

Wioletta PRYZYTAŚ¹, Krzysztof ULFIG², Korneliusz MIKSCH¹, Izabela GRABOWSKA¹

¹ Politechnika Śląska

Katedra Biotechnologii Środowiskowej

44-101 Gliwice, ul. Akademicka 2

² Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych

40-832 Katowice, ul. Kossutha 6

WSTĘPNE BADANIA USUWANIA WĘGLOWODORÓW ROPY NAFTOWEJ PRZEZ GRZYBY KERATYNOLITYCZNE

Streszczenie. Powszechność skażenia środowiska glebowego ropą naftową skłania do poszukiwania nowych, bardziej efektywnych i tańszych metod jego remediacji. Do nich należą przede wszystkim metody biologiczne (bioremediacyjne) z wykorzystaniem naturalnej mikroflory środowiska. Większość dostępnych prac dotyczy udziału bakterii w biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w środowisku. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się jednak roli grzybów w powyższym procesie. Celem niniejszych wstępnych badań było określenie zdolności wybranych grzybów keratynolitycznych do usuwania węglowodorów ropy naftowej, jako jedynego źródła materii organicznej oraz podczas biodegradacji włosów.

A PRELIMINARY STUDY OF PETROLEUM HYDROCARBONS REMOVAL BY KERATINOLYTIC FUNGI

Summary. The widespread problem of environmental contamination with petroleum hydrocarbons implies the need to searching for new, more efficacious and inexpensive environmental remediation methods. These methods chiefly include bioremediation technologies employing natural microflora. The majority of available papers have concerned the contribution of bacteria to the biodegradation of petroleum hydrocarbons in the environment. In recent years, however, more attention has been paid for the role of fungi in the above process. This preliminary study was to determine the ability of selected keratinolytic fungi to remove petroleum hydrocarbons as a sole source of organic matter and during hair biodegradation.

WSTĘP

Powszechność wykorzystania ropy naftowej prowadzi do coraz większego zanieczyszczenia środowiska glebowego produktami ropopochodnymi. Dotyczy to głównie

okolic rafinerii, baz paliwowych i innych zakładów przemysłowych, np. koksowni. Produkty pochodzenia petrochemicznego mogą przedostawać się do gleby wraz ze ściekami, a także wraz z wodami burzowymi, spłukującymi powierzchnie dróg i ulic [1]. Poziom skażeń tymi substancjami terenów zakładów rafineryjno-petrochemicznych, miejsc stacjonowania byłych wojsk radzieckich, terenów stacji przeładunku paliw, stacji benzynowych określa się jako bardzo wysoki. Przedostawanie się węglowodorów do otwartych zbiorników wodnych, wód gruntowych, ziemi uprawnej może powodować poważne następstwa ekologiczne i zdrowotne, wynikające m.in. z toksycznego i kancerogennego działania tych substancji.

Najbardziej „ekologicznym” sposobem remediacji środowiska zanieczyszczonego związkami ropopochodnymi jest zastosowanie metod biotechnologicznych (bioremediacyjnych) [2]. Bardzo wiele mikroorganizmów ma zdolność do rozkładu węglowodorów. Zalicza się do nich bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Acinetobacter* i inne. Również wiele promieniowców bierze udział w degradacji powyższych związków [3]. Odkryto, że w procesie bioremediacji gleby zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi duże znaczenie mogą mieć grzyby. Zdolność do biodegradacji węglowodorów posiada wiele grzybów m.in. z rodzajów *Mucor*, *Penicillium*, *Graphium*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Absidia*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Scolecobasidium*, *Cunninghamella* i *Aspergillus* [4, 5]. Wśród tych grzybów spotyka się również gatunki keratynolityczne, należące do rodzajów *Chrysosporium* i *Trichophyton* [4].

Grzyby keratynolityczne to wąsko wyspecjalizowana grupa drobnoustrojów glebowych, mających zdolność do hydrolizy białka keratyny. Należą tu m. in. dermatofity geofilne, reprezentowane przez rodzaje: *Microsporium* i *Trichophyton* oraz spokrewnione z dermatofitami grzyby z rodzaju *Chrysosporium*. Grzyby keratynolityczne występują przede wszystkim w glebach bogatych w materię organiczną i odpady keratynowe, czyli włosy, paznokcie, fragmenty naskórka itd. W szczególnej obfitości grzyby te spotyka się w ogrodach, przy drogach, na osiedlach mieszkaniowych, farmach, w pobliżu nor zwierząt dzikich i gospodarskich oraz w odpadach komunalnych, osadach ściekowych i osadach dennych zanieczyszczonych ściekami wód powierzchniowych [6].

Izolowanie grzybów keratynolitycznych z siedlisk zanieczyszczonych ropą naftową [4] oraz wyniki pracy Ulfiga i wsp. [7], dotyczącej usuwania węglowodorów przez szczep *Trichophyton ajelloi* R66 podczas biodegradacji keratyny, skłoniły nas do podjęcia niniejszych badań. Ich celem było określenie zdolności innych gatunków i szczepów keratynolitycznych, wyizolowanych z siedlisk zanieczyszczonych, do usuwania węglowodorów ropy naftowej, jako jedyne źródła materii organicznej oraz podczas biodegradacji włosów dziecięcych, jako źródła keratyny.

MATERIAŁY I METODY

Badania prowadzono na 8 szczepach grzybów keratynolitycznych należących do 4 gatunków (badano po dwa szczepy z każdego gatunku), wyizolowanych z gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi i z osadów ściekowych. Były to: PS 15 *Chrysosporium keratinophilum*, PS 14 *Chrysosporium keratinophilum*, PS 25 *Chrysosporium anamorf Aphanoascus reticulisporus*, PS 22 *Trichophyton terrestre*, PS 26 *Chrysosporium anamorf Aphanoascus reticulisporus*, PS 27 *Trichophyton terrestre*, PS 10 *Microsporium gypseum* i PS 4 *Microsporium gypseum*.

W badaniach usuwania węglowodorów ropy naftowej przez grzyby keratynolityczne podczas biodegradacji keratyny wykorzystano płynną pożywkę mineralną o składzie: NH_4NO_3 - 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,02 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 g; K_2HPO_4 - 1g; KH_2PO_4 - 1g i woda redestylowana - 1000 ml. Końcowe pH pożywki wynosiło 6,8. Doświadczenie przeprowadzono w kolbach Erlenmeyera o pojemności 300 ml. Do wszystkich kolb wprowadzono po 50 ml pożywki mineralnej. Do części kolb dodano po 20 μl (22,8 mg) wyjałowionej w autoklawie ropy naftowej, po 50 mg drobno pociętych (na fragmenty o długości 5 mm) i wyjałowionych włosów dziecięcych i po 100 μl jednorodnej zawiesiny zarodników badanych szczepów [7]. W ten sposób uzyskano następujące kombinacje doświadczenia: kolby z ropą naftową (kontrola), kolby z włosami (kontrola), kolby z ropą naftową i zarodnikami grzybów oraz kolby z ropą naftową, włosami i zarodnikami grzybów. Poszczególne kombinacje doświadczenia wykonano w 2 powtórzeniach. Kolby umieszczono na wstrząsarkach i prowadzono hodowlę w ciemności w temperaturze pokojowej przez 48 dni. Po tym czasie w kolbach wykonano oznaczenia sumy niepolarnych węglowodorów alifatycznych TPH (IR) oraz sumy niepolarnych węglowodorów alifatycznych i polarnych związków organicznych TPOC (IR) - metodą spektrometrii w podczerwieni IR, jak również sumy wszystkich węglowodorów i ich pochodnych TPOC (GC/MS) - metodą chromatografii gazowej GC/MS. Oprócz zawartości węglowodorów oznaczono: zawartość suchej masy - metodą grawimetryczną, pH - metodą potencjometryczną, zawartość białek - metodą Lowry'ego [8], związków tiolowych - metodą Saville'a [9], siarki siarczanowej - metodą chromatografii jonowej oraz azotu amonowego - metodą Nesslerera [8].

Analizę statystyczną wyników wykonano przy użyciu programu Statistica w środowisku Windows.

WYNIKI

Wyniki odnoszące się do ubytku masy węglowodorów, oznaczanych metodami IR i GC/MS, przedstawiono w tab. 1. Symbole R i W oznaczają kombinacje doświadczenia odpowiednio z ropą naftową i włosami. W stosunku do kolb kontrolnych zawierających ropę naftową - w kolbach z ropą naftową i grzybami keratynolitycznymi oraz w kolbach z ropą naftową, włosami i grzybami ubytek sumy niepolarnych węglowodorów alifatycznych TPH (IR) wahał się odpowiednio w granicach 11,4-25,5% oraz 4,3-45,4%, przy zbliżonych średnich 19,0 i 18,6%. Wartości minimalne i maksymalne oraz średnie dla TPOC (IR) wynosiły odpowiednio 11,7-22,1%, 4,0-45,5%, 17,1 i 17,1%. Wartości minimalne i maksymalne oraz średnie dla TPOC (GC/MS) wynosiły odpowiednio -23,6-29,4%, -22,9-38,9%, 8,3 i 13,6%. Wartości ujemne TPOC (GC/MS) świadczą o przyroście masy węglowodorów w kolbach w toku hodowli. Jedynie w przypadku szczepu *Trichophyton terrestre* PS22 odnotowano znacznie wyższe wartości ubytku masy węglowodorów w kolbach z ropą naftową, włosami i grzybem niż w kolbach z ropą naftową i grzybem. Dla pozostałych szczepów powyższe różnice były znacznie mniejsze.

Wyniki oznaczeń pozostałych parametrów zestawiono w tab. 2. Duże znaczenie w interpretacji wyników mają średnie dla poszczególnych kombinacji doświadczenia (tab. 3). Pomiedzy kombinacjami z ropą naftową (kontrola), włosami (kontrola) i ropą naftową z grzybem (G) nie stwierdzono istotnych różnic w średnich dla odczynu (pH), zawartości N- NH_4 , białek i S- SO_4 . Średnia zawartość związków tiolowych była nadspodziewanie wysoka w kolbach kontrolnych z włosami. W omawianych kombinacjach doświadczenia średnia

wartość suchej masy była najwyższa w kontroli z włosami, a najniższa w kontroli z ropą naftową. Z wyjątkiem suchej masy zdecydowanie najwyższe średnie wartości oznaczanych parametrów odnotowano dla kombinacji z ropą naftową, włosami i grzybem. Średnia wartość suchej masy dla tej kombinacji była o 23,75 mg niższa od sumy średnich dla kombinacji kontrolnych.

W badaniach nie stwierdzono korelacji pomiędzy parametrami z tab. 2 a wskaźnikami ubytku masy węglowodorów ropy naftowej (tab. 1). Korelacje odnotowano jednak pomiędzy parametrami z tab. 2. Odczyn (pH) był skorelowany z zawartością N-NH₄ ($r=0,95$), białek (0,91) i S-SO₄ (0,80). Zawartość N-NH₄ była skorelowana z zawartością białek (0,89) i S-SO₄ (0,68). Z kolei zawartość białek była skorelowana z zawartością S-SO₄ (0,79), a zawartość związków tiolowych z suchą masą (0,72).

Tabela 1

Wyniki oznaczeń ubytku masy węglowodorów

Szczep	Kombinacja	Ubytek masy węglowodorów (%)		
		TPH (IR)	TPOC (GC/MS)	TPOC (IR)
PS15	R	22,1	20,4	24,0
PS15	R+W	24,5	37,5	28,0
PS14	R	19,1	29,4	21,2
PS14	R+W	18,0	11,4	19,4
PS25	R	16,3	5,1	22,1
PS25	R+W	4,0	-22,9	4,3
PS22	R	13,5	11,9	14,1
PS22	R+W	45,5	38,9	45,4
PS26	R	20,1	14,0	21,0
PS26	R+W	6,5	14,8	9,4
PS27	R	12,9	5,1	12,6
PS27	R+W	9,9	1,8	12,1
PS10	R	21,0	3,9	25,5
PS10	R+W	9,8	5,0	11,0
PS4	R	11,7	-23,6	11,4
PS4	R+W	18,6	22,2	19,6

Tabela 2

Wyniki oznaczeń innych parametrów fizykochemicznych

Szczep	Kombinacja	Wyniki oznaczeń					
		pH	N-NH ₄	Białka	Zw. tiolowe	S-SO ₄	Sucha masa
		-	[mg/próba]	[mg/próba]	[μg/próba]	[mg/próba]	[mg/próba]
Kontrola	R	6,82	0,17	0,00	0,00	4,22	8,0
	W	6,83	0,17	0,00	0,44	4,27	50,0
PS15	R	6,85	0,16	0,00	0,00	3,92	14,0
	R+W	7,30	0,26	6,81	0,63	5,97	39,0
PS14	R	6,66	0,15	0,00	0,00	4,14	9,0
	R+W	7,16	0,26	5,51	0,46	5,71	34,0
PS25	R	6,80	0,17	0,18	0,00	4,35	20,0
	R+W	7,00	0,20	2,74	2,01	3,94	45,0
PS26	R	6,65	0,15	0,94	0,00	4,02	10,0
	R+W	7,38	0,27	6,56	0,76	7,69	28,0
PS22	R	6,86	0,20	0,02	0,00	3,71	13,0
	R+W	7,12	0,24	4,62	0,42	5,16	39,0
PS27	R	6,84	0,17	0,07	0,00	3,86	14,0
	R+W	6,89	0,19	5,58	1,81	4,53	40,0
PS10	R	6,83	0,17	0,00	0,00	3,29	9,0
	R+W	7,43	0,27	9,83	0,87	7,15	22,0
PS4	R	6,86	0,17	0,00	0,00	4,04	15,0
	R+W	7,41	0,34	8,44	0,89	4,61	27,0

Tabela 3

Średnie wartości dla innych oznaczeń fizyczno-chemicznych

Kombinacja	pH	N-NH ₄	Białka	Zw. tiolowe	S-SO ₄	Sucha masa
	-	[mg/próba]	[mg/próba]	[μg/próba]	[mg/próba]	[mg/próba]
R (K)	6,82	0,17	0,00	0,00	4,22	8,00
W (K)	6,83	0,17	0,00	0,44	4,27	50,00
R (G)	6,79	0,17	0,15	0,00	3,92	13,00
R+W (G)	7,21	0,25	6,26	0,98	5,60	34,25

R (K) – kontrola z ropą naftową

W (K) – kontrola z włosami

R (G) – kombinacja z ropą naftową i grzybami

R+W (G) – kombinacja z ropą naftową, włosami i grzybami

DYSKUSJA

W badaniach Ulfiga i wsp. [7], odnoszących się do usuwania ropy naftowej przez szczep *Trichophyton ajelloi* R66 podczas biodegradacji włosów, średnia wartość ubytku węglowodorów TPH (IR) w kolbach z ropą naftową i grzybem wynosiła 33,4%. W kolbach z ropą naftową, włosami i grzybem wartość ubytku tych związków była znacznie wyższa i wynosiła 94,5%. W naszym doświadczeniu średni ubytek TPH (IR) w kolbach z ropą naftową i grzybami był wyraźnie mniejszy i wynosił 19,0%. W kolbach z ropą naftową, włosami i grzybami średnia wartość ubytku była zbliżona i wynosiła 18,6%. W obydwu pracach stwierdzono jednak wyższą zawartość białek, siarki siarczanowej i wyższy odczyn (pH) w kolbkach z ropą naftową, włosami i grzybami.

Z jednej strony porównane wyniki potwierdzają istnienie procesów proteolizy, sulfitolizy, amonifikacji i alkalizacji pożywki, zachodzących podczas biodegradacji keratyny włosów dziecięcych przez grzyby keratynolityczne [10]. Wskazują również na to, że obecność węglowodorów czyni powyższe procesy znacznie wydajniejszymi. W naszym doświadczeniu rozkład włosów, jako jedyne źródła materii organicznej, był słaby. Dopiero dodatek ropy naftowej spowodował znaczną intensyfikację powyższego procesu. Z drugiej strony wyniki wskazują na silnie zróżnicowaną zdolność poszczególnych gatunków i szczepów grzybów keratynolitycznych do usuwania węglowodorów ropy naftowej, jako jedyne substratu organicznego oraz podczas biodegradacji włosów. Szczep *Trichophyton ajelloi* R66 wyizolowano z gleby na terenie rafinerii. W glebie tej zachodziły intensywne i długotrwałe procesy rozkładu węglowodorów ropopochodnych. Szczepy wykorzystane w naszym doświadczeniu wyizolowano natomiast z gleb i osadów ściekowych o mniejszym stopniu zanieczyszczenia węglowodorami. Wśród tych szczepów tylko w przypadku *Trichophyton terrestre* PS22 wykazano istotną różnicę pomiędzy ubytkami węglowodorów w kolbach bez włosów i z włosami. Na podstawie porównywanych wyników można więc zaryzykować hipotezę, że zróżnicowana zdolność grzybów keratynolitycznych do usuwania węglowodorów wynika ze stopnia ich zaadaptowania do warunków środowiskowych, w szczególności do poziomu skażenia środowiska węglowodorami ropopochodnymi.

Pewien wpływ na wartość ubytku węglowodorów mogła mieć również adsorpcja tych związków na powierzchni włosów. Wiadomo, że w obecności mikroorganizmów pod wpływem naturalnych związków powierzchniowo czynnych zachodzi mobilizacja węglowodorów zaadsorbowanych na molekułach organicznych i nieorganicznych. polegająca na desorpcji, emulsyfikacji i solubilizacji węglowodorów. W ten sposób substraty te stają się na powrót dostępne dla enzymów drobnoustrojów [11]. Mechanizmy powyższego zjawiska wymagają jednak gruntownego przebadania.

W przeciwieństwie do mechanizmów biodegradacji keratyny przez grzyby keratynolityczne [10], mechanizmy rozkładu węglowodorów przez powyższe drobnoustroje nie były dotąd dokładnie badane. Z ekologicznego, biochemicznego i biotechnologicznego punktu widzenia szczególnie zainteresowanie budzi zjawisko utylizacji węglowodorów przez grzyby keratynolityczne podczas biodegradacji keratyny. McGugan i wsp. [4] wykazali na przykład, że grzyby z rodzaju *Trichophyton* i *Chrysosporium* były w stanie w ciągu 30 dni usunąć około 50% węglowodorów. Wyniki wskazują więc na istotną rolę grzybów keratynolitycznych w procesie usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych z siedlisk bogatych w odpady keratynowe oraz uzasadniają potrzebę dalszych badań.

LITERATURA

1. Gierak A.: Zagrożenie środowiska produktami ropopochodnymi, *Ochrona Środowiska* 2(57), 1995.
2. Galas E., Kwapisz E.: Biodegradacja węglowodorów ropy naftowej, II Ogólnopolskie Sympozjum - Biotechnologia w Uczelniach Technicznych, Warszawa 1997.
3. Łebkowska M.: Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów naftowych w środowisku glebowym, *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 3, 1996.
4. McGugan B. R., Lees Z. M., Senior E.: Bioremediation of an oil-contaminated soil by fungal intervention, *Bioremediation* 3 (3), 1995.
5. Nyns E. J., Auquirere J. P., Wiaux A. L.: Taxonomic value of the property of fungi to assimilate hydrocarbons, *Antonie van Leeuwenhoek* 34, 1968.
6. Ulfig K.: Grzyby keratynofilne w środowisku, *Wiadomości Botaniczne* 34(4), 1990.
7. Ulfig K., Płaza G., Wypych J., Łukasik K., Dziewięcka B., Manko T., Krajewska J., Terakowski M., Staszewski T.: Badania wstępne nad usuwaniem węglowodorów przez *Trichophyton ajelloi* szczep R66 w czasie biodegradacji keratyny, *Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej*, 2000 (w druku).
8. Skrypt Uczelniany: *Laboratorium podstaw biochemii technicznej*. Dział Wydawnictw Politechniki Śląskiej, Gliwice 1980.
9. Saville B.: A Scheme for the Calorimetric Determination of Microgram Amounts of Thiols, *Analyst* 83, 1958.
10. Kunert J.: Physiology of keratinophilic fungi, W: *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*, Eds. R.K.S. Kushwaha i J. Guarro, *Revista Iberoamericana de Micologia*, supplement, 2000.
11. 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, 1991.

Abstract

Keratinolytic fungi are a group of microorganisms specialized in biodegradation of keratin remains in the environment. A preliminary experiment was conducted to determine the abilities of selected keratinolytic fungal species (*Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium* anamorph of *Aphanoascus reticulisporus*, *Trichophyton terrestre*, *Microsporium gypseum*) to remove petroleum as a sole source of organic matter and during hair biodegradation. The results confirmed the processes of proteolysis, sulfitolysis, amination and medium alkalization that take place during the hair biodegradation by keratinolytic fungi. The results also indicated that the presence of hydrocarbons makes the above processes much more efficacious. The mean mass losses of hydrocarbons without and with hair biodegradation were similar (ca. 19%). In the case of the strain *T. terrestre* PS22 only, a distinct increase of the hydrocarbon mass loss up to 45% was observed during hair biodegradation. It has been hypothesized that the differentiated capabilities of keratinolytic fungi to remove petroleum can result from the degree of adaptation of these microorganisms to environmental conditions and to the level of environmental contamination with hydrocarbons in particular.

Recenzent: Prof. dr hab. Barbara Maliszewska-Kordybach