

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