased release of keratinolytic and proteolytic enzymes, El-Ghonemy and Ali [57] showed that higher production of keratinase and protease by the *Aspergillus* sp. strain DHE 7 was favored by increased native feather keratin concentration (2%). On the other hand, a further increase in feather concentration to 3, 4, and 5% inhibited keratinase activity, but not the release of soluble proteins and peptides. It is possible, as El-Ghonemy and Ali [57] assumed, that this effect was related to the activity of fungal proteases. As opposed to keratinases, whose secretion is induced by the presence of a substrate, proteases belong to constitutional enzymes and their secretion is induced by nutritional stress, i.e., the lack of carbon, nitrogen, and energy sources [58]. Anbu, et al. [54] reported that extremely acidic (pH = 4.5) and alkaline (pH = 11) pH was not conducive to enzyme production. Anbu et al. [38] reported pH = 8 as optimal for keratinase activity of

the dermatophyte *Trichophyton* sp. HA-2. This was not consistent with the results of our research, which showed that keratinase activity was the highest at the substrate's initial pH of 4.5 and temperature of 28 °C. It is known, however, that *Trichophyton ajelloi* belongs to the acidophilic fungi, preferring acidic environments [59]. The results of our research also indicated a lower optimum temperature for keratinase activity of the tested *T. ajelloi* strains compared to the results of other authors [20,38]. The optimum temperature for the production of keratinase determined by us was 28 °C. The same fungus species was tested by Kačínová, et al. [20], who showed the highest production of keratinase at slightly higher than the above-mentioned temperature (30 °C); however, at the same time, these authors reported high keratinase production at 37 °C [20]. A similar optimum (35 °C) for keratinase activity, closer to the unidentified *Trichophyton* sp. HA-2 strain, was also recorded by Anbu, et al. [38]. Filamentous fungi are aerobic organisms and their growth is favored by aeration. Kanchana [60] showed that culture aeration by shaking promoted keratinase activity of *Aspergillus* sp., and our research demonstrated that agitation also stimulated the release of active proteases. The main difficulty in enzymatic biodegradation of keratin is the presence of numerous disulfide bridges in the keratin structure [61]. Disulfide reductase is an enzyme involved in breaking down disulfide bridges during biodegradation of native keratin (including feathers), which has previously been detected mainly in bacterial cultures [1,62]. There is little information in the literature regarding the release of these enzymes by keratinolytic fungi. This was indicated by Bhari et al. [63], who reported that both keratinase and disulfide reductase were secreted by bacteria, actinomycetes, and keratinolytic fungi, and their synthesis was induced by the presence of a keratin substrate. Our research showed that disulfide reductase was synthesized by *T. ajelloi* strains and production of this enzyme was favored by the initial pH of the substrate equal to 4.5, 1% feathers and culture temperature of 28 °C. As reported by Rahayu et al. [64], disulfide reductase interacted synergistically with keratinase, which led not only to the reduction of disulfide bridges, but also to the release of proteins containing disulfide bonds. The synergistic activity of these enzymes was also confirmed in the present study. However, this was not a statistically significant effect, as opposed to the interaction of these enzymes in bacterial cells.

4.3. Soluble Proteins and Peptides, Amino Acids and Mineral Biodegradation Products of Chicken Feather Keratin

Some authors [65] reported that proteolysis and sulfitolysis in the process of keratinolysis were simultaneous and complementary phenomena, leading to high nitrogen and high sulfur feather keratin transformation into valuable products of high nutritional value. Bohacz [12] has emphasized that the fungi themselves present in cultivated soils are natural fertilizing agents due to mineral nitrogen and sulfur forms released during biodegradation of native keratin.

Taking into account the release of organic and mineral bonds during keratinolysis of chicken feathers [12,30,31], the current study considered, often omitted by other authors, the effect of different culture conditions and medium composition on the release of high concentrations of soluble proteins and peptides, amino acids, and ammonium and sulfate ions.

Li [52] determined that the release of soluble proteins, peptides, oligopeptides, and amino acids depended on mutually acting and complementary enzymes. The concentration of these organic products of feather keratin biodegradation by *Trichophyton ajelloi* strains tested in this study increased with culture time, which was consistent with the results of Bohacz [12] in *Chrysosporium articulatum* and *Aphanoascus fulvescens* cultures, and of Maruthi, et al. [66] in *Chrysosporium tropicum* cultures. Soluble proteins and peptides, formed during keratin biodegradation account for the nutritional value of the resulting hydrolysates, which may have applications in animal nutrition [67] and, as reported by Kumari and Kumar [68], also in agriculture due to the presence of amino acids accompanying proteins. Näsholm, et al. [69] believed that amino acids could be absorbed by plants as an N

source. Moreover, soluble proteins, peptides and amino acids released in the keratinolysis process constitute fractions of readily hydrolyzing nitrogen, which would undergo further microbial mineralization when introduced into the soil. In the present study, it was shown that, under optimized culture conditions of *Trichophyton ajelloi* fungi, the quantitative and qualitative amino acid composition of the hydrolysates increased significantly compared to amino acid composition under non-optimized conditions in *Arthroderma tuberculatum* and *Arthroderma multifidum* cultures [14]. Considering different cultivation conditions and medium composition, the release of soluble proteins, peptides, and amino acids varies depending on the strain of the microorganism. The effect of 0.09% glucose concentration on the release of soluble proteins from hair by various species of filamentous fungi was investigated by Kaul and Sumbali [70]. These authors recorded in the cultures of *Chrysosporium pannorum* and *Scopulariopsis brevicaulis* more than a 2-fold increase in protein concentration in the variant with glucose. In the study conducted by El-Ghonemy and Ali [57], the release of proteins during keratinolysis by *Aspergillus* sp. DHE7 increased with increasing concentration of feather waste, despite a decrease in keratinase activity. Elevated protein release was also favored by higher (37 °C) temperatures in *Aspergillus* sp. DHE7 cultures, which was also consistent with the results obtained in this study. As demonstrated by Jain, et al. [71], the release of soluble proteins in optimized cultures of the actinobacterium *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 was favored by the initial pH of 8.0, feather concentration of 2% and the presence of glucose, which was also consistent with the results of our own research. Mehta, et al. [72] reported that in the presence of readily available carbon and energy sources such as glucose, sucrose, and mannitol, keratinase secretion in cultures of *Bacillus sonorensis* decreased, and thus the release of amino acids, i.e., the end product of protein degradation. In the cultures of the tested *Trichophyton ajelloi* fungal strains, stimulation of amino acid release, measured by the level of amino and thiol groups, was shown mainly in the presence of glucose. Galarza, et al. [65] reported that keratinases were involved in the release of thiol and amino groups during keratinolysis. Amino acid release, measured by the level of thiol and amino groups in the cultures of *Trichophyton ajelloi* strains, was the most effective when the initial medium pH was higher (6.5 and 8.5), the concentration of chicken feather waste was 2%, and incubation temperature 37 °C; Mehta, et al. [72] made similar observations in bacterial cultures. Additionally, our research showed that the temperature of 28 and 20 °C also stimulated the release of amino acids in *T. ajelloi* cultures growing on feathers.

Fungi are able to carry out catabolic reactions during keratinolysis, leading to the conversion of cysteine and release of mineral sulfur forms as sulfates and sulfites [48]. Inorganic sulfite released in the process of sulfitolysis plays a role in the reduction of disulfide bridges, contributing to the formation of sulfocysteine, which corresponds to the release of reduced thiols [73]. Many authors in studies on keratinolysis have shown that sulfates are released in the cultures of fungi [12,30,31,48,74], bacteria [62], and actinomycetes. An increase in sulfate content in the medium with increasing culture times was demonstrated by Rajak, et al. [74] in *Chrysosporium indicum*, *Talaromyces trachyspermus*, *Scopulariopsis brevis*, and *Geotrichum candidum* cultures, by Kornilłowicz–Kowalska [30] in cultures of various fungi from the group of geophilic dermatophytes and *Chrysosporium*, and in recent years by Bohacz [12] and Bohacz, et al. [13,14] in cultures of fungi from the *Chrysosporium* group and the genus *Arthroderma*. In the present study, the first attempt to optimize the cultivation conditions of *Trichophyton ajelloi* showed that the accumulation of high concentrations of sulfate ions in the medium was mainly favored by the temperature of 28 °C, initial pH of 4.5 and feather waste concentration of 2%, while the release of ammonium ions by the presence of xylose, 1 and 2% feather concentration, temperature of 20 and 28 °C, and initial pH of 4.5 and 6.5.

The release of ammonium ions was accompanied by alkalization of the culture medium, which was consistent with the results of other authors [12–14,30,75]. The increase in the concentration of these ions, and thus the gradual increase of medium pH was recorded on day 28, according to the data reported by Bohacz [12] for stationary cultures of

Aphanoascus keratinophilus and *Chrysosporium articulatum*, and between days 12 and 14 in stationary cultures of *Arthroderma*, i.e., *Arthroderma multifidum*, and *Arthroderma tuberculatum* at initial pH of 6.5, 1% feathers and incubation temperature of 28 °C [14]. *Trichophyton ajelloi* culture conditions optimized in this study showed that the maximum release of ammonium and sulfate ions occurred in the presence of readily available carbon and energy sources, different feather concentrations, culture temperature, initial medium pH, and culture method between days 14 and 21 of solubilization of native keratin by these fungi. We consider species differences in keratinolytic activity to be the reason for these (relatively small) discrepancies between the results of this and previous works [12–14] on feather keratinolysis by geophilic dermatophytes and Chrysosporia.

The present study is particularly relevant considering the lack of research in the literature on condition optimization for microorganism cultivation in order to obtain ammonium and sulfate ions—important mineral fertilizer components—as a result of feather waste biodegradation. Particularly important is the availability of bioavailable sulfur in the form of sulfates, because soils in Poland are poor in sulfur, as reported in an earlier study by Bohacz, et al. [26]. Therefore, the intensification of research on fungal or bacterial processing of high-nitrogen and high-sulfur waste into fertilizing preparations is the right step towards obtaining new environmentally friendly biofertilizers.

5. Conclusions

Based on the data obtained during the entire experiment, it has been shown that *Trichophyton ajelloi* has a high ability to decompose hard-to-degrade chicken feather waste. *Trichophyton ajelloi*, due to its keratin waste biodegradation ability, may be considered in the management of keratin-rich waste for its reuse. During the fungal biodegradation of feather keratin, among others, mineral and organic forms of nitrogen and sulfur are released and the resulting keratin hydrolysates can therefore be a valuable biopreparation in terms of fertilization. Optimization of the culture conditions and composition of the culture medium of three strains of *Trichophyton ajelloi* fungus, designated as III, XII, and XIV, in order to obtain the most effective parameters for chicken feather biodegradation, showed that all keratinolysis parameters (keratinase activity, protease, disulfide reductase, feather weight loss and content of organic and mineral forms of nitrogen and sulfur) required different culture parameters and medium composition. Considering the hitherto unoptimized culture conditions and medium composition in terms of obtaining a biopreparation with the highest content of ammonium and sulfate ions, it was demonstrated that all culture conditions favored the generation of sulfate ions, in particular the addition of 2% chicken feathers, temperature of 28 °C and an initial medium pH of 4.5. Concentration of these compounds was recorded at an average of 1.21 mg cm⁻³. The basal control medium, i.e., 1% feathers, pH 4.5, 28 °C (an average of 0.58 mg cm⁻³) was conducive to the release of ammonium ions. Keratin hydrolysate obtained by biodegradation of feather keratin by *Trichophyton ajelloi* strain XII had the highest concentration of mineral forms of nitrogen and sulfur and could be considered as a biopreparation for agricultural application. Research in this area is currently the subject of another publication.

Based on the results of the study, it can be concluded that biological methods of keratin waste management provide products with high fertilizing values through which they contribute to the protection of the environment and public health, as they replace economically unprofitable and environmentally unfriendly chemical methods of their management.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijerph191710858/s1>, Table S1: Dynamics of changes in enzymatic activity and secretion of organic and mineral products of chicken feather keratinolysis by *Trichophyton ajelloi* strains with the addition of various carbon sources to the culture medium; Table S2: Dynamics of changes in enzymatic activity and secretion of organic and mineral products of chicken feather keratinolysis by *Trichophyton ajelloi* strains at various concentrations (1.0, 1.5 and 2.0%) of feather waste; Table S3: Dynamics of changes in enzymatic activity and secretion of organic and mineral products of chicken feather keratinolysis by *Trichophyton ajelloi* strains at different initial

pH (4.5, 6.5, 8.5) of the culture medium, Table S4: Dynamics of changes in enzymatic activity and secretion of organic and mineral products of chicken feather keratinolysis by *Trichophyton ajelloi* strains fungi in various culture temperature variants (20, 28, and 37 °C); Table S5: Dynamics of changes in enzymatic activity and secretion of organic and mineral products of chicken feather keratinolysis of by *Trichophyton ajelloi* strains with different culture methods.

Author Contributions: Conceptualization, J.B.; methodology, J.B. and M.M.; software, M.M. and J.B.; validation, J.B. and M.M.; formal analysis, M.M. and J.B.; investigation, M.M. and J.B.; resources, J.B. and M.M.; data curation, M.M. and J.B.; writing—original draft preparation, J.B. and M.M.; writing—review and editing, J.B. and M.M.; visualization, M.M. and J.B.; supervision, J.B.; project administration, J.B.; funding acquisition, J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by subsidies from the Ministry of Education and Science, Poland, for the maintenance and development of research potential (research task RKM/S/21/2021).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data is contained within the article.

Acknowledgments: Research financed by subsidies from the Ministry of Education and Science, Poland, for the maintenance and development of research potential (research task RKM/S/21/2021). The author would like to thank Jan Gawor for identifying the fungi with the sequencing method.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Korniłowicz-Kowalska, T.; Bohacz, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manag.* **2011**, *31*, 1689–1701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Statistics Poland. *Statistical Yearbook of Agriculture*; Statistical Publishing Establishment: Warsaw, Poland, 2021; pp. 178–180.
- OECD-FAO. *Agricultural Outlook 2017–2026*; OECD Publishing: Paris, France, 2017; pp. 131–132. [[CrossRef](#)]
- Journal of Laws 2013, Item 21, Act on Waste of December 14, 2012*; Government Legislative Center: Warsaw, Poland, 2013.
- Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal by-products Regulation). In *Official Journal of European Union*; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2009; pp. 1–33. [[CrossRef](#)]
- Bohacz, J. Lignocellulose-degrading enzymes, free-radical transformations during composting of lignocellulosic waste and biothermal phases in small-scale reactors. *Sci. Total Environ.* **2017**, *580*, 744–754. [[CrossRef](#)]
- Bohacz, J.; Korniłowicz-Kowalska, J. Changes in enzymatic activity in composts containing chicken feathers. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 3604–3612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Korniłowicz-Kowalska, T.; Bohacz, J. Dynamics of growth and succession of bacterial and fungal communities during composting of feather waste. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 1268–1276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bohacz, J. Microbial strategies and biochemical activity during lignocellulosic waste composting in relation to the occurring biothermal phases. *J. Environ. Manag.* **2018**, *206*, 1052–1062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bohacz, J.; Korniłowicz-Kowalska, T. Fungal diversity and keratinolytic activity of fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. *Process Biochem.* **2019**, *80*, 119–128. [[CrossRef](#)]
- Bohacz, J. Changes in mineral forms of nitrogen and sulfur and enzymatic activities during composting of lignocellulosic waste and chicken feathers. *Environ. Sci. Pollut. R* **2019**, *26*, 10333–10342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bohacz, J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World J. Microbiol. Biot.* **2017**, *33*, 13. [[CrossRef](#)]
- Bohacz, J.; Korniłowicz-Kowalska, T.; Kitowski, I.; Ciesielska, A. Degradation of chicken feathers by *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* strains from pellets of predatory birds and its practical aspect. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2020**, *151*, 104968. [[CrossRef](#)]
- Bohacz, J.; Możejko, M.; Kitowski, I. *Arthroderma tuberculatum* and *Arthroderma multifidum* isolated from soils in rook (*Corvus frugilegus*) colonies as producers of keratinolytic enzymes and mineral forms of N and S. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 9162. [[CrossRef](#)]
- Brandelli, A.; Sala, L.; Kalil, S.J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Res. Int.* **2015**, *73*, 3–12. [[CrossRef](#)]
- Łaba, W.; Rodziewicz, A. Biodegradation of keratinous wastes from poultry industry involving bacteria of genera *Bacillus* and *Sarcina*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **2004**, *3*, 109–120. (In Polish)

17. Chao, Y.; Xie, F.; Yang, J.; Lu, J.; Qian, S. Screening for a new *Streptomyces* strain capable on efficient keratin degradation. *J. Environ. Sci.* **2007**, *19*, 1125–1128. [[CrossRef](#)]
18. Syed, D.G.; Lee, J.C.; Li, W.; Kim, C.; Agasar, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 1868–1871. [[CrossRef](#)]
19. Xie, F.; Chao, Y.; Yang, X.; Yang, J.; Xue, Z.; Luo, Y.; Qian, S. Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 344–350. [[CrossRef](#)]
20. Kačínová, J.; Tančínová, D.; Medo, J. Production of extracellular keratinase by *Chrysosporium tropicum* and *Trichophyton ajelloi*. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **2014**, *3*, 103–106.
21. Kumar, J.; Kushwaha, R.K.S. Screening of fungi efficient in feather degradation and keratinase production. *Arch. Appl. Sci. Res.* **2014**, *6*, 73–78.
22. Gopinath, S.C.B.; Anbu, P.; Lakshmpriya, T.; Tang, T.; Chen, Y.; Hashim, U.; Ruslinda, A.R.; Arshad, M.K.M. Biotechnological aspects and perspective of microbial keratinase production. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 140726. [[CrossRef](#)]
23. Śpiewak, R.; Szostak, W. Zoophilic and geophilic dermatophytoses among farmers and non-farmers in Eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2000**, *7*, 125–129.
24. Kačínová, J.; Tančínová, D.; Labuda, R. Keratinophilic fungi in soils stressed by occurrence of animals. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **2013**, *2*, 1436–1446.
25. Bohacz, J.; Kornilłowicz-Kowalska, T. Species diversity of keratinophilic fungi in various soil types. *Cent. Eur. J. Biol.* **2012**, *7*, 259–266. [[CrossRef](#)]
26. Bohacz, J.; Mozejko, M.; Kornilłowicz-Kowalska, T.; Siebielec, G. Impact of ecological factors on the occurrence and spatial-taxonomic structure of keratinophilic fungi and their co-occurrence in arable soils. *Agriculture* **2022**, *12*, 194. [[CrossRef](#)]
27. Kornilłowicz-Kowalska, T.; Kitowski, I.; Iglík, H. Geophilic dermatophytes and other keratinophilic fungi in the nests of wetland birds. *Acta Mycol.* **2011**, *46*, 83–107. [[CrossRef](#)]
28. Ulfig, K. The occurrence of keratinolytic fungi in waste and waste-contaminated habitats. In *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*; Kushwaha, R., Guarro, J., Eds.; Revista Iberoamericana de Micología: Bilbao, Spain, 2000; Volume 17, pp. 44–50.
29. Ciesielska, A.; Bohacz, J.; Kornilłowicz-Kowalska, T.; Stączek, P. Microsatellite-primed PCR for intra-species genetic relatedness in *Trichophyton ajelloi* strains isolated in Poland from various soil samples. *Microbes Environ.* **2014**, *29*, 178–183. [[CrossRef](#)]
30. Kornilłowicz-Kowalska, T. Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. *Acta Mycol.* **1997**, *32*, 51–79. [[CrossRef](#)]
31. Kornilłowicz-Kowalska, T. Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. II. Sulphur and nitrogen balance. *Acta Mycol.* **1997**, *32*, 81–93. [[CrossRef](#)]
32. Cai, C.; Zheng, X. Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **2009**, *36*, 875–883. [[CrossRef](#)]
33. Pylak, M.; Oszust, K.; Frać, M. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Rev. Environ. Sci. Biol.* **2019**, *18*, 597–616. [[CrossRef](#)]
34. World Reference Base of Soil Resources. *International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps*; Update 2015; World Soil Recourses Reports No. 106; FAO: Rome, Italy, 2015.
35. Liu, D.; Paterson, R.R.M. *Chrysosporium*. In *Molecular Detection of Human Fungal Pathogens*, 1st ed.; Liu, D., Ed.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2011; pp. 197–200.
36. De Lima, G.G.; Schoenherr, Z.C.P.; Magalhães, W.L.E.; Tavares, L.B.B.; Helm, C.V. Enzymatic activities and analysis of a mycelium-based composite formation using peach palm (*Bactris gasipaes*) residues on *Lentinula edodes*. *Bioresour. Bioprocess* **2020**, *7*, 1–17. [[CrossRef](#)]
37. Yu, R.J.; Harmon, S.R.; Blank, F. Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Bacteriol.* **1968**, *96*, 1435–1436. [[CrossRef](#)]
38. Anbu, P.; Hilda, A.; Sur, H.W.; Hur, B.K.; Jayanthi, S. Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2008**, *62*, 287–292. [[CrossRef](#)]
39. Anson, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **1938**, *22*, 79–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kornilłowicz, T. Methods for determining keratinolytic activity of saprophytic fungi. *Acta Mycol.* **1994**, *29*, 169–178. [[CrossRef](#)]
41. Holmgren, A. Bovine thioredoxin system: Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 4600–4606. [[CrossRef](#)]
42. Aharonowitz, Y.; Av-Gay, Y.; Schreiber, R.; Cohen, G. Characterization of a thioredoxin-like disulfide reductase from *Streptomyces clavuligerus* and its possible role in β-lactam antibiotic biosynthesis. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 623–629. [[CrossRef](#)]
43. Lowry, O.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *93*, 265–275. [[CrossRef](#)]
44. Schacterle, G.R.; Pollack, R.L. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal. Biochem.* **1973**, *51*, 654–655. [[CrossRef](#)]
45. Ellman, G.L. Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77. [[CrossRef](#)]

46. Nilsson, M.; Andreas, L.; Lagerkvist, A. Effect of accelerated carbonation and zero valent iron on metal leaching from bottom ash. *Waste Manag.* **2016**, *51*, 97–104. [[CrossRef](#)]
47. Liang, J.D.; Han, Y.F.; Zhang, J.W.; Du, W.; Liang, Z.Q.; Li, Z.Z. Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *110*, 871–880. [[CrossRef](#)]
48. Kunert, J. Physiology of Keratinophilic Fungi. In *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*; Kushwaha, R., Guarro, J., Eds.; Revista Iberoamericana de Micología: Bilbao, Spain, 2000; Volume 17, pp. 77–85.
49. Günay, O.A.; Kırac, S.; Aldi, B.; Ergi, C. Isolation and identification of keratinophilic fungi in soil samples from excavation area of ancient city of Stratonikeia, Turkey and determination of its enzyme potentials. *J. Environ. Biol.* **2020**, *41*, 1521–1525. [[CrossRef](#)]
50. Călin, M.; Constantinescu-Aruxandei, D.; Alexandrescu, E.; Răut, I.; Doni, M.B.; Arsene, M.L.; Oancea, F.; Jecu, L.; Lazăr, V. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. *Electron. J. Biotechnol.* **2017**, *28*, 101–112. [[CrossRef](#)]
51. Muhsin, T.M.; Hadi, R.B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. *Mycopathologia* **2001**, *154*, 185–189. [[CrossRef](#)]
52. Li, Q. Structure, application, and biochemistry of microbial keratinases. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 674345. [[CrossRef](#)]
53. Mini, K.D.; George, S.M.; Mathew, J. Screening and selection of fungus for keratinase production by solid state fermentation and optimization of conditions of SSF and formulation of low cost medium for the production of keratinase by *Aspergillus flavus* S125. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2015**, *4*, 535–548.
54. Anbu, P.; Gopinath, S.C.B.; Hilda, A.; Lakshmi priya, T.; Annadurai, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 1298–1303. [[CrossRef](#)]
55. Singh, C.J. Extracellular protease expression in *Microsporium gypseum* complex, its regulation and keratinolytic potential. *Mycoses* **2010**, *54*, 183–188. [[CrossRef](#)]
56. Anbu, P.; Gopinath, S.C.B.; Hilda, A.; Mathivanan, N.; Annadurai, G. Secretion of keratinolytic enzymes and keratinolysis by *Scopulariopsis brevicaulis* and *Trichophyton mentagrophytes*: Regression analysis. *Can. J. Microbiol.* **2006**, *52*, 1060–1069. [[CrossRef](#)]
57. El-Ghonemy, D.H.; Ali, T.H. Optimization of physico-chemical parameters for hyper keratinase production from a newly isolated *Aspergillus* sp. DHE7 using chicken feather as substrate—Management of biowaste. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2017**, *7*, 171–178. [[CrossRef](#)]
58. Vidmar, B.; Vodovnik, M. Microbial keratinases: Enzymes with promising biotechnological applications. *Food Technol. Biotech.* **2018**, *56*, 312–328. [[CrossRef](#)]
59. Hubalek, Z. Keratinophilic fungi associated with free living mammals and birds. In *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*; Kushwaha, R., Guarro, J., Eds.; Revista Iberoamericana de Micología: Bilbao, Spain, 2000; Volume 17, pp. 93–103.
60. Kanchana, R.; Mesta, D. Native feather degradation by a keratinophilic fungus. *Int. J. Chem. Technol. Res.* **2013**, *5*, 2947–2954.
61. Qiu, J.; Wilkens, C.; Barrett, K.; Meyer, A.S. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *44*, 107607. [[CrossRef](#)]
62. Łaba, W.; Chońska, A.; Rodziejewicz, A. The release of sulfur compounds during degradation of feather keratin by two *Bacillus* strains. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **2013**, *12*, 29–40.
63. Bhari, R.; Manpreet, K.; Singh, R.S. Chicken feather waste hydrolysate as a superior biofertilizer in agroindustry. *Curr. Microbiol.* **2021**, *78*, 2212–2230. [[CrossRef](#)]
64. Rahayu, S.; Syah, D.; Suhartono, M.T. Degradation of keratin by keratinase and disulfide reductase from *Bacillus* sp. MTS of Indonesian origin. *Biocatal. Agric. Biotech.* **2012**, *1*, 152–158. [[CrossRef](#)]
65. Galarza, B.; Cavello, I.; Garro, L.; Gortari, C.; Hours, R.; Cantera, C. Evaluation of increase at the production of keratinolytics enzymes. *J. Ageic.* **2012**, *63*, 70–74.
66. Maruthi, A.Y.; Lakshmi, A.K.; Rao, R.S.; Chaitanya, A.D. Degradation of feather and hair by *Chryso sporium tropicum*: A potent keratinophilic fungus. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 3579–3584. [[CrossRef](#)]
67. Lasekan, A.; Abu Bakar, F.; Hashim, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Manag.* **2013**, *33*, 552–565. [[CrossRef](#)]
68. Kumari, M.; Kumar, J. Chicken feather waste degradation by *Alternaria tenuissima* and its application on plant growth. *J. Appl. Nat. Sci.* **2020**, *12*, 411–414. [[CrossRef](#)]
69. Näsholm, T.; Kielland, K.; Ganeteg, U. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol.* **2009**, *182*, 31–48. [[CrossRef](#)]
70. Kaul, S.; Sumbali, G. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. *Mycopathologia* **1997**, *139*, 137–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Jain, R.; Jain, P.C.; Agrawal, S.C. Feather degradation by *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068. *Ann. Microbiol.* **2012**, *62*, 973–978. [[CrossRef](#)]
72. Mehta, R.S.; Riddhi, J.; Jholapara, R.J.; Sawant, C.S. Isolation of a novel feather-degrading bacterium and optimization of its cultural conditions for enzyme production. *Int. J. Pharm. Sci.* **2014**, *6*, 194–201.
73. Kunert, J. Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporium gypseum*: A comparison. *J. Basic Microbiol.* **1989**, *29*, 597–604. [[CrossRef](#)]
74. Rajak, R.C.; Parwekar, S.; Malviya, H.; Hasiya, S.K. Keratin degradation by fungi isolated from the grounds of a gelatin factory in Jabalpur, India. *Mycopathologia* **1991**, *114*, 83–87. [[CrossRef](#)]
75. Godheja, J.; Shekhar, S.K. Biodegradation of keratin from chicken feathers by fungal species as a means of sustainable development. *J. Bioremediat. Biodegrad.* **2014**, *5*, 1–5. [[CrossRef](#)]

Publikacja 4 [P.4.] - Materiały uzupełniające (S)

Table S1. Dynamics of changes in enzymatic activity and the secretion of organic and mineral products of chicken feathers keratinolysis by *Trichophyton ajelloi* strains with the addition of various carbon sources to the culture medium.

Days	7	14	21	28	35	Mean
Protease [$\mu\text{g tyrosine cm}^{-3}$]						
F (III)	48.15 \pm 3.90 ^a	58.87 \pm 3.26 ^b	40.24 \pm 0.55 ^a	59.02 \pm 3.99 ^b	70.56 \pm 1.27 ^c	55.37 \pm 2.59
F (XII)	44.82 \pm 1.09 ^{ac}	47.56 \pm 2.08 ^a	37.57 \pm 1.64 ^b	40.01 \pm 1.27 ^{bc}	49.41 \pm 2.16 ^a	43.88 \pm 1.65
F (XIV)	49.04 \pm 2.54 ^c	38.09 \pm 3.02 ^{ab}	32.84 \pm 0.79 ^a	33.14 \pm 3.26 ^a	42.16 \pm 1.57 ^{bc}	39.05 \pm 2.24
F+G (III)	16.86 \pm 2.20 ^c	82.25 \pm 11.05 ^{ab}	92.08 \pm 5.28 ^b	68.05 \pm 3.71 ^a	73.74 \pm 2.73 ^{ab}	66.60 \pm 4.99
F+G (XII)	21.75 \pm 1.48 ^c	99.26 \pm 3.73 ^a	98.08 \pm 8.01 ^a	83.21 \pm 1.92 ^b	92.75 \pm 3.18 ^{ab}	79.01 \pm 3.66
F+G (XIV)	31.73 \pm 7.42 ^a	107.54 \pm 16.58 ^b	93.86 \pm 10.27 ^b	59.39 \pm 5.50 ^a	59.91 \pm 4.45 ^a	70.49 \pm 8.84
F+X (III)	16.79 \pm 2.24 ^c	41.94 \pm 6.71 ^{ab}	42.16 \pm 8.18 ^{ab}	36.46 \pm 0.82 ^a	56.95 \pm 4.96 ^b	38.86 \pm 4.58
F+X (XII)	13.68 \pm 1.45 ^b	38.39 \pm 3.99 ^a	34.91 \pm 2.73 ^a	45.27 \pm 9.55 ^a	74.70 \pm 3.63 ^c	41.39 \pm 4.27
F+X (XIV)	15.24 \pm 1.09 ^b	38.09 \pm 4.12 ^{ab}	45.86 \pm 17.49 ^{ab}	50.81 \pm 8.34 ^a	67.38 \pm 12.89 ^a	43.48 \pm 8.79
Keratinase [KU cm^{-3}]						
F (III)	54.77 \pm 1.68 ^b	79.57 \pm 1.75 ^a	81.03 \pm 1.54 ^a	80.73 \pm 2.78 ^a	93.70 \pm 1.69 ^c	77.96 \pm 1.89
F (XII)	40.23 \pm 2.05 ^a	38.53 \pm 1.55 ^a	48.40 \pm 2.27 ^b	44.30 \pm 2.60 ^{ab}	56.97 \pm 1.62 ^c	45.69 \pm 2.02
F (XIV)	39.67 \pm 2.48 ^a	42.87 \pm 1.02 ^{ab}	49.13 \pm 2.52 ^{bc}	50.27 \pm 1.62 ^c	56.80 \pm 1.39 ^d	47.75 \pm 1.81
F+G (III)	49.90 \pm 3.19 ^c	79.23 \pm 5.39 ^d	111.43 \pm 7.84 ^{ab}	110.63 \pm 6.37 ^a	129.73 \pm 4.34 ^b	96.19 \pm 5.43
F+G (XII)	37.10 \pm 6.08 ^b	57.80 \pm 6.37 ^c	86.00 \pm 7.08 ^a	78.13 \pm 3.33 ^a	109.71 \pm 1.88 ^d	73.75 \pm 4.95
F+G (XIV)	38.80 \pm 4.46 ^b	45.87 \pm 6.18 ^b	95.23 \pm 7.11 ^a	103.93 \pm 2.95 ^a	108.60 \pm 3.41 ^a	78.49 \pm 4.82
F+X (III)	51.30 \pm 3.12 ^a	42.97 \pm 3.61 ^a	68.23 \pm 6.59 ^b	55.40 \pm 2.91 ^{ab}	92.13 \pm 5.49 ^c	62.01 \pm 4.35
F+X (XII)	42.23 \pm 1.65 ^a	41.40 \pm 1.82 ^a	54.93 \pm 5.83 ^b	51.97 \pm 1.54 ^{ab}	92.33 \pm 4.32 ^c	56.57 \pm 3.03
F+X (XIV)	37.57 \pm 5.72 ^b	65.87 \pm 8.58 ^a	62.63 \pm 3.87 ^a	54.80 \pm 4.03 ^{ab}	97.70 \pm 6.65 ^c	63.71 \pm 5.77
Disulfide reductase [U cm^{-3}]						
F (III)	0.010 \pm 0.001 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.019 \pm 0.008 ^{ab}	0.032 \pm 0.005 ^b	0.017 \pm 0.004
F (XII)	0.194 \pm 0.008 ^{ab}	0.188 \pm 0.012 ^a	0.223 \pm 0.008 ^{bc}	0.207 \pm 0.012 ^{ab}	0.256 \pm 0.012 ^c	0.214 \pm 0.010
F (XIV)	0.013 \pm 0.005 ^a	0.036 \pm 0.009 ^b	0.019 \pm 0.008 ^{ab}	0.026 \pm 0.005 ^{ab}	0.084 \pm 0.005 ^c	0.036 \pm 0.006
F+G (III)	0.052 \pm 0.005 ^c	0.013 \pm 0.005 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.032 \pm 0.005 ^b	0.026 \pm 0.005 ^{ab}	0.027 \pm 0.005
F+G (XII)	0.032 \pm 0.005 ^{ab}	0.013 \pm 0.005 ^a	0.019 \pm 0.008 ^{ab}	0.016 \pm 0.005 ^a	0.039 \pm 0.008 ^b	0.024 \pm 0.006
F+G (XIV)	0.068 \pm 0.008 ^b	0.091 \pm 0.012 ^b	0.010 \pm 0.001 ^c	0.036 \pm 0.005 ^a	0.036 \pm 0.005 ^a	0.048 \pm 0.006
F+X (III)	0.207 \pm 0.012 ^c	0.032 \pm 0.012 ^a	0.142 \pm 0.017 ^b	0.013 \pm 0.005 ^a	0.049 \pm 0.016 ^a	0.089 \pm 0.012
F+X (XII)	0.136 \pm 0.008 ^b	0.010 \pm 0.001 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.010 \pm 0.001 ^a	0.036 \pm 0.003
F+X (XIV)	0.029 \pm 0.008 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.058 \pm 0.008 ^b	0.026 \pm 0.005 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.028 \pm 0.006
Proteins and peptides [$\mu\text{g of proteins cm}^{-3}$]						
F (III)	297.42 \pm 5.44 ^b	473.18 \pm 7.52 ^a	473.37 \pm 6.33 ^a	509.37 \pm 7.35 ^c	545.95 \pm 19.68 ^d	459.86 \pm 9.26
F (XII)	341.12 \pm 20.62 ^b	421.78 \pm 14.01 ^a	387.32 \pm 9.27 ^{ab}	394.06 \pm 14.68 ^a	430.25 \pm 15.16 ^a	394.91 \pm 14.75
F (XIV)	308.40 \pm 7.41 ^d	394.06 \pm 1.91 ^{bc}	365.19 \pm 2.37 ^a	378.85 \pm 6.48 ^{ab}	413.12 \pm 10.90 ^c	371.92 \pm 5.81
F+G (III)	756.55 \pm 13.59 ^a	498.78 \pm 46.63 ^b	720.17 \pm 25.67 ^a	692.25 \pm 19.61 ^a	716.51 \pm 23.49 ^a	676.85 \pm 25.80
F+G (XII)	775.80 \pm 7.22 ^e	471.64 \pm 12.43 ^a	619.49 \pm 5.70 ^b	677.43 \pm 2.63 ^c	724.79 \pm 8.66 ^d	653.83 \pm 7.33
F+G (XIV)	790.82 \pm 11.59 ^d	435.84 \pm 17.91 ^c	624.68 \pm 31.34 ^a	665.88 \pm 25.78 ^{ab}	705.92 \pm 23.98 ^b	644.63 \pm 22.12
F+X (III)	934.62 \pm 31.39 ^b	1227.62 \pm 39.60 ^a	1299.81 \pm 17.49 ^a	1217.22 \pm 29.43 ^a	1283.63 \pm 22.80 ^a	1192.58 \pm 28.14
F+X (XII)	933.46 \pm 26.93 ^c	1253.80 \pm 13.59 ^{ab}	1213.95 \pm 39.76 ^{ab}	1189.11 \pm 25.39 ^a	1288.83 \pm 33.92 ^b	1175.83 \pm 27.92
F+X (XIV)	932.12 \pm 26.29 ^b	968.89 \pm 46.82 ^b	1092.09 \pm 39.24 ^a	1118.46 \pm 33.59 ^a	1192.96 \pm 32.80 ^a	1060.90 \pm 35.75
Amino groups [$\mu\text{g N-NH}_2 \text{ cm}^{-3}$]						
F (III)	5.78 \pm 0.43 ^a	10.62 \pm 0.23 ^b	10.34 \pm 0.30 ^b	6.16 \pm 0.33 ^a	6.61 \pm 0.19 ^a	7.90 \pm 0.30
F (XII)	7.02 \pm 0.16 ^b	10.89 \pm 0.15 ^c	11.98 \pm 0.31 ^a	12.57 \pm 0.34 ^a	14.46 \pm 0.33 ^d	11.38 \pm 0.26
F (XIV)	5.37 \pm 0.31 ^b	8.32 \pm 0.24 ^a	9.15 \pm 0.28 ^a	7.32 \pm 0.17 ^c	8.42 \pm 0.32 ^a	7.72 \pm 0.26
F+G (III)	2.07 \pm 0.01 ^b	11.09 \pm 0.24 ^c	21.02 \pm 0.60 ^d	24.60 \pm 0.99 ^a	24.55 \pm 0.77 ^a	16.67 \pm 0.52
F+G (XII)	2.14 \pm 0.52 ^b	14.24 \pm 1.29 ^c	18.34 \pm 1.16 ^d	29.66 \pm 0.37 ^a	29.81 \pm 0.95 ^a	18.84 \pm 0.86
F+G (XIV)	2.54 \pm 0.05 ^b	10.10 \pm 0.37 ^c	22.23 \pm 1.73 ^d	28.64 \pm 0.91 ^a	31.66 \pm 1.35 ^a	19.03 \pm 0.88
F+X (III)	2.47 \pm 0.12 ^c	17.89 \pm 1.02 ^a	20.72 \pm 1.44 ^a	26.16 \pm 1.19 ^b	29.85 \pm 1.90 ^b	19.42 \pm 1.13
F+X (XII)	2.99 \pm 0.07 ^c	18.83 \pm 0.59 ^a	21.10 \pm 1.02 ^{ab}	24.07 \pm 0.83 ^b	27.51 \pm 1.61 ^d	18.90 \pm 0.82

F+X (XIV)	2.86 ± 0.34 ^a	14.08 ± 0.48 ^b	20.36 ± 0.63 ^c	27.06 ± 1.10 ^d	29.76 ± 0.74 ^e	18.82 ± 0.66
Thiol groups [$\mu\text{g -SH cm}^{-3}$]						
F (III)	2.35 ± 0.15 ^a	2.99 ± 0.15 ^{ab}	6.72 ± 0.47 ^d	4.69 ± 0.15 ^c	3.95 ± 0.53 ^{bc}	4.14 ± 0.29
F (XII)	5.28 ± 0.13 ^{ab}	7.14 ± 0.87 ^c	3.73 ± 0.40 ^a	4.37 ± 0.33 ^a	6.13 ± 0.42 ^{bc}	5.33 ± 0.43
F (XIV)	4.80 ± 0.23 ^a	5.33 ± 0.33 ^a	4.53 ± 0.87 ^a	4.69 ± 0.53 ^a	4.74 ± 0.96 ^a	4.82 ± 0.58
F+G (III)	0.43 ± 0.27 ^c	4.96 ± 1.12 ^b	8.80 ± 1.51 ^a	8.48 ± 1.26 ^{ab}	10.13 ± 0.80 ^a	6.56 ± 0.99
F+G (XII)	0.21 ± 0.08 ^b	4.58 ± 0.98 ^c	8.80 ± 1.71 ^a	8.58 ± 0.89 ^a	10.34 ± 0.98 ^a	6.50 ± 0.93
F+G (XIV)	1.44 ± 0.23 ^a	0.85 ± 0.20 ^a	5.54 ± 0.89 ^b	7.36 ± 1.45 ^b	11.78 ± 1.28 ^c	5.40 ± 0.81
F+X (III)	6.40 ± 0.91 ^c	2.67 ± 0.49 ^{ab}	3.52 ± 0.82 ^b	1.33 ± 0.27 ^a	2.13 ± 0.15 ^{ab}	3.21 ± 0.53
F+X (XII)	7.25 ± 1.32 ^b	4.74 ± 0.59 ^{ab}	3.52 ± 0.94 ^a	4.27 ± 0.72 ^{ab}	4.90 ± 0.80 ^{ab}	4.94 ± 0.87
F+X (XIV)	3.89 ± 0.64 ^a	2.67 ± 0.54 ^a	4.16 ± 0.45 ^a	4.43 ± 0.40 ^a	7.62 ± 1.57 ^b	4.55 ± 0.72
Sulfate ions [$\text{mg SO}_4^{2-} \text{cm}^{-3}$]						
F (III)	0.32 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.02 ^d	1.15 ± 0.02 ^e	0.55 ± 0.03 ^b	0.66 ± 0.03 ^c	0.73 ± 0.02
F (XII)	0.59 ± 0.04 ^a	0.96 ± 0.04 ^c	0.57 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.01 ^b	0.53 ± 0.02 ^a	0.56 ± 0.03
F (XIV)	0.34 ± 0.03 ^a	1.00 ± 0.06 ^b	0.91 ± 0.01 ^b	0.31 ± 0.10 ^a	0.60 ± 0.02 ^c	0.63 ± 0.04
F+G (III)	0.35 ± 0.02 ^b	0.46 ± 0.02 ^c	0.98 ± 0.02 ^d	0.91 ± 0.03 ^a	0.88 ± 0.02 ^a	0.71 ± 0.02
F+G (XII)	0.34 ± 0.02 ^b	0.71 ± 0.03 ^c	0.94 ± 0.04 ^a	0.92 ± 0.04 ^a	0.87 ± 0.02 ^a	0.76 ± 0.03
F+G (XIV)	0.48 ± 0.02 ^b	0.50 ± 0.03 ^b	1.02 ± 0.06 ^a	1.03 ± 0.01 ^a	0.95 ± 0.02 ^a	0.80 ± 0.03
F+X (III)	0.22 ± 0.01 ^b	0.49 ± 0.04 ^c	0.74 ± 0.06 ^a	0.65 ± 0.03 ^a	1.02 ± 0.02 ^d	0.62 ± 0.03
F+X (XII)	0.43 ± 0.02 ^a	0.53 ± 0.01 ^a	0.81 ± 0.01 ^b	0.77 ± 0.06 ^b	1.02 ± 0.04 ^c	0.71 ± 0.03
F+X (XIV)	0.26 ± 0.02 ^b	0.42 ± 0.04 ^a	0.48 ± 0.03 ^a	0.82 ± 0.04 ^c	0.94 ± 0.03 ^d	0.58 ± 0.03
Ammonium ions [$\mu\text{g NH}_4^+ \text{cm}^{-3}$]						
F (III)	365.53 ± 7.71 ^c	637.65 ± 9.38 ^a	620.27 ± 23.04 ^a	558.61 ± 7.19 ^b	598.95 ± 12.50 ^{ab}	556.20 ± 11.96
F (XII)	525.24 ± 7.75 ^b	687.03 ± 8.92 ^a	677.99 ± 5.42 ^a	555.37 ± 9.20 ^c	593.61 ± 10.50 ^d	607.85 ± 8.36
F (XIV)	460.33 ± 14.23 ^b	646.23 ± 2.29 ^a	668.71 ± 11.49 ^a	531.49 ± 8.98 ^c	578.08 ± 6.02 ^d	576.97 ± 8.60
F+G (III)	258.68 ± 6.55 ^b	286.49 ± 10.52 ^b	549.81 ± 3.13 ^a	562.55 ± 23.61 ^a	548.42 ± 11.70 ^a	441.19 ± 11.10
F+G (XII)	307.82 ± 27.87 ^b	403.08 ± 34.79 ^c	569.04 ± 13.06 ^a	583.18 ± 2.36 ^a	513.41 ± 22.46 ^a	475.31 ± 20.11
F+G (XIV)	308.05 ± 22.43 ^b	287.88 ± 37.37 ^b	487.69 ± 35.84 ^a	546.33 ± 36.16 ^a	569.04 ± 21.38 ^a	439.80 ± 30.64
F+X (III)	309.67 ± 19.88 ^b	499.04 ± 26.97 ^c	712.06 ± 53.76 ^a	677.52 ± 37.06 ^a	761.20 ± 24.59 ^a	591.90 ± 32.45
F+X (XII)	330.53 ± 37.86 ^d	528.94 ± 30.48 ^a	623.98 ± 27.28 ^{ab}	708.81 ± 16.43 ^{bc}	775.57 ± 45.92 ^c	593.57 ± 31.59
F+X (XIV)	303.64 ± 25.92 ^c	486.30 ± 32.72 ^b	621.89 ± 41.79 ^{ab}	689.11 ± 48.10 ^a	707.89 ± 57.38 ^a	561.77 ± 41.18

Explanations: Letters a, b, and c denote means forming homogenous groups, which were determined by one-way ANOVA and HSD-Tukey post-hoc test. If the means are marked with the same letter (e.g. a), they do not differ significantly (at $\alpha = 0.05$). If the means are given different letters (e.g.: a and b, they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

Table S2. Dynamics of changes in enzymatic activity and the secretion of organic and mineral products of chicken feathers keratinolysis by *Trichophyton ajelloi* strains at various concentrations (1.0, 1.5 and 2.0%) of feather waste.

Days	7	14	21	28	35	Mean
Protease [$\mu\text{g tyrosine cm}^{-3}$]						
1.0% (III)	48.15 \pm 3.90 ^a	58.87 \pm 3.26 ^b	40.24 \pm 0.55 ^a	59.02 \pm 3.99 ^b	70.56 \pm 1.27 ^c	55.37 \pm 2.59
1.0% (XII)	44.82 \pm 1.09 ^{ac}	47.56 \pm 2.08 ^a	37.57 \pm 1.64 ^b	40.01 \pm 1.27 ^{bc}	49.41 \pm 2.16 ^a	43.88 \pm 1.65
1.0% (XIV)	49.04 \pm 2.54 ^c	38.09 \pm 3.02 ^{ab}	32.84 \pm 0.79 ^a	33.14 \pm 3.26 ^a	42.16 \pm 1.57 ^{bc}	39.05 \pm 2.24
1.5% (III)	25.15 \pm 3.02 ^b	39.87 \pm 4.01 ^a	39.94 \pm 4.26 ^a	34.54 \pm 2.21 ^{ab}	37.43 \pm 2.60 ^a	35.38 \pm 3.22
1.5% (XII)	40.38 \pm 2.38 ^{ab}	51.70 \pm 4.08 ^b	46.38 \pm 2.98 ^{ab}	38.17 \pm 5.16 ^a	37.20 \pm 1.48 ^a	42.77 \pm 3.22
1.5% (XIV)	36.17 \pm 1.96 ^a	50.89 \pm 9.60 ^a	60.06 \pm 17.68 ^a	66.35 \pm 9.67 ^a	71.30 \pm 9.81 ^a	56.95 \pm 9.74
2.0% (III)	36.76 \pm 1.09 ^b	62.50 \pm 1.37 ^a	64.72 \pm 3.68 ^a	56.66 \pm 0.52 ^a	57.54 \pm 5.49 ^a	55.64 \pm 2.43
2.0% (XII)	33.28 \pm 2.44 ^b	58.65 \pm 9.01 ^a	57.47 \pm 3.57 ^a	51.11 \pm 3.17 ^{ab}	56.29 \pm 7.08 ^a	51.36 \pm 5.05
2.0% (XIV)	58.73 \pm 5.39 ^a	64.42 \pm 11.43 ^a	65.83 \pm 6.55 ^a	73.30 \pm 16.44 ^a	63.98 \pm 11.28 ^a	65.25 \pm 10.22
Keratinase [KU cm^{-3}]						
1.0% (III)	54.77 \pm 1.68 ^b	79.57 \pm 1.75 ^a	81.03 \pm 1.54 ^a	80.73 \pm 2.78 ^a	93.70 \pm 1.69 ^c	77.96 \pm 1.89
1.0% (XII)	40.23 \pm 2.05 ^a	38.53 \pm 1.55 ^a	48.40 \pm 2.27 ^b	44.30 \pm 2.60 ^{ab}	56.97 \pm 1.62 ^c	45.69 \pm 2.02
1.0% (XIV)	39.67 \pm 2.48 ^a	42.87 \pm 1.02 ^{ab}	49.13 \pm 2.52 ^{bc}	50.27 \pm 1.62 ^c	56.80 \pm 1.39 ^d	47.75 \pm 1.81
1.5% (III)	21.13 \pm 2.50 ^b	35.73 \pm 5.26 ^{ab}	42.67 \pm 7.02 ^a	48.27 \pm 5.77 ^a	73.87 \pm 5.17 ^c	44.33 \pm 5.14
1.5% (XII)	34.03 \pm 3.98 ^b	46.70 \pm 2.98 ^{ab}	55.63 \pm 9.16 ^a	58.37 \pm 3.92 ^a	87.43 \pm 3.14 ^c	56.43 \pm 4.64
1.5% (XIV)	35.27 \pm 0.97 ^a	39.40 \pm 1.21 ^a	55.37 \pm 3.23 ^b	66.60 \pm 2.42 ^b	80.33 \pm 6.60 ^c	55.39 \pm 2.89
2.0% (III)	34.97 \pm 2.05 ^b	60.73 \pm 5.74 ^a	63.30 \pm 2.55 ^a	85.47 \pm 2.68 ^c	111.37 \pm 3.66 ^d	71.17 \pm 3.34
2.0% (XII)	31.73 \pm 1.27 ^b	60.00 \pm 3.32 ^a	54.40 \pm 4.62 ^a	84.07 \pm 3.49 ^c	116.20 \pm 4.47 ^d	69.28 \pm 3.43
2.0% (XIV)	44.10 \pm 3.43 ^b	69.50 \pm 5.13 ^a	79.67 \pm 2.86 ^a	107.10 \pm 2.05 ^c	127.30 \pm 8.15 ^d	85.53 \pm 4.33
Disulfide reductase [U cm^{-3}]						
1.0% (III)	0.010 \pm 0.001 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.019 \pm 0.008 ^{ab}	0.032 \pm 0.005 ^b	0.017 \pm 0.004
1.0% (XII)	0.194 \pm 0.008 ^{ab}	0.188 \pm 0.012 ^a	0.223 \pm 0.008 ^{bc}	0.207 \pm 0.012 ^{ab}	0.256 \pm 0.012 ^c	0.214 \pm 0.010
1.0% (XIV)	0.013 \pm 0.005 ^a	0.036 \pm 0.009 ^b	0.019 \pm 0.008 ^{ab}	0.026 \pm 0.005 ^{ab}	0.084 \pm 0.005 ^c	0.036 \pm 0.006
1.5% (III)	0.013 \pm 0.005 ^a	0.019 \pm 0.001 ^a	0.026 \pm 0.009 ^a	0.023 \pm 0.005 ^a	0.029 \pm 0.008 ^a	0.022 \pm 0.005
1.5% (XII)	0.074 \pm 0.005 ^b	0.065 \pm 0.005 ^b	0.036 \pm 0.005 ^a	0.026 \pm 0.009 ^a	0.029 \pm 0.001 ^a	0.046 \pm 0.005
1.5% (XIV)	0.104 \pm 0.012 ^b	0.039 \pm 0.008 ^a	0.133 \pm 0.009 ^c	0.049 \pm 0.008 ^a	0.055 \pm 0.005 ^a	0.076 \pm 0.008
2.0% (III)	0.023 \pm 0.005 ^{bc}	0.013 \pm 0.005 ^b	0.039 \pm 0.008 ^{ac}	0.042 \pm 0.005 ^a	0.052 \pm 0.005 ^a	0.034 \pm 0.005
2.0% (XII)	0.032 \pm 0.005 ^{bc}	0.019 \pm 0.008 ^b	0.065 \pm 0.005 ^a	0.065 \pm 0.009 ^a	0.055 \pm 0.009 ^{ac}	0.047 \pm 0.007
2.0% (XIV)	0.061 \pm 0.005 ^a	0.016 \pm 0.005 ^b	0.107 \pm 0.008 ^c	0.058 \pm 0.008 ^a	0.061 \pm 0.005 ^a	0.061 \pm 0.006
Proteins and peptides [$\mu\text{g of proteins cm}^{-3}$]						
1.0% (III)	297.42 \pm 5.44 ^b	473.18 \pm 7.52 ^a	473.37 \pm 6.33 ^a	509.37 \pm 7.35 ^c	545.95 \pm 19.68 ^d	459.86 \pm 9.26
1.0% (XII)	341.12 \pm 20.62 ^b	421.78 \pm 14.01 ^a	387.32 \pm 9.27 ^{ab}	394.06 \pm 14.68 ^a	430.25 \pm 15.16 ^a	394.91 \pm 14.75
1.0% (XIV)	308.40 \pm 7.41 ^d	394.06 \pm 1.91 ^{bc}	365.19 \pm 2.37 ^a	378.85 \pm 6.48 ^{ab}	413.12 \pm 10.90 ^c	371.92 \pm 5.81
1.5% (III)	292.03 \pm 24.33 ^c	457.40 \pm 26.14 ^a	472.03 \pm 17.48 ^a	539.02 \pm 12.87 ^b	573.67 \pm 11.52 ^b	466.83 \pm 18.47
1.5% (XII)	350.55 \pm 5.44 ^a	470.10 \pm 1.25 ^b	539.79 \pm 1.66 ^c	605.82 \pm 4.79 ^d	663.57 \pm 18.93 ^c	525.97 \pm 6.41
1.5% (XIV)	399.45 \pm 44.04 ^a	504.56 \pm 46.01 ^a	613.13 \pm 20.28 ^c	719.78 \pm 17.11 ^b	783.12 \pm 21.75 ^b	604.01 \pm 29.84
2.0% (III)	431.79 \pm 12.84 ^d	602.35 \pm 3.56 ^a	687.63 \pm 31.93 ^{ab}	791.01 \pm 48.45 ^{bc}	902.47 \pm 53.69 ^c	683.05 \pm 30.09
2.0% (XII)	378.47 \pm 21.26 ^b	585.41 \pm 35.92 ^c	673.77 \pm 22.88 ^d	773.30 \pm 1.70 ^a	836.44 \pm 26.70 ^a	649.48 \pm 21.69
2.0% (XIV)	469.91 \pm 20.01 ^b	686.29 \pm 34.06 ^c	773.49 \pm 31.41 ^d	853.38 \pm 2.88 ^a	921.72 \pm 9.29 ^a	740.96 \pm 19.53
Amino groups [$\mu\text{g N-NH}_2 \text{ cm}^{-3}$]						
1.0% (III)	5.78 \pm 0.43 ^a	10.62 \pm 0.23 ^b	10.34 \pm 0.30 ^b	6.16 \pm 0.33 ^a	6.61 \pm 0.19 ^a	7.90 \pm 0.30
1.0% (XII)	7.02 \pm 0.16 ^b	10.89 \pm 0.15 ^c	11.98 \pm 0.31 ^a	12.57 \pm 0.34 ^a	14.46 \pm 0.33 ^d	11.38 \pm 0.26
1.0% (XIV)	5.37 \pm 0.31 ^b	8.32 \pm 0.24 ^a	9.15 \pm 0.28 ^a	7.32 \pm 0.17 ^c	8.42 \pm 0.32 ^a	7.72 \pm 0.26
1.5% (III)	3.80 \pm 0.16 ^b	13.79 \pm 0.72 ^c	31.97 \pm 1.02 ^a	32.41 \pm 1.83 ^a	33.71 \pm 1.86 ^a	23.14 \pm 1.12
1.5% (XII)	2.76 \pm 0.18 ^b	9.03 \pm 0.39 ^c	24.48 \pm 0.52 ^a	25.29 \pm 1.50 ^a	25.96 \pm 0.75 ^a	17.50 \pm 0.67
1.5% (XIV)	2.80 \pm 0.12 ^b	8.80 \pm 0.89 ^c	25.17 \pm 0.47 ^a	26.66 \pm 0.92 ^a	27.56 \pm 1.45 ^a	18.20 \pm 0.77
2.0% (III)	2.48 \pm 0.10 ^b	12.00 \pm 0.57 ^c	31.17 \pm 2.14 ^a	27.07 \pm 1.73 ^a	27.84 \pm 1.14 ^a	20.11 \pm 1.14
2.0% (XII)	3.60 \pm 0.15 ^b	8.74 \pm 0.96 ^c	35.18 \pm 0.82 ^d	21.55 \pm 1.09 ^a	22.58 \pm 1.71 ^a	18.33 \pm 0.95
2.0% (XIV)	2.93 \pm 0.11 ^b	9.44 \pm 0.28 ^c	29.33 \pm 0.03 ^d	25.94 \pm 0.95 ^a	27.06 \pm 0.89 ^a	18.94 \pm 0.45

Thiol groups [$\mu\text{g -SH cm}^{-3}$]						
1.0% (III)	2.35 ± 0.15 ^a	2.99 ± 0.15 ^{ab}	6.72 ± 0.47 ^d	4.69 ± 0.15 ^c	3.95 ± 0.53 ^{bc}	4.14 ± 0.29
1.0% (XII)	5.28 ± 0.13 ^{ab}	7.14 ± 0.87 ^c	3.73 ± 0.40 ^a	4.37 ± 0.33 ^a	6.13 ± 0.42 ^{bc}	5.33 ± 0.43
1.0% (XIV)	4.80 ± 0.23 ^a	5.33 ± 0.33 ^a	4.53 ± 0.87 ^a	4.69 ± 0.53 ^a	4.74 ± 0.96 ^a	4.82 ± 0.58
1.5% (III)	2.24 ± 0.35 ^{ab}	3.47 ± 0.46 ^b	2.67 ± 0.33 ^{ab}	1.71 ± 0.27 ^a	7.09 ± 0.79 ^c	3.43 ± 0.44
1.5% (XII)	6.18 ± 0.42 ^c	3.52 ± 0.47 ^b	9.49 ± 0.49 ^d	0.69 ± 0.20 ^a	19.51 ± 1.45 ^e	7.88 ± 0.61
1.5% (XIV)	8.48 ± 0.86 ^a	5.22 ± 0.49 ^a	8.69 ± 1.63 ^a	5.33 ± 0.33 ^a	23.99 ± 2.26 ^b	10.34 ± 1.11
2.0% (III)	7.84 ± 0.13 ^a	8.26 ± 1.11 ^{ab}	11.04 ± 0.79 ^b	9.92 ± 0.60 ^{ab}	38.33 ± 1.44 ^c	15.08 ± 0.81
2.0% (XII)	6.02 ± 0.80 ^a	9.44 ± 1.25 ^a	14.82 ± 2.12 ^b	22.44 ± 1.17 ^c	34.76 ± 2.08 ^d	17.50 ± 1.48
2.0% (XIV)	11.04 ± 1.77 ^a	9.49 ± 1.49 ^a	34.17 ± 0.72 ^c	9.97 ± 0.42 ^a	25.96 ± 2.17 ^b	18.13 ± 1.31
Sulfate ions [$\text{mg SO}_4^{2-} \text{cm}^{-3}$]						
1.0% (III)	0.32 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.02 ^d	1.15 ± 0.02 ^e	0.55 ± 0.03 ^b	0.66 ± 0.03 ^c	0.73 ± 0.02
1.0% (XII)	0.59 ± 0.04 ^a	0.96 ± 0.04 ^c	0.57 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.01 ^b	0.53 ± 0.02 ^a	0.56 ± 0.03
1.0% (XIV)	0.34 ± 0.03 ^a	1.00 ± 0.06 ^b	0.91 ± 0.01 ^b	0.31 ± 0.10 ^a	0.60 ± 0.02 ^c	0.63 ± 0.04
1.5% (III)	0.94 ± 0.04 ^b	0.71 ± 0.03 ^a	1.18 ± 0.02 ^c	0.74 ± 0.03 ^a	0.93 ± 0.03 ^b	0.90 ± 0.03
1.5% (XII)	0.86 ± 0.03 ^a	0.72 ± 0.03 ^c	1.31 ± 0.03 ^d	0.90 ± 0.03 ^{ab}	1.02 ± 0.06 ^b	0.96 ± 0.04
1.5% (XIV)	0.77 ± 0.01 ^a	0.51 ± 0.02 ^b	1.03 ± 0.03 ^c	0.71 ± 0.04 ^a	0.76 ± 0.04 ^a	0.76 ± 0.03
2.0% (III)	1.10 ± 0.03 ^a	1.06 ± 0.17 ^a	1.75 ± 0.08 ^b	1.12 ± 0.05 ^a	1.27 ± 0.02 ^a	1.26 ± 0.07
2.0% (XII)	1.07 ± 0.02 ^a	1.15 ± 0.03 ^{ab}	1.94 ± 0.04 ^c	1.10 ± 0.03 ^a	1.26 ± 0.04 ^b	1.30 ± 0.03
2.0% (XIV)	0.95 ± 0.03 ^a	0.78 ± 0.02 ^b	1.57 ± 0.03 ^d	0.98 ± 0.04 ^a	1.12 ± 0.04 ^c	1.08 ± 0.03
Ammonium ions [$\mu\text{g NH}_4^+ \text{cm}^{-3}$]						
1.0% (III)	365.53 ± 7.71 ^c	637.65 ± 9.38 ^a	620.27 ± 23.04 ^a	558.61 ± 7.19 ^b	598.95 ± 12.50 ^{ab}	556.20 ± 11.96
1.0% (XII)	525.24 ± 7.75 ^b	687.03 ± 8.92 ^a	677.99 ± 5.42 ^a	555.37 ± 9.20 ^c	593.61 ± 10.50 ^d	607.85 ± 8.36
1.0% (XIV)	460.33 ± 14.23 ^b	646.23 ± 2.29 ^a	668.71 ± 11.49 ^a	531.49 ± 8.98 ^c	578.08 ± 6.02 ^d	576.97 ± 8.60
1.5% (III)	381.53 ± 15.34 ^c	732.92 ± 28.62 ^b	738.95 ± 29.06 ^b	535.90 ± 3.47 ^a	568.58 ± 32.35 ^a	591.57 ± 21.77
1.5% (XII)	434.37 ± 57.12 ^a	501.59 ± 13.84 ^a	562.09 ± 22.43 ^a	874.31 ± 45.89 ^b	531.49 ± 47.75 ^a	580.77 ± 37.40
1.5% (XIV)	306.19 ± 23.28 ^c	429.51 ± 33.58 ^a	528.02 ± 20.32 ^b	539.38 ± 6.12 ^b	442.95 ± 25.09 ^a	449.21 ± 21.68
2.0% (III)	457.79 ± 29.37 ^b	638.35 ± 46.84 ^a	721.79 ± 65.36 ^a	621.20 ± 49.91 ^a	622.82 ± 44.88 ^a	612.39 ± 47.27
2.0% (XII)	290.66 ± 36.08 ^c	735.01 ± 69.05 ^{ab}	813.35 ± 23.34 ^b	679.84 ± 16.47 ^a	643.22 ± 6.32 ^a	632.42 ± 30.25
2.0% (XIV)	186.36 ± 19.90 ^c	583.65 ± 29.06 ^{ab}	669.18 ± 18.15 ^b	595.70 ± 42.34 ^{ab}	530.10 ± 69.55 ^a	513.00 ± 35.80

Explanations: as in Table S1.

Table S3. Dynamics of changes in enzymatic activity and the secretion of organic and mineral products of chicken feathers keratinolysis by *Trichophyton ajelloi* strains at different initial pH (4.5, 6.5, 8.5) of the culture medium.

Days	7	14	21	28	35	Mean
Protease [$\mu\text{g tyrosine cm}^{-3}$]						
4.5 (III)	48.15 \pm 3.90 ^a	58.87 \pm 3.26 ^b	40.24 \pm 0.55 ^a	59.02 \pm 3.99 ^b	70.56 \pm 1.27 ^c	55.37 \pm 2.59
4.5 (XII)	44.82 \pm 1.09 ^{ac}	47.56 \pm 2.08 ^a	37.57 \pm 1.64 ^b	40.01 \pm 1.27 ^{bc}	49.41 \pm 2.16 ^a	43.88 \pm 1.65
4.5 (XIV)	49.04 \pm 2.54 ^c	38.09 \pm 3.02 ^{ab}	32.84 \pm 0.79 ^a	33.14 \pm 3.26 ^a	42.16 \pm 1.57 ^{bc}	39.05 \pm 2.24
6.5 (III)	95.34 \pm 5.96 ^b	55.18 \pm 7.28 ^a	39.27 \pm 3.72 ^a	37.06 \pm 5.97 ^a	43.64 \pm 6.28 ^a	54.10 \pm 5.84
6.5 (XII)	48.59 \pm 5.33 ^a	37.43 \pm 7.00 ^a	34.10 \pm 9.48 ^a	42.31 \pm 9.31 ^a	43.12 \pm 8.59 ^a	41.11 \pm 7.94
6.5 (XIV)	24.33 \pm 2.77 ^{ab}	21.30 \pm 2.27 ^{ab}	19.16 \pm 1.05 ^a	23.30 \pm 1.31 ^{ab}	26.40 \pm 1.84 ^b	22.90 \pm 1.85
8.5 (III)	51.70 \pm 9.83 ^a	58.87 \pm 9.80 ^a	34.61 \pm 6.73 ^a	35.95 \pm 4.87 ^a	40.38 \pm 3.46 ^a	44.30 \pm 6.94
8.5 (XII)	26.40 \pm 2.74 ^a	29.29 \pm 3.92 ^a	30.32 \pm 5.00 ^a	34.10 \pm 1.11 ^a	36.02 \pm 3.12 ^a	31.23 \pm 3.18
8.5 (XIV)	18.49 \pm 3.72 ^a	18.05 \pm 2.61 ^a	23.96 \pm 4.26 ^a	27.00 \pm 2.28 ^a	25.59 \pm 3.40 ^a	22.62 \pm 3.26
Keratinase [KU cm^{-3}]						
4.5 (III)	54.77 \pm 1.68 ^b	79.57 \pm 1.75 ^a	81.03 \pm 1.54 ^a	80.73 \pm 2.78 ^a	93.70 \pm 1.69 ^c	77.96 \pm 1.89
4.5 (XII)	40.23 \pm 2.05 ^a	38.53 \pm 1.55 ^a	48.40 \pm 2.27 ^b	44.30 \pm 2.60 ^{ab}	56.97 \pm 1.62 ^c	45.69 \pm 2.02
4.5 (XIV)	39.67 \pm 2.48 ^a	42.87 \pm 1.02 ^{ab}	49.13 \pm 2.52 ^{bc}	50.27 \pm 1.62 ^c	56.80 \pm 1.39 ^d	47.75 \pm 1.81
6.5 (III)	21.87 \pm 3.97 ^a	29.40 \pm 6.13 ^{ab}	44.93 \pm 6.84 ^{bc}	106.70 \pm 4.32 ^d	60.77 \pm 4.15 ^c	52.73 \pm 5.08
6.5 (XII)	16.97 \pm 0.87 ^b	33.23 \pm 1.32 ^a	43.13 \pm 3.01 ^a	97.83 \pm 5.27 ^d	60.40 \pm 3.66 ^c	50.31 \pm 2.83
6.5 (XIV)	15.80 \pm 3.64 ^a	14.33 \pm 2.39 ^a	34.20 \pm 0.80 ^b	90.00 \pm 3.63 ^d	49.10 \pm 2.05 ^c	40.69 \pm 2.50
8.5 (III)	18.17 \pm 1.20 ^a	18.80 \pm 6.61 ^a	39.13 \pm 5.61 ^b	98.03 \pm 2.99 ^d	62.38 \pm 3.33 ^c	47.30 \pm 3.95
8.5 (XII)	18.97 \pm 1.81 ^a	16.70 \pm 2.33 ^a	42.27 \pm 5.38 ^b	115.33 \pm 2.49 ^d	64.07 \pm 3.07 ^c	51.47 \pm 3.01
8.5 (XIV)	19.70 \pm 7.02 ^a	16.47 \pm 4.25 ^a	36.93 \pm 4.69 ^b	110.23 \pm 4.66 ^d	63.27 \pm 2.67 ^c	49.32 \pm 4.66
Disulfide reductase [U cm^{-3}]						
4.5 (III)	0.010 \pm 0.001 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.019 \pm 0.008 ^{ab}	0.032 \pm 0.005 ^b	0.017 \pm 0.004
4.5 (XII)	0.194 \pm 0.008 ^{ab}	0.188 \pm 0.012 ^a	0.223 \pm 0.008 ^{bc}	0.207 \pm 0.012 ^{ab}	0.256 \pm 0.012 ^c	0.214 \pm 0.010
4.5 (XIV)	0.013 \pm 0.005 ^a	0.036 \pm 0.009 ^b	0.019 \pm 0.008 ^{ab}	0.026 \pm 0.005 ^{ab}	0.084 \pm 0.005 ^c	0.036 \pm 0.006
6.5 (III)	0.019 \pm 0.008 ^a	0.036 \pm 0.009 ^{ab}	0.029 \pm 0.008 ^{ab}	0.049 \pm 0.008 ^b	0.084 \pm 0.009 ^c	0.043 \pm 0.008
6.5 (XII)	0.039 \pm 0.008 ^a	0.045 \pm 0.005 ^a	0.026 \pm 0.005 ^a	0.078 \pm 0.008 ^b	0.094 \pm 0.012 ^b	0.056 \pm 0.007
6.5 (XIV)	0.029 \pm 0.008 ^{ab}	0.042 \pm 0.012 ^{ab}	0.036 \pm 0.009 ^{ab}	0.023 \pm 0.005 ^a	0.055 \pm 0.012 ^b	0.037 \pm 0.009
8.5 (III)	0.016 \pm 0.005 ^b	0.055 \pm 0.009 ^a	0.045 \pm 0.005 ^a	0.058 \pm 0.008 ^a	0.149 \pm 0.012 ^c	0.065 \pm 0.008
8.5 (XII)	0.013 \pm 0.005 ^a	0.029 \pm 0.008 ^{ab}	0.042 \pm 0.005 ^b	0.016 \pm 0.005 ^a	0.117 \pm 0.008 ^c	0.043 \pm 0.006
8.5 (XIV)	0.026 \pm 0.017 ^a	0.029 \pm 0.008 ^a	0.039 \pm 0.014 ^a	0.039 \pm 0.008 ^a	0.091 \pm 0.012 ^b	0.045 \pm 0.012
Proteins and peptides [$\mu\text{g of proteins cm}^{-3}$]						
4.5 (III)	297.42 \pm 5.44 ^b	473.18 \pm 7.52 ^a	473.37 \pm 6.33 ^a	509.37 \pm 7.35 ^c	545.95 \pm 19.68 ^d	459.86 \pm 9.26
4.5 (XII)	341.12 \pm 20.62 ^b	421.78 \pm 14.01 ^a	387.32 \pm 9.27 ^{ab}	394.06 \pm 14.68 ^a	430.25 \pm 15.16 ^a	394.91 \pm 14.75
4.5 (XIV)	308.40 \pm 7.41 ^d	394.06 \pm 1.91 ^{bc}	365.19 \pm 2.37 ^a	378.85 \pm 6.48 ^{ab}	413.12 \pm 10.90 ^c	371.92 \pm 5.81
6.5 (III)	253.15 \pm 14.66 ^c	331.88 \pm 15.36 ^a	372.89 \pm 9.63 ^a	457.78 \pm 26.16 ^b	499.55 \pm 13.07 ^b	383.05 \pm 15.78
6.5 (XII)	222.54 \pm 31.28 ^a	319.95 \pm 16.78 ^{ab}	385.40 \pm 24.89 ^{bc}	478.38 \pm 25.49 ^{cd}	500.90 \pm 48.65 ^d	381.43 \pm 29.42
6.5 (XIV)	176.72 \pm 15.18 ^a	258.34 \pm 16.51 ^b	313.98 \pm 12.95 ^c	401.38 \pm 10.99 ^d	445.85 \pm 9.68 ^e	319.25 \pm 13.06
8.5 (III)	182.69 \pm 24.00 ^c	275.67 \pm 23.98 ^a	332.65 \pm 11.62 ^{ab}	385.21 \pm 21.24 ^b	465.10 \pm 1.96 ^d	328.26 \pm 16.56
8.5 (XII)	192.12 \pm 26.88 ^c	316.48 \pm 6.95 ^a	354.02 \pm 13.88 ^a	436.80 \pm 26.07 ^b	490.31 \pm 16.40 ^b	357.95 \pm 18.04
8.5 (XIV)	166.90 \pm 28.06 ^a	262.19 \pm 14.73 ^{ab}	317.64 \pm 42.48 ^{bc}	401.95 \pm 41.16 ^{cd}	454.51 \pm 45.75 ^d	320.64 \pm 34.44
Amino groups [$\mu\text{g N-NH}_2 \text{ cm}^{-3}$]						
4.5 (III)	5.78 \pm 0.43 ^a	10.62 \pm 0.23 ^b	10.34 \pm 0.30 ^b	6.16 \pm 0.33 ^a	6.61 \pm 0.19 ^a	7.90 \pm 0.30
4.5 (XII)	7.02 \pm 0.16 ^b	10.89 \pm 0.15 ^c	11.98 \pm 0.31 ^a	12.57 \pm 0.34 ^a	14.46 \pm 0.33 ^d	11.38 \pm 0.26
4.5 (XIV)	5.37 \pm 0.31 ^b	8.32 \pm 0.24 ^a	9.15 \pm 0.28 ^a	7.32 \pm 0.17 ^c	8.42 \pm 0.32 ^a	7.72 \pm 0.26
6.5 (III)	24.07 \pm 0.68 ^a	32.62 \pm 1.06 ^b	50.03 \pm 0.70 ^d	36.84 \pm 1.80 ^c	23.61 \pm 0.39 ^a	33.43 \pm 0.92
6.5 (XII)	19.88 \pm 0.47 ^b	30.68 \pm 1.07 ^c	58.49 \pm 0.83 ^d	26.27 \pm 0.33 ^a	25.52 \pm 1.00 ^a	32.17 \pm 0.74
6.5 (XIV)	20.66 \pm 0.14 ^a	30.69 \pm 1.10 ^b	55.85 \pm 1.54 ^c	27.76 \pm 1.00 ^b	22.50 \pm 0.49 ^a	31.49 \pm 0.85
8.5 (III)	16.18 \pm 0.71 ^a	25.00 \pm 0.24 ^b	45.72 \pm 2.00 ^c	19.25 \pm 1.25 ^a	16.60 \pm 1.07 ^a	24.55 \pm 1.06
8.5 (XII)	15.87 \pm 0.90 ^a	25.27 \pm 0.92 ^b	44.97 \pm 1.36 ^c	26.01 \pm 0.98 ^b	17.77 \pm 0.96 ^a	25.98 \pm 1.03
8.5 (XIV)	18.61 \pm 0.43 ^a	23.49 \pm 0.28 ^b	36.28 \pm 0.59 ^d	28.56 \pm 0.71 ^c	19.34 \pm 0.44 ^a	25.26 \pm 0.49

Thiol groups [$\mu\text{g -SH cm}^{-3}$]						
4.5 (III)	2.35 ± 0.15 ^a	2.99 ± 0.15 ^{ab}	6.72 ± 0.47 ^d	4.69 ± 0.15 ^c	3.95 ± 0.53 ^{bc}	4.14 ± 0.29
4.5 (XII)	5.28 ± 0.13 ^{ab}	7.14 ± 0.87 ^c	3.73 ± 0.40 ^a	4.37 ± 0.33 ^a	6.13 ± 0.42 ^{bc}	5.33 ± 0.43
4.5 (XIV)	4.80 ± 0.23 ^a	5.33 ± 0.33 ^a	4.53 ± 0.87 ^a	4.69 ± 0.53 ^a	4.74 ± 0.96 ^a	4.82 ± 0.58
6.5 (III)	3.84 ± 0.26 ^a	0.85 ± 0.20 ^b	0.80 ± 0.13 ^b	4.69 ± 1.06 ^a	4.90 ± 1.29 ^a	3.02 ± 0.59
6.5 (XII)	1.97 ± 0.38 ^a	1.92 ± 0.35 ^a	3.04 ± 0.23 ^a	2.51 ± 0.40 ^a	6.77 ± 0.98 ^b	3.24 ± 0.47
6.5 (XIV)	0.75 ± 0.20 ^a	1.71 ± 0.53 ^a	3.89 ± 0.59 ^b	1.49 ± 0.42 ^a	2.24 ± 0.47 ^a	2.02 ± 0.44
8.5 (III)	2.72 ± 0.78 ^a	0.91 ± 0.20 ^a	0.69 ± 0.20 ^a	2.77 ± 0.53 ^a	5.81 ± 1.18 ^b	2.58 ± 0.58
8.5 (XII)	2.61 ± 0.85 ^a	1.33 ± 0.40 ^a	1.23 ± 0.33 ^a	1.71 ± 0.49 ^a	4.80 ± 0.35 ^b	2.34 ± 0.48
8.5 (XIV)	1.55 ± 0.33 ^a	0.80 ± 0.13 ^{ab}	1.65 ± 0.08 ^a	0.27 ± 0.15 ^b	5.22 ± 0.59 ^c	1.90 ± 0.25
Sulfate ions [$\text{mg SO}_4^{2-} \text{cm}^{-3}$]						
4.5 (III)	0.32 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.02 ^d	1.15 ± 0.02 ^e	0.55 ± 0.03 ^b	0.66 ± 0.03 ^c	0.73 ± 0.02
4.5 (XII)	0.59 ± 0.04 ^a	0.96 ± 0.04 ^c	0.57 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.01 ^b	0.53 ± 0.02 ^a	0.56 ± 0.03
4.5 (XIV)	0.34 ± 0.03 ^a	1.00 ± 0.06 ^b	0.91 ± 0.01 ^b	0.31 ± 0.10 ^a	0.60 ± 0.02 ^c	0.63 ± 0.04
6.5 (III)	0.61 ± 0.03 ^b	0.95 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.03 ^b	0.88 ± 0.04 ^a	0.95 ± 0.03 ^a	0.80 ± 0.03
6.5 (XII)	0.65 ± 0.03 ^a	1.08 ± 0.03 ^c	0.67 ± 0.03 ^a	0.90 ± 0.06 ^b	0.97 ± 0.03 ^{bc}	0.85 ± 0.04
6.5 (XIV)	0.65 ± 0.03 ^a	1.00 ± 0.04 ^b	0.58 ± 0.03 ^a	0.67 ± 0.02 ^a	1.02 ± 0.04 ^b	0.78 ± 0.03
8.5 (III)	0.67 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.02 ^b	0.55 ± 0.04 ^c	0.73 ± 0.04 ^a	0.92 ± 0.03 ^b	0.77 ± 0.03
8.5 (XII)	0.67 ± 0.02 ^a	0.92 ± 0.04 ^b	0.54 ± 0.03 ^c	0.73 ± 0.02 ^a	0.88 ± 0.04 ^b	0.75 ± 0.03
8.5 (XIV)	0.73 ± 0.01 ^{ab}	0.82 ± 0.02 ^a	0.67 ± 0.04 ^b	0.80 ± 0.03 ^a	0.94 ± 0.04 ^c	0.79 ± 0.03
Ammonium ions [$\mu\text{g NH}_4^+ \text{cm}^{-3}$]						
4.5 (III)	365.53 ± 7.71 ^c	637.65 ± 9.38 ^a	620.27 ± 23.04 ^a	558.61 ± 7.19 ^b	598.95 ± 12.50 ^{ab}	556.20 ± 11.96
4.5 (XII)	525.24 ± 7.75 ^b	687.03 ± 8.92 ^a	677.99 ± 5.42 ^a	555.37 ± 9.20 ^c	593.61 ± 10.50 ^d	607.85 ± 8.36
4.5 (XIV)	460.33 ± 14.23 ^b	646.23 ± 2.29 ^a	668.71 ± 11.49 ^a	531.49 ± 8.98 ^c	578.08 ± 6.02 ^d	576.97 ± 8.60
6.5 (III)	459.41 ± 27.58 ^a	587.36 ± 40.84 ^c	544.24 ± 16.69 ^{bc}	482.59 ± 9.85 ^{ab}	431.82 ± 16.78 ^a	501.08 ± 22.35
6.5 (XII)	474.01 ± 13.16 ^{ab}	574.61 ± 41.73 ^c	528.71 ± 6.25 ^{bc}	474.01 ± 16.55 ^{ab}	441.56 ± 15.56 ^a	498.58 ± 18.65
6.5 (XIV)	445.27 ± 12.51 ^a	565.80 ± 19.51 ^c	524.31 ± 28.23 ^{bc}	464.97 ± 19.48 ^{ab}	414.90 ± 9.02 ^a	483.05 ± 17.75
8.5 (III)	327.06 ± 39.48 ^a	491.86 ± 16.06 ^c	437.85 ± 19.87 ^{bc}	364.61 ± 13.63 ^{ab}	295.07 ± 17.05 ^a	383.29 ± 21.22
8.5 (XII)	363.45 ± 41.48 ^a	493.25 ± 11.97 ^b	439.94 ± 21.05 ^b	348.84 ± 10.00 ^a	296.92 ± 10.79 ^a	388.48 ± 19.06
8.5 (XIV)	338.41 ± 28.50 ^a	475.17 ± 8.80 ^b	427.88 ± 16.55 ^b	349.77 ± 11.40 ^a	294.61 ± 15.67 ^a	377.17 ± 16.18

Explanations: as in Table S1.

Table S4. Dynamics of changes in enzymatic activity and the secretion of organic and mineral products of chicken feathers keratinolysis of by *Trichophyton ajelloi* strains fungi in various culture temperature variants (20, 28 and 37°C).

Days	7	14	21	28	35	Mean
Protease [$\mu\text{g tyrosine cm}^{-3}$]						
20°C (III)	61.69 ± 12.15 ^d	246.82 ± 8.67 ^c	226.48 ± 6.42 ^a	188.46 ± 22.34 ^{ab}	173.00 ± 12.58 ^a	179.29 ± 12.43
20°C (XII)	51.18 ± 8.25 ^c	240.90 ± 5.80 ^b	211.24 ± 3.54 ^b	163.31 ± 18.21 ^a	134.76 ± 15.21 ^a	160.28 ± 10.20
20°C (XIV)	168.93 ± 0.75 ^a	221.30 ± 4.86 ^b	204.36 ± 9.91 ^b	159.76 ± 5.99 ^a	136.17 ± 8.70 ^c	178.10 ± 6.04
28°C (III)	48.15 ± 3.90 ^a	58.87 ± 3.26 ^b	40.24 ± 0.55 ^a	59.02 ± 3.99 ^b	70.56 ± 1.27 ^c	55.37 ± 2.59
28°C (XII)	44.82 ± 1.09 ^{ac}	47.56 ± 2.08 ^a	37.57 ± 1.64 ^b	40.01 ± 1.27 ^{bc}	49.41 ± 2.16 ^a	43.88 ± 1.65
28°C (XIV)	49.04 ± 2.54 ^c	38.09 ± 3.02 ^{ab}	32.84 ± 0.79 ^a	33.14 ± 3.26 ^a	42.16 ± 1.57 ^{bc}	39.05 ± 2.24
37°C (III)	24.11 ± 0.42 ^a	26.63 ± 2.06 ^{ab}	35.72 ± 2.37 ^b	27.88 ± 4.45 ^{ab}	31.06 ± 3.36 ^{ab}	29.08 ± 2.53
37°C (XII)	22.63 ± 1.89 ^a	27.07 ± 1.89 ^a	41.05 ± 7.62 ^b	30.77 ± 2.91 ^{ab}	33.51 ± 3.03 ^{ab}	31.01 ± 3.47
37°C (XIV)	14.27 ± 0.89 ^a	22.41 ± 2.57 ^{ab}	25.07 ± 3.64 ^{ab}	23.45 ± 7.01 ^{ab}	27.07 ± 2.04 ^b	22.46 ± 3.23
Keratinase [KU cm⁻³]						
20°C (III)	24.47 ± 4.58 ^b	37.00 ± 4.93 ^{ab}	40.20 ± 3.69 ^a	50.20 ± 4.34 ^{ac}	63.17 ± 4.83 ^c	43.01 ± 4.47
20°C (XII)	20.77 ± 3.84 ^b	38.07 ± 7.84 ^a	38.47 ± 6.71 ^a	42.07 ± 1.51 ^a	50.70 ± 3.48 ^a	38.01 ± 4.68
20°C (XIV)	24.70 ± 3.16 ^a	39.33 ± 2.37 ^{bc}	31.57 ± 4.83 ^{ab}	43.13 ± 2.11 ^c	56.63 ± 2.32 ^d	39.07 ± 2.96
28°C (III)	54.77 ± 1.68 ^b	79.57 ± 1.75 ^a	81.03 ± 1.54 ^a	80.73 ± 2.78 ^a	93.70 ± 1.69 ^c	77.96 ± 1.89
28°C (XII)	40.23 ± 2.05 ^a	38.53 ± 1.55 ^a	48.40 ± 2.27 ^b	44.30 ± 2.60 ^{ab}	56.97 ± 1.62 ^c	45.69 ± 2.02
28°C (XIV)	39.67 ± 2.48 ^a	42.87 ± 1.02 ^{ab}	49.13 ± 2.52 ^{bc}	50.27 ± 1.62 ^c	56.80 ± 1.39 ^d	47.75 ± 1.81
37°C (III)	34.87 ± 3.30 ^{ab}	29.13 ± 6.30 ^a	28.17 ± 3.92 ^a	45.70 ± 3.47 ^{bc}	56.67 ± 3.33 ^c	38.91 ± 4.06
37°C (XII)	37.47 ± 2.90 ^a	31.73 ± 1.81 ^{ab}	24.83 ± 0.80 ^b	39.53 ± 3.25 ^a	66.70 ± 3.29 ^c	40.05 ± 2.41
37°C (XIV)	36.80 ± 1.95 ^a	31.30 ± 4.08 ^{ab}	16.53 ± 3.59 ^b	35.73 ± 8.70 ^a	44.67 ± 1.92 ^a	33.01 ± 4.05
Disulfide reductase [U cm⁻³]						
20°C (III)	0.010 ± 0.001 ^a	0.019 ± 0.008 ^{ab}	0.010 ± 0.001 ^a	0.016 ± 0.006 ^{ab}	0.026 ± 0.005 ^b	0.016 ± 0.003
20°C (XII)	0.013 ± 0.005 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.019 ± 0.001 ^a	0.019 ± 0.008 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.016 ± 0.004
20°C (XIV)	0.010 ± 0.001 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.032 ± 0.005 ^b	0.016 ± 0.004
28°C (III)	0.010 ± 0.001 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.019 ± 0.008 ^{ab}	0.032 ± 0.005 ^b	0.017 ± 0.004
28°C (XII)	0.194 ± 0.008 ^{ab}	0.188 ± 0.012 ^a	0.223 ± 0.008 ^{bc}	0.207 ± 0.012 ^{ab}	0.256 ± 0.012 ^c	0.214 ± 0.010
28°C (XIV)	0.013 ± 0.005 ^a	0.036 ± 0.009 ^b	0.019 ± 0.008 ^{ab}	0.026 ± 0.005 ^{ab}	0.084 ± 0.005 ^c	0.036 ± 0.006
37°C (III)	0.016 ± 0.005 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.016 ± 0.005 ^a	0.049 ± 0.008 ^b	0.016 ± 0.005 ^a	0.022 ± 0.005
37°C (XII)	0.045 ± 0.005 ^a	0.013 ± 0.005 ^b	0.055 ± 0.009 ^a	0.045 ± 0.005 ^a	0.074 ± 0.005 ^c	0.047 ± 0.005
37°C (XIV)	0.023 ± 0.005 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.026 ± 0.005 ^{ab}	0.042 ± 0.005 ^b	0.016 ± 0.009 ^a	0.024 ± 0.005
Proteins and peptides [$\mu\text{g of proteins cm}^{-3}$]						
20°C (III)	214.84 ± 10.15 ^c	397.91 ± 21.41 ^a	434.49 ± 28.52 ^a	516.69 ± 13.52 ^b	507.83 ± 28.80 ^b	414.35 ± 20.48
20°C (XII)	228.31 ± 2.84 ^b	460.28 ± 20.86 ^a	442.96 ± 35.95 ^a	503.40 ± 29.84 ^a	499.94 ± 26.64 ^a	426.9 ± 23.23
20°C (XIV)	259.88 ± 29.34 ^c	393.87 ± 24.32 ^b	435.26 ± 17.48 ^{ab}	491.28 ± 17.03 ^a	488.58 ± 1.25 ^a	413.77 ± 17.88
28°C (III)	297.42 ± 5.44 ^b	473.18 ± 7.52 ^a	473.37 ± 6.33 ^a	509.37 ± 7.35 ^c	545.95 ± 19.68 ^d	459.86 ± 9.26
28°C (XII)	341.12 ± 20.62 ^b	421.78 ± 14.01 ^a	387.32 ± 9.27 ^{ab}	394.06 ± 14.68 ^a	430.25 ± 15.16 ^a	394.91 ± 14.75
28°C (XIV)	308.40 ± 7.41 ^d	394.06 ± 1.91 ^{bc}	365.19 ± 2.37 ^a	378.85 ± 6.48 ^{ab}	413.12 ± 10.90 ^c	371.92 ± 5.81
37°C (III)	333.61 ± 17.53 ^b	413.89 ± 12.21 ^{ab}	455.47 ± 19.88 ^a	488.97 ± 50.49 ^{ac}	575.79 ± 36.55 ^c	453.55 ± 27.33
37°C (XII)	316.87 ± 18.58 ^a	381.55 ± 14.84 ^a	463.56 ± 12.80 ^b	522.08 ± 16.58 ^{bc}	572.51 ± 31.23 ^c	451.31 ± 18.81
37°C (XIV)	365.96 ± 24.33 ^a	424.28 ± 52.95 ^a	458.17 ± 31.46 ^{ab}	539.79 ± 29.74 ^{bc}	596.19 ± 26.27 ^c	476.88 ± 32.95
Amino groups [$\mu\text{g N-NH}_2 \text{ cm}^{-3}$]						
20°C (III)	2.89 ± 0.12 ^b	12.06 ± 0.34 ^c	32.57 ± 0.11 ^a	30.08 ± 1.23 ^a	31.45 ± 1.19 ^a	21.81 ± 0.59
20°C (XII)	3.27 ± 0.16 ^b	14.01 ± 0.73 ^c	32.57 ± 0.78 ^d	25.68 ± 2.06 ^a	26.21 ± 1.47 ^a	20.35 ± 1.04
20°C (XIV)	3.04 ± 0.17 ^b	13.05 ± 0.53 ^c	32.03 ± 1.37 ^a	31.30 ± 0.92 ^a	32.51 ± 1.39 ^a	22.39 ± 0.87
28°C (III)	5.78 ± 0.43 ^a	10.62 ± 0.23 ^b	10.34 ± 0.30 ^b	6.16 ± 0.33 ^a	6.61 ± 0.19 ^a	7.90 ± 0.30
28°C (XII)	7.02 ± 0.16 ^b	10.89 ± 0.15 ^c	11.98 ± 0.31 ^a	12.57 ± 0.34 ^a	14.46 ± 0.33 ^d	11.38 ± 0.26
28°C (XIV)	5.37 ± 0.31 ^b	8.32 ± 0.24 ^a	9.15 ± 0.28 ^a	7.32 ± 0.17 ^c	8.42 ± 0.32 ^a	7.72 ± 0.26
37°C (III)	3.34 ± 0.08 ^{ac}	1.87 ± 0.07 ^c	4.43 ± 0.62 ^{ab}	5.03 ± 0.25 ^{ab}	5.73 ± 1.03 ^b	4.08 ± 0.41
37°C (XII)	3.40 ± 0.14 ^a	1.94 ± 0.13 ^a	5.39 ± 0.49 ^b	6.66 ± 0.65 ^{bc}	7.07 ± 0.70 ^c	4.89 ± 0.42
37°C (XIV)	2.52 ± 0.15 ^a	1.38 ± 0.04 ^a	4.04 ± 0.20 ^b	4.88 ± 0.69 ^{bc}	5.41 ± 0.26 ^c	3.64 ± 0.27

Thiol groups [$\mu\text{g -SH cm}^{-3}$]						
20°C (III)	1.60 ± 0.39 ^a	3.41 ± 0.42 ^b	1.92 ± 0.39 ^a	3.89 ± 0.20 ^b	0.96 ± 0.13 ^a	2.36 ± 0.31
20°C (XII)	4.58 ± 1.06 ^a	3.36 ± 0.86 ^a	1.97 ± 0.49 ^a	4.85 ± 0.87 ^a	9.28 ± 1.25 ^b	4.81 ± 0.91
20°C (XIV)	1.39 ± 0.20 ^{ab}	2.24 ± 0.13 ^a	0.91 ± 0.38 ^b	5.76 ± 0.52 ^c	2.45 ± 0.46 ^a	2.55 ± 0.34
28°C (III)	2.35 ± 0.15 ^a	2.99 ± 0.15 ^{ab}	6.72 ± 0.47 ^d	4.69 ± 0.15 ^c	3.95 ± 0.53 ^{bc}	4.14 ± 0.29
28°C (XII)	5.28 ± 0.13 ^{ab}	7.14 ± 0.87 ^c	3.73 ± 0.40 ^a	4.37 ± 0.33 ^a	6.13 ± 0.42 ^{bc}	5.33 ± 0.43
28°C (XIV)	4.80 ± 0.23 ^a	5.33 ± 0.33 ^a	4.53 ± 0.87 ^a	4.69 ± 0.53 ^a	4.74 ± 0.96 ^a	4.82 ± 0.58
37°C (III)	3.68 ± 0.35 ^a	2.35 ± 0.33 ^a	1.76 ± 0.26 ^a	9.01 ± 0.20 ^b	35.83 ± 1.51 ^c	10.52 ± 0.53
37°C (XII)	6.13 ± 0.59 ^a	5.81 ± 0.27 ^a	3.57 ± 0.27 ^b	9.33 ± 0.79 ^c	37.59 ± 0.91 ^d	12.49 ± 0.57
37°C (XIV)	3.52 ± 1.26 ^a	4.85 ± 1.18 ^a	20.05 ± 0.74 ^b	16.10 ± 1.10 ^b	31.67 ± 1.71 ^c	15.24 ± 1.20
Sulfate ions [$\text{mg SO}_4^{2-} \text{cm}^{-3}$]						
20°C (III)	0.73 ± 0.01 ^c	0.64 ± 0.01 ^a	1.18 ± 0.02 ^d	0.66 ± 0.02 ^{ab}	0.70 ± 0.02 ^{bc}	0.78 ± 0.01
20°C (XII)	0.49 ± 0.02 ^a	0.70 ± 0.03 ^b	1.23 ± 0.03 ^e	0.95 ± 0.03 ^d	0.83 ± 0.02 ^c	0.84 ± 0.03
20°C (XIV)	0.90 ± 0.05 ^c	0.60 ± 0.02 ^b	1.16 ± 0.02 ^d	0.79 ± 0.03 ^a	0.75 ± 0.02 ^a	0.84 ± 0.03
28°C (III)	0.32 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.02 ^d	1.15 ± 0.02 ^e	0.55 ± 0.03 ^b	0.66 ± 0.03 ^c	0.73 ± 0.02
28°C (XII)	0.59 ± 0.04 ^a	0.96 ± 0.04 ^c	0.57 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.01 ^b	0.53 ± 0.02 ^a	0.56 ± 0.03
28°C (XIV)	0.34 ± 0.03 ^a	1.00 ± 0.06 ^b	0.91 ± 0.01 ^b	0.31 ± 0.10 ^a	0.60 ± 0.02 ^c	0.63 ± 0.04
37°C (III)	0.34 ± 0.02 ^b	0.11 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.02 ^a	0.16 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.02 ^a	0.19 ± 0.02
37°C (XII)	0.34 ± 0.01 ^b	0.08 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.04 ^a	0.18 ± 0.02
37°C (XIV)	0.26 ± 0.02 ^c	0.01 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^{ab}	0.05 ± 0.02 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.01
Ammonium ions [$\mu\text{g NH}_4^+ \text{cm}^{-3}$]						
20°C (III)	237.82 ± 16.54 ^b	636.50 ± 35.28 ^a	718.09 ± 45.27 ^a	637.65 ± 41.74 ^a	641.83 ± 18.69 ^a	574.38 ± 31.51
20°C (XII)	129.57 ± 44.24 ^b	525.24 ± 32.09 ^a	615.17 ± 42.31 ^a	523.61 ± 3.97 ^a	531.26 ± 20.45 ^a	464.97 ± 28.61
20°C (XIV)	296.00 ± 2.29 ^c	675.67 ± 37.62 ^{ab}	729.91 ± 8.54 ^b	655.97 ± 32.57 ^{ab}	635.10 ± 13.16 ^a	598.53 ± 18.84
28°C (III)	365.53 ± 7.71 ^c	637.65 ± 9.38 ^a	620.27 ± 23.04 ^a	558.61 ± 7.19 ^b	598.95 ± 12.50 ^{ab}	556.20 ± 11.96
28°C (XII)	525.24 ± 7.75 ^b	687.03 ± 8.92 ^a	677.99 ± 5.42 ^a	555.37 ± 9.20 ^c	593.61 ± 10.50 ^d	607.85 ± 8.36
28°C (XIV)	460.33 ± 14.23 ^b	646.23 ± 2.29 ^a	668.71 ± 11.49 ^a	531.49 ± 8.98 ^c	578.08 ± 6.02 ^d	576.97 ± 8.60
37°C (III)	66.52 ± 3.69 ^a	111.95 ± 9.01 ^a	110.80 ± 20.16 ^a	98.05 ± 9.95 ^a	188.21 ± 20.96 ^b	115.11 ± 12.75
37°C (XII)	66.29 ± 7.19 ^a	109.40 ± 4.76 ^{bc}	138.38 ± 10.36 ^c	89.93 ± 10.50 ^{ab}	180.80 ± 10.09 ^d	116.96 ± 8.58
37°C (XIV)	12.28 ± 1.73 ^b	28.28 ± 3.78 ^{ab}	30.60 ± 4.54 ^{ab}	41.26 ± 12.62 ^a	46.13 ± 3.28 ^a	31.71 ± 5.19

Explanations: as in Table S1.

Table S5. Dynamics of changes in enzymatic activity and the secretion of organic and mineral products of chicken feathers keratinolysis of by *Trichophyton ajelloi* strains with different culture methods.

Days	7	14	21	28	35	Mean
Protease [$\mu\text{g tyrosine cm}^{-3}$]						
ST (III)	48.15 \pm 3.90 ^a	58.87 \pm 3.26 ^b	40.24 \pm 0.55 ^a	59.02 \pm 3.99 ^b	70.56 \pm 1.27 ^c	55.37 \pm 2.59
ST (XII)	44.82 \pm 1.09 ^{ac}	47.56 \pm 2.08 ^a	37.57 \pm 1.64 ^b	40.01 \pm 1.27 ^{bc}	49.41 \pm 2.16 ^a	43.88 \pm 1.65
ST (XIV)	49.04 \pm 2.54 ^c	38.09 \pm 3.02 ^{ab}	32.84 \pm 0.79 ^a	33.14 \pm 3.26 ^a	42.16 \pm 1.57 ^{bc}	39.05 \pm 2.24
AG (III)	30.62 \pm 1.78 ^a	38.61 \pm 7.53 ^a	29.51 \pm 1.01 ^a	28.85 \pm 2.68 ^a	36.32 \pm 9.96 ^a	32.78 \pm 4.59
AG (XII)	72.48 \pm 9.42 ^c	45.41 \pm 2.47 ^b	29.66 \pm 1.68 ^{ab}	39.94 \pm 8.04 ^{ab}	23.00 \pm 1.83 ^a	42.10 \pm 4.69
AG (XIV)	34.61 \pm 2.02 ^a	28.99 \pm 0.75 ^a	21.75 \pm 1.75 ^b	15.53 \pm 0.83 ^b	31.43 \pm 3.73 ^a	26.46 \pm 1.82
Keratinase [KU cm⁻³]						
ST (III)	54.77 \pm 1.68 ^b	79.57 \pm 1.75 ^a	81.03 \pm 1.54 ^a	80.73 \pm 2.78 ^a	93.70 \pm 1.69 ^c	77.96 \pm 1.89
ST (XII)	40.23 \pm 2.05 ^a	38.53 \pm 1.55 ^a	48.40 \pm 2.27 ^b	44.30 \pm 2.60 ^{ab}	56.97 \pm 1.62 ^c	45.69 \pm 2.02
ST (XIV)	39.67 \pm 2.48 ^a	42.87 \pm 1.02 ^{ab}	49.13 \pm 2.52 ^{bc}	50.27 \pm 1.62 ^c	56.80 \pm 1.39 ^d	47.75 \pm 1.81
AG (III)	71.07 \pm 0.12 ^a	42.50 \pm 1.85 ^b	61.30 \pm 5.41 ^a	47.30 \pm 5.75 ^{bc}	59.10 \pm 2.51 ^a	56.25 \pm 3.13
AG (XII)	54.97 \pm 0.25 ^{ab}	42.93 \pm 2.61 ^a	63.93 \pm 5.71 ^b	48.30 \pm 5.42 ^a	52.33 \pm 1.95 ^{ab}	52.49 \pm 3.19
AG (XIV)	54.87 \pm 5.52 ^b	35.97 \pm 3.87 ^a	52.27 \pm 6.47 ^b	37.13 \pm 4.03 ^a	44.63 \pm 3.80 ^{ab}	44.97 \pm 4.74
Disulfide reductase [U cm⁻³]						
ST (III)	0.010 \pm 0.001 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.013 \pm 0.005 ^a	0.019 \pm 0.008 ^{ab}	0.032 \pm 0.005 ^b	0.017 \pm 0.004
ST (XII)	0.194 \pm 0.008 ^{ab}	0.188 \pm 0.012 ^a	0.223 \pm 0.008 ^{bc}	0.207 \pm 0.012 ^{ab}	0.256 \pm 0.012 ^c	0.214 \pm 0.010
ST (XIV)	0.013 \pm 0.005 ^a	0.036 \pm 0.009 ^b	0.019 \pm 0.008 ^{ab}	0.026 \pm 0.005 ^{ab}	0.084 \pm 0.005 ^c	0.036 \pm 0.006
AG (III)	0.045 \pm 0.005 ^b	0.010 \pm 0.001 ^a	0.039 \pm 0.008 ^b	0.013 \pm 0.005 ^a	0.071 \pm 0.012 ^c	0.036 \pm 0.006
AG (XII)	0.013 \pm 0.005 ^a	0.010 \pm 0.001 ^a	0.023 \pm 0.005 ^{ab}	0.036 \pm 0.009 ^b	0.013 \pm 0.005 ^a	0.019 \pm 0.005
AG (XIV)	0.036 \pm 0.005 ^b	0.026 \pm 0.005 ^{ab}	0.013 \pm 0.005 ^a	0.071 \pm 0.012 ^c	0.023 \pm 0.005 ^{ab}	0.034 \pm 0.006
Proteins and peptides [$\mu\text{g of proteins cm}^{-3}$]						
ST (III)	297.42 \pm 5.44 ^b	473.18 \pm 7.52 ^a	473.37 \pm 6.33 ^a	509.37 \pm 7.35 ^c	545.95 \pm 19.68 ^d	459.86 \pm 9.26
ST (XII)	341.12 \pm 20.62 ^b	421.78 \pm 14.01 ^a	387.32 \pm 9.27 ^{ab}	394.06 \pm 14.68 ^a	430.25 \pm 15.16 ^a	394.91 \pm 14.75
ST (XIV)	308.40 \pm 7.41 ^d	394.06 \pm 1.91 ^{bc}	365.19 \pm 2.37 ^a	378.85 \pm 6.48 ^{ab}	413.12 \pm 10.90 ^c	371.92 \pm 5.81
AG (III)	471.45 \pm 43.81 ^a	459.51 \pm 10.46 ^a	529.59 \pm 25.18 ^{ab}	571.94 \pm 28.75 ^{bc}	630.65 \pm 11.12 ^c	532.63 \pm 23.86
AG (XII)	500.71 \pm 18.91 ^{ab}	460.48 \pm 21.72 ^a	495.90 \pm 20.80 ^{ab}	517.27 \pm 24.28 ^{ab}	529.97 \pm 6.74 ^b	500.86 \pm 18.49
AG (XIV)	380.97 \pm 26.27 ^a	355.56 \pm 3.48 ^a	398.10 \pm 44.10 ^a	414.47 \pm 36.13 ^a	429.87 \pm 11.37 ^a	395.79 \pm 24.27
Amino groups [$\mu\text{g N-NH}_2 \text{ cm}^{-3}$]						
ST (III)	5.78 \pm 0.43 ^a	10.62 \pm 0.23 ^b	10.34 \pm 0.30 ^b	6.16 \pm 0.33 ^a	6.61 \pm 0.19 ^a	7.90 \pm 0.30
ST (XII)	7.02 \pm 0.16 ^b	10.89 \pm 0.15 ^c	11.98 \pm 0.31 ^a	12.57 \pm 0.34 ^a	14.46 \pm 0.33 ^d	11.38 \pm 0.26
ST (XIV)	5.37 \pm 0.31 ^b	8.32 \pm 0.24 ^a	9.15 \pm 0.28 ^a	7.32 \pm 0.17 ^c	8.42 \pm 0.32 ^a	7.72 \pm 0.26
AG (III)	3.63 \pm 0.17 ^b	12.17 \pm 1.04 ^c	17.28 \pm 1.79 ^d	23.25 \pm 0.73 ^a	24.20 \pm 1.41 ^a	16.11 \pm 1.03
AG (XII)	6.19 \pm 0.22 ^c	20.81 \pm 0.44 ^{ab}	19.56 \pm 0.87 ^a	21.48 \pm 1.04 ^{ab}	22.83 \pm 1.11 ^b	18.17 \pm 0.74
AG (XIV)	5.87 \pm 0.50 ^c	17.60 \pm 0.68 ^a	16.89 \pm 0.40 ^a	20.31 \pm 0.49 ^b	21.49 \pm 0.39 ^b	16.43 \pm 0.49
Thiol groups [$\mu\text{g -SH cm}^{-3}$]						
ST (III)	2.35 \pm 0.15 ^a	2.99 \pm 0.15 ^{ab}	6.72 \pm 0.47 ^d	4.69 \pm 0.15 ^c	3.95 \pm 0.53 ^{bc}	4.14 \pm 0.29
ST (XII)	5.28 \pm 0.13 ^{ab}	7.14 \pm 0.87 ^c	3.73 \pm 0.40 ^a	4.37 \pm 0.33 ^a	6.13 \pm 0.42 ^{bc}	5.33 \pm 0.43
ST (XIV)	4.80 \pm 0.23 ^a	5.33 \pm 0.33 ^a	4.53 \pm 0.87 ^a	4.69 \pm 0.53 ^a	4.74 \pm 0.96 ^a	4.82 \pm 0.58
AG (III)	4.90 \pm 0.96 ^a	6.66 \pm 0.62 ^a	6.98 \pm 1.18 ^a	4.32 \pm 0.69 ^a	1.07 \pm 0.33 ^b	4.79 \pm 0.76
AG (XII)	5.06 \pm 0.67 ^{ab}	6.18 \pm 0.20 ^a	5.60 \pm 1.33 ^{ab}	2.88 \pm 0.79 ^b	6.08 \pm 0.78 ^a	5.16 \pm 0.75
AG (XIV)	2.56 \pm 0.35 ^{ab}	3.63 \pm 0.20 ^{bc}	5.54 \pm 1.63 ^c	0.69 \pm 0.08 ^a	3.09 \pm 0.49 ^{abc}	3.10 \pm 0.55
Sulfate ions [mg SO₄²⁻ cm⁻³]						
ST (III)	0.32 \pm 0.03 ^a	0.95 \pm 0.02 ^d	1.15 \pm 0.02 ^e	0.55 \pm 0.03 ^b	0.66 \pm 0.03 ^c	0.73 \pm 0.02
ST (XII)	0.59 \pm 0.04 ^a	0.96 \pm 0.04 ^c	0.57 \pm 0.03 ^a	0.17 \pm 0.01 ^b	0.53 \pm 0.02 ^a	0.56 \pm 0.03
ST (XIV)	0.34 \pm 0.03 ^a	1.00 \pm 0.06 ^b	0.91 \pm 0.01 ^b	0.31 \pm 0.10 ^a	0.60 \pm 0.02 ^c	0.63 \pm 0.04
AG (III)	0.51 \pm 0.04 ^b	0.65 \pm 0.03 ^c	0.96 \pm 0.03 ^d	1.16 \pm 0.02 ^a	1.09 \pm 0.04 ^a	0.87 \pm 0.03
AG (XII)	0.58 \pm 0.03 ^b	0.70 \pm 0.04 ^b	1.10 \pm 0.04 ^a	1.10 \pm 0.03 ^a	1.10 \pm 0.04 ^a	0.92 \pm 0.04
AG (XIV)	0.54 \pm 0.03 ^c	0.64 \pm 0.02 ^d	0.89 \pm 0.03 ^a	0.95 \pm 0.02 ^{ab}	0.98 \pm 0.03 ^b	0.80 \pm 0.03
Ammonium ions [$\mu\text{g NH}_4^+ \text{ cm}^{-3}$]						

ST (III)	365.53 ± 7.71 ^c	637.65 ± 9.38 ^a	620.27 ± 23.04 ^a	558.61 ± 7.19 ^b	598.95 ± 12.50 ^{ab}	556.20 ± 11.96
ST (XII)	525.24 ± 7.75 ^b	687.03 ± 8.92 ^a	677.99 ± 5.42 ^a	555.37 ± 9.20 ^c	593.61 ± 10.50 ^d	607.85 ± 8.36
ST (XIV)	460.33 ± 14.23 ^b	646.23 ± 2.29 ^a	668.71 ± 11.49 ^a	531.49 ± 8.98 ^c	578.08 ± 6.02 ^d	576.97 ± 8.60
AG (III)	217.19 ± 18.78 ^b	256.59 ± 29.81 ^b	423.25 ± 39.92 ^a	433.68 ± 42.91 ^a	457.32 ± 46.90 ^a	357.61 ± 35.66
AG (XII)	319.17 ± 29.34 ^b	411.43 ± 10.73 ^a	454.31 ± 11.27 ^a	417.92 ± 13.35 ^a	392.42 ± 37.65 ^a	399.05 ± 20.47
AG (XIV)	276.06 ± 24.59 ^b	427.88 ± 10.23 ^a	434.37 ± 22.21 ^a	403.31 ± 6.40 ^a	392.19 ± 10.33 ^a	386.76 ± 14.75

Explanations: as in Table S1.

5. Publikacja 5 [P.5.]



Article


Effect of Keratin Hydrolysates Obtained from Feather Decomposition by *Trichophyton ajelloi* on Plant Germination, Growth and Biological Activity of Selected Arable Soils under Model Conditions

Michał Możejko and Justyna Bohacz



Article

Effect of Keratin Hydrolysates Obtained from Feather Decomposition by *Trichophyton ajelloi* on Plant Germination, Growth and Biological Activity of Selected Arable Soils under Model Conditions

Michał Mozejko  and Justyna Bohacz * 

Department of Environmental Microbiology, Faculty of Agrobioengineering, University of Life Sciences in Lublin, Leszczyńskiego 7 Street, 20-069 Lublin, Poland

* Correspondence: justyna.bohacz@up.lublin.pl; Tel.: +48-815248105; Fax: +48-815248106

Abstract: The use of fertilizers based on organic waste as a result of microbial biodegradation and biotransformation is becoming increasingly common practice in plant cultivation. This is to limit the chemicals used in agriculture and thus protect the environment and consumer health. The aim of this study was to evaluate a hitherto unexplored effect of hydrolysates obtained after biodegradation of chicken feather waste by a soil strain of the keratinolytic fungus *Trichophyton ajelloi* on germination, early growth, and development of plants, in particular with high sulfur requirements, and to verify, in model conditions, their impact on soil biological activity and the total pool of soil DNA. Undiluted and diluted keratin hydrolysate generally stimulated seed germination as well as root and shoot growth of the *Lepidium sativum* L. (garden cress) and *Brassica napus* L. var. *napus* (oilseed rape) on sandy soil (Cambisol I), loamy soil (Cambisol II), and Chernozem. In the model experiment, in the variants with and without oilseed rape on sandy soil and Chernozem, the introduction of keratin hydrolysate generally increased the total abundance of microorganisms. In sandy soil, feather hydrolysate mostly increased respiratory activity, dehydrogenase activity, and alkaline phosphatase activity by an average of approx. 38% and the total DNA pool by 15% and 23% in the variant with and without plants. The activity of protease and acid phosphatase increased by an average of 4% and 6% only in the variant without oilseed rape. Respiratory and enzymatic activity in Chernozem, in the variants with and without oilseed rape, tended to show a downward trend, despite periodically recorded increases. The total DNA pool has increased by 8% in the oilseed rape variant. Oilseed rape biomass was almost two-fold higher after adding feather hydrolysate to both soils, and its yield was higher by 98% in Chernozem than in sandy soil. The results have demonstrated that keratin hydrolysate can be used as a biofertilizer.

Keywords: *Trichophyton ajelloi*; feather hydrolysate; biofertilizer; phytotoxicity; soil microorganisms; soil respiration; soil enzymes; dsDNA; *Brassica napus* L. var *napus*



Citation: Mozejko, M.; Bohacz, J. Effect of Keratin Hydrolysates Obtained from Feather Decomposition by *Trichophyton ajelloi* on Plant Germination, Growth and Biological Activity of Selected Arable Soils under Model Conditions. *Agronomy* **2023**, *13*, 187. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010187>

Academic Editor: Justyna Starzyk

Received: 17 November 2022

Revised: 28 December 2022

Accepted: 3 January 2023

Published: 6 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Unfavorable climate change has been forcing environmental protection measures for years, including limiting the use of chemical fertilizers and plant protection products. Preparation on the basis of organic waste subjected to microbiological biodegradation and biotransformation are an alternative, environmentally friendly and non-threatening form of fertilizers for consumers. Wastes with high potential for reuse include, among others, lignocellulosic waste due to their high organic C content and humus-forming potential, as well as keratin waste with high nitrogen and organic sulfur content [1]. As shown by Brandelli et al. [2], these wastes, especially feather waste, after appropriate processing, become valuable products applied in various industries. Mozejko and Bohacz [3] have reported that processed keratin waste is used as a bioproduct with high fertilizer and feed potential, and

keratinolytic enzymes of microbial origin find applications in medicine, pharmaceuticals, industry, and bioenergetics. Studies by Bohacz [4], Bohacz and Kornilłowicz-Kowalska [5], Bohacz et al. [6,7], and Możejko and Bohacz [3] have shown that soil fungi of the genera *Chrysosporium*, *Arthroderma*, *Trichophyton*, and the species *Aphanoascus keratinophilus*, isolated from composts, release soluble proteins, peptides, and amino acids, as well as mineral forms of sulfur and nitrogen during the biodegradation of waste native keratin, which is important from the fertilization perspective. Fertilizers and microbial-based fertilizers produced through microbiological processing are increasingly used in agriculture. For example, composted lignocellulosic waste provides compost with a high fertilizing value which is safe in sanitary and phytosanitary terms [8]. This waste is used as an ecofriendly biosorbent for the application of heavy metal ion sorption and processed in energy recovery and ethanol production processes [9].

Despite the progressive development of waste management, including waste of animal origin, methods of applying and testing the effectiveness of fertilizers produced by microbiological biodegradation of chicken feather waste remain underdeveloped in practice. Kornilłowicz-Kowalska and Bohacz [1] and Brandelli et al. [2] reported that hydrolysates obtained by enzymatic microbial biodegradation of feather keratin could be useful in agriculture as nitrogen fertilizers or soil modifications. Such fertilizers produced on the basis of microorganisms and/or their metabolites, containing plant extracts and humic substances, are described by many authors as biopreparations, biostimulants, or microbiological vaccines [10]; other authors [11] define them as biofertilizers.

As de Silva [12] has pointed out, biopreparations in the form of protein hydrolysates for agriculture use exert a beneficial effect on soil fertility and act as plant biostimulants. The study of Santi et al. [13] showed that protein hydrolysates stimulated the growth of maize more effectively than mineral nitrogen fertilization. Other authors [14] reported that the treatment of wheat seeds with 5.0% keratin hydrolysate obtained chemically and physically from sheep's wool increased wheat growth by an average of 15%. Keratin hydrolysates, apart from being introduced into the soil, can also be used for foliar fertilization because they stimulate plant growth and development, as written by Gaidau et al. [15]. These authors have emphasized that a special role in this process is played by the low-molecular-weight protein fractions of the hydrolysate, as well as high free amino acid content. In addition, the action of protein hydrolysates is associated with the supply of nutrients readily available to microorganisms, intensification of their circulation in the soil, and thus stimulation of its biological activity [13,16]. Enriching the soil with mineral and organic compounds affects the abundance and diversity of microorganisms inhabiting this environment [17,18], as well as their biochemical activity, including enzymatic and respiratory processes [19,20]. Therefore, this practice can exert both stimulating and limiting effects on biological activity [21].

According to Możejko and Bohacz [3], keratin hydrolysate obtained under optimized *Trichophyton ajelloi* culture conditions could be considered a mineral-organic biofertilizer because it had a high content of soluble proteins, peptides, and amino acids, as well as ammonium and sulfate ions. As a result, it could be considered as a potential mineral-organic fertilizer, especially in the cultivation of plants with high sulfur requirements.

Global annual production of oil plants is estimated at 550 million Mg [22]. Oilseed rape plays a significant role in this type of production, as it has the largest cultivated acreage in the world second to soybean [23]. Oilseed rape is a plant with high sensitivity to soil sulfur deficiency, which has a direct impact on yields [24]. Groth et al. [22] reported that representatives of the families *Brassicaceae* and *Liliaceae* have the highest requirements for this element. Sulfur plays an important role in plant yielding because its deficiency reduces nitrogen uptake by the plant, i.e., the most important macronutrient that determines and promotes plant growth [25]. Sulfur is also important in the plant metabolic processes, as it is part of proteins and enzymes that play a key role in the synthesis of compounds important for plants, including *Brassicaceae*, such as proteins, lignins, or fatty acids; moreover, in the metabolism of nitrogen compounds and sugars, it affects the amount and quality of

fat in oilseed rape, as well as the taste and aroma of some plants [22,26]. In addition, the particularly high demand of *Brassicaceae* members in relation to sulfur is due to the presence of sulfur compounds in the biomass of these plants, i.e., glutathione (GSH), sulfolipids, glucosinolates (GSL), phytoalexins, and alliinins [26]. Adequate supply for oilseed rape and other sulfur-sensitive crops with this element should be the basis of the fertilization plan, as its availability determines the yield and resistance of plants to biotic and abiotic stresses [23,26–28].

Keratin hydrolysate obtained by microbiological biodegradation, due to the high content of soluble proteins, peptides, and mineral forms of sulfur and nitrogen, is ideally suited for use as a biofertilizer in plants' cultivation, especially those with high sulfur demand. There are little data in the literature on the use of keratin hydrolysates, especially of fungal origin, for soil and plant fertilization. Therefore, the aim of the present work, consisting in model experiments, was to evaluate the effect of not previously studied hydrolysates obtained after chicken feather waste biodegradation by the soil strain of the keratinolytic fungus *Trichophyton ajelloi* on germination, early growth, and development of plants, particularly those with high sulfur demand (*Brassica napus* L. var. *napus*), and to study their phytotoxicity and influence on soil biological activity based on microbiological, biochemical, and enzymatic indices.

2. Materials and Methods

2.1. Fungus Strain

A strain of *Trichophyton ajelloi* (Vanbreus.) was used to obtain feather hydrolysates. The strain, designated as No. XII, was selected from among three fungal strains of this species, isolated by the keratin bait method (chicken feathers) from brown soil with particle size distribution of light loamy sand, classified according to World Reference Base Classification [29] as Cambisol [30]. The strain was selected for its ability to biodegrade chicken feathers after 21 days of static culture of the three tested strains in a liquid medium containing 1.0% feather waste as the only source of C, N, S, and energy [3]. The maximum amounts of ammonium ions and sulfate ions produced as products of feather biodegradation, important from the fertilization point of view, were considered as a selection criterion.

2.2. Production and Chemical Composition of Feather Hydrolysate

In order to obtain keratin hydrolysate, liquid cultures of the test strain No. XII *Trichophyton ajelloi* were established on a medium with the composition provided in the work of Mozejko and Bohacz [3], with an initial pH of 4.5 and the addition of 1.0% feather waste as the only source of carbon, nitrogen, sulfur, and energy. The cultures were carried out at 28 °C under static conditions. The hydrolysate obtained after 21 days of the fungus culture was separated from feather residues and mycelium by filtering using sterile, hydrophilic PVDF syringe filters (pore diameter: 0.22 µm, filter diameter: 33 mm). The resulting fertilizer biopreparation contained 0.03% N, 443 mg kg⁻¹ K, 677.99 µg ml⁻¹ NH₄⁺, and 0.57 mg ml⁻¹ SO₄²⁻.

Detailed characteristics of the keratinolytic potential of *Trichophyton ajelloi* strain No. XII used in this study and the two other *Trichophyton ajelloi* strains designated as No. III and No. XIV, as well as the hydrolysates obtained on their basis, were described in the previous article of Mozejko and Bohacz [3].

2.3. Determination of Keratin Hydrolysate Phytotoxicity

2.3.1. Soils Used for Phytotoxicity Tests of Feather Hydrolysates

Phytotoxicity of keratin hydrolysates was determined on three soil samples. Soil I and II were classified as Cambisols with particle size distribution of light loamy sand and sandy loam, respectively. These soils in the study of Bohacz et al. [30] were conventionally defined as sandy (Cambisol I) and loamy soil (Cambisol II), respectively. Soil III was classified as Chernozem with the texture of silt loam. Soil samples were collected from the depth of 0–20 cm of the arable layer of agriculture fields of individual farms located in the Lublin

Province (southeastern Poland). Cambisol I was characterized by the following chemical parameters: 0.59% organic C, 0.059% N, 102.0 mg kg⁻¹ P, and 80.0 mg kg⁻¹ K; Cambisol II contained 1.02% organic C, 0.107% N, 67.0 mg kg⁻¹ P, and 140.0 mg kg⁻¹ K, and Chernozem contained 3.16% organic C, 0.301% N, 212.0 mg kg⁻¹ P, and 472.0 mg kg⁻¹ K [30]. The exact location of soils and soil sampling method are described in the study of Bohacz et al. [30].

2.3.2. Plants Used for Phytotoxicity Tests of Feather Hydrolysates

The effect of keratin hydrolysate obtained by fungal keratinolysis on the growth, and development of the test plants was carried out using the commercial Phytotoxkit kit (Tigret, Poland).

The phytotoxicity of feather hydrolysate was analyzed against two test plants, i.e., cress (*Lepidium sativum* L.), also known as garden cress, and oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *napus*). *Lepidium sativum* L. was selected for the study because seeds of this plant are used in toxicity tests due to their rapid germination, growth, and high sensitivity to toxic metabolites [31]. Both plants belong to *Brassicaceae*, i.e., plants with high sulfur requirements [24,26]. The seeds of winter oilseed rape of the variety Hugo were derived from an individual farm in southeastern Poland, while garden cress seeds were attached to the Phytotoxkit kit as a reference material (Tigret, Poland).

2.3.3. Phytotoxicity Determination

Air-dry soil samples in the amount of 100.0 g were applied on prepared phytotoxicity test plates and moistened with undiluted and 3-times diluted hydrolysate to 70% whc. Plates with soil moistened with distilled water to the same moisture level were used as controls. The moistened soils were spread evenly over the entire surface of the test plates to obtain a soil layer of uniform thickness, and a paper filter was placed on the surface of the soaked soil (control and experimental). Subsequently 10 seeds of both tested test plants were laid out, i.e., garden cress (*Lepidium sativum* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *napus*). The plates were closed with lids, and the thus prepared phytotests were incubated for 3 days at 25 °C in the dark in type ST 350/350 incubators manufactured by Pol-Eko, Poland.

On the basis of the obtained data, seed germination capacity (G_C), root growth inhibition coefficient (I_R), and plant shoot elongation coefficient (I_S) were calculated according to Czop et al. [32], and the germination index (G_I) according to Carvalho Neves et al. [33] using the following equations:

$$G_C (\%) = \frac{N_G}{N_S} \times 100$$

where:

N_G —number of germinated seeds; N_S —number of seeds sown

$$I_R (\%) = \frac{L_C - L_S}{L_C} \times 100$$

where:

L_C —average plant root length in control (mm); L_S —average plant root length in the experimental sample (mm)

$$I_S (\%) = \frac{L_C - L_S}{L_C} \times 100$$

where:

L_C —average plant shoot length in control (mm); L_S —average plant shoot length in the experimental sample (mm)

$$G_I (\%) = \frac{R_S}{R_C} \times \frac{G_S}{G_C} \times 100$$

where:

R_S —average root length in sample (mm); R_C —average root length in control (mm); G_S —average number of germinated seeds in sample; G_C —average number of germinated seeds in control.

The G_I value exceeding 80% [34] indicates the absence of phytotoxic effect of organic fertilizers, especially composts, on plant growth and development.

The mean root to shoot length ratio was also calculated using the formula of Czop et al. [32]:

$$\frac{L_R}{L_S} \sim 1$$

where:

L_R —average root length (mm); L_S —average shoot length (mm).

This ratio is an indicator of the influence of the substrate on the disproportions in plant development. It should have a value of approx. 1, which indicates that the root and shoot grow proportionally to each other and reach equal value [32].

2.4. Determination of the Effect of Keratin Hydrolysates on Biological Activity of Soils and Plant Growth

2.4.1. Soils Used in the Study

In order to investigate the effect of keratin hydrolysates on soil biological activity and plant growth, a pot experiment was set up on two soils, i.e., sandy soil (Cambisol I) and Chernozem. Soils were selected based on differences in chemical properties and phytotoxicity results.

2.4.2. Experimental Variants, Test Plant, and Experimental Conditions

Oilseed rape *Brassica napus* L. var. *napus* was selected to study the effects of feather hydrolysates on microbiological, biochemical, and enzymatic soil parameters and plant growth.

The experimental model included four experimental variants for each of the two tested soils, in triplicate:

- Variant I (control 1): soil, water;
- Variant II (control 2): soil, water, oilseed rape;
- Variant III: soil, keratin hydrolysate;
- Variant IV: soil, keratin hydrolysate, oilseed rape.

The experiment was carried out for 60 days in a Biogenet FD147 Inox growth chamber in pots with an area of 64 cm². Each pot contained 400 g of soil on which 25 oilseed rape seeds were placed. The plants were maintained at 23.0 °C during the day and 17.5 °C at night with 85.0% air humidity. The set photoperiod at that time was 15 h light/9 h dark.

Periodically, the soils in each of the variants were moistened to 60% of the total water capacity with a water hydrolysate solution or only with water (controls).

The total amount of ammonium N and sulfate S introduced into the studied soils was calculated based on the concentration of ammonium and sulfate ions in the resulting hydrolysate. A total of 1095.2×10^{-7} kg of N—ammonium and 395.2×10^{-7} kg S—sulfate was introduced per pot of sandy soil during the experiment, which was equivalent to 171 kg ha⁻¹ N and 62 kg ha⁻¹ S. To Chernozem, a total of 1158.4×10^{-7} kg of N—ammonium and 418×10^{-7} kg of S—sulfate was introduced, and it corresponded to 183 kg ha⁻¹ N and 65 kg ha⁻¹ S.

Periodically, i.e., after 3, 30 and 60 days, the biological activity of the soil in the experimental combinations was determined based on the microbiological, enzymatic, and biochemical indicators, as well as the content of the total dsDNA pool in soil samples. The biomass of the tested plant was also determined.

2.4.3. Abundance of Soil Microorganisms

Determination of the number of microorganisms was carried out by plating decimal dilutions of the tested soil samples using standard methods commonly applied in soil microbiology. The total number of bacteria was determined on a soil extract medium (30.0% of the final medium volume) with the following composition [g dm^{-3}]: yeast extract (1.0), K_2HPO_4 (1.3), KH_2PO_4 (1.0), KNO_3 (0.5), agar (20.0), and $\text{pH} = 7.0$. The total abundance of soil fungi was determined on Martin medium [35] containing [g dm^{-3}]: glucose (10.0), peptone (5.0), KH_2PO_4 (1.0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5), and agar (20.0); [mg dm^{-3}]: rose bengal (33.3), streptomycin (30.0), and chlortetracycline (2.0). The abundance of proteolytic microorganisms was determined on Frazier's medium with gelatin as the main N source with the following composition [g dm^{-3}]: NaCl (3.0), K_2HPO_4 (1.5), KH_2PO_4 (0.5), gelatin (6.0), glucose (0.05), peptone (0.1), agar (15.0), broth (1 cm^3), and $\text{pH} = 7.0$. The number of cellulolytic bacteria and fungi was determined using cellulose filter paper (Whatman 1) as the only source of C and energy. The mineral medium for cellulolytic bacteria contained [g dm^{-3}]: KNO_3 (1.0), K_2HPO_4 (0.5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2), NaCl (0.2), CaCO_3 (5.0), agar (15.0), trace amount of MnSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, and $\text{pH} = 7.0$. Cellulolytic fungi were cultured on a medium with the following salt composition [g dm^{-3}]: NH_4NO_3 (2.0), KNO_3 (1.0), KH_2PO_4 (1.0), KCl (0.5), MgSO_4 (0.5), FeSO_4 (0.01), agar (15.0), trace amount of CuSO_4 and NaCl , and $\text{pH} = 5.5$.

Microbial cultures were conducted in Petri dishes in type ST 350/350 incubators (Pol-Eko, Poland). Cultures for bacteria were carried out at $28 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 days, and for fungi at $26 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 days. After this time, the grown colonies were counted using a colony counter (LKB 2002, Pol-Eko, Poland). Proteolytic microorganisms were counted after pouring Frazier's reagent ($\text{HgCl}_2 - 15 \text{ g}$, $\text{HCl}_{\text{con.}} - 20 \text{ cm}^3$, $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}} - 100 \text{ cm}^3$) over the medium with grown colonies. Only those colonies that were surrounded by a clear zone of degraded protein were counted.

In all cases, microbial count determinations were performed in triplicate. The results are given in $\text{cfu kg}^{-1} \text{ d. m. of soil}$.

2.4.4. Respiratory and Soil Enzyme Activity

Respiratory activity was determined according to the methodology of Rühling and Tyler [36]. The obtained results were converted into $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d.m. soil } 24 \text{ h}^{-1}$. Dehydrogenase activity was determined using the method of Thalmann [37] with 1.0% 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) as a substrate dissolved in Tris-HCl buffer at $\text{pH} 7.4$. TPF (triphenylformazan) was measured spectrophotometrically (Rayleigh UV-VIS-1800 spectrophotometer, China) at 485 nm. The results are given in $\text{mg TPF kg}^{-1} \text{ d.m. of soil } 24 \text{ h}^{-1}$. Acid and alkaline phosphatase activity was measured against a 0.1% solution of PNPNa (4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate) in a modified universal buffer at $\text{pH} 6.5$ and 11.0 , respectively, at 400 nm [38]. The results are given in $\text{mmol PNP kg}^{-1} \text{ d.m. of soil h}^{-1}$. Protease activity in soil samples was determined spectrophotometrically at 578 nm according to the method of Ladd and Butler [39] using a 1.0% solution of sodium caseinate dissolved in 0.1 M Tris-HCl buffer at $\text{pH} = 8.1$. The results are given in $\text{mg of tyrosine kg}^{-1} \text{ d.m. of soil h}^{-1}$.

Soil dry matter determinations were carried out at $105 \text{ }^\circ\text{C}$ using a balance with a built-in dryer (MAC 50/NH, RADWAG, Radom, Poland).

The soil from each experimental variant (from pot) was sieved through a sieve with a diameter of 2 mm and then weighed in the appropriate amount for each analysis in accordance with the methodology provided.

2.4.5. DNA Concentration Measurements

DNA was isolated from each tested variant from all experimental time points. Isolation of soil DNA was carried out using the commercial GeneMATRIX Series DNA kit (EURX, Gdansk, Poland) and followed the attached procedure, and dsDNA concentration was

measured using a UV–VIS NanoDrop One spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

According to the literature data [40], genetic material with the A_{260}/A_{280} ratio between 1.80 and 2.00 was assumed as pure DNA of soil samples.

2.4.6. Oilseed Rape Biomass Determination

As one of the parameters determining the effect of soil bio-fertilization on the growth and development of oilseed rape, the yield of fresh oilseed rape biomass was periodically determined by weight (g), i.e., after 3, 14, 21, and 30 days. For this purpose, the plant biomass was separated from the soil by shaking the roots and then weighed (PS 210/C/2, RADWAG, Radom, Poland).

2.4.7. Determination of Soil Chemical Parameters

The pH of the tested soil samples was measured potentiometrically in 1 M KCl using a pH meter (pH meter CP–504, Elmetron, Zabrze, Poland) on day 3, 30, and 60 of the experiment.

Soil total organic C content (TOC) was determined on a non-dispersive NDIR infrared gas analyzer (TOC–VCSH Analyzer, Shimadzu, Kyoto, Japan). Total nitrogen (N) content was analyzed by the Kjeldahl method, after digestion at 420 °C in an automatic digester (Tecator Digester™ Auto 2520, FOSS, Denmark), followed by distillation and titration in an analyzer (KjelROC Analyzer, OPSIS LiquidLINE, Kävlinge Municipality, Sweden). A spectrophotometric method of determining the intensity of blue color of phosphate–molybdenum (UV–1800 Spectrophotometer, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was used to determine the content of bioavailable phosphorus (P). Potassium content was measured using flame atomization atomic absorption spectrometry (FAAS) (SpektrAA 280FS with SPS–3 autosampler and SIPS diluter, Varian, Australia). Determinations of TOC, N, P, and K contents were carried out in all experimental variants at the beginning, i.e., day 3, and at the end, i.e., after 60 days of the experiment.

2.5. Statistical Analysis

The results were statistically analyzed using Statistica ver. 13.3 software (StatSoft, Kraków, Poland). A multivariate analysis of variance (ANOVA) was carried out at the $\alpha = 0.05$ level of significance to determine significant differences between the microbiological, biochemical, and enzymatic parameters of soil biological activity, as well as differences in plant biomass in different experimental variants over the course of the experiment. In addition, to capture the interrelationships between the measured indicators and chemical parameters in the experimental variants, r–Pearson’s linear correlation coefficients were calculated at the significance levels of $\alpha = 0.05$, 0.01, and 0.001.

Principal component analysis (PCA) was performed to demonstrate the relationship between the microbiological, biochemical, and enzymatic indicators and their changes depending on the experimental time point. The results of the analysis are presented on the score (dots) and loading (vectors) plots that should be interpreted simultaneously [41]. The loading plot shows the effect of variables, i.e., number of bacteria, fungi, proteolytic microorganisms, number of cellulolytic bacteria and fungi, respiratory activity, dehydrogenase activity, protease activity and acid and alkaline phosphatase activity on individual principal components and reveals the correlation structure against the variables. The score plot is a map of observation and presents experimental variants and analysis dates. If the observation on the score plot (individual optimized parameters and experimental variants) is in the corresponding part on the loading plot, the greater the influence of the variable on the observation.

3. Results

3.1. Phytotoxicity

Based on the seed germination capacity (G_C) of the test plants *Lepidium sativum* L. (garden cress) and *Brassica napus* L. var. *napus* (oilseed rape), it was found that both undiluted and diluted keratin hydrolysate stimulated seed germination (Table 1). In contrast, an inhibitory effect occurred on root growth (I_R) and shoot elongation (I_S) of oilseed rape and garden cress under the influence of undiluted keratin hydrolysate introduced into sandy soil (Cambisol I). Oilseed rape turned out to be more sensitive plant, which was expressed by 16% higher inhibition of root growth and 94% higher shoot elongation inhibition of this plant compared to garden cress. In addition, the undiluted hydrolysate more strongly inhibited the shoot growth than the root of both plants tested. On the other hand, the introduction of undiluted keratin hydrolysate into Chernozem inhibited root and shoot growth of oilseed rape but not garden cress. However, compared to sandy soil, the inhibition of oilseed rape root and shoot growth on Chernozem was two times weaker (Table 1).

Table 1. Phytotoxicity of feather hydrolysates in soils with different physico-chemical properties.

Soil	Plant	[%]				R:S
		G_C	I_R	I_S	G_I	
Feather hydrolysate						
Cambisol I	<i>Brassica napus</i> L. var. <i>napus</i>	100.00	48.66	42.11	51.34	3.15
	<i>Lepidium sativum</i> L.	100.00	41.82	21.76	58.18	1.47
Chernozem	<i>Brassica napus</i> var. <i>napus</i>	100.00	17.78	21.94	82.22	2.71
	<i>Lepidium sativum</i> L.	100.00	−7.63	−27.81	107.63	1.71
Feather hydrolysate diluted 1:2						
Cambisol I	<i>Brassica napus</i> L. var. <i>napus</i>	100.00	−1.63	−59.47	101.63	2.26
	<i>Lepidium sativum</i> L.	100.00	17.76	17.13	82.24	1.97
Cambisol II	<i>Brassica napus</i> L. var. <i>napus</i>	100.00	10.92	−2.19	89.08	2.71
	<i>Lepidium sativum</i> L.	100.00	−2.02	−26.25	102.02	1.38
Chernozem	<i>Brassica napus</i> L. var. <i>napus</i>	100.00	−26.55	−70.22	126.55	1.91
	<i>Lepidium sativum</i> L.	100.00	−13.95	−13.90	113.95	2.03

Explanations: G_C —seed germination capacity; I_R —root growth inhibition coefficient; I_S —shoot elongation inhibition coefficient; G_I —germination index; R:S—root to shoot length ratio.

The triple-diluted hydrolysate introduced into all three soils: sandy soil (Cambisol I), loamy soil (Cambisol II), and Chernozem stimulated both root and shoot growth of *Brassica napus* L. var. *napus* except for root growth in loamy soil (Cambisol II) (Table 1). With regard to *Lepidium sativum* L., stimulation of the analyzed plant growth indices was also observed under the influence of diluted hydrolysate, except for sandy soil. The data in Table 1 show that the stimulation of oilseed rape root and shoot growth on Chernozem was 1529% and 18% higher, respectively, compared to sandy soil. In contrast, inhibition of oilseed rape root growth was recorded in loamy soil (Cambisol II).

The analyses demonstrated that the root/shoot length ratio in all experimental variants reached values above the optimum, i.e., about 1, which indicated that root growth was faster within 3 days (Table 1).

Overall, a diluted (1:2) fertilizer biopreparation had a more favorable effect on the growth and development of the tested plants. Stronger stimulation of plant growth and development after hydrolysate application was observed for rapeseed (*Brassica napus* L. var. *napus*) than for garden cress (*Lepidium sativum* L.) as determined by higher G_I values (Table 1).

3.2. Abundance of Soil Microorganisms

The data in Figure 1 show that the total number of bacteria in the studied soils, i.e., sandy soil (Cambisol I) and Chernozem, increased with the duration of the experiment. This effect was observed both in the control variants irrigated with distilled water and the variants with the addition of hydrolysate with and without plants. The highest significant increase (by 714%) of the abundance of this group of microorganisms in relation to the initial date was recorded after the introduction of the hydrolysate into sandy soil without oilseed rape plants (Figure 1, Table S1). The lowest, but not statistically significant ($\alpha = 0.05$), increase in number of bacteria (by 27%) was recorded in sandy soil irrigated with water with the growth of the test plant (control 2). Compared to both control variants on sandy soil, the introduction of the hydrolysate stimulated bacterial growth by an average of 103% in the variant without plants and by 26% in the variant with plants (Figure 1, Table S1).

The total abundance of soil bacteria in Chernozem was significantly higher throughout the experiment and in all experimental variants compared to sandy soil. With respect to water-moistened control variants, the hydrolysate introduced into the soil increased bacterial abundance by 19% in the system with oilseed rape, while it had the opposite effect without oilseed rape plants, i.e., a decrease in the number of bacteria by 7% (Figure 1, Table S1).

In conclusion, it was found that bacterial abundance in both sandy soil and Chernozem was higher after hydrolysate application, regardless of the presence of the plant, except for Chernozem without plants (Figure 1, Table S1).

The introduction of keratin hydrolysate also had an effect on soil fungal populations in both sandy soil and Chernozem. In the first month of the experiment, there was a decrease in total fungal abundance in the control variants not fertilized with keratin hydrolysate, with the exception of the variant with plants and sandy soil (Figure 1). However, these changes were not statistically significant ($\alpha = 0.05$). After this date, a further decrease in fungal abundance in the control variants without oilseed rape planting and an increase in abundance in the variants with oilseed rape in sandy soil (9%) and Chernozem (31%) were observed. The addition of the hydrolysate to sandy soil in the long term resulted in a 32% decrease in fungal abundance in the variant with plants and an 11% decrease in the variant without them (Figure 1, Table S1). In Chernozem, total fungal abundance was on average 10% lower compared to sandy soil in the control and hydrolysate-fertilized variants (Table S1). The data obtained indicated that keratin hydrolysate in both soils exerted a significantly higher and positive effect on fungal populations in the variants without plant growth. This corresponded to an increase in the abundance at an average of 22% and 31% in Cambisol I and Chernozem, respectively, (Figure 1, Table S1).

Due to the high content of organic nitrogen compounds in keratin hydrolysates, it was justified to study the dynamics of changes in the abundance of proteolytic microorganisms. The data in Figure 1 show that the number of proteolytic microorganisms in sandy soil increased in all experimental variants until day 60 of the experiment, except for the variant with the addition of the hydrolysate and plant growth. The highest significant increase (by 282%) in the number of this group of microorganisms in relation to the initial time point was recorded after the introduction of the hydrolysate into sandy soil without plants (Figure 1, Table S1). In the variant with oilseed rape plants, the abundance of proteolytic microorganisms decreased non-significantly after day 30 of the experiment (Figure 1).

In Chernozem, the abundance of proteolytic microorganisms increased until day 30 of the experiment. After this time, it decreased in all experimental variants established on this soil. The highest decrease in the abundance of these microorganisms was recorded in the control variants without hydrolysate addition and with plants (68%) and a smaller decrease (9%) in the variant without plants (Figure 1, Table S1). Overall, keratin hydrolysate introduced into Chernozem reduced the growth of proteolytic microorganisms in both unfertilized and oilseed rape-planted variants (by 6% and 38%, respectively) relative to the unfertilized variants (Figure 1, Table S1).

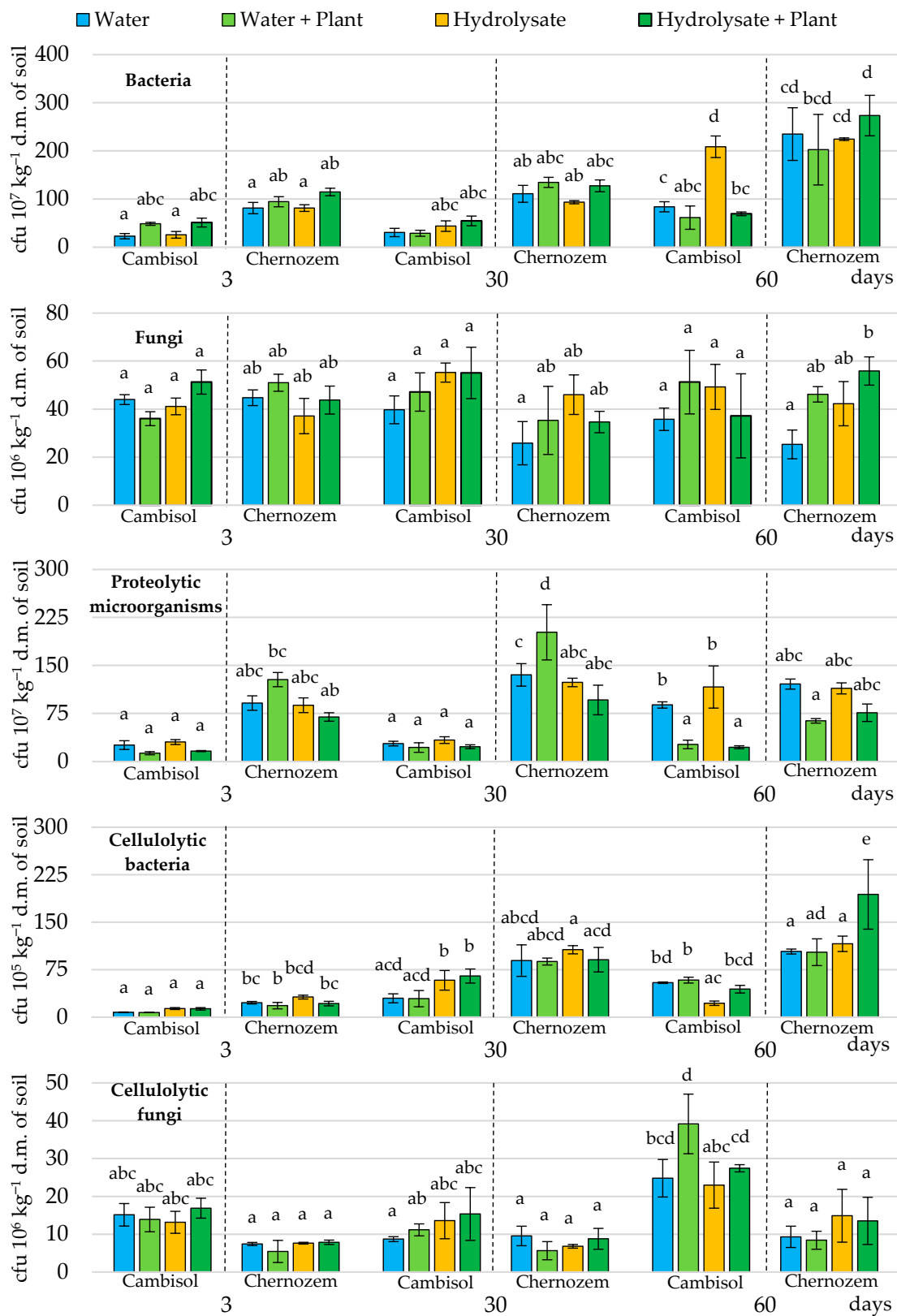


Figure 1. Dynamics of changes in the numbers of selected groups of microorganisms in different experimental variants; letters, i.e., a, b, c, d denote the means that form homogenous groups (HSD—Tukey post hoc test for multivariate ANOVA). When two compared means were assigned the same letter (e.g., a, a or ab, ab) that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g., a and b, etc.) they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

On the other hand, the duration of the experiment had a positive effect on the abundance of cellulolytic bacteria colonizing the tested soils (Figure 1). A statistically significant ($\alpha = 0.05$) increase in the abundance of this group of microorganisms over time was recorded for all experimental variants tested. The only exception was Cambisol I enriched with the hydrolysate, in which, after 30 days of the experiment, a significant decrease (62%) in the number of cellulolytic bacteria was recorded in the variant without oilseed rape plants. A non-significant decrease (32%) in the number of these bacteria was recorded in the variant with oilseed rape (Figure 1, Table S1). The abundance of cellulolytic bacteria generally reached higher levels in the variants where plants were included. The highest statistically significant increase of 803% in the abundance of this group of bacteria during the course of the experiment was recorded in Chernozem with oilseed rape plants and hydrolysate addition (Figure 1, Table S1). It was also found that the introduction of keratin hydrolysate had a more beneficial effect on cellulolytic bacteria inhabiting Chernozem than Cambisol I. In this soil, the number of these bacteria was significantly higher (by 171%) in the variant without oilseed rape, as well as with these plants (150%) (Figure 1, Table S1).

The abundance of cellulolytic fungi increased in all experimental variants of both tested soils (Figure 1). However, a statistically significant ($\alpha = 0.05$) increase in the abundance of this group of fungi at the final stage of the experiment (182%; $\alpha = 0.05$) was found only in sandy soil with oilseed rape and the absence of fertilization with hydrolysate (Table S1). After adding the hydrolysate to sandy soil, the abundance of this group of microorganisms decreased slightly in the variant with oilseed rape and increased slightly in the variant without these plants (Figure 1). With respect to Chernozem with hydrolysate treatment, the abundance of cellulolytic fungi increased compared to control samples 1 and 2 by 12% in the variant without plants and by 55% in the variant with plants (Figure 1, Table S1).

Comparing the effect of keratin hydrolysate on the two soils, it was found that it was more effective in stimulating the abundance of cellulolytic fungi in sandy soil than in Chernozem (Figure 1, Table S1).

3.3. Respiratory and Enzymatic Activity

The data in Figure 2 indicate that the amount of CO₂ released from both tested soils after 60 days of the experiment was higher compared to the initial date. Statistically significant ($\alpha = 0.05$) increases in respiratory activity in sandy soil (Cambisol I), relative to the initial date of analysis, were recorded in the variants with oilseed rape without keratin hydrolysate and with the hydrolysate but without plants (433% and 75%, respectively) (Figure 2, Table S2).

The amount of CO₂ released in this soil on day 60 of the experiment was significantly the highest in the variant with the hydrolysate without plants. In Chernozem, significantly higher CO₂ release, compared to the initial time point, was recorded in the variant without rapeseed planting, irrigated with distilled water, and with keratin hydrolysate (by 108% and 204%, respectively) (Figure 2, Table S2). A slight decrease (21%) in carbon dioxide release between the first and last date of analysis was found only in the case of water-irrigated Chernozem with the test plant growth (Figure 2, Table S2). Overall, the enrichment of sandy soil with microbiologically processed feathers resulted in a visible increase in respiratory activity in the variants without oilseed rape (averaging 97% and 37%, respectively) (Table S2). On the other hand, a decrease in carbon dioxide emission was observed in Chernozem after enrichment with this keratin biofertilizer. It amounted to an average of 34% in the soil without oilseed rape and 11% in the soil with oilseed rape growth (Figure 2, Table S2). In addition, based on the average values for the entire study period, it was noted that respiratory activity, regardless of the experimental variant, was higher in Chernozem than in sandy soil. The exception was the variant with the addition of the hydrolysate without *Brassica napus* L. var. *napus* (Figure 2, Table S2).

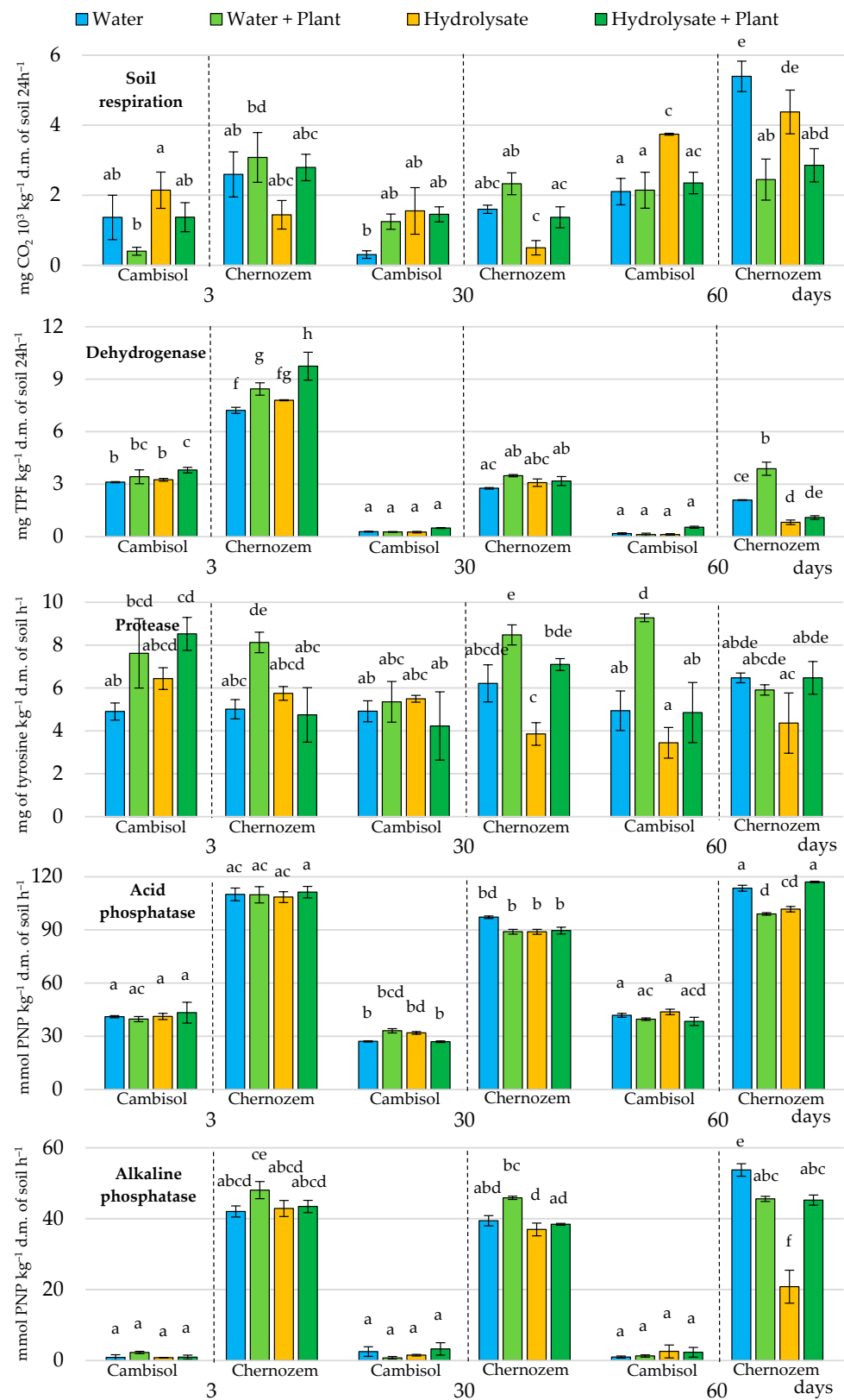


Figure 2. Dynamics of changes in enzymatic activity in different experimental variants; letters, i.e., a, b, c, d denote the means that form homogenous groups (HSD–Tukey post hoc test for multivariate ANOVA). When two compared means were assigned the same letter (e.g., a, a or ab, ab) that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g., a and b, etc.) they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

The activity of dehydrogenases up to day 60 of the experiment gradually and statistically significantly ($\alpha = 0.05$) decreased in all variants. The only but insignificant increase in the activity of this enzyme was recorded between days 30 and 60 of analyses in sandy soil with the hydrolysate and plants, as well as Chernozem moistened with water and planted (Figure 2). The decrease in the activity of these enzymes, observed in the course of the study, was stronger in Chernozem than in sandy soil. In sandy soil, the highest (96%) decrease in dehydrogenase activity was recorded in the control not fertilized with the hydrolysate and planted with oilseed rape (control 2) (Figure 2, Table S2). On the other hand, the lowest decrease in dehydrogenase activity in this soil was observed in the control moistened with water (control 1). The introduction of keratin hydrolysate to the discussed soil generally stimulated the activity of dehydrogenases by 2% in the variant without plants and by 27% with plant population (Table S2). In Chernozem, the highest decrease in dehydrogenase activity within 60 days of the experiment, amounting to 89%, was observed in the experimental variant enriched with feather hydrolysate and with plant population (Figure 2, Table S2). The lowest decrease in dehydrogenase activity, i.e., 54%, was found in Chernozem not fertilized with the hydrolysate, with oilseed rape plants (Table S2). The introduction of the hydrolysate into this soil resulted in a 3% decrease in dehydrogenase activity in the variant without oilseed rape and an 11% decrease with this plant (Table S2). Overall, it was found that dehydrogenase activity was significantly higher in Chernozem than in Cambisol I. The experiment further showed that keratin hydrolysate affected dehydrogenase activity similarly to respiratory activity; i.e., it had a stimulating effect in sandy soil, while it reduced the activity of this enzyme in Chernozem, as determined based on the mean values of this enzyme activity (Table S2, Figure 2).

During the experiment, protease activity under the influence of hydrolysate in both sandy soil and Chernozem tended to decrease (Figure 2). This was indicated by the lower values of this parameter after 60 days of the experiment in relation to the initial date. The exception was the variant with Chernozem with oilseed rape plants, in which protease activity did not significantly increase. A similar stimulating effect occurred in the control variant (control 1) without the addition of the hydrolysate and without plants (Figure 2). In sandy soil with oilseed rape plants, fertilization with the hydrolysate after 60 days resulted in a significant decrease (43%) in protease activity (Table S2). The activity of this enzyme in Chernozem in both variants fertilized with the hydrolysate was also significantly lower compared to the control variants, despite a transient increase in the activity. This effect became apparent 30 days after the introduction of keratin hydrolysate into the soil with plant growth and amounted to 49% compared to the baseline analysis (Figure 2, Table S2). Overall, the introduction of the hydrolysate into Chernozem without and with rapeseed planting resulted in a significant 21% and 19% reduction in protease activity, respectively, compared to control (Figure 2, Table S2). In sandy soil with oilseed rape, the hydrolysate effect was similar and resulted in a 21% reduction in protease activity compared to control. A beneficial effect of the hydrolysate on protease activity was noted only in the variant without plants, and it amounted to a 4% increase in their average activity (Figure 2, Table S2).

Acid phosphatase activity decreased significantly ($\alpha = 0.05$) during the first 30 days of the experiment in all experimental variants in both soils tested. The exception was a sandy soil not enriched with the hydrolysate with oilseed rape planting (Figure 2). The highest (38%) significant decrease in acid phosphatase activity after 30 days was recorded in hydrolysate-enriched sandy soil with the test plants (Table S2). Over a longer period of time, i.e., after 60 days, a significant increase in the activity of this enzyme was recorded in all experimental variants on this soil (Cambisol I). Overall, the introduction of keratin hydrolysate into sandy soil resulted in a non-significant increase in acid phosphatase activity relative to the control variant (control 1). A decrease in the activity of these enzymes was recorded in the variant with plants compared to control (control 2) (Figure 2). With respect to Chernozem, the decrease in acid phosphatase activity in all variants between days 3 and 30 of the experiment was higher than in sandy soil. The lowest decrease of only

12% in the activity of the tested enzyme was determined in unfertilized soil without plants (Figure 2, Table S2). On the other hand, the highest significant decrease (i.e., 19%) in the analyzed index at that time point was found for Chernozem with plants in the absence and after the application of hydrolysate fertilization (Table S2). Later, the activity of acid phosphatase increased significantly ($\alpha = 0.05$) in all tested experimental variants, except for sandy soil moistened with distilled water with plants (control 2) (Figure 2). Based on the obtained data, it was found that the introduction of keratin hydrolysate into the soil had a different effect on the activity of acid phosphatase in sandy and Chernozem (Figure 2). The use of the hydrolysate in sandy soil without oilseed rape resulted in a 6% stimulation of acid phosphatase activity in relation to the non-fertilized variant and a decrease in the activity of this enzyme by 3% in the variant with plant growth (Table S2). In contrast, an inverse relationship was noted for Chernozem, as the introduction of this biofertilizer into the soil without plants resulted in a reduction in the activity of the tested enzyme by 7%, while a 7% increase was measured in the soil with oilseed rape (Figure 2, Table S2).

It was found that the activity of alkaline phosphatase in sandy soil generally increased with the duration of the experiment (Figure 2). The exception was the control variant with plants (control 2) for which a 43% decrease in the activity of this enzyme was recorded (Table S2). However, these changes were not statistically significant. The highest increase in alkaline phosphatase activity over time, amounting to 217%, was recorded after introducing keratin hydrolysate into sandy soil without oilseed rape (Figure 2, Table S2). For Chernozem, a significant ($\alpha = 0.05$) increase in the activity of the enzyme was recorded on day 60 of the experiment in the unfertilized and unplanted variant (control 1). On the other hand, a statistically insignificant increase in alkaline phosphatase activity was observed after the addition of the hydrolysate into Chernozem sown with oilseed rape (Figure 2). For both of the aforementioned variants on Chernozem, there was a 28% and 4% increase, respectively, in the activity of this enzyme over time, relative to the baseline (Table S2). However, a decrease in the activity was observed in the unfertilized variant with oilseed rape and in the variant without this plant but with the addition of keratin hydrolysate (5% and 51%, respectively) (Table S2). The experiment showed that while keratin hydrolysate stimulated alkaline phosphatase activity in sandy soil in the variant without and with oilseed rape relative to unfertilized soil variants (by 12% and 52%, respectively), it reduced the activity of this enzyme in Chernozem in analogous combinations (by 26% and 9%, respectively) (Figure 2, Table S2).

3.4. Total DNA Pool

The data in Figure 3 show that throughout the study period, in both sandy soil and Chernozem, the quantity of dsDNA increased significantly ($\alpha = 0.05$) in all experimental variants. The exception was the control sandy soil not sown with oilseed rape (control 1), where a non-significant decrease in DNA concentration was recorded (Figure 3). In this variant, the amount of dsDNA increased up to day 30 of the experiment by 21%, after which it decreased on day 60 also by 21% relative to the first analysis time point (Table S3). Overall, i.e., within 60 days of the experiment, dsDNA levels significantly increased (by 137%) in sandy soil enriched with the hydrolysate, especially in the variant with oilseed rape (Figure 3, Table S3). For Chernozem, a significant increase in the total DNA pool during 60 days of the experiment was recorded in all experimental variants. Significantly the highest increase in dsDNA concentration, as in sandy soil, was recorded in the variant with the hydrolysate and plants.

In general, it was observed that keratin hydrolysate was more effective in increasing the concentration of dsDNA in sandy soil than in Chernozem, causing its average, significant increase by 23% and 15% in the variant without and with oilseed rape, respectively, (Table S3). In Chernozem, the addition of the hydrolysate resulted only in an 8% increase in the total dsDNA pool in the variant without the plant and a 9% decrease in the variant with the plant compared to the control variants (Figure 3, Table S3).

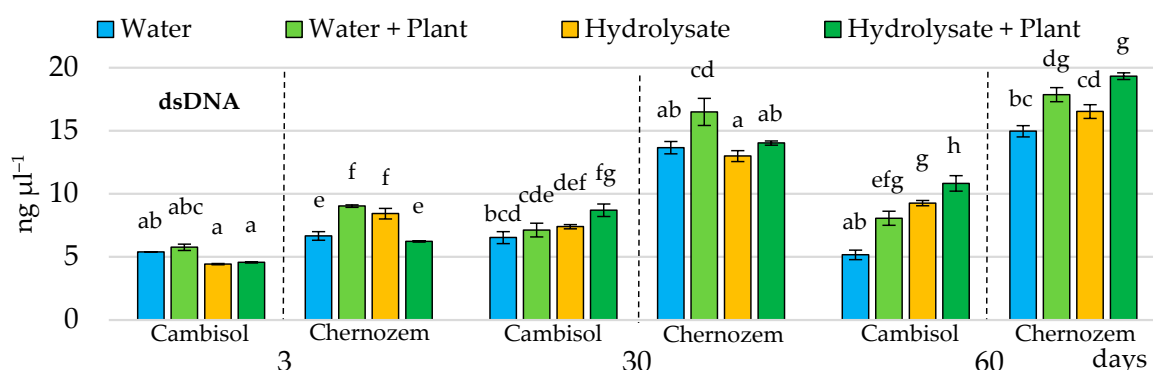


Figure 3. Dynamics of changes in nucleic acid (dsDNA) concentration in different experimental variants; letters, i.e., a, b, c, d denote the means that form homogenous groups (HSD–Tukey post hoc test for multivariate ANOVA). When two compared means were assigned the same letter (e.g., a, a or ab, ab) that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g., a and b, etc.) they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

3.5. Plant Biomass

The data in Table 2 show that at almost all measurement time points, keratin hydrolysate introduced into sandy soil (Cambisol I) and Chernozem caused a significant ($\alpha = 0.05$) increase in the biomass of *Brassica napus* L. var. *napus* compared to the biomass of this plant in variants without hydrolysate fertilization. The only exception for both soils was the biomass of oilseed rape sprouts obtained 3 days after the application of the biopreparation. In comparison to the control variants, the biomass of oilseed rape was on average significantly higher by 52% in sandy soil and by 56% in Chernozem (Table 2). It was also found that in both tested soils, enriched and those untreated with the hydrolysate, the increment of oilseed rape biomass significantly ($\alpha = 0.05$) increased over time.

Table 2. Dynamic of changes in *Brassica napus* L. var. *napus* biomass.

Soil	Experimental Variants	Days of Measurement			
		3 ^A	14 ^B	21 ^C	30 ^D
Cambisol ^A	Water ^A	0.88 ± 0.03 ^a	2.30 ± 0.02 ^c	4.81 ± 0.15 ^e	6.61 ± 0.17 ^b
	Hydrolysate ^B	1.13 ± 0.02 ^a	4.12 ± 0.16 ^d	7.00 ± 0.18 ^b	10.00 ± 0.32 ^f
Chernozem ^B	Water ^A	1.42 ± 0.07 ^a	4.35 ± 0.18 ^c	8.14 ± 0.22 ^e	12.65 ± 0.42 ^b
	Hydrolysate ^B	2.12 ± 0.03 ^a	6.59 ± 0.27 ^d	12.94 ± 0.20 ^b	19.87 ± 0.80 ^f

Explanations: Letters, i.e., lowercase (a, b, c, d) or capital (A, B, C, D) denote the means that form homogenous groups (HSD–Tukey post hoc test for multivariate ANOVA). When two compared means were assigned the same letter (e.g., a or A), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g., a and b, or A and B), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

3.6. Chemical Parameters

3.6.1. pH

Introduction of keratin hydrolysate into sandy soil (Cambisol I) within 3 days of setting up the experiment resulted in an increase in pH relative to control samples (control 1 and 2) (Table 3). However, the pH tended to decrease significantly ($\alpha = 0.05$) over the course of the experiment in both soils tested in the variant without and with keratin hydrolysate. First, i.e., up to day 30, the pH slightly and insignificantly increased in half of the analyzed experimental variants, and then, i.e., after 60 days, it decreased again (Table 3). In sandy soil, this concerned both variants enriched with the hydrolysate, while in Chernozem both control variants. In sandy soil, the highest, i.e., 9% decrease in pH, was found during the experiment after biofertilizer introduction to the soil sown with oilseed rape (Table S4). On the other hand, in Chernozem, 3 days after the introduction of keratin hydrolysate into the soil without plants, a decrease in the reaction was recorded, while its increase

was observed in the variant with plants. The most significant, 19% decrease in pH in Chernozem, analogous to sandy soil, was found in soil with oilseed rape fertilized with keratin biofertilizer (Tables 3 and S4). The same trend was also noted in Chernozem without plant population after the introduction of keratin hydrolysate (Table 3). A significant decrease in pH after the introduction of the biofertilizer under study occurred only in Chernozem with and without plant growth. However, this relationship was not observed in sandy soil (Table 3).

Table 3. Dynamics of changes of soil pH.

Soil	Days	3	30	60	Mean
pH [$-\log_{10}[\text{H}^+]$]					
Cambisol	Water	3.71 ± 0.01	3.67 ± 0.01	3.61 ± 0.01	3.66 ± 0.01 ^{aA}
	Water + Plant	3.72 ± 0.01	3.68 ± 0.01	3.57 ± 0.01	3.66 ± 0.01 ^{aA}
	Hydrolysate	3.76 ± 0.01	3.81 ± 0.06	3.42 ± 0.01	3.67 ± 0.02 ^{aA}
	Hydrolysate + Plant	3.75 ± 0.01	3.78 ± 0.04	3.40 ± 0.01	3.64 ± 0.02 ^{aA}
Chernozem	Water	6.20 ± 0.02	6.21 ± 0.08	6.17 ± 0.04	6.19 ± 0.05 ^{bC}
	Water + Plant	6.08 ± 0.10	6.21 ± 0.12	6.06 ± 0.07	6.11 ± 0.09 ^{bC}
	Hydrolysate	6.15 ± 0.05	5.87 ± 0.07	5.16 ± 0.03	5.72 ± 0.05 ^{aB}
	Hydrolysate + Plant	6.31 ± 0.03	5.56 ± 0.26	5.11 ± 0.20	5.66 ± 0.17 ^{aB}

Explanations: Letters, i.e., lowercase (a, b) or capital (A, B, C, D) denote the means that form homogenous groups (HSD–Tukey post-hoc test for multivariate ANOVA) within each of the tested soils separately, and within both soils together, respectively. When two compared means were assigned the same letter (e.g., a or A), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g., a and b, or A and B), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

3.6.2. NPK and TOC

The data in Table 4 show differences between the studied soils in organic C (TOC), nitrogen (N), phosphorus (P), and potassium (K) content. In sandy soil (Cambisol I), organic carbon content of the experimental variants generally decreased after 60 days, except for the control variant (control 1). On the other hand, in Chernozem, where the level of this component was higher by 146%, the introduction of keratin hydrolysate tended to reduce organic carbon content in both variants, especially with plants. The highest TOC content in both soils was typically recorded in the variants with plants and without the hydrolysate (Table 4). Total N content in sandy soil, such as TOC, decreased after 60 days of the experiment, in the variants with plants. In Chernozem, this was observed in the variant only with the hydrolysate and control 2. In both soils, the highest total N content was recorded on day 3 of the experiment in the unfertilized combination with plants. On day 60, it was documented in the non-fertilized combination without plants and in sandy soil enriched with the hydrolysate without plants (Table 4). The level of available phosphorus generally increased in all soil variants 60 days after the start of the experiment. Enrichment with the hydrolysate increased the content of this nutrient in both soils compared to the non-enriched variants. On day 3 of the experiment, the highest levels of assimilable phosphorus in these soils were recorded in the variants with the hydrolysate alone and on day 60 in the variants with the hydrolysate and plants (Table 4). The introduction of the hydrolysate also altered potassium levels in the tested soils, as it increased on day 3 in the variants without plants and decreased in the variants with vegetation. After 60 days of the experiment, the opposite trend was noted in the variants with the hydrolysate and plants. Maximum potassium concentrations were recorded at the beginning of the experiment (day 3) in the variants with plants and without hydrolysate fertilization and at the end of the experiment (day 60) in the variant with the hydrolysate and plant growth (Table 4).

Table 4. Content of total organic carbon (TOC) and N, P, K concentration in two types of soil in different experimental variants.

Soil	Days of Analyses	Sample	TOC (g kg ⁻¹)	N (g kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)	K (mg kg ⁻¹)
Cambisol	3	Water	5.40	0.20	32.00	348.00
		Water + Plant	6.20	0.60	31.20	485.00
		Hydrolysate	6.05	0.40	43.00	447.00
		Hydrolysate + Plant	5.95	0.40	40.60	397.00
	60	Water	6.20	0.60	29.10	483.00
		Water + Plant	5.87	0.50	44.90	352.00
		Hydrolysate	5.90	0.60	89.10	370.00
		Hydrolysate + Plant	5.73	0.30	106.80	678.00
Chernozem	3	Water	13.57	0.00	17.80	1310.00
		Water + Plant	13.75	1.50	25.40	2980.00
		Hydrolysate	13.07	1.20	33.90	2520.00
		Hydrolysate + Plant	12.97	0.40	27.30	2620.00
	60	Water	14.41	1.10	37.70	2700.00
		Water + Plant	16.41	0.40	37.60	2080.00
		Hydrolysate	14.51	0.40	99.80	2260.00
		Hydrolysate + Plant	13.49	0.50	104.60	3040.00

3.7. Statistical Analysis

3.7.1. Correlations

To better understand microbial, enzymatic, and chemical transformations and their interrelationships, the results were subjected to Pearson's correlation analysis after the introduction of keratin hydrolysate into the studied soils differing in chemical parameters (Table 5). Non-fertilized and fertilized variants, with and without plants, were considered jointly. The conducted analysis generally showed that the keratin hydrolysate introduced into the soils stimulated their biological activity associated with the transformations of TOC, N, P and K, especially in sandy soil (Cambisol I). This was expressed in an increase in the number of correlations and the significance between the number of microorganisms, enzyme activity, and chemical parameters, i.e., the content of organic C, N, P, and K.

In sandy soil not fertilized with the hydrolysate, bacteria played an important role in TOC and N transformations (Table 5). This was evidenced by a positive, significant correlation between the level of these components and the total bacterial abundance (0.598 *, and 0.666 *, respectively). However, the relationship of total fungi and cellulolytic fungi became apparent in the context of bioavailable P content. Their numbers grew with increasing concentration of this component (0.600 *, and 0.742 **, respectively). Total fungal abundance in sandy soil not enriched with the hydrolysate was also significantly but negatively correlated with potassium content (−0.594 *). Unlike fungi, total bacterial abundance was not correlated with either P or K content (Table 5). The introduction of keratin hydrolysate into sandy soil significantly increased the correlation between the abundance of total soil bacteria (0.826 ***), proteolytic bacteria (0.855 ***), respiratory activity (0.703 *), and N content. At the same time, a negative correlation between the total DNA pool (−0.700 *), cellulolytic microbial abundance (−0.720 **), alkaline phosphatase (−0.639 *), and TOC content was recorded (Table 5). The level of the latter parameter rose with increasing pH (0.627 *). The introduction of the hydrolysate to sandy soil also increased the correlation between P content and the development of the population of cellulolytic fungi (0.807 **) and bacteria (0.856 ***). The latter relationship was not observed

in the variant not enriched with the hydrolysate. An inverse significant correlation was found between the level of P and the activity of dehydrogenase (-0.944^{**}) and protease (-0.720^{**}) after sandy soil enrichment with the hydrolysate (Table 5). Moreover, the hydrolysate enhanced significantly the correlations between the content of this component, pH (-0.980^{***}), and dsDNA (0.989^{***}). It was found that only the number of cellulolytic bacteria (0.868^{***}) and dsDNA were significantly positively correlated with potassium content after the addition of the hydrolysate (0.585^*).

Table 5. The values of r-Pearson's correlation coefficients between microbiological, biochemical, and chemical parameters.

Soil	Experimental Variant	Analyzed Parameters	TOC	N	P	K
Cambisol	Water	Soil bacteria	0.598 *	0.666 *	0.025	0.504
		Soil fungi	-0.339	-0.245	0.600 *	-0.594 *
		Proteolytic microorganisms	0.336	0.325	-0.371	0.399
		Cellulolytic bacteria	0.316	0.436	0.486	-0.034
		Cellulolytic fungi	0.047	0.213	0.742 **	-0.296
		Soil respiration	-0.145	-0.010	0.344	-0.265
		Dehydrogenase	-0.265	-0.393	-0.443	0.051
		Protease	0.122	0.306	0.728 **	-0.181
		Acid phosphatase	-0.163	-0.153	-0.426	0.190
		Alkaline phosphatase	0.487	0.426	-0.038	0.337
		pH	-0.180	-0.315	-0.620 *	0.205
	dsDNA	-0.043	0.111	0.941 ***	-0.516	
	Hydrolysate	Soil bacteria	-0.159	0.826 ***	0.527	-0.337
		Soil fungi	0.184	0.227	-0.243	-0.370
		Proteolytic microorganisms	0.087	0.855 ***	0.356	-0.439
		Cellulolytic bacteria	-0.720 **	-0.434	0.856 ***	0.868 ***
		Cellulolytic fungi	-0.421	-0.063	0.807 **	0.503
		Soil respiration	-0.185	0.703 *	0.574	-0.153
		Dehydrogenase	0.547	-0.309	-0.944 ***	-0.347
		Protease	0.400	-0.436	-0.720 **	-0.187
		Acid phosphatase	0.148	0.385	-0.258	-0.501
		Alkaline phosphatase	-0.639 *	0.133	0.511	0.197
pH		0.627 *	-0.183	-0.980 ***	-0.449	
dsDNA	-0.700 *	0.034	0.989 ***	0.585 *		
Chernozem	Water	Soil bacteria	0.426	0.117	0.772 **	0.246
		Soil fungi	0.025	-0.086	-0.462	-0.143
		Proteolytic microorganisms	-0.652 *	0.745 **	-0.156	0.624 *
		Cellulolytic bacteria	0.632 *	-0.032	0.869 ***	0.134
		Cellulolytic fungi	0.141	-0.143	0.267	-0.170
		Soil respiration	-0.128	0.438	0.431	0.481
		Dehydrogenase	-0.537	0.053	-0.835 ***	-0.112

Table 5. Cont.

Soil	Experimental Variant	Analyzed Parameters	TOC	N	P	K
Chernozem	Hydrolysate	Protease	−0.129	0.893 ***	0.153	0.884 ***
		Acid phosphatase	−0.613 *	0.316	−0.259	0.248
		Alkaline phosphatase	−0.004	0.683 *	0.625 *	0.736 **
		pH	−0.502	−0.237	−0.340	−0.371
		dsDNA	0.837 ***	0.071	0.946 ***	0.273
		Soil bacteria	0.535	−0.586 *	0.927 ***	0.281
		Soil fungi	−0.203	−0.387	0.430	0.600 *
		Proteolytic microorganisms	0.555	−0.023	0.381	−0.577 *
		Cellulolytic bacteria	0.449	−0.353	0.885 ***	0.487
		Cellulolytic fungi	0.325	−0.311	0.577 *	−0.049
	Soil respiration	0.566	−0.750 **	0.600 *	−0.316	
	Dehydrogenase	−0.664 *	0.368	−0.986 ***	−0.102	
	Protease	−0.171	0.263	0.121	0.519	
	Acid phosphatase	−0.523	−0.020	−0.012	0.916 ***	
	Alkaline phosphatase	−0.749 **	0.328	−0.441	0.695 *	
	pH	−0.654 *	0.414	−0.988 ***	−0.143	
	dsDNA	0.551	−0.370	0.981 ***	0.273	
	Control	Protease	−0.129	0.893 ***	0.153	0.884 ***
		Acid phosphatase	−0.613 *	0.316	−0.259	0.248
		Alkaline phosphatase	−0.004	0.683 *	0.625 *	0.736 **
pH		−0.502	−0.237	−0.340	−0.371	
dsDNA		0.837 ***	0.071	0.946 ***	0.273	
Soil bacteria		0.535	−0.586 *	0.927 ***	0.281	
Soil fungi		−0.203	−0.387	0.430	0.600 *	
Proteolytic microorganisms		0.555	−0.023	0.381	−0.577 *	
Cellulolytic bacteria		0.449	−0.353	0.885 ***	0.487	
Cellulolytic fungi		0.325	−0.311	0.577 *	−0.049	

Explanations: r—Pearson's correlation coefficients at three levels of significance: * (0.05); ** (0.01); *** (0.001).

In Chernozem, no significant relationships were found after the introduction of the keratin hydrolysate between TOC and the number of microorganisms (Table 5). Only a significantly negative correlation was found between the TOC level and the activity of dehydrogenases (−0.664 *), alkaline phosphatase (−0.749 **), and pH (−0.654 *). In the variant without the addition of keratin hydrolysate, the increase in N content elevated the number of proteolytic microorganisms (0.745 **) and the activity of protease (0.893 ***) and alkaline phosphatase (0.683 *). The introduction of biofertilizer to this soil in relation to N content only showed that the increase in N levels significantly reduced the number of soil bacteria (−0.586 *) and the intensity of soil respiration (−0.750 **). Considering the P content, it was found that Chernozem not enriched with keratin biopreparation was characterized by a significant positive effect on the total number of bacteria (0.772 **), cellulolytic bacteria (0.869 ***), and dsDNA content (0.946 ***). In turn, a negative relationship of this element with dehydrogenase activity was observed (−0.835 ***) (Table 5). All these relationships were strengthened after introducing the feather hydrolysate into Chernozem. In addition, the hydrolysate suppressed the significant positive correlation between P content and alkaline phosphatase activity ($\alpha = 0.05$) observed in the variant without hydrolysate. However, it showed a positive relationship of this element with the number of cellulolytic fungi (0.577 *) and soil respiration (0.600 *). Potassium in Chernozem not enriched with biofertilizer showed a beneficial effect on the activity of protease (0.884 ***) and alkaline phosphatase (0.736 **). Both relationships were significantly weakened after introducing biofertilizer to the tested soil (Table 5). In the presence of the biofertilizer, a significant positive relationship between K content, the abundance of soil fungi (0.600 *), and acid phosphatase activity (0.916 ***) was observed. Fertilization of Chernozem with processed feathers also resulted in a significant reduction in the number of proteolytic microorganisms in relation to K increase (−0.577 *).

In general, the correlation analysis showed that phosphorus was the element that had the most significant influence on the biochemical and microbiological indicators in

unfertilized and fertilized Cambisol I and Chernozem (Table 5). In both soils, hydrolyzed feathers strengthened the negative correlation between P availability and pH (Table 5).

3.7.2. PCA

The obtained results were subjected to principal component analysis to explain the relationships between microbial indicators, enzymatic activity, experimental variants, and the dates of the analyses, and the applied model explained 62.36% of the variability by two principal components (PC1: 38.63% and PC2: 23.73%) for Cambisol I and 61.34% of the variability by two principal components (PC1: 40.86% and PC2: 20.48%) for Chernozem. The loading plot (Figure 4) demonstrates the correlation structure of the analyzed variables, i.e., total abundance of bacteria and fungi, proteolytic microorganisms, cellulolytic bacteria and fungi, respiratory activity, dehydrogenase activity, protease, acid and alkaline phosphatase, pH, and dsDNA. Location of the dots on the score plot grouped the experimental variants, i.e., water-irrigated (W), water-irrigated and planted (WP), keratin hydrolysate-fertilized (H), and keratin hydrolysate-fertilized with oilseed rape plants (HP) after 3, 30, and 60 days of the experiment in relation to the parameters (variables) studied.

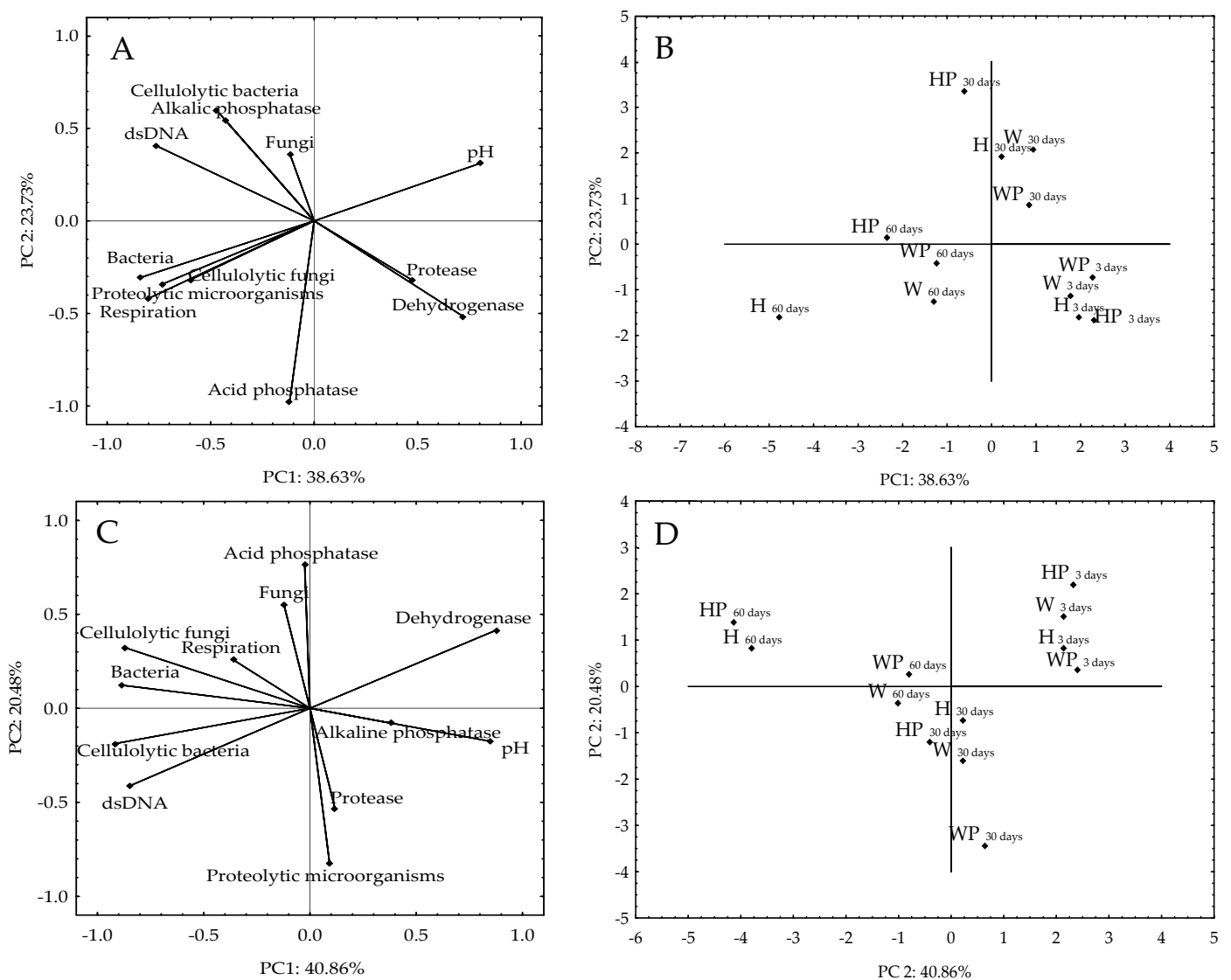


Figure 4. The loading plot (A,C) and the score plot (B,D) showing the number of selected groups of microorganisms and respiratory/enzymatic activity in Cambisol I (A,B) and Chernozem (C,D) in different experimental variants.

The results obtained for Cambisol I (sandy soil) demonstrated the association of protease and dehydrogenase activity with all experimental variants on day 3 of the experiment (observation–dots), as well as respiratory activity, total abundance of bacteria, proteolytic microorganisms, and cellulolytic fungi with the experimental variants on day 60 of the experiment, especially with the variant fertilized with keratin hydrolysate (H) (Figure 4A,B). In addition, this analysis indicated significantly positive correlations between these last variables.

PCA analysis demonstrated that the pH in sandy soil significantly decreased with increasing respiration activity, the total number of bacteria, proteolytic microorganisms, cellulolytic bacteria and fungi, and the total DNA pool. Factor 2 explained to a lesser extent the relationship between the variables (Figure 4A,B). The analysis showed that the activity of dehydrogenase increased significantly with acid phosphatase activity and decreased with alkaline phosphatase activity, higher number of cellulolytic bacteria, and the total pool of dsDNA, as well as with the duration of the experiment. The results showed (Figure 4A,B) that the total DNA pool was associated with the abundance of cellulolytic bacteria and fungi and the total number of bacteria and proteolytic microorganisms. A significantly positive correlation between these variables indicated a high involvement of this group of microorganisms in the transformations of C and N compounds in the soil, which results in the multiplication of the number of these microorganisms and thus an increase in DNA concentration (Figure 4A,B).

The results obtained for Chernozem demonstrated the association of high dehydrogenase activity with day 3 of the experiment in all four experimental variants (Figure 4C,D). The increased abundance of cellulolytic fungi and the total number of bacteria, in particular in variants fertilized with the hydrolysate, with and without plant growth, was significant, especially on day 60 of the experiment. PC analysis showed that the protease activity abundance of proteolytic microorganisms was significantly associated only with the control variant with plants. In addition, a strong positive correlation was demonstrated between the total abundance of bacteria, cellulolytic bacteria and fungi, and dsDNA (Figure 4C,D). However, these variables were significantly negatively correlated with soil pH and dehydrogenase activity. A significant, although statistically weaker (PC2) negative correlation between proteolytic microorganisms and acid phosphatase was also demonstrated. An insignificant, but important, relationship, in terms of the hydrolysates introduced into the soil with a high mineral N content, was shown between proteolytic microorganisms and protease activity, and a negative one with the number of fungi. This indicated the involvement of proteolytic bacteria in the transformation of mineral forms of nitrogen, correlated especially in the variants without keratin hydrolysate but with plants on day 30 and the total bacterial pool in the variant with the hydrolysate, as well as with and without plant growth on day 60 of the experiment (Figure 4C,D).

4. Discussion

Agricultural land use and climate change are one of the main reasons for the deterioration of the natural environment [21,42]. The methods counteracting these phenomena include, among others, developing organic crops and using organic or mineral–organic fertilizers that contain microorganisms to support specific soil processes. The determinant of the dynamics of changes occurring in the soil, reflecting its current state, is the so-called biological activity of soil consisting of a number of microbiological, biochemical, and enzymatic parameters [43–45], as well as the yield of cultivated plants [46].

The subject of this study was to investigate the effect of feather hydrolysate with a high content of soluble proteins, peptides, and amino acids, as well as mineral forms of nitrogen and sulfur obtained during decomposition of waste keratin of chicken feathers by the *Trichophyton ajelloi* strain No. XII on the early growth of test plants and microbiological and enzymatic properties in two soils with different physical and chemical parameters, i.e., in the soil conventionally called sandy soil (Cambisol I) and Chernozem.

4.1. Phytotoxicity

Phytotoxicity is a negative phenomenon consisting in the harmful effect of various chemical compounds or environmental conditions on plants [47]. It can be manifested by limited seed germination, inhibited growth of plant roots and shoots, the appearance of necrosis, chlorosis, etc. [47,48]. This study found that keratin hydrolysates introduced into sandy soil and Chernozem, both undiluted and diluted (1:2), did not have a negative effect on the germination of seeds of the *Brassica napus* L. var. *napus* and *Lepidium sativum* L. Our observations are consistent with the results of other authors [46,49–51] studying the effects of native keratin hydrolysates obtained through both physicochemical and microbiological transformations. This was evidenced by the results of Nustorova et al. [49], who demonstrated the beneficial effect of the hydrolysate obtained through alkaline hydrolysis of sheep wool on the germination and growth of ryegrass, especially at its higher doses. In turn, Bhavsar et al. [50] reported that hydrothermal wool hydrolysate had no phytotoxic effect on the germination of *Lepidium sativum* L. seeds, as it generally oscillated around 100%, especially in the presence of diluted hydrolysates. Gousterova et al. [51] applied soil feather hydrolysate obtained using *Thermoactinomyces* strains and showed stimulation of ryegrass (*Lolium* L.) seed germination at lower and inhibition at higher hydrolysate concentrations. Jain et al. [46] used feathers hydrolyzed by the actinomycete *Streptomyces sampsonii* strain GS1322 and observed stimulation of wheat seed germination (%) in the presence of all applied doses. In the present study, three-fold diluted keratin hydrolysates obtained from feather decomposition by the soil strain No. XII of the fungus *Trichophyton ajelloi*, contrary to undiluted hydrolysates, did not inhibit root and shoot growth of *Lepidium sativum* L. and *Brassica napus* L. var. *napus* in Chernozem, *Lepidium sativum* L. in loamy soil (Cambisol II), and *Brassica napus* L. var. *napus* in sandy soil (Cambisol I). According to Bhavsar et al. [50], undiluted hydrolysates may reduce germination due to too high osmotic salt concentration surrounding the seeds. On the other hand, the stimulating effect on plant germination observed for both diluted and undiluted hydrolysates was attributed to the presence of proteins, amino acids, and micronutrients in the hydrolysates. Keratin hydrolysates used in our study can therefore be regarded as biostimulants of root and shoot germination and growth due to their content of soluble proteins, peptides, and amino acids.

The so-called germination index (G_I) is one of important indices of the absence of phytotoxic effects of introduced organic or organic–mineral fertilizers. According to the interpretation proposed by Zucconi et al. [34] for composts, those with $G_I < 80\%$ are considered phytotoxic. Bohacz [8] showed that composts obtained on the basis of chicken feathers and lignocellulosic waste had no toxic effect on *Lepidium sativum* L. and even stimulated seed germination and root growth of this plant. The research conducted in this study demonstrated that only the G_I of undiluted hydrolysates introduced into sandy soil (Cambisol I) reached values below 80%. In other cases, it was higher ($G_I > 80\%$), especially in variants with diluted hydrolysate. Moreover, the G_I after the application of diluted feather hydrolysate was generally higher for *Brassica napus* L. var. *napus* than for *Lepidium sativum* L.: 101.63 and 82.24 in sandy soil, and 126.55 and 113.95 in Chernozem, respectively. According to the interpretation proposed by Zucconi et al. [34], this indicated no phytotoxic effect of the diluted hydrolysate, in contrast to the undiluted preparation. The root-to-stem length ratio, whose optimal value is approx. 1.0, is also an important plant growth indicator [32], indicating the uniform growth of the root and stem and showing the substrate's effect on developmental disproportions [32]. The current experiment showed that undiluted feather hydrolysate in sandy soil caused almost three times faster *Brassica napus* L. var. *napus* root than the shoot growth and approx. 1.5 times more intensive growth of roots than shoots of *Lepidium sativum* L. For Chernozem, its influence against oilseed rape was weaker, while against garden cress it was stronger. The diluted hydrolysate most strongly altered the ratio between root and shoot growth in loamy soil (Cambisol II) (R:S = 2.71), which was visible in case of oilseed rape. The R:S ratio in sandy soil and Chernozem indicated a more uniform growth of oilseed rape roots and shoots.

For the above reasons, further studies concerning the effect of feather hydrolysates on soil biological activity and plant growth focused on two soils: sandy (Cambisol I) and Chernozem, resigning from loamy soil (Cambisol II).

4.2. Abundance of Soil Microorganisms in Variants Treated and Non-Treated with Feather Hydrolysate

Microorganisms play a key role in shaping soil fertility [52]. The diversity of microorganism communities and their metabolic activity contribute not only to the good quality of the soil environment, but also allow to maintain high yielding potential [53]. The model experiment carried out in this study generally indicated the activating effect of keratin hydrolysates, formed after fungal biodegradation of chicken feathers, on soil microorganisms. This effect should be attributed to soil enrichment with readily available organic matter, nitrogen, and mineral sulfur, as noted by many authors who observed stimulation of microorganism development in soils fertilized with protein hydrolysates [16,49]. Our study also showed that the intensity of microbial growth varied depending on the soil, time of exposure, and experimental variant (with and without hydrolysate, with and without plants). It was found that populations of bacteria, fungi, proteolytic microorganisms, and cellulolytic bacteria in sandy soil developed faster in both variants with the hydrolysate than in variants not fertilized with the preparation. In Chernozem, the abundance of all studied groups of microorganisms increased, especially in the variants with plants fertilized with the hydrolysate, except for proteolytic microorganisms. Due to the significant abundance of organic carbon compounds in Chernozem, growth stimulation of microorganisms involved in the transformation of these substances, such as bacteria and fungi, including cellulolytic microorganisms, may have resulted from the supply of large amounts of readily available nitrogen with the hydrolysate. This suggestion was supported by the findings of Nustorova et al. [49], who showed that the introduction of the hydrolysate into the soil after sheep's wool biodegradation increased the number of microorganisms, which led to an accelerated decomposition and mineralization of organic matter in the soil and thus increased the assimilability of nutrients, also for plants. The latter thesis was confirmed in this study by the decrease in organic carbon content in the tested soils after the introduction of the hydrolysate, especially in variants with plants, as well as the correlation between the total number of bacteria, cellulolytic bacteria and fungi, and proteolytic microorganisms, as well as the total DNA pool, and respiratory activity in the tested soil samples. The presence of proteolytic microorganisms in the soil reflects the intensity of mineralization processes of organic nitrogen forms, which are subsequently made available in an easily assimilable form to plants and microorganisms [54,55]. Respiratory activity is a measure of the intensity of the oxidation and mineralization processes of an organic substance. It has long been known [56] that bacteria are much more efficient than fungi in utilizing low molecular weight organic and mineral forms of nitrogen and sulfur. This suggests that in the initial period, bacterial populations were more active in the hydrolysate transformations in the studied soils. This was evidenced by the stimulation of the overall increase in the abundance of bacteria, proteolytic microorganisms, and cellulolytic bacteria during the first 30 days of the experiment, after the introduction of keratin hydrolysate into both tested soils. The subsequent decline in the abundance of the bacterial groups studied, especially in the variants with plants, may have been due to the depletion of readily available carbon and nitrogen compounds both by the microorganisms and plants. The introduced feather hydrolysate had a relatively weak effect on the populations of cellulolytic bacteria and fungi, with the exception of Chernozem with plants, where significant differences were recorded after the introduction of the hydrolysate compared to the control variant. Cellulolytic microorganisms mainly utilize cellulose as a source of C and energy, which was only available in the soil and not in the hydrolysate. The high stimulation of cellulolytic bacteria in Chernozem may have been due to favorable growth conditions for these bacteria, i.e., the presence of cellulose-rich organic matter and the optimal soil pH, as well as the availability of nitrogen, which stimulated the growth of cellulolytic microorganisms. On the

other hand, the higher overall abundance and stimulation of fungal growth in sandy soil than in Chernozem, after the introduction of the hydrolysate (the first month), should be associated with the lower pH of this soil, favoring the growth of these microorganisms. The long-term decrease in fungal abundance observed in both soils, especially in sandy soil in the variant with plants, may have been due to the effect of oilseed rape root secretions with antifungal activity that inhibited fungal growth or the presence of antagonistic rhizosphere microorganisms that synthesize fungal growth inhibitors. We based this assumption on studies indicating that fungal growth was inhibited by oilseed rape root exudates [57,58], as well as reporting the stimulation of toxic nitrosamine biosynthesis in the presence of high-dose nitrogen fertilization [59].

Soil pH is considered to be an important factor in the microbiological metabolism of organic matter and its mineralization due to the formation of the products of different chemical nature. PCA analysis showed that a decrease in the pH of the tested soils in different variants of the experiment was accompanied by an increase in the number of the tested groups of microorganisms, with the exception of sandy soil in which a decrease in pH resulted in a lower abundance of fungi. However, it was not a significant relationship. According to Borymski [60], a decrease in soil pH in addition to carbonic acid secretion during root respiration, organic acid secretion by roots, and decomposition of organic matter in the soil was also caused by ammonium ion uptake and ion exchange. On this basis, it can be concluded that the introduction of feather hydrolysate with a high content of ammonium ions into the studied soils could activate the uptake of these ions by microorganisms and plants and intensify nitrification. This assumption was confirmed by the reduction of total nitrogen content in the variants with oilseed rape in both studied soils. As a result, not only would the soil become slightly acidified but also stimulate the development of many populations of soil microorganisms. On the other hand, soil acidification may also have had the effect of increased phosphorus availability. The present study found a significantly negative correlation between pH and the content of available P in all experimental variants. Phosphorus is known [61] to be necessary for the proper development of aboveground and underground plant organs; it affects the rate of plant maturation, biomass growth, fruit quantity and size, flowering intensity, and grain yield. In addition to organic compounds, this element is also found in the soil in the form of metal salts inaccessible to plants such as iron phosphate, calcium phosphate, and aluminum phosphate. Root exudates, i.e., organic acids and various compounds produced by microorganisms, among others siderophores, have the ability to complex metal ions, thereby contributing to the release of phosphorus from inaccessible associations and increasing the forms of iron available for plants [60,62,63]. In this study, the total dsDNA pool was also significantly correlated with soil phosphorus content, which was on average higher after the introduction of feather hydrolysate to the studied soils. Particularly high content of assimilable P was recorded in sandy soil and Chernozem at the end of the experiment in the variants with the hydrolysate and plants, which could indicate its release from inaccessible sources and stimulation of the general pool of soil microorganisms.

According to Hartmann et al. [63], ion exchange associated with the release of protons into the soil by plant roots in exchange for cations uptake, contributing to lowering soil pH, was also one of the mechanisms that helped plants take up iron, an element important, inter alia, in enzymatic processes.

The total pool of DNA isolated from the studied sandy soil and Chernozem was significantly positively correlated with all analyzed groups of microorganisms, except for the total number of fungi in sandy soil and proteolytic microorganisms in Chernozem. Wolińska et al. [64] also reported the correlation of the total DNA pool with microbial abundance. The positive correlation observed by us between DNA levels and soil respiration activity could indicate an intracellular source of microbial DNA. The process of cellular respiration, i.e., biological oxidation in microbial cells, is accompanied by decarboxylation.

4.3. Enzymatic Activity of Soils Fertilized and Not Fertilized with Feather Hydrolysate

All transformations of organic matter and biogenic elements occurring in the soil are conditioned by the activity of enzymes, which affects the availability of nutrients for plants and soil fertility [52].

Zhu et al. [65] reported that soil respiratory activity was stimulated by low nitrogen levels and inhibited by high nitrogen content. The higher content of nitrogen compounds in the studied soils caused, among others, by the introduction of feather hydrolysate, caused a periodic reduction in CO₂ release. This was particularly evident in sandy soil because it was characterized by higher N content in the initial period. In Chernozem, a decrease in respiration was recorded on day 30 of the experiment, which was also associated with high levels of total nitrogen. It was visible in all experimental variants except the control irrigated with water. In the next experimental period, a significant reduction in nitrogen content, particularly in the variants with the hydrolysate, resulted in a significant increase in CO₂ release. This effect was visible especially in Chernozem fertilized with the hydrolysate without and with plants and in sandy soil fertilized with the hydrolysate only.

Dehydrogenases are respiratory enzymes that serve as indicators of respiration intensity and carbon mineralization of organic matter in the soil environment. Their activity is determined by the availability of food substrates for microorganisms and the pH of the environment. Dehydrogenase activity also reflects the oxidative potential of the soil, as these enzymes are associated with living, metabolizing microbial cells [21]. The activity of dehydrogenases in this study, in all analyzed experimental variants, tended to gradually decrease, which could be explained by reduced soil pH. Dehydrogenases belong to enzymes showing low activity in acidic soils; while in alkaline soils, they reach high catalytic activity [66].

Keratin hydrolysate affected dehydrogenase activity similarly to respiratory activity, which was expressed as stimulation of the activity of these enzymes in sandy soil and its inhibition in Chernozem. The latter effect, due to the high activity of dehydrogenases in this soil, may have been caused by faster depletion of the readily available carbon and energy sources brought with this biofertilizer. On the other hand, with the generally low activity of dehydrogenases in sandy soil, its enrichment with the hydrolysate may have been sufficient not only to maintain, but also to stimulate the catalytic activity of these enzymes. This explanation was supported by the positive, albeit non-significant, correlation in sandy soil between dehydrogenase activity and organic C content after the introduction of feather hydrolysate and indicated that microorganisms in this soil did not utilize organic matter contained in the hydrolysate.

Just as dehydrogenases are necessary in organic C transformations in soil, proteases are key enzymes in the transformations of organic N associated with protein breakdown into simpler compounds, i.e., short-chain peptides and amino acids [67]. Nitrogen-rich feather hydrolysates, when introduced into the tested soils, tended to decrease the activity of these enzymes, with a periodic increase, especially in the variants with plants. This effect, particularly pronounced in Chernozem with high TOC content, could have been caused by catabolic repression of the synthesis of these enzymes under the influence of simple carbon bonds broken during carbon hydrolysis of organic matter [68]. As regards nitrogen, it is primarily the level of its macromolecular fraction that is important. Vranova et al. [68] reported that protease activity was dependent on both organic C and nitrogen content. For instance, Caballero et al. [69] showed that enrichment of anthropogenic soil with autoclaved poultry feathers, i.e., denatured keratin, significantly stimulated proteolytic activity of this soil. Opinions regarding mineral forms of nitrogen, i.e., N-NH₄⁺, are divided. Vranova et al. [68] reported that while some researchers believed that the addition of ammonium ion to soil stimulated proteolytic activity, others were of the opinion that it had an inhibitory effect on protease biosynthesis in soil. A similar conclusion, indicating the inhibition of soil protease activity by N-NH₄⁺, can be drawn based on the present results, after enriching the soil with a feather hydrolysate rich in ammonium ions. Additionally, PCA analysis revealed that the decrease in protease activity in the studied soils was

correlated with an increase in respiratory activity and vice versa. The effect of the level of CO₂ release, as an indicator of respiratory activity, on the dynamics of protease activity was previously reported by Vranova et al. [68]. The relationship found in this study indicated that stimulation of protease activity occurred when readily available sources of organic C were exhausted as respiratory substrates (reduced respiratory activity). This “forces” the microorganisms to use the “inferior” sources of organic C, such as organic nitrogen associations (increased protease activity). In the present study, protease activity decreased, while respiratory activity increased.

This study also analyzed the activity of soil phosphatases (acid and alkaline phosphatases) due to the importance of phosphorus in maintaining the functional status of the soil and thus crop yields. These enzymes play an important role in the transformation of organic forms of phosphorus into soluble inorganic forms absorbed by plants and soil microorganisms. The activity of phosphatases depends primarily on the pH of the soil [70]. The most optimal use of phosphorus by living organisms occurs in soils with a pH in the range of 5.5–7.0 [71].

Acid phosphatase is more widespread than alkaline phosphatase in most soils, and its activity also depends on the availability of N and increases when the pool of available N rises [72]. In the present study, this could be applied to acid phosphatase, whose activity significantly increased after introducing feather hydrolysate containing soluble proteins, peptides, and amino acids into sandy soil without plants. Caballero et al. [69] showed that the introduction of denatured chicken feathers into the soil enhanced the phosphatase activity, which would confirm the beneficial effect of the available N associations on acid phosphatase activity observed in this study. The present study showed, however, that after a month of the experiment, the activity of acid phosphatase decreased in both soils, fertilized and not fertilized with feather hydrolysate, with and without oilseed rape. This effect can be explained by lower pH in the tested variants and depletion of assimilable N compounds. In this study, it was also noted that acid phosphatase activity was higher than the activity of alkaline phosphatase in all variants of the experiment. According to Saha et al. [73], the dominance of acid phosphatase activity over alkaline phosphatase activity was directly related to the reaction of the soil environment. The higher activity of acid phosphatase observed in Chernozem could be due to both the higher pH of this soil and the higher content of organic matter in this soil. Saha et al. [73] showed in their research that the highest phosphatase activity occurred in soil fertilized simultaneously and not separately with mineral and organic fertilizers (manure). Kwiatkowski et al. [74] also reported the influence of organic fertilization on the activity of acid phosphatase. The cited authors showed that organic fertilization with Humac Agro biofertilizer combined with crop rotation was more effective in stimulating the activity of acid phosphatase than conventional mineral–organic fertilization.

Alkaline phosphatase is considered to be a very good indicator of the activity and population size of soil microorganisms [52]. Its availability in soil is much lower due to its predominantly microbiological origin [75]. Acid phosphatases, which have a much broader origin, support alkaline phosphatases in making phosphorus available to plants [75]. In our study, alkaline phosphatase activity generally increased over time, especially in sandy soil (Cambisol I). The only exception was a variant of planted soil in the absence of fertilizer. Enrichment of sandy soil with waste feather hydrolysate stimulated the activity of this enzyme. In the case of Chernozem, the applied biofertilizer reduced alkaline phosphatase activity both in the variant with and without oilseed rape. Kwiatkowski et al. [74] demonstrated that conventional mineral–organic fertilization had a more negative effect on alkaline phosphatase activity in the soil compared to only organic fertilization such as the Humac Agro biopreparation. Opposite results were obtained by Chang et al. [76], who showed that this mineral fertilization reduced the activity of soil alkaline phosphatase in the soil. The data obtained in the present study have indicated that mineral–organic feather hydrolysate may have a different effect on the soil depending on its physicochemical parameters.

4.4. Oilseed Rape Biomass

This study showed a significant almost two-fold increase in oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *napus*) biomass after the addition of feather hydrolysate to both soils. This was consistent with the results of the research by Nustorova et al. [49], who also showed an increase in fresh plant biomass (ryegrass *Lolium perenne* L.), especially in the variant with a higher concentration of feather hydrolysate obtained by chemical transformation. Kaur et al. [77] also demonstrated that the introduction of feathers processed by *Bacillus aerius* NSMk2 into the soil stimulated the increment of *Vigna radiata* biomass relative to the biomass estimated from the non-fertilized control.

5. Conclusions

Feathers processed by the soil strain No. XII *Trichophyton ajelloi* are valuable in terms of composition and mineral-organic biopreparation with a high fertilization potential. Biodegradation of chicken feather waste by *Trichophyton ajelloi* not only reduces their deposition in the environment and uncontrolled decomposition, but also is a safe alternative in the fertilization practice of plants with high sulfur requirements, such as *Lepidium sativum* L. and *Brassica napus* L. var. *napus*, due to the lack of phytotoxicity signs and the high content of sulfur products. Hydrolyzed feather keratin significantly affects both microbiological, biochemical, and enzymatic indicators of soil biological activity. The effect of the hydrolysate, however, depends on the physical and chemical properties of the soil into which it is introduced. In addition, the extracted keratin hydrolysate significantly intensifies the growth of test plants such as oilseed rape.

The tested *Trichophyton ajelloi* strain No. XII, due to its high ability to biodegrade keratin protein, can be used in the future to manage keratin waste other than chicken feathers and study its effect on soil biological activity and plant growth not only under model but also field conditions.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agronomy13010187/s1>, Table S1: Dynamics of changes in the number of selected groups of microorganisms in both examined soils (Cambisol I and Chernozem), without and with addition of feather hydrolysate, and without and with *Brassica napus* L. var. *napus* growth; Table S2: Dynamics of changes in the respiratory and enzymatic activity in both examined soils (Cambisol I and Chernozem), without and with addition of feather hydrolysate, and without and with *Brassica napus* L. var. *napus* growth; Table S3: Dynamics of changes in the concentration of dsDNA isolated from both examined soils (Cambisol I and Chernozem), without and with addition of feather hydrolysate, and without and with *Brassica napus* L. var. *napus* growth.

Author Contributions: Conceptualization, J.B. and M.M.; methodology, J.B.; software, M.M. and J.B.; validation, J.B. and M.M.; formal analysis, M.M. and J.B.; investigation, M.M. and J.B.; resources, J.B. and M.M.; data curation, M.M. and J.B.; writing—original draft preparation, M.M. and J.B.; writing—review and editing, J.B. and M.M.; visualization, M.M. and J.B.; supervision, J.B.; project administration, M.M.; funding acquisition, M.M. and J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially funded by subsidy of the Ministry of Education and Science, Poland, as part of an internal competition of the University of Life Sciences in Lublin for research projects for Young Scientists in the discipline of agriculture and horticulture, grant number RKM/MN-2/RIO/22. The APC was funded by subsidy of the Ministry of Education and Science, Poland, as part of an internal competition of the University of Life Sciences in Lublin for research projects for Young Scientists in the discipline of agriculture and horticulture, grant number RKM/MN-2/RIO/22.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are contained within the article and Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Korniłowicz–Kowalska, T.; Bohacz, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manag.* **2011**, *31*, 1689–1701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brandelli, A.; Sala, L.; Kalil, S.J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added–value products. *Food Res. Int.* **2015**, *73*, 3–12. [[CrossRef](#)]
- Możejko, M.; Bohacz, J. Optimization of conditions for feather waste biodegradation by geophilic *Trichophyton ajelloi* fungal strains towards further agricultural use. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 10858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bohacz, J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World J. Microb. Biotechnol.* **2017**, *33*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bohacz, J.; Korniłowicz–Kowalska, T. Fungal diversity and keratinolytic activity of fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. *Process Biochem.* **2019**, *80*, 119–128. [[CrossRef](#)]
- Bohacz, J.; Korniłowicz–Kowalska, T.; Kitowski, I.; Ciesielska, A. Degradation of chicken feathers by *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* strains from pellets of predatory birds and its practical aspect. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2020**, *151*, 104968. [[CrossRef](#)]
- Bohacz, J.; Możejko, M.; Kitowski, I. *Arthroderma tuberculatum* and *Arthroderma multifidum* isolated from soils in rook (*Corvus frugilegus*) colonies as producers of keratinolytic enzymes and mineral forms of N and S. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 9162. [[CrossRef](#)]
- Bohacz, J. Microbial strategies and biochemical activity during lignocellulosic waste composting in relation to the occurring biothermal phases. *J. Environ. Manag.* **2018**, *206*, 1052–1062. [[CrossRef](#)]
- Thakur, V.; Sharma, E.; Guleria, A.; Sangar, S.; Singh, K. Modification and management of lignocellulosic waste as an ecofriendly biosorbent for the application of heavy metal ions sorption. *Mater. Today Proc.* **2020**, *32*, 608–619. [[CrossRef](#)]
- Pylak, M.; Oszust, K.; Fraç, M. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* **2020**, *18*, 597–616. [[CrossRef](#)]
- Dasgupta, D.; Kumar, K.; Miglani, R.; Mishra, R.; Panda, A.K.; Bisht, S.S. Microbial biofertilizers: Recent trends and future outlook. In *Recent Advancement in Microbial Biotechnology, Agricultural and Industrial Approach*, 1st ed.; Manda, S.D., Passari, A.K., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2021; Volume 1, pp. 1–26. [[CrossRef](#)]
- De Silva, R.R. Enzymatic synthesis of protein hydrolysates from animal proteins: Exploring microbial peptidases. *Front. Microbiol.* **2011**, *9*, 735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Santi, C.; Zamboni, A.; Varanini, Z.; Pandolfini, T. Growth stimulatory effects and genome–wide transcriptional changes produced by protein hydrolysates in maize seedlings. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Berechet, M.D.; Simion, D.; Stanca, M.; Alexe, C.A.; Chelaru, C.; Răpă, M. Keratin hydrolysates extracted from sheep wool with potential use as organic fertilizer. *Leather Footwear J.* **2020**, *20*, 267–276. [[CrossRef](#)]
- Gaidau, C.; Stanca, M.; Niculescu, M.D.; Alexe, C.A.; Becheritu, M.; Horoias, R.; Cioineag, C.; Răpă, M.; Stanculescu, I.R. Wool keratin hydrolysates for bioactive additives preparation. *Materials* **2021**, *14*, 4696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Paul, T.; Halder, S.K.; Das, A.; Bera, S.; Maity, C.; Mandal, A.; Das, P.S.; Das Mohapatra, P.K.; Pati, B.R.; Mondal, K.C. Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2013**, *2*, 50–57. [[CrossRef](#)]
- Korniłowicz–Kowalska, T.; Bohacz, J. The influence of keratin–bark and keratin–bark–straw composts and development of bacteria and fungi in two soils under different plant cultivation systems. *Adv. Agric. Sci. Probl. Issues* **2005**, *506*, 245–259. (In Polish)
- Meena, V.S.; Maurya, B.R.; Verma, R.; Meena, R.S.; Jatav, G.K.; Meena, S.K.; Meena, R.; Meena, S.K. Soil microbial population and selected enzyme activities as influenced by concentrate manure and inorganic fertilizer in Alluvium soil of Varanasi. *Bioscan* **2013**, *8*, 931–935.
- Szwed, A.; Bohacz, J. Enzymatic activity and certain chemical properties of grey–brown podzolic soil (Haplic Luvisol) amended with compost of tobacco wastes. *Arch. Environ. Prot.* **2014**, *40*, 61–73. [[CrossRef](#)]
- Santos, J.A.; Nunes, L.A.P.L.; Melo, W.J.; Araújo, A.S.F. Tannery sludge compost amendment rates on soil microbial biomass of two different soils. *Eur. J. Soil Biol.* **2011**, *47*, 146–151. [[CrossRef](#)]
- Šimon, T.; Czako, A. Influence of long–term application of organic and inorganic fertilizers on soil properties. *Plant Soil Environ.* **2014**, *60*, 314–319. [[CrossRef](#)]
- Groth, D.A.; Sokólski, M.; Jankowski, K.J. A multi–criteria evaluation of the effectiveness of nitrogen and sulfur fertilization in different cultivars of winter rapeseed—Productivity, economic and energy balance. *Energies* **2020**, *13*, 4654. [[CrossRef](#)]
- Stepaniuk, M.; Głowacka, A. Yield of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *napus*) in a short–term monoculture and the macronutrient accumulation in relation to the dose and method of sulphur application. *Agronomy* **2022**, *12*, 68. [[CrossRef](#)]
- Marazzi, C.; Städler, E. Influence of plant sulphur nutrition on oviposition and larval performance of the diamondback moth. *Entomol. Exp. Appl.* **2004**, *111*, 225–232. [[CrossRef](#)]

25. Jakubus, M. *Sulfur in the Environment*, 1st ed.; Agricultural Academy in Poznan Publishing House: Poznan, Poland, 2006; pp. 1–48. (In Polish)
26. Kozłowska–Strawska, J.; Badora, A. Selected problems of sulfur management in crops. *Pol. J. Nat. Sci.* **2013**, *28*, 309–316.
27. Podleśna, A. The effect of sulfur fertilization on concentration and uptake of nutrients by winter oilseed rape. *Oilseeds* **2005**, *25*, 627–636. (In Polish)
28. Rausch, T.; Wachter, A. Sulfur metabolism: A versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 503–509. [[CrossRef](#)]
29. World Reference Base of Soil Resources. *International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps*; Update 2015; World Soil Recourses Reports No. 106; FAO: Rome, Italy, 2015.
30. Bohacz, J.; Możejko, M.; Kornilłowicz–Kowalska, T.; Siebielec, G. Impact of ecological factors on the occurrence and spatial–taxonomic structure of keratinophilic fungi and their co–occurrence in arable soils. *Agriculture* **2022**, *12*, 194. [[CrossRef](#)]
31. Masciandaro, G.; Ceccanti, B.; Garcia, C. Soil agro–ecological management: Fertirrigation and vermicompost treatments. *Bioresour. Technol.* **1997**, *59*, 199–206. [[CrossRef](#)]
32. Czop, M.; Żorawik, K.; Grochowska, S.; Kulkińska, L.; Januszewska, W. Tests of phytotoxicity of mining wastes on selected group of plants. *Arch. Waste Manag. Environ. Prot.* **2016**, *18*, 33–44. (In Polish)
33. Carvalho Neves, L.; de Souza, J.B.; de Souza Vidal, C.M.; Herbert, L.T.; de Souza, K.V.; Martins, K.G.; Young, B.J. Phytotoxicity indexes and removal of color, COD, phenols and ISA from pulp and paper mill wastewater post–treated by UV/H₂O₂ and photo–fenton. *Ecotox. Environ. Saf.* **2020**, *202*, 110939. [[CrossRef](#)]
34. Zucconi, F.; Forte, M.; Monaco, A.; De Bertoldi, M. Biological evaluation of compost maturity. *Biocycle* **1981**, *22*, 27–29.
35. Martin, J.P. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* **1950**, *69*, 215–232. [[CrossRef](#)]
36. Rühling, Å.; Tyler, G. Heavy metal pollution and decomposition of spruce needle litter. *Oikos* **1973**, *24*, 402–416. [[CrossRef](#)]
37. Thalmann, A. Zur methodik der bestimmung der dehydrogenaseaktivität im boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch Forsch* **1968**, *21*, 249–258.
38. Tabatabai, M.A.; Bremner, J.M. Use of p–nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* **1969**, *1*, 301–307. [[CrossRef](#)]
39. Ladd, J.N.; Butler, J.A.H. Short–term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.* **1972**, *4*, 19–30. [[CrossRef](#)]
40. Olson, N.D.; Morrow, J.B. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Res. Notes* **2012**, *5*, 668. [[CrossRef](#)]
41. Nilsson, M.; Andreas, L.; Lagerkvist, A. Effect of accelerated carbonation and zero valent iron on metal leaching from bottom ash. *Waste Manag.* **2016**, *51*, 97–104. [[CrossRef](#)]
42. Tang, Y.; Wang, L.; Jia, J.; Fu, X.; Le, Y.; Chen, X.; Sun, Y. Response of soil microbial community in Jiuduansha wetland to different successional stages and its implications for soil microbial respiration and carbon turnover. *Soil Biol. Biochem.* **2011**, *43*, 638–646. [[CrossRef](#)]
43. Utobo, E.B.; Tewari, L. Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. *Appl. Ecol. Environ. Res.* **2015**, *13*, 147–169. [[CrossRef](#)]
44. Mocek–Płóćiniak, A. Utilisation of enzymatic activity for the evaluation of the impact of anthropogenic changes caused by heavy metals in soil environment. *Sci. Nat. Technol.* **2010**, *4*, 1–10. (In Polish)
45. Joniec, J. Enzymatic activity as an indicator of regeneration processes in degraded soil reclaimed with various types of waste. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2018**, *15*, 2241–2252. [[CrossRef](#)]
46. Jain, R.; Jain, A.; Rawat, N.; Nair, M.; Gumashta, R. Feather hydrolysate from *Streptomyces sampsonii* GS 1322: A potential low cost soil amendment. *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, *121*, 672–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Adetunji, D.A.; Obideyi, O.A.; Evinemi, O.T.; Adetunji, O.A. Phytotoxicity assessment of compost–type biofertilizer using co–composting and post composting fortification methods. *Asian J. Agric. Food Sci.* **2020**, *8*, 44–48. [[CrossRef](#)]
48. Rys, M.; Saja–Garbarz, D.; Skoczowski, A. Phytotoxic effects of selected herbal extracts on the germination, growth and metabolism of mustard and oilseed rape. *Agronomy* **2022**, *12*, 110. [[CrossRef](#)]
49. Nustorova, M.; Braikova, D.; Gousterova, A.; Vasileva–Tonkova, E.; Nedkov, P. Chemical, microbiological and plant analysis of soil fertilized with alkaline hydrolysate of sheep’s wool waste. *World J. Microb. Biotechnol.* **2006**, *22*, 383–390. [[CrossRef](#)]
50. Bhavsar, P.S.; Zoccola, M.; Patrucco, A.; Montarsolo, A.; Mossotti, R.; Rovero, G.; Giansetti, M.; Tonin, C. Superheated water hydrolysis of waste wool in a semi–industrial reactor to obtain nitrogen fertilizers. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 6722–6731. [[CrossRef](#)]
51. Gousterova, A.; Nustorova, M.; Paskaleva, D.; Naydenov, M.; Neshev, G.; Vasileva–Tonkova, E. Assessment of feather hydrolysate from thermophilic actinomycetes for soil amendment and biological control application. *Int. J. Environ. Res.* **2011**, *5*, 1065–1070. [[CrossRef](#)]
52. Bielińska, E.J.; Futa, B.; Bik–Mołodzińska, M.; Szewczuk, C.; Sugier, D. The impact of fertilizing agents on the enzymatic activity of soils. *J. Res. Appl. Agric. Eng.* **2013**, *58*, 15–19. (In Polish)
53. Wrońska, I.; Onyszko, M.; Cybulska, K.; Telesiński, A.; Mahdi–Oraibi, S. The content of live microbial biomass and its number in horticultural soil enriched with biological preparation. *Proc. ECOpole* **2015**, *9*, 795–801. [[CrossRef](#)]

54. Wang, S.; Cheng, X. Changes in proteolytic bacteria in paddy soils in response to organic management. *Acta Agric. Scand. Sect. B—Soil Plant Sci.* **2017**, *67*, 583–589. [[CrossRef](#)]
55. Różyło, K.; Bohacz, J. Microbial and enzyme analysis of soil after the agricultural utilization of biogas digestate and mineral mining waste. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2020**, *17*, 1051–1062. [[CrossRef](#)]
56. Griffin, D.M. *Ecology of Soil Fungi*, 1st ed.; Chapman and Hall: London, UK, 1973; pp. 1–193.
57. Shreiner, R.P.; Koide, R.T. Antifungal compounds from the roots of mycotrophic and non-mycotrophic plant species. *New Phytol.* **1993**, *123*, 99–105. [[CrossRef](#)]
58. Yasumoto, S.; Suzuki, K.; Matsuzaki, M.; Hiradate, S.; Oose, K.; Hirokane, H.; Okada, K. Effects of plant residue, root exudate and juvenile plants of rapeseed (*Brassica napus* L.) on the germination, growth, yield, and quality of subsequent crops in successive and rotational cropping systems. *Plant Prod. Sci.* **2011**, *14*, 339–348. [[CrossRef](#)]
59. Smyk, B.; Barabasz, W.; Różycki, E. The effect of the use of mineral nitrogen fertilizers (N and NPK) on the occurrence of nitrosamines and mycotoxins in mountain soils and lowland grassland ecosystems. *Adv. Agric. Sci. Probl. Issues* **1989**, *380*, 1–9. (In Polish)
60. Borymski, S. Characteristics of Biodiversity of Microorganism Assemblies Inhabiting the Metallophytes Rhizosphere in Soils Contaminated with Heavy Metals. Ph.D. Thesis, University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland, 2019. (In Polish).
61. Ahemad, M.; Zaidi, A.; Khan, S.; Oves, M. Biological importance of phosphorus and phosphate solubilizing microbes—An overview. In *Phosphate Solubilizing Microbes for Crop Improvement*, 1st ed.; Khan, M.S., Zaidi, A., Eds.; Nova Science Publishers, Inc.: New York, NY, USA, 2009; Volume 1, pp. 1–14.
62. Kurek, E.; Jaroszuk, J. Siderophores and their role in the soil environment. *Adv. Microb.* **1993**, *32*, 71–81. (In Polish)
63. Hartmann, A.; Schmid, M.; van Tuinen, D.; Berg, G. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* **2009**, *321*, 235–257. [[CrossRef](#)]
64. Wolińska, A.; Stępniewska, Z.; Szymańska, E. Dehydrogenase activity of soil microorganisms and the total DNA level in soil of different use. *J. Agric. Sci. Technol. B* **2013**, *3*, 613–622.
65. Zhu, C.; Ma, Y.; Wu, H.; Sun, T.; La Pierre, K.J.; Sun, Z.; Yu, Q. Divergent effects of nitrogen addition on soil respiration in a semiarid grassland. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33541. [[CrossRef](#)]
66. Wolińska, A.; Stępniewska, Z. Dehydrogenase activity in the soil environment. In *Dehydrogenases*, 1st ed.; Canuto, R.A., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2012; Volume 8, pp. 183–210. [[CrossRef](#)]
67. Greenfield, L.M.; Puissant, J.; Jones, D.L. Synthesis of methods used to assess soil protease activity. *Soil Biol. Biochem.* **2021**, *158*, 108277. [[CrossRef](#)]
68. Vranova, V.; Rejsek, K.; Formanek, P. Proteolytic activity in soil: A review. *Appl. Soil Ecol.* **2013**, *70*, 23–32. [[CrossRef](#)]
69. Caballero, P.; Macías-Benítez, S.; Revilla, E.; Tejada, M.; Parrado, J.; Castaño, A. Effect of subtilisin, a protease from *Bacillus* sp., on soil biochemical parameters and microbial biodiversity. *Eur. J. Soil Biol.* **2020**, *101*, 103244. [[CrossRef](#)]
70. Bielińska, E.J. Methods of determination of phosphatase activity. *Acta Agrophys. Dissert. Monog.* **2005**, *3*, 63–74. (In Polish)
71. Klaczyński, E. Phosphorus in the environment, its importance and possibilities of recovery from sewage sludge. *ABC Technol.* **2015**, *6*, 35–41. (In Polish)
72. Sun, Y.; Goll, D.S.; Ciais, P.; Peng, S.; Margalef, O.; Asensio, D.; Sardans, J.; Peñuelas, J. Spatial pattern and environmental drivers of acid phosphatase activity in Europe. *Front. Big Data* **2020**, *5*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Saha, S.; Prakash, V.; Kundu, S.; Kumar, N.; Mina, B.L. Soil enzymatic activity as affected by long term application of farm yard manure and mineral fertilizer under a rainfed soybean-wheat system in N-W Himalaya. *Eur. J. Soil. Biol.* **2008**, *44*, 309–315. [[CrossRef](#)]
74. Kwiatkowski, C.A.; Harasim, E.; Feledyn-Szewczyk, B.; Antonkiewicz, J. Enzymatic activity of loess soil in organic and conventional farming systems. *Agriculture* **2020**, *10*, 135. [[CrossRef](#)]
75. Chen, X.; Jiang, N.; Condrón, L.M.; Dunfield, K.E.; Chen, Z.; Wang, J.; Chen, L. Soil alkaline phosphatase activity and bacterial phoD gene abundance and diversity under long-term nitrogen and manure inputs. *Geoderma* **2019**, *349*, 36–44. [[CrossRef](#)]
76. Chang, E.H.; Chung, R.S.; Tsai, Y.H. Effect of different application rates of organic fertilizer on soil enzyme activity and microbial population. *Soil Sci. Plant Nutr.* **2007**, *53*, 132–140. [[CrossRef](#)]
77. Kaur, M.; Bhari, R.; Singh, R.S. Chicken feather waste-derived protein hydrolysate as a potential biostimulant for cultivation of mung beans. *Biologia* **2021**, *76*, 1807–1815. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Publikacja 5 [P.5.] - Materiały uzupełniające (S)

Table S1. Dynamics of changes in the number of selected groups of microorganisms in both examined soils (Cambisol I and Chernozem), without and with addition of feather hydrolysate, and without and with *Brassica napus* L. var *napus* growth.

Soil	Days	3	30	60	Mean
Soil bacteria [cfu 10⁷ kg⁻¹ d.m. of soil]					
Cambisol	Water	22.84 ± 5.57	30.50 ± 8.64	83.87 ± 10.56	45.73 ± 8.26 ^{aB}
	Water + Plant	48.49 ± 3.04	28.87 ± 6.34	61.37 ± 24.13	46.24 ± 11.17 ^{aB}
	Hydrolysate	25.63 ± 6.93	43.80 ± 10.79	208.62 ± 22.44	92.68 ± 13.39 ^{bCD}
	Hydrolysate + Plant	51.07 ± 9.18	54.55 ± 10.10	69.23 ± 3.83	58.28 ± 7.70 ^{aBC}
Chernozem	Water	81.10 ± 11.76	110.84 ± 17.49	234.99 ± 54.64	142.31 ± 27.96 ^{aA}
	Water + Plant	94.40 ± 10.61	134.54 ± 10.46	202.54 ± 73.41	143.83 ± 31.49 ^{aA}
	Hydrolysate	81.24 ± 7.03	93.30 ± 3.30	224.32 ± 2.70	132.95 ± 4.34 ^{aAD}
	Hydrolysate + Plant	114.67 ± 7.77	127.40 ± 12.44	273.39 ± 42.03	171.82 ± 20.75 ^{aA}
Soil fungi [cfu 10⁶ kg⁻¹ d.m. of soil]					
Cambisol	Water	43.99 ± 2.06	39.73 ± 5.81	35.79 ± 4.66	39.83 ± 4.17 ^{aAB}
	Water + Plant	36.04 ± 2.88	47.12 ± 7.98	51.25 ± 13.22	44.80 ± 8.03 ^{aAB}
	Hydrolysate	41.12 ± 3.47	55.24 ± 3.98	49.25 ± 9.38	48.54 ± 5.61 ^{aA}
	Hydrolysate + Plant	51.26 ± 5.03	55.08 ± 10.71	37.20 ± 17.49	47.85 ± 11.08 ^{aA}
Chernozem	Water	44.73 ± 3.26	25.83 ± 9.02	25.33 ± 5.98	31.96 ± 6.09 ^{bB}
	Water + Plant	50.99 ± 3.53	35.34 ± 14.17	46.16 ± 3.21	44.16 ± 6.97 ^{aAB}
	Hydrolysate	37.12 ± 7.34	46.02 ± 8.22	42.27 ± 9.23	41.80 ± 8.26 ^{abAB}
	Hydrolysate + Plant	43.78 ± 5.81	34.64 ± 4.45	55.87 ± 5.90	44.76 ± 5.39 ^{aAB}
Proteolytic microorganisms [cfu 10⁷ kg⁻¹ d.m. of soil]					
Cambisol	Water	25.73 ± 6.77	28.06 ± 3.63	88.43 ± 4.89	47.41 ± 5.10 ^{bC}
	Water + Plant	13.17 ± 2.48	21.96 ± 7.37	26.71 ± 6.75	20.61 ± 5.53 ^{aB}
	Hydrolysate	30.49 ± 3.80	33.55 ± 5.23	116.40 ± 32.88	60.14 ± 13.97 ^{bCD}
	Hydrolysate + Plant	16.35 ± 0.81	23.18 ± 3.01	22.32 ± 2.32	20.61 ± 2.05 ^{aB}
Chernozem	Water	91.30 ± 11.28	135.36 ± 17.49	121.05 ± 7.88	115.90 ± 12.22 ^{aA}
	Water + Plant	128.02 ± 11.04	201.81 ± 43.05	63.59 ± 3.49	131.14 ± 19.20 ^{aA}
	Hydrolysate	87.96 ± 11.53	123.57 ± 6.67	114.29 ± 8.69	108.61 ± 8.96 ^{aA}
	Hydrolysate + Plant	69.60 ± 6.63	96.20 ± 23.11	76.22 ± 13.65	80.68 ± 14.46 ^{bD}
Cellulolytic bacteria [cfu 10⁵ kg⁻¹ d.m. of soil]					
Cambisol	Water	7.67 ± 0.46	29.81 ± 7.08	54.41 ± 1.23	30.63 ± 2.92 ^{aA}
	Water + Plant	7.32 ± 0.27	29.24 ± 12.86	58.48 ± 4.64	31.68 ± 5.92 ^{aA}
	Hydrolysate	13.53 ± 1.51	58.22 ± 15.53	21.95 ± 3.50	31.23 ± 6.85 ^{aA}
	Hydrolysate + Plant	13.23 ± 1.93	65.04 ± 11.10	44.24 ± 6.00	40.84 ± 6.34 ^{aA}
Chernozem	Water	22.85 ± 1.93	89.37 ± 24.88	103.72 ± 3.90	71.98 ± 10.24 ^{abB}
	Water + Plant	18.15 ± 5.04	87.87 ± 5.46	102.52 ± 21.11	69.51 ± 10.54 ^{aB}
	Hydrolysate	31.72 ± 2.96	106.55 ± 6.47	115.80 ± 12.13	84.69 ± 7.19 ^{abBC}
	Hydrolysate + Plant	21.46 ± 3.58	90.72 ± 19.41	193.87 ± 54.81	102.02 ± 25.93 ^{bC}
Cellulolytic fungi [cfu 10⁶ kg⁻¹ d.m. of soil]					
Cambisol	Water	15.15 ± 2.99	8.71 ± 0.64	24.83 ± 4.96	16.23 ± 2.86 ^{aBC}
	Water + Plant	13.90 ± 3.24	11.16 ± 1.58	39.16 ± 7.88	21.41 ± 4.23 ^{aC}
	Hydrolysate	13.17 ± 2.91	13.60 ± 4.79	22.99 ± 6.09	16.59 ± 4.60 ^{aBC}
	Hydrolysate + Plant	16.89 ± 2.64	15.36 ± 6.99	27.44 ± 0.94	19.90 ± 3.52 ^{aC}
Chernozem	Water	7.42 ± 0.41	9.57 ± 2.58	9.32 ± 2.82	8.77 ± 1.93 ^{aA}
	Water + Plant	5.46 ± 2.94	5.67 ± 2.41	8.43 ± 2.38	6.52 ± 2.57 ^{aA}
	Hydrolysate	7.65 ± 0.25	6.81 ± 0.48	14.90 ± 6.98	9.79 ± 2.57 ^{aAB}
	Hydrolysate + Plant	7.88 ± 0.59	8.81 ± 2.77	13.54 ± 6.22	10.08 ± 3.19 ^{aAB}

Explanations: Letters, i.e., lowercase (a, b) or capital (A, B, C, D) denote the means that form homogenous groups (HSD–Tukey post–hoc test for multivariate ANOVA) within each of the tested soils separately, and within both soil together, respectively. When two compared means were assigned the same letter (e.g.: a, or A), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g.: a and b, or A and B), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

Table S2. Dynamics of changes in the respiratory and enzymatic activity in both examined soils (Cambisol I and Chernozem), without and with addition of feather hydrolysate, and without and with *Brassica napus* L. var *napus* growth.

Soil	Days	3	30	60	Mean
Soil respiration [mg CO₂ kg⁻¹ d.m. of soil 24h⁻¹]					
Cambisol	Water	1367.51 ± 636.52	306.67 ± 108.26	2105.17 ± 378.52	1259.78 ± 374.43 ^{aC}
	Water + Plant	402.49 ± 113.85	1247.07 ± 219.14	2144.58 ± 515.15	1264.71 ± 282.71 ^{aC}
	Hydrolysate	2143.39 ± 517.39	1551.87 ± 666.16	3742.21 ± 26.33	2479.16 ± 403.29 ^{bABD}
	Hydrolysate + Plant	1374.47 ± 413.41	1456.43 ± 213.69	2350.80 ± 309.07	1727.23 ± 312.06 ^{aAC}
Chernozem	Water	2595.16 ± 642.81	1600.18 ± 117.30	5396.80 ± 434.89	3197.38 ± 398.33 ^{bD}
	Water + Plant	3080.96 ± 712.29	2328.04 ± 311.10	2448.23 ± 587.13	2619.08 ± 536.84 ^{abBD}
	Hydrolysate	1442.61 ± 408.81	500.29 ± 205.40	4379.47 ± 623.90	2107.46 ± 412.70 ^{aAB}
	Hydrolysate + Plant	2793.09 ± 376.45	1370.68 ± 298.87	2854.43 ± 474.99	2339.40 ± 383.44 ^{aAB}
Dehydrogenase [mg TPF kg⁻¹ d.m. of soil 24h⁻¹]					
Cambisol	Water	3.12 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.18 ± 0.04	1.19 ± 0.03 ^{aA}
	Water + Plant	3.42 ± 0.40	0.27 ± 0.03	0.12 ± 0.08	1.27 ± 0.17 ^{aA}
	Hydrolysate	3.25 ± 0.08	0.26 ± 0.04	0.12 ± 0.05	1.21 ± 0.06 ^{aA}
	Hydrolysate + Plant	3.81 ± 0.16	0.50 ± 0.03	0.54 ± 0.06	1.61 ± 0.08 ^{bA}
Chernozem	Water	7.22 ± 0.17	2.77 ± 0.04	2.09 ± 0.02	4.03 ± 0.08 ^{aB}
	Water + Plant	8.44 ± 0.36	3.49 ± 0.06	3.88 ± 0.37	5.27 ± 0.26 ^{cD}
	Hydrolysate	7.80 ± 0.03	3.08 ± 0.21	0.82 ± 0.13	3.90 ± 0.12 ^{aB}
	Hydrolysate + Plant	9.74 ± 0.80	3.18 ± 0.26	1.10 ± 0.11	4.67 ± 0.39 ^{bC}
Protease [mg of tyrosine kg⁻¹ d.m. of soil h⁻¹]					
Cambisol	Water	4.90 ± 0.40	4.92 ± 0.49	4.94 ± 0.92	4.92 ± 0.60 ^{aA}
	Water + Plant	7.62 ± 1.62	5.36 ± 0.95	9.27 ± 0.18	7.42 ± 0.92 ^{bBC}
	Hydrolysate	6.44 ± 0.51	5.50 ± 0.16	3.44 ± 0.72	5.13 ± 0.46 ^{aA}
	Hydrolysate + Plant	8.52 ± 0.77	4.23 ± 1.59	4.86 ± 1.40	5.87 ± 1.25 ^{aA}
Chernozem	Water	5.01 ± 0.45	6.22 ± 0.87	6.47 ± 0.23	5.90 ± 0.51 ^{aAB}
	Water + Plant	8.12 ± 0.48	8.48 ± 0.47	5.91 ± 0.24	7.50 ± 0.40 ^{cC}
	Hydrolysate	5.75 ± 0.32	3.86 ± 0.53	4.36 ± 1.41	4.66 ± 0.75 ^{bA}
	Hydrolysate + Plant	4.75 ± 1.27	7.10 ± 0.28	6.47 ± 0.76	6.11 ± 0.77 ^{aABC}
Acid phosphatase [mmol PNP kg⁻¹ d.m. of soil h⁻¹]					
Cambisol	Water	41.05 ± 0.62	27.14 ± 0.34	41.87 ± 1.10	36.69 ± 0.69 ^{aA}
	Water + Plant	39.71 ± 1.44	33.14 ± 1.21	39.67 ± 0.71	37.51 ± 1.12 ^{aA}
	Hydrolysate	41.21 ± 1.76	31.91 ± 0.81	43.77 ± 1.51	38.97 ± 1.36 ^{aA}
	Hydrolysate + Plant	43.34 ± 5.89	26.95 ± 0.48	38.44 ± 2.32	36.24 ± 2.89 ^{aA}
Chernozem	Water	110.07 ± 3.55	97.20 ± 0.73	113.56 ± 1.70	106.95 ± 1.99 ^{bC}
	Water + Plant	109.84 ± 4.58	89.00 ± 1.36	99.03 ± 0.73	99.29 ± 2.22 ^{aB}
	Hydrolysate	108.53 ± 3.04	88.96 ± 1.37	101.72 ± 1.55	99.73 ± 1.99 ^{aB}
	Hydrolysate + Plant	111.34 ± 3.24	89.65 ± 1.91	117.04 ± 0.37	106.01 ± 1.84 ^{bC}
Alkaline phosphatase Acid phosphatase [mmol PNP kg⁻¹ d.m. of soil h⁻¹]					
Cambisol	Water	0.87 ± 0.78	2.53 ± 1.36	0.99 ± 0.29	1.46 ± 0.81 ^{aA}
	Water + Plant	2.28 ± 0.30	0.75 ± 0.39	1.30 ± 0.33	1.44 ± 0.34 ^{aA}
	Hydrolysate	0.81 ± 0.09	1.52 ± 0.24	2.57 ± 1.83	1.64 ± 0.72 ^{aA}
	Hydrolysate + Plant	0.95 ± 0.58	3.28 ± 1.75	2.34 ± 1.36	2.19 ± 1.23 ^{aA}
Chernozem	Water	42.05 ± 1.58	39.42 ± 1.45	53.75 ± 1.75	45.07 ± 1.59 ^{abBC}
	Water + Plant	48.07 ± 2.42	45.89 ± 0.48	45.60 ± 0.73	46.52 ± 1.21 ^{bC}
	Hydrolysate	42.88 ± 2.27	36.96 ± 1.79	20.83 ± 4.63	33.56 ± 2.90 ^{cD}
	Hydrolysate + Plant	43.46 ± 1.73	38.42 ± 0.27	45.25 ± 1.43	42.38 ± 1.14 ^{aB}

Explanations: Letters, i.e., lowercase (a, b) or capital (A, B, C, D) denote the means that form homogenous groups (HSD–Tukey post–hoc test for multivariate ANOVA) within each of the tested soils separately, and within both soil together, respectively. When two compared means were assigned the same letter (e.g.: a, or A), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g.: a and b, or A and B), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

Table S3. Dynamics of changes in the concentration of dsDNA isolated from both examined soils (Cambisol I and Chernozem), without and with addition of feather hydrolysate, and without and with *Brassica napus* L. var *napus* growth.

Soil	Days	3	30	60	Mean
dsDNA [ng μl⁻¹]					
Cambisol	Water	5.40 ± 0.01	6.53 ± 0.47	5.17 ± 0.38	5.70 ± 0.28 ^{bC}
	Water + Plant	5.77 ± 0.25	7.13 ± 0.54	8.07 ± 0.56	6.99 ± 0.45 ^{aA}
	Hydrolysate	4.43 ± 0.05	7.40 ± 0.16	9.27 ± 0.21	7.03 ± 0.14 ^{aA}
	Hydrolysate + Plant	4.57 ± 0.05	8.70 ± 0.50	10.83 ± 0.62	8.03 ± 0.39 ^{cD}
Chernozem	Water	6.67 ± 0.34	13.67 ± 0.49	14.97 ± 0.45	11.77 ± 0.43 ^{bE}
	Water + Plant	9.03 ± 0.09	16.50 ± 1.07	17.87 ± 0.56	14.47 ± 0.57 ^{cF}
	Hydrolysate	8.43 ± 0.42	13.00 ± 0.43	16.53 ± 0.54	12.66 ± 0.46 ^{aB}
	Hydrolysate + Plant	6.23 ± 0.05	14.03 ± 0.17	19.33 ± 0.26	13.20 ± 0.16 ^{aB}

Explanations: Letters, i.e., lowercase (a, b) or capital (A, B, C, D) denote the means that form homogenous groups (HSD–Tukey post–hoc test for multivariate ANOVA) within each of the tested soils separately, and within both soil together, respectively. When two compared means were assigned the same letter (e.g.: a, or A), that means did not differ significantly (at $\alpha = 0.05$); if means are marked with different letters (e.g.: a and b, or A and B), they differ significantly from each other (at $\alpha = 0.05$).

**VIII. Oświadczenia dotyczące wkładu w przygotowanie
opublikowanych prac naukowych**

mgr inż. Michał Możejko
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobiotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin
+48 815 248 105
michal.mozejko@up.lublin.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Możejko M., Bohacz J. 2021. Mikroorganizmy i enzymy keratynolityczne. W: Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa. Babicz M., Nowakowicz-Dębek B. (red.). Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, s. 96-103. ISBN: 978-83-7259-344-3.

mój udział oszacowany na 90% polegał na

- *tworzeniu koncepcji pracy,*
- *zebraniu i analizie literatury,*
- *przygotowaniu tekstu manuskryptu,*
- *współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje,*
- *wykonaniu korekt wydawniczych na poszczególnych etapach procesu publikacji,*
- *pełnieniu roli autora korespondencyjnego.*

..Michał Możejko.....

Podpis

dr hab. Justyna Bohacz, prof. UP
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobioinżynierii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin
+48 815 248 104
justyna.bohacz@up.lublin.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Możejko M., Bohacz J. 2021. Mikroorganizmy i enzymy keratynolityczne. W: Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa. Babicz M., Nowakowicz-Dębek B. (red.). Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, s. 96-103. ISBN: 978-83-7259-344-3.

mój udział oszacowany na 10% polegał na

- *współtworzeniu koncepcji pracy,*
- *współuczestniczeniu w przygotowaniu tekstu manuskryptu,*
- *współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje.*


.....
Podpis

dr hab. Justyna Bohacz, prof. UP
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobiżynierii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20–069 Lublin
+48 815 248 104
justyna.bohacz@up.lublin.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

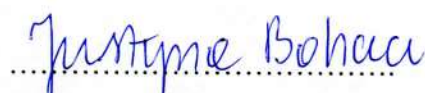
Niniejszym oświadczam, że w pracy

Bohacz J., Możejko M., Kornilowicz–Kowalska T., Siebielec G., 2022. Impact of ecological factors on the occurrence and spatial–taxonomic structure of keratinophilic fungi and their co–occurrence in arable soils. *Agriculture*, 12, 194.

<https://doi.org/10.3390/agriculture12020194>

mój udział oszacowany na 45% polegał na

- *opracowaniu podstaw koncepcji i metodologii badań,*
- *identyfikacji gatunkowej grzybów,*
- *współudziale w analizie statystycznej i interpretacji wyników badań,*
- *współudziale w przygotowaniu części dokumentacyjnej i tekstu manuskryptu,*
- *współudziale w edycji i korekcie manuskryptu,*
- *współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje.*


.....
Podpis

prof. dr hab. Teresa Kornilowicz–Kowalska
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobiotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20–069 Lublin
+48 815 248 149
teresa.kornilowicz@up.lublin.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Bohacz J., Możejko M., Kornilowicz–Kowalska T., Siebielec G., 2022. Impact of ecological factors on the occurrence and spatial–taxonomic structure of keratinophilic fungi and their co–occurrence in arable soils. *Agriculture*, 12, 194.

<https://doi.org/10.3390/agriculture12020194>

mój udział oszacowany na 5% polegał na

- *współdziałanie w identyfikacji gatunkowej grzybów,*
- *współuczestniczeniu w przygotowaniu tekstu manuskryptu.*



Podpis

dr hab. Grzegorz Siebielec, prof. IUNG–PIB
Zakład Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
ul. Czartoryskich 8, 24–100 Puławy
+48 81 516 203 523
gs@iung.pulawy.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Bohacz J., Możejko M., Kornilowicz–Kowalska T., Siebielec G., 2022. Impact of ecological factors on the occurrence and spatial–taxonomic structure of keratinophilic fungi and their co–occurrence in arable soils. *Agriculture*, 12, 194.

<https://doi.org/10.3390/agriculture12020194>

mój udział oszacowany na 5% polegał na

- *wykonaniu i opisie metodyki dotyczącej analiz chemicznych w badanych próbkach gleb,*
- *współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje.*



.....
Podpis

dr hab. Justyna Bohacz, prof. UP
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobiotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin
+48 815 248 104
justyna.bohacz@up.lublin.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

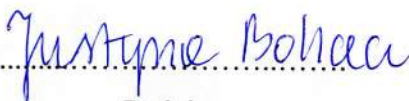
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Bohacz J., Możejko M. Biodegradation of feather keratin by pigmenting and non-pigmenting fungal strains of *Trichophyton ajelloi* from two soils with different physical and chemical properties.

mój udział oszacowany na 50% polegał na

- *opracowaniu podstaw koncepcji i metodologii badań,*
- *współdziale w analizie statystycznej i interpretacji wyników badań,*
- *współdziale w przygotowaniu części dokumentacyjnej i tekstu manuskryptu.*



Podpis

mgr inż. Michał Możejko
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobioinżynierii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin
+48 815 248 105
michal.mozejko@up.lublin.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Bohacz J., Możejko M. Biodegradation of feather keratin by pigmented and non-pigmented fungal strains of *Trichophyton ajelloi* from two soils with different physical and chemical properties.

mój udział oszacowany na 50% polegał na

- *współudziale w tworzeniu koncepcji badań,*
- *zaplanowaniu, założeniu doświadczenia i przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, które obejmowały oznaczanie aktywności keratynolitycznej najliczniej występujących w badanych glebach uprawnych 37 szczepów geofilnego grzyba *Trichophyton ajelloi*,*
- *współudziale w analizie i interpretacji wyników,*
- *współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu,*
- *wykonaniu zamieszczonych w pracy rysunków, tabel i statystycznych analiz,*
- *pełnieniu roli autora korespondencyjnego.*

.....Michał Możejko.....
Podpis

mgr inż. Michał Możejko
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobioinżynierii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin
+48 815 248 105
michal.mozejko@up.lublin.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Możejko M., Bohacz J., 2022. Optimization of conditions for feather waste biodegradation by geophilic *Trichophyton ajelloi* fungal strains towards further agricultural use. International Journal of Environmental Research and Public Health, 19, 10858.

<https://doi.org/10.3390/ijerph191710858>

mój udział oszacowany na 55% polegał na

- *współudziale w tworzeniu koncepcji badań i wybranych założeń metodycznych,*
- *zaplanowaniu, założeniu doświadczenia i przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, które obejmowały badania nad optymalizacją warunków hodowli i składu podłoża hodowlanego wytypowanych trzech szczepów grzyba *Trichophyton ajelloi*,*
- *współudziale w analizie i interpretacji wyników,*
- *współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu,*
- *wykonaniu zamieszczonych w pracy rysunków, tabel i statystycznych analiz,*
- *współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje,*
- *wykonaniu edycji manuskryptu i korekt wydawniczych na poszczególnych etapach procesu publikacji.*

.....*Michał Możejko*.....
Podpis

dr hab. Justyna Bohacz, prof. UP
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobioinżynierii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin
+48 815 248 104
justyna.bohacz@up.lublin.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Możejko M., Bohacz J., 2022. Optimization of conditions for feather waste biodegradation by geophilic *Trichophyton ajelloi* fungal strains towards further agricultural use. International Journal of Environmental Research and Public Health, 19, 10858.

<https://doi.org/10.3390/ijerph191710858>

mój udział oszacowany na 45% polegał na

- *opracowaniu podstaw koncepcji i metodologii badań,*
- *współdziale w analizie statystycznej i interpretacji wyników badań,*
- *współdziale w przygotowaniu części dokumentacyjnej i tekstu manuskryptu,*
- *współdziale w odpowiedziach na recenzje,*
- *współdziale w edycji i korekcie manuskryptu,*
- *pełnieniu roli autora korespondencyjnego.*



Podpis

mgr inż. Michał Mozejko
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobiotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin
+48 815 248 105
michal.mozejko@up.lublin.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Mozejko M., Bohacz J., 2023. Effect of keratin hydrolysates obtained from feather decomposition by *Trichophyton ajelloi* on plant germination, growth and biological activity of selected arable soils under model conditions. *Agronomy*, 13, 186, <https://doi.org/10.3390/agronomy13010187>

mój udział oszacowany na 60% polegał na

- *współudziale w tworzeniu koncepcji badań i wybranych założeń metodycznych,*
- *zaplanowaniu, założeniu doświadczenia i przeprowadzeniu analiz, które obejmowały wpływ hydrolizatów keratynowych na kiełkowanie i wzrost roślin oraz aktywność biologiczną gleby,*
- *współudziale w analizie i interpretacji wyników,*
- *współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu,*
- *przygotowaniu zamieszczonych w pracy rysunków, tabel i statystycznych analiz,*
- *współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje,*
- *wykonaniu edycji manuskryptu i korekt wydawniczych na poszczególnych etapach procesu publikacji.*

...Michał Mozejko...

Podpis

dr hab. Justyna Bohacz, prof. UP
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobiotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin
+48 815 248 104
justyna.bohacz@up.lublin.pl

Lublin, 28.04.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy

Możejko M., Bohacz J., 2023. Effect of keratin hydrolysates obtained from feather decomposition by *Trichophyton ajelloi* on plant germination, growth and biological activity of selected arable soils under model conditions. *Agronomy*, 13, 186.

<https://doi.org/10.3390/agronomy13010187>

mój udział oszacowany na 40% polegał na

- *opracowaniu podstaw koncepcji i metodologii badań,*
- *współudziale w analizie i interpretacji wyników badań,*
- *współudziale w analizie statystycznej i interpretacji wyników badań,*
- *współudziale w przygotowaniu części dokumentacyjnej i tekstu manuskryptu,*
- *współuczestniczeniu w odpowiedziach na recenzje,*
- *współudziale w edycji i korekcie manuskryptu,*
- *pełnieniu roli autora korespondencyjnego,*

.....*Justyna Bohacz*.....

Podpis

Wykaz dorobku naukowego niebędącego przedmiotem rozprawy doktorskiej

Publikacje w czasopismach naukowych ujętych w wykazie MEiN i posiadających Impact Factor:

1. Kornilłowicz-Kowalska, T., Wojdyło-Kotwica, B., Bohacz, J., Możejko, M.T., 2022. Occurrence and distribution of *Fusarium* communities in the root zone in a post-bog permanent meadow in relation to mineral fertilization and growing seasons. *Pathogens* 11, 341. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030341> (MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁: 100 pkt., IFJCR: 4,531).
2. Kornilłowicz-Kowalska, T., Andruszczak, S., Bohacz, J., Kraska, P., Możejko, M., Kwiecińska-Poppe, E., 2022. The effect of tillage and no-tillage system on culturable fungal communities in the rhizosphere and soil of two spelt cultivars. *Applied Soil Ecology* 174, 104413. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104413> (MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁: 140 pkt., IFJCR: 5,509).
3. Bohacz, J., Możejko, M., Kitowski, I., 2020. *Arthroderma tuberculatum* and *Arthroderma multifidum* isolated from soils in rook (*Corvus frugilegus*) colonies as producers of keratinolytic enzymes and mineral forms of N and S. *International Journal of Environmental Research and Public* 17, 9162. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249162> (MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁: 140 pkt., IFJCR: 3,390).

Rozdziały w monografiach naukowych wydawanych przez wydawnictwa ujęte w wykazie MEiN:

1. Kornilłowicz-Kowalska, T., Wojdyło-Kotwica, B., Bohacz, J., Możejko, M., 2020. Bioróżnorodność saprotroficznych grzybów strefy korzeniowej traw i koniczyn łąki trwałej w siedlisku pobagiennym przy uwzględnieniu sezonu wegetacyjnego oraz nawożenia (Zakłęśność Sosnowicka, Polesie Zachodnie). W: Polesie - środowisko, melioracje, Międzynarodowa monografia naukowa. T. 3, Polesie polskie. Mażajski, J.A., Rokoczyński, A.N., Wołczek, A. A., Mieszuk, O.P., Jeznach, J. (red.). Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, s. 485-538. ISBN: 978-83-7583-945-6 (MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁: 20 pkt.).

2. Możejko, M., Wawer, J., Bohacz J., **2020**. Dynamika zmian liczebności mikroorganizmów i aktywności enzymatycznej gleb wzbogaconych produktami ubocznymi z przemysłu owocowo-warzywnego. W: Problemy i wyzwania współczesnego rolnictwa oraz ochrony środowiska. Tom 1: Babicz, M. (red.). Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, s. 65-74. ISBN: 978-83-7259-327-6 (MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁: **20 pkt.**).
3. Możejko, M., Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., **2020**. Znaczenie i rola mikroorganizmów w biodegradacji złożonej materii organicznej. W: Badania z zakresu nauk przyrodniczych - nowe trendy: Danielewska, A., Maciąg, M. (red.). Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o, s. 100-112. ISBN: 978-83-66489-08-0 (MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁: **20 pkt.**).

Publikacje popularnonaukowe:

1. Bohacz, J., Możejko, M., **2020**. To już nie jest „waga piórkowa”. Pierze kurcząt jako źródło użytecznych bioproduktów. Ekologia 4/96, 44-46. (MEiN₂₀₁₉₋₂₀₂₁: **0 pkt.**).

Referaty wygłoszone na konferencjach o zasięgu międzynarodowym:

1. Bohacz, J., Możejko, M., **2023**. Optimization of enzymatic activity of *Trichophyton ajelloi* strains from arable soils. W: 2nd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: Environment - Plant - Animal - Product: Abstracts: E024. Lublin, 19-20 kwietnia 2023, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie. <https://doi.org/10.24326/ICDSUPL2.E024>
2. Możejko, M., Bohacz, J., **2022**. Numbers of microorganisms in soils with different physico-chemical properties. W: 1st International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: Environment - Plant - Animal - Product: Abstracts, E008. Lublin, 26 kwietnia 2022, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie. <https://doi.org/10.24326/ICDSUPL1.E008>

Referaty wygłoszone na konferencjach o zasięgu ogólnopolskim:

1. Możejko, M., Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., **2021**. Wpływ niektórych czynników ekologicznych na występowanie grzybów zasiedlających resztki keratynowe w glebie. W: 54 Konferencja Mikrobiologiczna „Mikroorganizmy różnych

- środowisk”: Abstrakty, s. 41. Lublin, 20-21 września, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.
2. Możejko, M., Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., **2021**. Enzymatic activity and protein-sulfur products as indicators of keratinolytic potential of *Chrysosporium tropicum* and *Trichophyton ajelloi*. W: Ogólnopolska Konferencja Doktorantów: Streszczenia, Babicz, M., Całyniuk, Z., Drabik, K., Możejko, M. (red.), s. 43. Lublin, 10 kwietnia, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.
<https://doi.org/10.24326/mon.2021.3>
 3. Możejko, M., Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., **2020**. Frequency and distribution of potentially keratinolytic fungi in cultivated soils. W: Przegląd badań prowadzonych przez doktorantów, s. 33. Lublin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie. ISBN: 978-83-7259-318-4. <https://doi.org/10.24326/srzp.2020.1>
 4. Możejko, M., Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., **2020**. Generic and species characteristics of keratinolytic fungi populations colonizing cultivated soils W: Przegląd badań prowadzonych przez doktorantów, s. 34. Lublin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie. ISBN: 978-83-7259-318-4. <https://doi.org/10.24326/srzp.2020.1>
 5. Możejko, M., Wawer, J., Olek, M., Cieślak, D., Bohacz, J., **2019**. Aktywność mikrobiologiczna gleb po wzbogaceniu ubocznymi produktami z przemysłu owocowo-warzywnego. W: Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju: XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel: Abstrakty, Wrzyszczyk, B., Chodźko, E., Maciąg, K. (red.), s. 144. Lublin 23-24 marca, Fundacja na rzecz Promocji Nauki i Rozwoju Tygiel, Wydawnictwo Naukowe Tygiel. ISBN: 978-83-66261-09-9.
 6. Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., Możejko, M., **2019**. Ocena aktywności keratynolitycznej grzybów wyizolowanych z kompostu na podstawie organicznych i mineralnych produktów keratynolizy. W: XVI Międzynarodowe Seminarium Studenckich Kół Naukowych nt. „Środowisko - Zwierzę - Produkt”: VI Konferencja Doktorantów, s.160. Lublin, 8 kwietnia, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

Postery prezentowane na konferencjach o zasięgu ogólnopolskim:

1. Możejko, M., Wawer, J., Olek, M., Cieślak, D., **2018**. Liczebność wybranych grup mikroorganizmów i aktywność oddechowa gleby po wprowadzeniu wyłoków owocowych i warzywnych. W: X Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”: Abstrakty, Nowak, B.A., Maciąg, M.,

Maciąg, K. (red.), s. 324-325. Lublin, 17-18 marca, Fundacja na Rzecz Promocji Nauki i Rozwoju TYGIEL. ISBN: 978-83-65272-76-8.

Współautorstwo doniesień prezentowanych w formie posterów na konferencjach o zasięgu międzynarodowym:

1. Bohacz, J., Możejko, M., Kitowski, I., Bednarz, J., **2021**. Involvement of keratinolytic fungi derived from rookery soils in the management of poultry industry post-production waste for practical use. W: 2nd International Scientific Conference on Ecological and Environmental Engineering: Book of Abstracts, s. 8. Wrocław, 30 czerwca - 1 lipca.
2. Bohacz, J., Kornilowicz-Kowalska, T., Możejko, M., **2019**. Removal of textile dye (RBBR) from water environment by fungi from lignocellulosic composts. W: Book of Abstracts the 9th International Scientific-Technical Conference: Environmental engineering, Photogrammetry, Geoinformatics: Modern Technologies and Development Perspectives, s. 162-163. Lublin, 17-20 października,

Współautorstwo doniesień prezentowanych w formie posterów na konferencjach o zasięgu ogólnopolskim:

1. Bohacz, J., Możejko, M., **2022**. Kształtowanie się różnorodności grzybów glebowych pod wpływem wprowadzonego hydrolizatu keratynowego. W: VI Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „Metagenomy różnych środowisk”: Materiały konferencyjne, s. 62. Puławy, 23-24 czerwca, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowy Instytut Badawczy. ISBN: 978-83-7562-382-6.
2. Bohacz, J., Majewska, M., Kornilowicz-Kowalska, T., Jaroszuk-Ścisiel, J., Możejko, M., **2021**. Zmiany aktywności i różnorodności metabolicznej mikroorganizmów glebowych po wprowadzeniu biopreparatu keratynowego. W: 54 Konferencja Mikrobiologiczna „Mikroorganizmy różnych środowisk”: Abstrakty, s. 55. Lublin, 20-21 września, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.
3. Możejko, M., Bohacz, J., Kitowski, I., Bednarz, J., **2021**. Dynamika zmian organicznych i mineralnych produktów biodegradacji odpadowego pierza przez grzyby wyizolowane z gleby pochodzącej z kolonii gawrona *Corvus frugilegus*. W: Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Problem odpadów i ich zagospodarowania”:

- Abstrakty, Danielewska, A., Jędrzejewska, J. (red.), s. 24-25. Lublin, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL. ISBN: 978-83-66261-83-9.
4. Bohacz, J., Możejko, M., Kitowski, I., Bednarz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., **2020**. Wstępna ocena aktywności enzymów keratynolitycznych grzybów *Arthroderma tuberculatum* wyizolowanych z gleby zlokalizowanej w koloniach gawrona *Corvus frugilegus*. W: Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju: XII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel: Abstrakty, Mołdoch-Mendoń, I., Talarek, K., Danielewska, A. (red.), s. 232. Lublin, 24-27 września, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL. ISBN: 978-83-66261-48-8.
 5. Łopatiuk, O., Flak, N., Krakowiak, D., Laszczka, D., Dobrosz, K., Możejko, M., Bohacz, J., **2020**. Zmiany aktywności amylolitycznej grzybów wyizolowanych z wybranych przypraw W: Przegląd badań prowadzonych w studenckich kołach naukowych, s. 21. Lublin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie. <https://doi.org/10.24326/srzp.2020.2>
 6. Kornilłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J., Wojdyło-Kotwica, B., Możejko, M., **2019**. Struktura taksonomiczna i przestrzenna zbiorowisk grzybów strefy korzeniowej roślin łąkowych w siedlisku pobagiennym. W: „Nauka dla zrównoważonego rozwoju i biogospodarki”- Międzynarodowa Konferencja Naukowa połączona z Jubileuszem 75-lecia Wydziału Agrobioinżynierii, s 105. Lublin, 12-13 czerwca, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.
 7. Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., Możejko, M., **2019**. Zmiany aktywności biologicznej gleby po wprowadzeniu biopreparatu pochodzenia keratynowego. W: „Mikroorganizmy w zrównoważonym rolnictwie, ochronie środowiska i procesach biotechnologicznych” - 53 Ogólnopolska Konferencja Mikrobiologiczna, s. 16. Poznań, 8-11 września.
 8. Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., Możejko, M., **2018**. Badania nad wpływem biopreparatu po grzybowym rozkładzie pierza na przyrost długości korzenia wybranych roślin testowych. W: Bioróżnorodność funkcjonalna gleb Polski: Konferencja Naukowa: Materiały konferencyjne, s. 37. Puławy, 18-19 października, Dział Upowszechniania i Wydawnictw. ISBN: 978-83-7562-293-5.
 9. Bohacz, J., Kornilłowicz-Kowalska, T., Możejko, M., **2018**. Wpływ preparatu pochodzenia mikrobiologicznego na kiełkowanie i wzrost roślin testowych. W: Bioróżnorodność funkcjonalna gleb Polski: Konferencja Naukowa: Materiały

konferencyjne, s. 38. Puławy, 18-19 października 2018, Dział Upowszechniania i Wydawnictw. ISBN: 978-83-7562-293-5.

Nagrody i wyróżnienia:

1. Pierwsze miejsce w sesji referatowej za prezentację pt. „Numbers of microorganisms in soils with different physico-chemical properties” przedstawioną podczas 1st International PhD Student’s Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: Environment - Plant - Animal - Product. Lublin, 26 kwietnia 2022.
2. Drugie miejsce w sesji referatowej za prezentację pt. “Enzymatic activity and protein-sulfur products as indicators of keratinolytic potential of *Chrysosporium tropicum* and *Trichophyton ajelloi*” przedstawioną podczas Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów. Lublin, 10 kwietnia 2021.
3. Pierwsze miejsce w sesji referatowej za prezentację pt. „Ocena aktywności keratynolitycznej grzybów wyizolowanych z kompostu na podstawie organicznych i mineralnych produktów keratynolizy” przedstawioną podczas VI Konferencja Doktorantów. Lublin, 8 kwietnia 2019.

Wnioski projektowe i udział w projektach:

1. Projekt dla młodych naukowców pt. „Badanie fitotoksyczności płynów pochodzących otrzymanych po grzybowej biodegradacji pierza oraz ich wpływu na biologiczną aktywność gleby oraz wzrost roślin” (nr projektu: RKM/MN-2/RIO/22) otrzymany w ramach konkursu na projekty dla młodych naukowców finansowanego z subwencji MNiSW (Zarządzenie Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 21 grudnia 2018 r.). Okres realizacji: 1.05.2022 r. - 31.01.2023 r. Kwota finansowania: 20 000 zł - Kierownik i główny wykonawca.
2. Zgłoszenie projektu w ramach konkursu na projekty dla młodych naukowców w ramach konkursu na projekty dla młodych naukowców finansowanego z subwencji MNiSW (Zarządzenie Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 21 grudnia 2018 r.) pt. „Badanie potencjału keratynolitycznego dermatofitów geofilnych *Trichophyton ajelloi*. Projekt nie został zakwalifikowany do finansowania.
3. Współwykonawca projektu w 2020 roku finansowanego ze środków WFOŚiGW w Lublinie, pod kierownictwem Pani dr hab. Justyny Bohacz prof. Uczelni pt. „Rozkład

odpadowego pierza na bioprodukty przez grzyby wyodrębnione z gleb z przeznaczeniem do wykorzystania rolniczego”.

4. Współtwórca z Panią dr hab. Justyną Bohacz, prof. Uczelni oraz Panią prof. dr hab. Teresą Kornilłowicz-Kowalską zgłoszenia patentowego w 2018 roku na wynalazek pt. „Preparat do użyźniania gleby i nawożenia roślin”.