

Krzysztof ULFIG, Grażyna PŁAZA, Jacek WYPYCH, Krystyna ŁUKASIK,
Brygida DZIEWIĘCKA, Tadeusz MAŃKO, Józefa KRAJEWSKA,
Maciej TERAŃKOWSKI, Tomasz STASZEWSKI

Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych
40-832 Katowice, ul. Kossutha 6

BADANIA WSTĘPNE NAD USUWANIEM WĘGLOWODORÓW ROPOPOCHODNYCH PRZEZ *TRICHOPHYTON AJELLOI* SZCZEP R66 W CZASIE BIODEGRADACJI KERATYNY

Streszczenie. Zaobserwowano, że podczas biodegradacji keratyny włosów przez szczep *Trichophyton ajelloi* R66 następował wyraźny ubytek masy dodanych do pożywki węglowodorów ropopochodnych, takich jak: ropa naftowa, pristan i heksadekan. Wyniki potwierdzają istnienie procesów enzymatycznej hydrolizy keratyny, sulfitolizy i alkalizacji pożywki przez szczep R66. Wskazują również, że obecność węglowodorów w pożywce zwiększyła wydajność powyższych procesów.

A PRELIMINARY STUDY OF PETROLEUM HYDROCARBON REMOVAL BY THE STRAIN *TRICHOPHYTON AJELLOI* R66 DURING KERATIN BIODEGRADATION

Summary. Distinct mass losses of petroleum hydrocarbons such as petroleum, pristane and hexadecane, added to the medium, were observed during the biodegradation of children's hair keratin by the strain *Trichophyton ajelloi* R66. The results confirmed the processes of keratin enzymatic hydrolysis, sulfitolysis and alkalisation of the medium by this strain. The presence of petroleum hydrocarbons in the medium made these processes more efficacious.

WPROWADZENIE

W piśmiennictwie liczne są doniesienia na temat biodegradacji keratyny przez grzyby keratynolityczne, w tym na temat zastosowań tych grzybów w różnych biotechnologiach [1]. Wiadomo również, że grzyby keratynolityczne mają zdolność do rozkładu wielu innych substratów [2, 3]. Al-Musallam & Radwan [4] oraz Senapati [5] donieśli o zdolności tych grzybów do biodegradacji tłuszczów, kwasów tłuszczowych, gliceryny i cholesterolu. Nie znaleziono jednak wzmianki na temat znaczenia grzybów keratynolitycznych w usuwaniu węglowodorów ropopochodnych ze środowiska.

Badania w ramach projektu bioremediacji gleby na terenie jednej z polskich rafinerii [6] wykazały, że grzyby keratynolityczne mogą żyć w skrajnych warunkach środowiskowych. Grzyby te występowały na terenie tzw. dołów kwasowych w tej rafinerii. Doły kwasowe zawierają odpady po kwaśnej rafinacji ropy naftowej. Mimo niskiego odczynu (pH 1-4) i wysokich stężeń węglowodorów grzyby keratynolityczne w ciągu prawie 100 lat funkcjonowania dołów kwasowych potrafiły zaadaptować się do panujących tam warunków środowiskowych. Dzięki tym zdolnościom adaptacyjnym grzyby keratynolityczne występowały w tzw. bioprzyrmie, w której prowadzono intensywne procesy oczyszczania gleby z węglowodorów ropopochodnych [7]. Wyizolowane z dołów kwasowych szczepy grzybowe charakteryzują się dużą żywotnością, zmienioną morfologią, a przede wszystkim – zdolnością do usuwania węglowodorów ropopochodnych podczas rozkładu włosów. Włosy są źródłem keratyny dla tych wyspecjalizowanych w jej rozkładzie grzybów. Dotyczy to w szczególności gatunku *Trichophyton (=Keratinomyces) ajelloi* (Vanbreuseghem) Ajello. Celem pracy było określenie wydajności usuwania ropy naftowej, pristanu i heksadekanu przez szczep *T. ajelloi* R66 podczas biodegradacji keratyny włosów.

MATERIAŁ I METODYKA

W badaniach wykorzystano szczep *T. ajelloi* R66, wyizolowany zmodyfikowaną metodą przynęty włosowej [8] z gleby pobranej z dołów kwasowych na terenie rafinerii. Modyfikacja powyższej metody polegała na tym, że włosy dziecięce wyłożone na próbach gleby hodowano w ekzykatorze w oparach ropy naftowej (z dostępem powietrza), dzięki czemu izolowano szczepy zdolne do usuwania węglowodorów ropopochodnych, a jednocześnie odporne na węglowodory lotne (BTEX). Przeprowadzono trzy doświadczenia mające na celu określenie wydajności usuwania węglowodorów przez powyższy szczep podczas biodegradacji włosów.

W doświadczeniach wykorzystano pożywkę mineralną o składzie: NH_4NO_3 – 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,03 g, KH_2PO_4 – 1 g, K_2HPO_4 – 1 g, roztwór mikroelementów – 1 ml, woda redestylowana – 1000 ml. Końcowe pH pożywki wynosiło 6,8. Skład roztworu mikroelementów podaje Schlegel [9]. W pierwszym doświadczeniu do kolbek Erlenmeyera o pojemności 300 ml dodano po 55 ml pożywki mineralnej. Do części kolbek dodano również po 100 mg odtłuszczonych i drobno pociętych włosów dziecięcych, a następnie kolbki wyjałowiono w autoklawie. Po sterylizacji i schłodzeniu do temperatury pokojowej do pewnych kolbek dodano po 100 μl trzykrotnie wyjałowionej w autoklawie (w odstępach 24-godzinnych) ropy naftowej. Część kolbek zaszczepiono 200 μl zawiesiny zarodników *T. ajelloi* R66. W ten sposób uzyskano następujące kombinacje doświadczenia: kolbki zawierające pożywkę mineralną i ropę naftową (kontrola); pożywkę mineralną, ropę naftową i włosy (kontrola); pożywkę mineralną i włosy (kontrola); pożywkę mineralną, ropę naftową i zawiesinę zarodników *T. ajelloi* R66; pożywkę mineralną, włosy i zawiesinę zarodników *T. ajelloi* R66 oraz pożywkę mineralną, ropę naftową, włosy i zawiesinę zarodników *T. ajelloi* R66. Dla każdej kombinacji przygotowano 4-8 kolbek (powtórzeń). Kolbki wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 64 dni. Drugie i trzecie doświadczenie trwało odpowiednio 40 i 66 dni, a do kolbek dodano po 40 μl wyjałowionej ropy naftowej, pristanu i heksadekanu.

Zawiesinę zarodników sporządzano w następujący sposób: szczep *T. ajelloi* R66 hodowano przez 14 dni na stałej pożywce 1:10 SAB z solami mineralnymi (Takashio), z antybiotykami chloramfenikolem (100 mg/l) i aktidionem (500 mg/l) w ekzykatorze z dostępem powietrza, w oparach ropy naftowej. Centralną, obficie zarodnikującą część hodowli cięto na drobne kostki agarowe. Do uprzednio przygotowanej próbówki z 10 ml jałowej soli fizjologicznej

wprowadzano 8 takich kostek. Kostki zanurzone w soli fizjologicznej intensywnie wytrząsano na aparacie Vortex przez 1 minutę. Sporządzoną w ten sposób zawiesinę wykorzystywano do zaszczepiania badanych substratów w kolbkach Erlenmeyera.

Po upływie czasu hodowli połowę kolbek Erlenmeyera z poszczególnych kombinacji doświadczenia poddano procedurze ekstrakcji i oznaczania zawartości węglowodorów. Ropę naftową ekstrahowano czterochlorkiem węgla i oznaczano zawartość węglowodorów metodą spektrometrii w podczerwieni. Powyższe procedury opisały Łukasik i Dziewięcka [10]. Wykorzystano również metody podane przez Polską Normę PN-82/C-04565.01 [11] oraz normę EPA no. 3620 [12]. Ekstrakty w czterochlorku węgla analizowano także metodą GC/FID. W doświadczeniu z pristanem i heksadekanem stosowano ekstrakcję w izooktanie i oznaczano zawartość tych węglowodorów metodą GC/MS [13]. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono średnie wskaźniki ubytku węglowodorów w próbach (kolbkach Erlenmeyera): ubytek masy węglowodorów (UMW) i szybkość usuwania węglowodorów w ciągu doby (SUW). Drugą połowę kolbek poddano procedurze sączenia, a na sączkach - metodą grawimetryczną - oznaczano zawiesinę całkowitą, obejmującą wagę włosów, biomasy grzybowej i węglowodorów. W przesączu oznaczano odczyn (pH) - metodą potencjometryczną; zawartość białek - metodą według Lowry *et al.* [14] i zawartość siarki siarczanowej - metodą chromatografii jonowej.

WYNIKI

Wartości średnie dla dwóch doświadczeń z hodowlą szczepu *T. ajelloi* R66 na ropie naftowej i włosach zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1
Wyniki doświadczeń z hodowlą szczepu *T. ajelloi* R66 na włosach i ropie naftowej

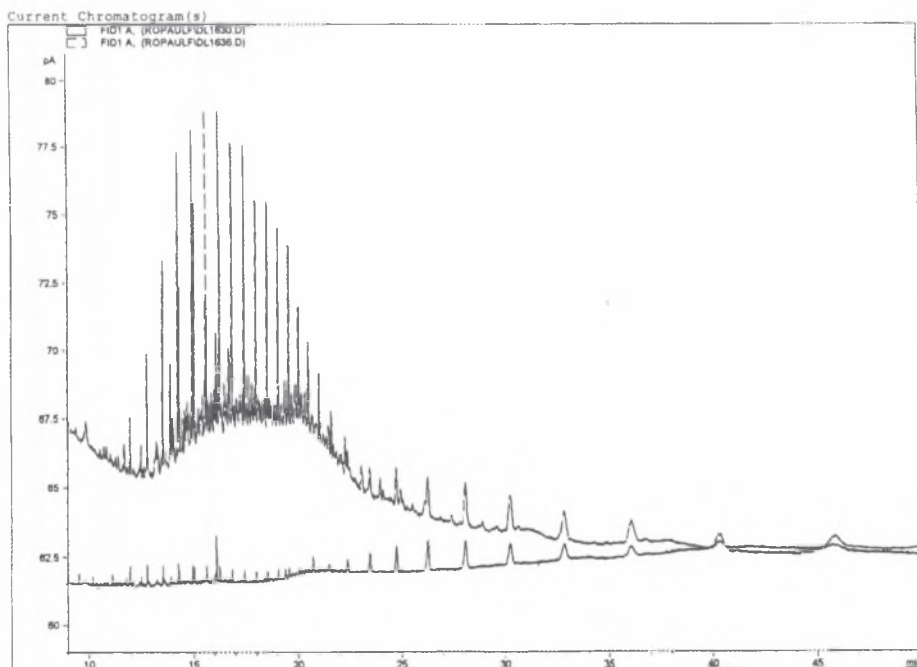
Kombinacja doświadczenia	Zawiesina (mg/próba)	Białka (mg/próba)	pH (mg/próba)	S-SO ₄ (mg/próba)	UMW (%)	SUW (mg/doba)
Włosy	97,87*	6,21	7,24	1,13	-	-
Włosy + szczep R66	59,21	19,54	7,35	1,97	-	-
Ropa naftowa	26,03	10,05	7,33	0,05	-	-
Ropa naftowa + włosy	146,51	10,08	7,12	b.w.	33,40	0,19
Ropa + szczep R66	36,24	7,40	7,34	0,07	20,76	0,09
Ropa + włosy + szczep R66	128,75	23,93	7,84	10,66	94,49	0,49

* - średnie dla dwóch doświadczeń

b.w. - brak wyniku

Zawartość zawiesiny całkowitej wahała się w granicach 26,03-146,51 mg/próba. Najniższą zawartość zawiesiny stwierdzono w kolbkach kontrolnych z ropą naftową, a najwyższą - w kolbkach kontrolnych z ropą naftową i włosami. Zawartość białek w przesączu wahała się w granicach 6,21-23,93 mg/próba, odpowiednio w kolbkach kontrolnych z włosami i w kolbkach z ropą naftową, włosami i szczepem R66. W stosunku do

kolbek kontrolnych z włosami - w kolbkach z włosami i szczepem R66 odnotowano 3,1-krotny przyrost stężenia białek w przesączu. Zawartość białek w kolbkach z ropą naftową, z ropą naftową i włosami oraz w kolbkach z ropą naftową i szczepem R66 była nieznacznie wyższa niż w kolbach kontrolnych z włosami. Zawartość białek w kolbkach z ropą naftową, włosami i szczepem R66 była 3,8-krotnie wyższa niż w kolbkach kontrolnych z włosami i 1,2-krotnie wyższa niż w kolbkach z włosami i szczepem R66. Odczyn przesączu wahał się w granicach 7,12-7,84 pH. Odczyn w kolbkach z ropą naftową, włosami i szczepem R66 był wyraźnie wyższy od odczynu w pozostałych kolbkach. Zawartość siarki siarczanowej ($S-SO_4$) w przesączu wahała się w granicach 0,05-10,66 mg/próba. Zawartość $S-SO_4$ w kolbkach z ropą naftową, włosami i szczepem R66 była wyraźnie wyższa od zawartości w pozostałych kolbkach. W stosunku do kontroli z ropą naftową ubytek masy węglowodorów (UMW) w kolbkach z ropą naftową i szczepem R66 wyniósł 20,76%, co odpowiada szybkości usuwania węglowodorów (SUW) - 0,09 mg na dobę. Wartość UMW w kolbkach z ropą naftową i włosami (bez grzyba) wynosiła 33,4%, co odpowiada wartości SUW - 0,19 mg/doba. Wartość UMW w kolbkach z ropą naftową, włosami i szczepem R66 wynosiła 94,49%, co odpowiada wartości SUW - 0,49 mg/doba. Porównanie chromatogramów GC/MS dotyczących kolbki kontrolnej z ropą naftową oraz kolbki z ropą naftową, włosami i szczepem R66 przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Chromatogramy GC/MS odnoszące się do próby z ropą naftową (górny) oraz do próby z ropą naftową i włosami zaszczerpienych szczepem *T. ajelloi* R66 (dolny)

Fig. 1. GC/MS chromatograms concerning the sample with petroleum (above) and the sample with petroleum and hair inoculated with the strain *T. ajelloi* R66 (below)

Z wyjątkiem różnic dla odczynu (pH) różnice dla pozostałych mierzonych parametrów przy $p < 0,05$ były statystycznie istotne (tzw. efekt ogólny w analizie wariancji). Najniższe współczynniki p stwierdzono dla S-SO₄ i ubytku masy węglowodorów.

Wyniki doświadczenia z hodowlą szczepu *T. ajelloi* R66 na włosach, heksadekanie i pristanie zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Wyniki doświadczenia z hodowlą szczepu *T. ajelloi* R66 na włosach, heksadekanie i pristanie

Kombinacja doświadczenia	Zawiesina (mg/próba)	Białka (mg/próba)	pH	S-SO ₄ (mg/próba)	UMW (%)	SUW (mg/doba)
Włosy	98,25	3,85	6,60	1,06	-	-
Włosy + szczep R66	88,26	4,93	6,71	0,94	-	-
Heksadekan	0,13	2,52	6,59	0,87	-	-
Heksadekan + szczep R66	0,13	2,60	6,39	0,95	6,39	0,02
Heksadekan + włosy + szczep R66	36,76	9,86	7,36	2,82	33,73	0,1
Pristan	0,12	3,91	6,39	0,92	-	-
Pristan + szczep R66	0,38	4,43	6,49	1,10	9,08	-0,02
Pristan + włosy + szczep R66	29,29	6,40	7,34	1,72	55,05	0,19

Zawartość zawiesiny całkowitej wahała się w granicach 0,12-98,25 mg/próba. Najniższą zawartość zawiesiny stwierdzono w kolbkach kontrolnych z heksadekanem i pristanem, a najwyższą – w kolbkach kontrolnych z włosami. Zawartość białek w przesączu wahała się w granicach 2,52-9,86 mg/próba, odpowiednio w kolbkach kontrolnych z heksadekanem i w kolbkach z heksadekanem, włosami i szczepem R66. W stosunku do kolbek kontrolnych z włosami - w kolbkach z włosami i szczepem R66 odnotowano 1,3-krotny przyrost stężenia białek w przesączu. Zawartość białek w kolbkach z heksadekanem, włosami i szczepem R66 była 2,6-krotnie wyższa niż w kolbkach z włosami i 2-krotnie wyższa niż w kolbkach z włosami i szczepem R66. Zawartość białek w kolbkach z pristanem, włosami i szczepem R66 była 1,7-krotnie wyższa niż w kolbkach z włosami i 1,3-krotnie wyższa niż w kolbkach z włosami i szczepem R66. Odczyn przesączu wahał się w granicach 6,39-7,36 pH. Odczyn w kolbkach z węglowodorami, włosami i szczepem R66 był wyraźnie wyższy od odczynu w pozostałych kolbkach. Zawartość siarki siarczanowej (S-SO₄) wahała się w granicach 0,87-2,82 mg/próba. Zawartość S-SO₄ w kolbkach z węglowodorami, włosami i szczepem R66 była wyższa od zawartości w pozostałych kolbkach. W stosunku do kontroli z heksadekanem wartość UMW w kolbkach z heksadekanem i szczepem R66 wynosiła 6,39%, co odpowiada wartości SUW - 0,02 mg na dobę, a w kolbkach z heksadekanem, włosami i szczepem R66 – 33,73%, co z kolei odpowiada wartości SUW – 0,1 mg/doba. Wartość UMW w kolbkach z pristanem i szczepem R66 wynosiła 9,08%, co odpowiada wartości SUW – 0,02 mg/doba,

a w kolbkach z pristanem, włosami i szczepem R66 – 55,05%, co odpowiada wartości SUW – 0,19 mg/doba.

Różnice dla wszystkich mierzonych parametrów przy $p < 0,05$ były statystycznie istotne. Najniższe współczynniki p stwierdzono dla zawiesiny i odczynu.

DYSKUSJA

W pracy zaobserwowano, że podczas biodegradacji keratyny włosów dziecięcych przez szczep *T. ajelloi* R66 następował wyraźny ubytek masy dodanych do pożywki węglowodorów ropopochodnych. Przy braku włosów w pożywce uzyskane wartości ubytku zawartości węglowodorów były niskie. Najwyższy ubytek węglowodorów stwierdzono w kolbkach z dodatkiem ropy naftowej, wyraźnie mniejszy – z dodatkiem pristanu, a najmniejszy – z dodatkiem heksadekanu, włosów i zarodników szczepu R66. Taką kolejność wartości ubytku różnych węglowodorów na obecnym etapie badań trudno jest jednoznacznie zinterpretować. Z jednej strony najwyższy ubytek węglowodorów ropy naftowej można próbować wytłumaczyć różnorodnością jej składu ilościowego i jakościowego (nawet po wyjałowieniu w autoklawie), mnogością substratów, z których pewne są łatwiej przyswajalne dla grzybów od innych. Wyniki analizy chromatogramów (rys. 1) potwierdzają tę tezę, wskazując na zróżnicowany, lecz ogólnie wyższy ubytek węglowodorów o mniejszej masie cząsteczkowej. Z drugiej jednak strony pristan (2,6,10,14-tetrametylopentadekan) jest węglowodorem rozgałęzionym i w związku z tym trudniej dostępnym dla mikroorganizmów niż prosty łańcuch heksadekanu [15]. Wyraźnie niższe współczynniki ubytku heksadekanu w stosunku do pristanu są więc trudne do wytłumaczenia.

W stosunku do kolbek z ropą naftową w kolbkach z ropą naftową i włosami zawartość węglowodorów uległa zmniejszeniu średnio o 33,4%. Wyniki wskazują więc, że pewien wpływ na wartość ubytku węglowodorów mogła mieć adsorpcja tych związków na powierzchni włosów. W kolbkach z ropą naftową, włosami i szczepem R66 uzyskano jednak aż 94,49% ubytek węglowodorów. Wiadomo, że w obecności mikroorganizmów pod wpływem naturalnych związków powierzchniowo czynnych zachodzi mobilizacja węglowodorów zaadsorbowanych na molekułach organicznych i nieorganicznych. Mobilizacja ta polega na desorpcji, emulsyfikacji i solubilizacji węglowodorów, dzięki czemu substraty te stają się na powrót dostępne dla enzymów drobnoustrojów [16]. Uzyskane wyniki zdają się potwierdzać zjawisko mobilizacji węglowodorów ropy naftowej z powierzchni włosów. Mechanizmy powyższego zjawiska wymagają jednak przebadania.

Mechanizmy biodegradacji keratyny przez grzyby keratynolityczne były przedmiotem licznych prac. Ich wyniki podsumował ostatnio Onifade *et al.* [1]. Na podstawie tych badań ustalono, że proces tzw. keratynolizy u grzybów keratynolitycznych nie polega tylko na aktywności enzymów proteolitycznych, lecz najpierw obejmuje mechaniczne rozszczępienie włókien keratynowych przez nitki grzybni oraz denaturację keratyny poprzez rozerwanie mostków dwusiarczkowych. Siarka aminokwasów cystyny i cysteiny utleniana jest do siarczynu i siarczanu. W środowisku obojętnym i zasadowym siarczyn powoduje rozerwanie cystyny na S-sulfocysteinę i cysteinę. Proces ten określany jest mianem sulfitolizy. Zdenaturowana keratyna jest podatna na hydrolizę zachodzącą przy udziale enzymów proteolitycznych grzybów. Grzyby keratynolityczne eliminują nadmiar azotu na drodze deaminacji i uwalniania amoniaku, co powoduje alkalizację pożywki, przyspiesza proces sulfitolizy i dalszą biodegradację keratyny. W stosunku do kontroli w kolbkach z włosami i szczepem R66 stwierdzono generalnie wyższą zawartość białek, siarki siarczanowej

i wyższy odczyn (pH) pożywki. Wyniki zdają się więc potwierdzać istnienie procesów proteolizy (enzymatycznej hydrolizy keratyny), sulfitolizy i alkalizacji pożywki. Wyniki dla kolbek z węglowodorami, włosami i szczepem R66 wskazują również, że obecność węglowodorów zwiększyła wydajność powyższych procesów.

Mechanizmy usuwania węglowodorów przez grzyby keratynolityczne podczas biodegradacji keratyny nie były dotąd badane. Z jednej strony można ogólnie sądzić, że keratyna jest rezerwuarem węgla i azotu, potrzebnym tym mikroorganizmom do produkcji biomasy i enzymów biorących udział w usuwaniu węglowodorów ropopochodnych. Istotną rolę może również odgrywać wysoka zawartość siarki we włosach (3,66%) – głównie w postaci aminokwasów cystyny i cysteiny. Dowiedziono bowiem, że w wyniku dekarboksylacji cysteiny tworzy się cysteamina, niezbędna do syntezy koenzymu A biorącego udział w β -oksydacji kwasów tłuszczowych. Z drugiej strony Kunert [17] podaje, że w procesie sulfitolizy bierze udział zredukowany glutation (GSH). Wiadomo, że synteza glutationu wymaga nakładu energetycznego w postaci ATP. Z kolei regeneracja utlenionego w procesie sulfitolizy glutationu (GSSG) zachodzi m.in. przy współudziale reduktazy glutationowej - enzymu wykorzystującego NADPH, jako źródło elektronów i wodoru, oraz FAD, do którego syntezy niezbędny jest również ATP [18]. Źródłem elektronów i wodoru oraz energii w procesie sulfitolizy mogą być właśnie węglowodory i ich pochodne.

Proces usuwania węglowodorów przez szczep *T. ajelloi* R66 w czasie biodegradacji keratyny jest przykładem nie badanego dotąd kometabolizmu (*sensu lato*), który może być wykorzystany w biotechnologii. Poznanie tego procesu może mieć również znaczenie z ekologicznego i zdrowotnego punktu widzenia. Wiadomo, że szczepy niektórych dermatofitów o wysokiej wirulencji charakteryzują się wyższą aktywnością keratynolityczną niż szczepy o słabszej wirulencji. W warunkach obniżonego progu odpornościowego ustroju aktywność i wirulencja tych szczepów mogą być potęgowane przez substraty obecne w skórze, np. skwalen, kwasy tłuszczowe i cholesterol oraz w niektórych kosmetykach. Usuwanie węglowodorów i substratów pochodnych przez grzyby keratynolityczne może również zachodzić w glebie bogatej w keratynę i zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi, na przykład na obszarze dużych aglomeracji miejskich oraz w odpadach zawierających zarówno węglowodory, jak i keratynę pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego, na przykład w osadach ściekowych i odpadach komunalnych. W sprzyjających warunkach rozkład ten może sprzyjać występowaniu gatunków chorobotwórczych w środowisku (dane nie opublikowane).

LITERATURA

1. Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Musallam A.A., Al-Zarban S.: *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, 1998.
2. Singh K.V., Agrawal S.C.: *Use of solid media for detection of enzymes by keratinophilic fungi and dermatophytes*. Acta Botanica Indica 10, 288-290, 1982.
3. Calvo R.M., Calvo M.A., Larrondo J.: *Enzyme activities in Chrysosporium strains*. Mycopathologia 116, 177-179, 1991.
4. Al-Musallam A.A., Radwan S.S.: *Wool-colonizing micro-organisms capable of utilizing wool-lipids and fatty acids as sole sources of carbon and energy*. J. Appl. Bacteriol. 69, 806-813, 1990.

5. Senapati V.: *Studies on nutritional pattern and growth retardation of some gymnoascaceous fungi*. Ph.D. thesis, Sambalpur Univ., Rourkela 1999.
6. Worsztynowicz A., Tien A., Rzychoń D., Ulfig K.: *Soil remediation in Czechowice S.A. refinery: biopile technology*. The First Annual Meeting of Risk Abatement Network (RANET), Contaminated Land Management in Central and Eastern Europe, Katowice 1998.
7. Ulfig K., Płaza G., Łukasik K., Krajewska J., Mańko T., Wypych J., Dziewięcka B., Worsztynowicz A.: *Selected filamentous fungi as bioindicators of leachate toxicity and bioremediation progress*. Sympozjum "Bioremediacja Gruntów", Wisła 1998.
8. Vanbreuseghem R.: *Technique biologique pour l'isolment des dermatophytes du sol*. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 32, 173, 1952.
9. Schlegel H.G.: *Mikrobiologia ogólna*. WN PWN, Warszawa 1996.
10. Łukasik K., Dziewięcka B.: *Oznaczanie związków ropopochodnych w wodzie, glebie i odpadach*. Maszynopis IETU, Katowice 1996.
11. PN-82/C-04565.01. *Badanie zawartości ropy naftowej i jej składników. Oznaczanie niepolarnych węglowodorów alifatycznych metodą spektrometrii w podczerwieni*.
12. EPA Method 3620. *Florisil Cleanup*. Cincinnati, Ohio 1992.
13. Grob R.L.: *Modern Practice of Gas Chromatography*. Third Edition, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., New York-Singapore 1995.
14. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: *Protein measurements with folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
15. Watkinson R.J., Morgan P.: *Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms*. Biodegradation 1, 79-92, 1990.
16. Aronstein B.N., Calvillo M.C., Alexander M.: *Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil*. Environ. Sci. Technol. 25, 1728-1731, 1991.
17. Kunert J.: *Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete Streptomyces fradiae and the fungus Microsporium gypseum*. J. Basic Microbiol. 29, 597-604, 1989.
18. Stryer L.: *Biochemistry*. Fourth Edition, Witt Freeman & Company, New York 1996.

Abstract

The study was to determine the efficiency of petroleum hydrocarbon removal during the biodegradation of children's hair keratin by the strain *Trichophyton ajelloi* R66. This strain was isolated from soil heavily contaminated with petroleum hydrocarbons at one of the Polish petroleum refineries. The distinct mass losses of petroleum, pristane and hexadecane were observed during the biodegradation of keratin by the strain R66. Under the absence of keratin, the strain did not decrease, or decreased to a small degree, the mass of hydrocarbons. The highest hydrocarbon mass losses were determined for petroleum followed by the mass losses for pristane and hexadecane. The mechanisms of hydrocarbon removal require thorough examination. The study confirmed the processes of proteolysis, sulfitolysis, and alkalization of the mineral medium during keratin biodegradation. The presence of hydrocarbons made the process of keratin biodegradation by the strain R66 more efficacious.