

1. Wstęp. 2. Naturalne i antropogeniczne źródła krezoli w środowisku. 3. Toksyczność krezoli. 4. Drobnoustroje uczestniczące w rozkładzie krezoli. 5. Tlenowy katabolizm krezoli. 6. Beztlenowy katabolizm krezoli. 7. Mikrobiologiczna degradacja krezoli w środowisku glebowym. 8. Podsumowanie

Cresols and the microorganisms of the soil environment

Abstract: Phenolic compounds, including cresols, in the soil environment are a result of natural processes such as: biodegradation of lignins and tannins, and anthropogenic activity. Cresols are present in disinfectants as well as in the wastewater from chemical, petrochemical, pharmaceutical, paper and textile industry. They are also used in the production of insecticides, herbicides, medicines and antioxidants and have been classified as hazardous substances. Exposure of microorganisms to cresols can bring about changes in the structure of their cell membranes, resulting in their growth inhibition and cell lysis. However, there is still an untapped bioremediation potential in microorganisms, which are able to participate in the catabolism of cresols, both under aerobic and anaerobic conditions. The typical strategies of the aerobic degradation of cresols include the use of monooxygenase and dioxygenase enzymes. Thanks to these enzymes, atoms of molecular oxygen initiate fission of the aromatic ring structure. Under anaerobic conditions, the mechanisms of cresol decomposition currently focus on the addition of fumarate, hydroxylation or carboxylation. The effectiveness of microorganisms in the degradation of cresols is not only due to their occurrence in consortia. They are also effective as single strains. The only controversial aspect involves using genetically modified organisms (GMOs) or their genes in the bioaugmentation process. This is because they are strictly selected and target only specific substrates. Due to this, they do not compete with autochthonous microorganisms undergoing natural selection.

1. Introduction. 2. Natural and anthropogenic sources of cresols in the environment. 3. Toxicity of cresols. 4. The microorganisms participating in the distribution of cresols. 5. Aerobic catabolism of cresols. 6. Anaerobic catabolism of cresols. 7. Microbial degradation of cresols in the soil environment. 8. Summary

Słowa kluczowe: biodegradacja, gleba, katabolizm, krezole, mikroorganizmy

Key words: biodegradation, soil, catabolism, cresols, microorganisms

1. Wstęp

Krezol (C_7H_8O) jest to organiczny związek chemiczny z grupy fenoli o masie cząsteczkowej 108,14 mg mol⁻¹. Jest hydroksylową pochodną toluenu lub metylową pochodną fenolu. Występuje w postaci trzech izomerów strukturalnych różniących się nieznacznie strukturą chemiczną: 2-metylofenol (*o*-krezol), 3-metylofenol (*m*-krezol) i 4-metylofenol (*p*-krezol) [68, 94, 95]. Ich ogólną charakterystykę i wybrane właściwości fizykochemiczne podano w tabeli I.

2. Antropogeniczne i naturalne źródła krezoli w środowisku

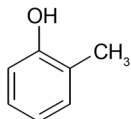
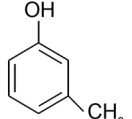
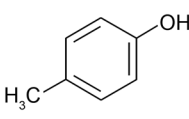
W środowisku naturalnym krezole, podobnie jak inne związki fenolowe powstają w procesie biodegradacji polimerów takich jak ligniny i taniny [45]. Są również składnikami barwników kwiatów i owoców. Wchodzą w skład wydzielin korzeniowych roślin, jako kwasy hydroksybenzoesowe (galusowy, protokatechowy, syringinowy i wanilinowy) oraz kwasy hydroksycynamonowe (*p*-kumarowy, ferulowy, kwas kofeinowy) [15, 93]. Wśród związków fenolowych

roślinnych wyróżnia się również alkohole cynamyłowe (gwajakol, syringol, alkohol koniferyłowy) i flawonoidy (katechiny i epikatechiny). Są one odpowiedzialne za pigmentację, wzrost i rozmnażanie roślin, a także odporność na patogeny i drapieżniki. Naturalnym źródłem prostych związków fenolowych, w tym krezoli, są warzywa, zboża, rośliny strączkowe, owoce, orzechy oraz produkty roślinne takie jak: wino, cydr, piwo, herbata i kakao [15]. Ich obecność w ekosystemach związana jest również ściśle z negatywnymi skutkami działalności antropogenicznej. Do 2005 r. Europa Zachodnia wiodła prym w wykorzystaniu *o*-krezolu. Przypuszcza się, że w środkach dezynfekujących, czyszczących i klejach wykorzystano rocznie 550 Mg tego ksenobiotyku [69]. Światowa produkcja *m*-krezolu wynosiła około 28.500 Mg, *p*-krezolu – 59.500 Mg, a mieszaniny tych dwóch izomerów – 128.000 Mg. Zdecydowana większość krezoli wykorzystywana jest w półproduktach, a bezpośrednio ich zastosowanie stanowi zaledwie około 1% produkcji światowej [68].

Spośród najstarszych metod otrzymywania krezoli na uwagę zasługuje kraking benzyny ciężkiej oraz destylacja frakcjonowana smoły węglowej będącej produktem suchej destylacji węgla kamiennego [60, 95]. *o*-krezol

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Plac Łódzki 3, 10-727 Olsztyn; tel. 89 5233589; e-mail: m.zaborowska@uwm.edu.pl

Tabela I
Ogólna charakterystyka i wybrane właściwości fizykochemiczne krezolu

Analizowane dane	<i>o</i> -krezol	<i>m</i> -krezol	<i>p</i> -krezol	Mieszanka <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> - krezolu
Wzór strukturalny				
Nazwa CAS	2-methylphenol	3-methylphenol	4-methylphenol	methylphenol
Numer CAS	95-48-7	108-39-4	106-44-5	1319-77-3
Synonimy	2-hydroksytoluen, kwas <i>o</i> -krezolowy	3-hydroksytoluen, kwas <i>m</i> -krezolowy	4-hydroksytoluen, kwas <i>p</i> -krezolowy	hydroksytoluen, kwas krezolowy
Temp. topnienia (°C)	30,94	12,22	34,74	11 ÷ 35
Temp. wrzenia (1013 hPa) (°C)	191	202,2	201,9	191 ÷ 203
Ciężar właściwy (w temp. 20°C)	1,0273 g cm ⁻³	1,0336 g cm ⁻³	1,0336 g cm ⁻³	1,0336 g cm ⁻³
Rozpuszczalność w wodzie	25,95 g dm ⁻³	22,7 g dm ⁻³	21,52 g dm ⁻³	brak danych
Postać	białe kryształy	żółta lub bezbarwna ciecz	ciało stałe	Bezbarwna, żółta lub różowa ciecz

otrzymywany jest obecnie z 2,6-ksylenolu na drodze alkirowania metanolem fenolu w fazie gazowej, w obecności MgO jako katalizatora. Temperatura tego procesu waha się pomiędzy 673 a 773K [29]. Alkaliczna hydroлиза chlorotoluenu bądź rozszczepienie wodoronadtlenku cymenu skutkuje uzyskaniem mieszaniny krezoli o dużej zawartości *m*-krezolu. Z kolei *p*-krezol powstaje w procesie sulfonowania toluenu kwasem siarkowym, zgodnie z mechanizmem substytucji elektrofilowej [82]

Krezole są uwalniane ze ściekami z zakładów przemysłu chemicznego, petrochemicznego, farmaceutycznego, papierniczego i tekstylnego [4, 60]. W ściekach z procesu konwersji węgla w piecach koksowniczych 60% zanieczyszczeń stanowią fenole, a 30% krezole [101]. Z płynnymi odpadami z pirolizy węgla w 1 dm³ wprowadzane jest do wód 10 g fenolu, katecholu, rezorcyny, ksyleny, pirogalolu oraz *o*-, *m*-, *p*-krezolu [27].

Metylofenole w pozycji *orto*-, *para*-, i *meta*- są stosowane powszechnie do syntezy leków, herbicydów, przeciwutleniaczy i barwników [82]. 4,6-dinitro-*o*-krezol (DNOC) posiada działanie owadobójcze, grzybobójcze i chwastobójcze. Do 2000 r. był on wykorzystany jako selektywny herbicyd w uprawie zbóż, chmielu, winorośli i owoców [26]. 4-chloro-*o*-krezol (PCPOC) jest materiałem wyjściowym dla ważnych selektywnych herbicydów. *p*-krezol w postaci 2,6-di-tetra-butyl-*p*-krezolu, znany jest jako butylowany hydroksytoluen (BHT) do wytwarzania żywic fenolowych, przeciwutleniaczy oraz inhibitorów polimeryzacji. Jest również stosowany do produkcji *p*-hydroksybenzoniuryli (*p*-HBN), ważnego związku stosowanego podczas zabiegów agrochemicznych [53], natomiast *o*-krezol do wytwarzania żywic epoksydowych, stosowanych jako materiał uszczelniający do układów scalonych (chipów) [21, 85]. Z *m*-krezolu jako surowca produkowane są pyretroidy,

insektycydy trzeciej generacji [83]. Olej krezotowy, produkt uboczny destylacji smoły węglowej zawiera 45% fenoli, w tym fenoli i krezoli [76].

3. Toksyczność krezoli

Ze względu na ich potencjalne skutki toksyczne, mutagenne, rakotwórcze i teratogenne, krezole sklasyfikowano jako priorytetowe substancje niebezpieczne [67]. Uwzględniając stopień szkodliwości można uszeregować je następująco: 4,6-dinitro-*o*-krezol > *p*-krezol > *o*-krezol > krezole [6]. Według Starka [94] krezole są substancjami toksycznymi i żrącymi. Wywierają negatywny wpływ na ośrodkowy układ nerwowy, układ oddechowy, skórę wątrobę oraz nerki. Co istotne, destabilizują rozrodzność w modelu wielopokoleniowym i są promotorami procesu nowotworowego. *p*-krezol został przypisany przez US Environmental Protection Agency (EPA) do zanieczyszczeń z Grupy C, skupiającej związki o możliwym działaniu rakotwórczym dla człowieka [1]. Niemniej jednak Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) nie zakwalifikowała krezoli do puli związków kancerogennych [6]. Obwarowane prawnie są również dopuszczalne stężenia krezoli (mg kg⁻¹ s.m.) w glebie. W zależności od głębokości, wynoszą one odpowiednio: 0,1 mg (0–0,3 m), 0,5–20 mg (0,3–15 m), 3–40 mg (> 15 m). Dotyczy to gruntów zaliczonych do użytków rolnych, z wyłączeniem gruntów pod stawami i gruntów pod rowami, gruntów leśnych oraz zadrzewionych i zakrzewionych, nieużytków, a także gruntów zabudowanych i zurbanizowanych. W glebie z terenów przemysłowych, użytków kopalnych oraz terenów komunikacyjnych te wytyczne kształtują się następująco: 50 mg – (0–2 m), 3–100 mg (2–15 m) [24]. Z racji

tego, że głównym źródłem krezoli są ścieki z różnych gałęzi przemysłu również w nich należy monitorować zawartość fenoli. Indeks fenolowy dotyczący wszystkich ich rodzajów wprowadzanych do wód wynosi obecnie $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$ [23]. Szczególnym zagrożeniem dla wód są chlorowane pochodne fenolu – chlorometylofenole, stosowane szeroko w produkcji barwników, leków i środków ochrony roślin [3]. Z kolei wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia krezoli – mieszaniny izomerów w powietrzu, w miejscu pracy wynosi 22 mg m^{-3} [22].

Toksyczność tej grupy fenoli jest związana z dwoma procesami: toksycznością nieokreśloną związaną z hydrofobowością pojedynczego związku i tworzeniem się wolnych rodników [61]. Na skutek działania peroksydaz i prostaglandyn tworzą się m.in. rodniki fenoksylowe wchodzące w interakcje z biocząsteczkami w komórce. Fenole wykorzystujące większą reaktywność prowokują peroksydację lipidów błony komórkowej. Z kolei te charakteryzujące się niższą reaktywnością są odpowiedzialne za uszkodzenia retikulum endoplazmatycznego, mitochondriów oraz jądra, a w nim enzymów i kwasów nukleinowych [33]. Bardziej efektywna penetracja błony komórkowej przez związki fenolowe jest również wynikiem spadku wartości pKa (gdzie Ka jest stałą dysocjacji związku) oraz wzrostu wartości logP (gdzie P jest współczynnikiem podziału danego związku w układzie oktanol – woda z kwasów niezdysocjowanych) i hydrofobowości tych ksenobiotyków [62]. Według Sikkema i wsp. [91] w przypadku drobnoustrojów istotne jest również aktualne stężenie tych związków w błonie cytoplazmatycznej i ich oddziaływanie z jej składnikami. Ekspozycja drobnoustrojów na działanie toksycznych związków aromatycznych, w tym krezoli, prowadzi do zmian właściwości błony komórkowej, jej struktury, a przede wszystkim składu fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs) [47], identyfikowanych w błonie jako acylowe składniki fosfolipidów, glikolipidów i glikofosfolipidów [40]. Dzięki dużemu powinowactwu tych ksenobiotyków do błony komórkowej następuje ograniczenie interakcji między łańcuchami kwasów tłuszczowych, czego skutkiem jest zahamowanie oddychania i wzrostu drobnoustrojów. Najmniej oczekiwanym następstwem może być także liza komórek [20, 35]. Toksyczność metylofenoli obrazuje wartość EC_{30} dla *Pseudomonas putida* w odniesieniu do *m*-krezolu, która po 16 h ekspozycji wynosiła 53 mg dm^{-3} [68].

4. Drobnoustroje uczestniczące w rozkładzie krezoli

Drobnoustroje indukujące rozkład krezoli są szeroko rozpowszechnione w środowisku (Tab. II, III, IV) [52]. Wykorzystanie bogactwa potencjału bioremediacyjnego mikroorganizmów w integracji z podstawami genetyki, uwzględniającymi wysoką przepustowość na poziomie genomu, daje nadzieję na powstanie nowych

metod biotechnologicznych. Geny kodujące enzymy odpowiedzialne za katabolizm krezoli ewaluowały wśród wielu szczepów bakteryjnych w wyniku zanieczyszczenia środowiska tymi ksenobiotykami. Informacja genetyczna o syntezie enzymów zaangażowanych w rozkład pierścienia aromatycznego może być zlokalizowana w chromosomach bakteryjnych oraz w plazmidach degradacyjnych. Procedura sekwencjonowania genomów bakteryjnych dostarcza ogromniej ilości danych na temat działania genów. Na szczególną uwagę

Tabela II
Drobnoustroje tlenowe uczestniczące w rozkładzie krezoli

Drobnoustroje tlenowe	Piśmiennictwo
1. <i>Comamonas testosteroni</i> E23	[106]
2. <i>Pseudomonas putida</i> F1-Te	[89]
3. <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1-Km	[38, 100]
4. <i>Pseudomonas putida</i> NCIMB9869	[49]
5. <i>Pseudomonas</i> sp. B13	[38, 100]
6. <i>Pseudomonas</i> sp. CF600	[38, 100]
7. <i>Rhodococcus erythropolis</i> UVP-1	[81]
8. <i>Rhodococcus erythropolis</i> M1	[28]
9. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCIMB 8250	[65, 102]
10. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> NCIMB 9867	[49, 102]
11. <i>Cupriavidus necator</i> JMP134	[71]
12. <i>Citrobacter farmeri</i> SC01	[77]
13. <i>Ewingella americana</i>	[48]
14. <i>Serratia plymuthica</i> GC	[74]
15. <i>Burkholderia</i> sp.	[65]
16. <i>Ralstonia</i> sp.	[65]
17. <i>Pseudomonas stutzeri</i> 0X1	[16]
18. <i>Pseudomonas</i> sp. HH35	[87]
19. <i>Sphingomonas xenophaga</i> BN6	[78]
20. <i>Pseudomonas mendocina</i> PC1	[34]
21. <i>Pseudomonas fluorescens</i> P1, PC18, PC20	[34]
22. <i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	[105]

Tabela III
Grzyby uczestniczące w rozkładzie krezoli

Grzyby	Piśmiennictwo
1. <i>Candida tropicalis</i>	[43]
2. <i>Trichosporon montevidense</i> PHE1	[39]
3. <i>Trichosporon cutaneum</i> R57	[2]
4. <i>Aspergillus</i> sp.	[5]
5. <i>Cladosporium</i> sp.	[5]
6. <i>Fusarium</i> sp.	[5]
7. <i>Monicillium</i> sp.	[5]
8. <i>Trichoderma</i> sp.	[5]
9. <i>Penicillium</i> sp.	[5]
10. <i>Pleurotus</i> sp.	[5]
11. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	[5, 45, 94]

Tabela IV
Drobnoustroje beztlenowe uczestniczące w rozkładzie krezoli

Drobnoustroje beztlenowe	Piśmiennictwo
1. <i>Desulfobacterium phenolicum</i>	[7]
2. <i>Desulfobacterium cetonicum</i>	[64]
3. <i>Magnetospirillum</i> sp.	[86, 90]
4. <i>Thauera aromatica</i>	[86, 90]
5. <i>Azoarcus buckelli</i>	[86, 90]
6. <i>Desulfosarcina cetonica</i> DSM 7267	[58]
7. <i>Geobacter metallireducens</i>	[58]
8. <i>Desulfobacula toluolica</i>	[75]
9. <i>Paracoccus</i> sp.	[80]

Tabela V
Drobnoustroje uczestniczące w beztlenowym rozkładzie benzoilo-CoA z wykorzystaniem *p*-krezolu jako substratu

Mikroorganizm	Akceptor elektronów	Piśmiennictwo
1. <i>Aromatoleum aromaticum</i>	NO ₃ ⁻	[104]
2. <i>Desulfobacula toluolica</i> Tol2	SO ₄ ²⁻	[103]
3. <i>Geobacter metallireducens</i>	Fe ³⁺	[108]
4. <i>Magnetospirillum</i> TS-6	NO ₃ ⁻	[90]

zasługuje grupa bakterii modyfikowanych genetycznie (GMMs), wyizolowanych z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej. Należą do niej m.in.: *Comamonas testosteroni* E23, *Pseudomonas putida* F1-Te, *Pseudomonas putida* DOT-T1-Km, *Pseudomonas* sp. B13, czy *Pseudomonas* sp. CF600 [38, 89, 100, 106].

W szczepie *Rhodococcus erythropolis* UVP-1 Saa i wsp. [81] zidentyfikowali dwa białka, kodowane przez dwa geny pheA1 (542 aminokwasy) i pheA2 (189 aminokwasów), o wysokiej homologii do dwuskładnikowej hydroksylazy fenolowej inicjującej m.in. biodegradację krezoli. Podobnie *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 8250 oraz *Pseudomonas pseudoalcaligenes* NCIMB 9867 są w stanie katalizować tlenową hydroksylację *p*-krezolu, w którym ostatecznym akceptorem elektronów jest tlen [102]. Niektóre drobnoustroje posiadają zestaw genów kodujących enzymy uczestniczące w degradacji różnych pochodnych fenolu w obrębie jednej komórki [67]. I tu przykładem jest *Cupriavidus necator* JMP134 (były *Alcaligenes eutrophus*). Jest to szczep wyróżniający się wysoką liczbą genów biorących udział w rozkładzie fenolu i jego pochodnych, w tym 2-, 3-, i 4-metylofenolu. Geny kodujące enzymy oraz białka regulacyjne uczestniczące w katabolizmie krezoli umieszczone są zarówno w plazmidach jak i w chromosomach [71].

Do listy mikroorganizmów istotnych w biodegradacji krezoli należy dopisać także drożdże *Candida tropicalis* [43], *Trichosporon montevidense* PHE1 [39], *Trichosporon cutaneum* R57 [2] oraz grzyby z rodzaju: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monicillium*, *Tri-*

choderma, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Phanerochaete* [5]. Za utlenianie roślinnych związków fenolowych przez grzyby odpowiedzialne są oksydoreduktazy, do których należą m.in. metaloenzymy – lakkazy (EC 1.10.32), zewnątrzkomórkowe peroksydazy (VPS) zawierające hem (EC 1.11.1), LiP – ligninazy I (EC 1.11.1.14) oraz tanazy produkowane przez *Aspergillus* i *Penicillium* tolerujące nawet do 20% tanin [66, 59].

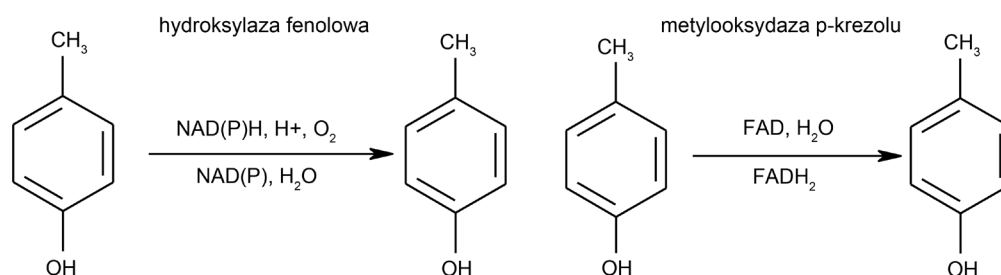
Przeważającą większość wśród izolatów pozyskanych ze środowisk zanieczyszczonych krezolami stanowią jednak gatunki z rodzaju *Pseudomonas* [80]. Potwierdzają to również Jain i wsp. [42], którzy przeanalizowali różne szlaki metaboliczne *m*-krezolu z udziałem *Pseudomonas putida* NCIMB9869 z 3,5-ksylenolem oraz *m*-krezolem jako źródłem energii. Tschach i Fuchs [96] także zidentyfikowali bakterie z rodzaju *Pseudomonas* wśród analizowanych izolatów. Katabolizm krezolu przebiegał w obecności azotanów (V), jako końcowego akceptora elektronów. Skuteczny w biodegradacji *m*-krezolu okazał się także *Citrobacter farmeri* SC01 wyizolowany w warunkach tlenowych w zlewni oczyszczalni ścieków koksowniczych [77]. Dobrze poznanymi pod względem biochemicznym i genetycznym są również szczepy *Ewingella americana* i *Serratia plymuthica* GC [48, 74].

Drobnoustroje wykazują także potencjał degradacyjny w środowisku beztlenowym. Zdolność do rozkładu fenoli i ich pochodnych w warunkach pozbawionych tlenu wykazano u drobnoustroju redukującego siarczany – *Desulfobacterium phenolicum* [7] oraz *Desulfobacterium cetonicum* [64]. Według badań Shinoda i wsp. [90] i Schmeling'a i wsp. [86] istotną rolę w tym procesie odgrywają bakterie denitryfikacyjne *Magnetospirillum* sp. oraz *Thauera aromatica* i *Azoarcus buckelli*, dla którego ostatecznym akceptorem elektronów są azotany (V). Beztlenową karboksylację *m*- i *p*-krezolu jest w stanie indukować również *Desulfosarcina cetonica* DSM 7267. Przyjmującymi parę elektronów stają się wówczas siarczany. W pulę drobnoustrojów posiadających zdolności biodegradacyjne metylofenoli wpisuje się także *Geobacter metallireducens* przeprowadzający proces utlenienia *p*-krezolu redukując Fe³⁺ do Fe²⁺ [58]. Ponadto izomer ten jest wykorzystywany jako źródło energii przez *Desulfobacula toluolica* [75].

5. Tlenowy katabolizm krezoli

Związki aromatyczne są wszechobecnym podłożem wzrostowym dla mikroorganizmów, źródłem węgla i energii. Aby substraty te mogły być wykorzystane, kluczowym etapem jest pojawienie się w środowisku grup hydroksylowych, równoznaczny z obecnością tlenu cząsteczkowego, jako ko-substratu [31].

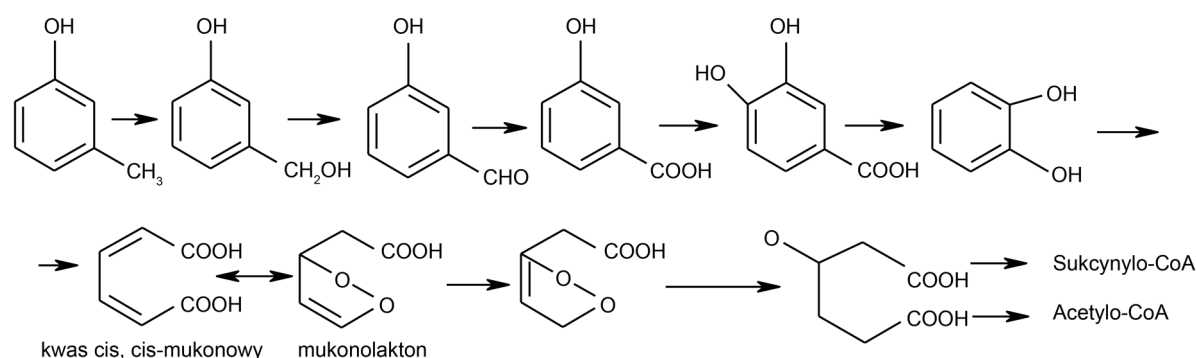
Tlenowy katabolizm krezoli jest inicjowany przez hydroksylazę fenolową (MHS), enzym należący do monooksygenaz z grupy hydroksylaz, przeprowadzający

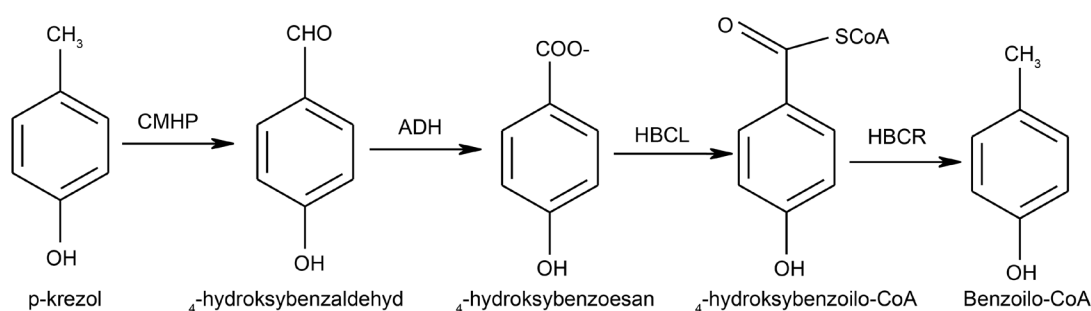
Rys. 1. Schemat etapu inicjującego mikrobiologiczny rozkład *p*-krezolu

hydroksylację pierścienia aromatycznego (Rys. 1) [54]. Do grupy monooksygenaz fenolowych (EC 1.14.13.7) należą enzymy indukcyjne, pochodne cytochromu P-450, zawierające w swym centrum aktywnym jony żelaza na różnych stopniach utlenienia [70]. Uwzględniając liczbę podjednostek białkowych można wyróżnić: wieloskładnikowe (mMHS), dwuskładnikowe (MHS) oraz jednoskładnikowe (MHS) hydroksylazy. Wieloskładnikowe (mMHS) wyizolowano ze szczepów bakterii *G-Proteobacteria*. Hydroksylazę fenolową składającą się z sześciu różnych podjednostek opisano u następujących rodzajów drobnoustrojów: *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Cupriavidus* [65]. Hydroksylaza fenolowa wbudowuje jeden z atomów tlenu cząsteczkowego do pierścienia aromatycznego lub, w przypadku krezoli, do grupy metylowej. Na tym etapie elektrony z dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH) są przenoszone przez białka żelazowo-siarkowe, pośrednio na flawinę reduktazy (NADPH) i ostatecznie na terminalną oksygenazę, za co odpowiada ferrodoksyna. Pierwszy elektron pochodzi zatem od kofaktora NAD(P)H [73, 89, 97]. Po jego przyjęciu kation Fe^{2+} wiąże cząsteczkowy tlen. Kompleks żelazo-nadtlenkowy jest skutkiem przyłączenia drugiego elektronu. W wyniku rozszczepienia tego kompleksu powstaje cząsteczka wody. Usunięcie z niej wodoru skutkuje powstaniem wolnego rodnika. Po jego uwolnieniu żelazo powraca do stanu wyjściowego [97]. Cafaro i wsp. [16] podkreślają, iż w genomie *Pseudomonas stutzeri* OX1 odkryto dwie różne monooksygenazy, hydroksylazę fenolową i monooksygenazę toluenu/o-xyłenu (TOMO). Uwzględniając szeroki

zakres specyficzności substratowej i zdolności hydroksylowania więcej niż jednej pozycji pierścienia aromatycznego przez enzym TOMO, można przypuszczać, że jest on w głównej mierze odpowiedzialny za reakcje monooksygenacji krezoli [8].

Kluczowymi związkami pośrednimi wytwarzanymi na szlaku biodegradacji tlenowej krezoli, które zostały zidentyfikowane są: katechol, kwas protokatechowy i kwas gentyzynowy [17]. Z badań Hopper'a i Taylor'a [37] wynika, że najczęstszymi ścieżkami biodegradacji *m*-krezolu jest szlak gentyzynowy i katecholowy (Rys. 2). Ren i wsp. [77] wskazują również na trzy najważniejsze związki pośrednie charakterystyczne dla szlaku tlenowego *orto m*-krezolu. Są to: kwas 3-hydroksybenzoesowy, kwas *cis*, *cis*-mukonowy i mukonolaktone, powstające dzięki indukcji przez drobnoustroje np. *Citrobacter farmeri* SC01 1,2-dioksygenazy, należącej do grupy enzymów intradiolowych (EC 1.13.11.1). Dioksygenaza terminalna (Rieske'ego) o potencjale oksydoredukcyjnym – 150 mV posiada Fe występujące na trzecim stopniu utlenienia i nie jest wrażliwa na zmiany pH [19]. Kwas *cis* *cis*-mukonowy, po przekształceniu do mukonolaktone ulega kolejnym zmianom do kwasu 3-ketoadyinowego, a ostatecznie do kwasu bursztynowego i acetylo-CoA włączanego do cyklu Krebsa [73, 89]. Na uwagę zasługuje również fakt, że metylowane związki aromatyczne rzadko ulegają rozszczepieniu intradiolowemu w procesie *orto*, ponieważ powstaje wówczas intermediat o wysokiej toksyczności – metylo-laktone. Proces ten jest jednak możliwy, gdy w układzie obok mieszaniny metylowych pochodnych pojawiają się związki chlorowane [36].

Rys. 2. Ścieżka biodegradacji *m*-krezolu na szlaku *orto* (katecholowym)



Rys. 3. Szlak beztlenowej biodegradacji *p*-krezolu. CMHP – metylohydroksylaza – *p*-krezolu, ADH – dehydrogenaza aldehydu, HBCL – 4-hydroksybenzoesan metylu-CoA; HBCR – reduktaza 4-hydroksybenzoilo-CoA

Wyniki badań Zaborin'y i wsp. [107] wykazują hamujący wpływ metylokatecholi na aktywność 1,2 dioksygenazy hydroksychinonowej. Jest on, co prawda, nieco słabszy od inhibicji związków chlorowych co powiązано z elektrodonorowym charakterem grupy metylowej, jednak godny podkreślenia. Nie należy również bagatelizować faktu, iż podczas rozszczepiania niektórych metylowych pochodnych katecholu mogą powstać toksyczne metabolity takie jak acylohalogenki [78, 87]. Niemniej jednak, pomimo toksycznego wpływu intermediatów, szczep *Pseudomonas* sp. HH35 wykazuje zdolność do rozkładu różnorodnych metylowych pochodnych hydrochinonu [87]. Może być to związane z aktywnością fosfolipidów, które jako cząsteczki efektorowe, przyłączają się do hydrofobowego fragmentu 1,2 dioksygenaz, co umożliwia z kolei dołączenie się do enzymu laktonizującego *cis*, *cis*-mukonianu. Według Guzik i wsp. [30] daje to szansę na zachowanie niskiego stężenia związków potencjalnie toksycznych w komórce.

Riegert i wsp. [78] twierdzą, że pochodne węglowodorów aromatycznych z grupą metylową, w warunkach tlenowych, mogą ulegać również rozszczepieniu typu *meta*, zarówno dystalnie jak i proksymalnie. Umiejętność proksymalnego rozszczepienia 3-metylokatecholu posiada chociażby *Sphingomonas xenophaga* BN6. Proces rozszczepienia metylokatecholu przeprowadzają 2,3 dioksygenazy (EC 1.13.11.2), enzymy ekstradiolowe. W wyniku ich działania wytwarzany jest semialdehyd 2-hydroksymukonowy, ulegający ostatecznym przekształceniom do aldehydu octowego i kwasu pirogronowego włączanych do cyklu Krebsa [73, 89]. Analiza skryzalizowanego enzymu 2,3 dioksygenazy wyizolowanego z *Pseudomonas putida*, ujawniła, iż w każdej z czterech podjednostek tworzących ten enzym funkcjonalny znajduje się niehemowe Fe (II) [51].

6. Beztlenowy katabolizm krezoli

Wszystkie trzy izomery krezolu ulegają beztlenowemu rozkładowi przez drobnoustroje denitryfikacyjne, redukujące siarczany oraz konsorcja metano-

genne, aczkolwiek szlaki metaboliczne każdego izomeru mogą różnić się od siebie [33]. Aktualny stan wiedzy odnośnie mechanizmów początkowych degradacji krezoli obejmuje dodawanie fumaranu, hydroksylację lub karboksylację [72]. W warunkach pozbawionych tlenu proces biodegradacji krezoli zaczyna się od utlenienia grupy metylowej. Kolejny etap to karboksylowanie do odpowiednich hydroksybenzoesanów, które następnie są przekształcane do benzoilo-CoA (Rys. 3) [31].

Johannes i wsp. [44] podkreślają, iż pierwszym, inicjującym enzymem jest metylohydroksylaza *p*-krezolu – PCMH (WE 1.17.99.1) heterotetrameryczne białko składające się z dwóch podjednostek, wyizolowane z bakterii bezwzględnie beztlenowej *Geobacter metallireducens*. Szczegółowe badania genetyczne szlaków metabolicznych wykazały, że spośród wielu *Pseudomonas* sp. tylko trzy szczepy posiadają ten enzym. Są to: *Pseudomonas putida* NCIMB 9866, *Pseudomonas putida* NCIMB 9869 [49] oraz *Pseudomonas mendocina* KR1. Jest to ściśle związane z obecnością genów kodujących PCMH zorganizowanych jako operony: *pchACXF* (*Pseudomonas putida* NCIMB 9866), *pcuCAXB* (*Pseudomonas mendocina* KR1) i *pchCF/pcuAB* kodujące PCMH [105].

Drobnoustroje te katalizują hydroksylację *p*-krezolu do alkoholu hydroksybenzylowego, po czym utleniają go do hydroksybenzaldehydu. W kolejnym etapie konwersji krezolu bierze udział 4-hydroksybenzoesan metylu-CoA (HBCL) jako aktywny monomer zaangażowany w syntezę tioestru 4-hydroksybenzoesan metylu-CoA [9] oraz reduktaza 4-hydroksybenzoilo-CoA (HBCR) odpowiedzialna za usunięcie grupy hydroksylowej z powstałego kwasu przez redukcję dwóch elektronów, których donorem jest ferredoksyna [12].

Skuteczność fumaranu odnotowano w przypadku *Desulfobacula toluolica* Tol2. Szczep ten przeprowadzał degradację *p*-krezolu w obecności zjonizowanej formy kwasu fumarowego przez specyficzne enzymy HBsA ujawniające nowe filogenetyczne rozgałęzienia, prowadząc do powstania aryl-bursztynianu [104].

Zaobserwowano także, że *o*-krezol metabolizowany przez *Paracoccus* sp. ulega karboksylacji do kwasu

3-metylo-4-hydroksybenzoesowego, który jest aktywowany do tioestru CoA i 3-metylo-4-hydroksybenzoilo-CoA przechodzącego do 3-metylobenzoilu CoA. Nie jest jednak do końca wyjaśnione, czy grupa metylowa jest utleniana bądź usuwana przed redukcją pierścienia. Proces ten przeprowadzają podobnie bakterie denitryfikacyjne i metanogenne. Nie stwierdzono jednak utlenienia grupy metylowej ani karboksylacji *m*-krezolu przez szczepy *Pseudomonas* sp. [80]. Z kolei degradacja *m*-krezolu przez bakterie metanogenne jest inicjowana przez karboksylację do kwasu 2-metylo-4-hydroksybenzoesowego. Zaobserwowano również, że w ich obecności następuje demetylacja 2-metylo-4-hydroksybenzoesanu metylu do 4-hydroksybenzoesanu [5]. W przypadku bakterii denitryfikacyjnych odkryto utlenianie grupy metylowej do 3-hydroksybenzoesanu, a ostatecznie na drodze dehydroksylacji do benzoilu lub benzoenu CoA [10].

Mimo że istnieje duża różnorodność aromatycznych substratów i mechanizmów inicjacji ścieżek beztlenowej degradacji krezoli, wspólnym związkiem pośrednim na szlakach ich rozkładu jest benzoilo-CoA (Tab. V). Na jednym z nich Bossert i wsp. [13] zaobserwowali zjawisko synergizmu pomiędzy dwoma szczepami drobnoustrojów denitryfikacyjnych PC-07 i PB-04. Obydwa szczepy transformowały *p*-krezol do kwasu *p*-hydroksybenzoesowego. Zaobserwowano jednak, że szczep PB-04 posiadał tę zdolność tylko w obecności szczepu PC-07.

Najnowsze badania dowodzą, że zarówno benzoilo-CoA jak i gen *GamA* odgrywają ważną rolę w globalnym obiegu węgla. Gen *GamA* jest kodowany przez hydrolazy rozsiewające pierścień benzoilo-CoA. Jego szczególna rola wynika z faktu, że gen ten, w przeciwieństwie do reduktazy benzoilo-CoA jest aktywny w procesie denitryfikacji, redukcji żelaza i siarczanów. Dlatego też gen *GamA* może być proponowany jako biomarker w beztlenowym rozkładzie związków aromatycznych, w tym krezoli [72].

7. Mikrobiologiczna degradacja krezoli w środowisku glebowym

Wysoki koszt konwencjonalnych metod fizycznych i chemicznych usuwania fenolu i jego pochodnych nakłania do uwzględniania zdolności różnych mikroorganizmów do metabolizowania związków fenolowych, jako alternatywy w skutecznej bioremediacji środowiska skażonego tymi substancjami toksycznymi [3]. Wiedza na temat biodegradacji, biotransformacji krezoli i uwarunkowań genetycznych tych procesów stanowi podstawę do skutecznego poszukiwania rozwiązań analizowanego problemu. W wielu badaniach wykorzystuje się genetycznie modyfikowane mikro-

organizmy (GMMs) i tworzone z nich konsorcja, metody stymulacji oraz bioaugmentacji. Mikroorganizmy mogą być wprowadzane do gleby również jako pojedyncze szczepy preadaptowane do rozkładu konkretnych związków fenolowych. Stosuje się także geny, które w procesie koniugacji przenoszone są do komórek drobnoustrojów autochtonicznych [25].

Szybszy przebieg procesu degradacji można uzyskać jednak dzięki mieszanym kulturom, co zaobserwowano w badaniach Goswami i wsp. [28]. Szczepy *Rhodococcus erythropolis* M1 i *Pseudomonas fluorescens* P1 rozkładały znacznie szybciej mieszaninę fenolu i 4-krezolu w konsorcjum aniżeli w monokulturze. Niemniej jednak wykazały odwrotne, konkurencyjne oddziaływanie w stosunku do mieszaniny fenolu i 2-chlorofenolu. *Pseudomonas fluorescens* P1 był drobnoustrojem dominującym w stosunku do *Rhodococcus erythropolis* M1. Spowodowało to usunięcie fenolu i 2-chlorofenolu w ciągu 48 h, podczas gdy w monokulturach biodegradacja mieszaniny tych związków zajęła 18 h.

Silva i wsp. [92] zaobserwowali również intrygującą zależność. Okazało się, że proces nityfikacji przebiegał znacznie szybciej w obecności mieszaniny związków fenolowych, w tym: fenolu, 2-chlorofenolu, *p*-krezolu i 4-hydroksybenzaldehydu, aniżeli w obecności pojedynczych związków. Konsorcja bakterii nityfikacyjnych całkowicie usunęły mieszaninę związków fenolowych, podczas gdy sam 2-chlorofenol okazał się istotnym inhibitorem procesu nityfikacji.

Ważna jest również świadomość zróżnicowanej aktywności degradacyjnej ukierunkowanych na nią szczepów bakterii, a w szczególności uruchamiania różnych szlaków metabolicznych. Heinaru i wsp. [34] po wprowadzeniu do gleby zanieczyszczonej m.in. krezolem szczepów *Pseudomonas mendocina* PC1, *Pseudomonas fluorescens* PC18, PC20 i C24 zaobserwowali, iż mimo, że wszystkie szczepy rozkładały *p*-krezol, to jednak szczepy PC1 i PC20 przeprowadzały go drogą *meta*, a szczepy PC18 i PC24 szlakiem *orto*.

Zainteresowaniem cieszy się również łączenie w inokulacie szczepów bakterii i grzybów mikroskopowych [41]. Kirk [50] odkrył, że podczas degradacji związków aromatycznych bakterie funkcjonują na śluzowatych strzępkach grzyba *Corollospora maritima*, co może przyczynić się do inicjacji sukcesji mikroorganizmów. Potencjał degradacyjny grzybów w odniesieniu do związków fenolowych, obligujący do prowadzenia badań w tym kierunku, odkryli Valli i Gold [98]. Wynioskowali oni, że grzyb *Phanerochaete chrysosporium* stymulował metabolizm 2,4-dichlorofenolu, bez precedensu usuwając atomy chloru przed rozsiewaniem pierścienia. Z kolei Kennes i Lema [46] dowiedli, że grzyb ten, w obecności glukozy, jest w stanie katalizować rozkład *p*-krezolu (50 mg dm⁻³) jak i fenolu (50 mg dm⁻³) na zbliżonym poziomie. Wyniki analiz

Alexievy i wsp. [2] wykazały, że *Trichosporon cutaneum* R57 w obecności *m*-krezolu ($0,2 \text{ g dm}^{-3}$), jako jedyne źródła węgla, katalizował metabolizm tego związku dużo szybciej niż w kombinacji z fenolem. Co więcej, krezol w pozycji *meta* w czasie 27 h badań uległ degradacji w mniejszym stopniu niż 3-nitrofenol, 2,6-nitrofenol czy rezorcyna.

Próbę oceny wrażliwości dziewięciu rodzajów grzybów na trzy izomery krezolu w glebie zanieczyszczonej krezotem podjął Atagana [5]. Już po 14 dniach badań stwierdził, że ze wszystkich rodzajów grzybów: *Candida*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monicillium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Phanerochaete*, czułe na obecność *p*-krezolu w glebie są *Candida* sp. i *Pleurotus* sp., a na *o*-krezol i *m*-krezol *Trichoderma* sp. i *Phanerochaete* sp. Zastosowanie mieszaniny sześciu izolatów ujawniło jednak, że *Phanerochaete* sp. jako jedyny jest w stanie funkcjonować w glebie zanieczyszczonej krezotem po upływie 38 dni inkubacji. Znacznie wolniej aniżeli fenol i *o*-krezol degradowane były izomery krezolu w położeniu *meta* i *para*, przy czym *p*-krezol okazał się bardziej oporny niż *m*-krezol. Niemniej jednak po aplikacji mieszaniny sześciu izolatów grzybów został również skutecznie zdegradowany.

Na uwagę zasługują także konstatacje Chi i wsp. [18]. Zaobserwowali oni korzystne zjawisko synergizmu w środowisku glebowym. Pomimo wprowadzenia do gleby określonych szczepów drobnoustrojów degradacja związków fenolowych była szybsza w obecności mikroorganizmów rodzimych niż w sterylnej glebie. Nakłania to do wykonywania badań nad rozkładem krezoli w naturalnych warunkach środowiskowych tym bardziej, że ich przebieg determinują w istotny sposób właściwości biologiczne, fizyczne i chemiczne gleb [63]. Romantschuk i wsp. [79] podkreślają znaczenie temperatury, dostępności tlenu atmosferycznego, ilości substancji odżywczych, pH oraz wilgotności. Mrozik [63] sugeruje, że fenole i ich pochodne, jako główne składniki budulcowe jąder substancji humusowych, wykazują największe powinowactwo do frakcji humin. W mniejszym stopniu wiążą się z kwasami huminowymi i fulwowymi. Wydajnej biodegradacji związków aromatycznych w glebie możemy oczekiwać wówczas gdy stosunek węgla do azotu i fosforu wynosi odpowiednio 100:10:1 [56], minimalna ilość powietrza wypełniająca przestrzeń w glebie utrzymuje się na poziomie około 10%, wartość pH oscyluje pomiędzy 6–8, a temperatura środowiska glebowego wynosi 20–30°C [11, 55]. Nie bez znaczenia jest również stopień agregacji gleby, który determinuje zarówno aktywność mikroorganizmów jak i biodostępność związków aromatycznych [15]. Wyniki badań Shibata i wsp. [88] analizujących biodegradację *p*-krezolu w siedmiu japońskich glebach ryżowych po części korespondują z tą tezą. Odnotowano bowiem, że w warunkach tle-

nowych, niezależnie od zróżnicowanych właściwości gleb ich czas rozkładu wynosił 19 dni. Więcej zależności zaobserwowano w przebiegu beztlenowej biodegradacji *p*-krezolu w trzech glebach wyróżniających się niską zawartością żelaza i azotanów. Okres półtrwania tego związku wynosił w nich od 11 do 740 dni. Istotną rolę odgrywała wartość potencjału oksydo-redukcyjnego tych gleb. Zawartość węgla organicznego nie miała w tym procesie znaczenia.

Drobnoustroje zmodyfikowane genetycznie stanowią dość kontrowersyjną grupę mikroorganizmów w odniesieniu do naturalnych warunków środowiskowych. Wydawałoby się, że w związku z tym, że są one źródłem transpozonów oraz plazmidów dla mikroflory autochtonicznej gleb, łatwo przenoszonych na nią na drodze horyzontalnego transferu genów, istnieje szansa na szybki wzrost zdolności degradacyjnych mikroorganizmów glebowych. Jednak Van der Meer i wsp. [99] podkreślają, że GMMs jest to grupa skuteczna tylko w odniesieniu do ściśle wyselekcjonowanego specyficznego substratu. Dlatego też w złożonych warunkach naturalnych staje się mniej przydatna, a mikroorganizmy autochtoniczne są dla niej silną konkurencją, chociażby z tego powodu, że przeszły naturalną selekcję i posiadają potencjał do tworzenia nowych szlaków metabolicznych.

8. Podsumowanie

Jednym ze skutecznych sposobów eliminacji krezoli ze środowiska glebowego jest ich degradacja mikrobiologiczna do CO_2 i H_2O . Satysfakcjonujący jest również rozkład tych ksenobiotyków do związków całkowicie nietoksycznych bądź do produktów pośrednich o mniejszej toksyczności [63]. Mikroorganizmy posiadają wyjątkową umiejętność adaptacji w nowych, trudnych warunkach środowiskowych, a co istotniejsze są w stanie wykorzystać, jako substraty energetyczne i budulcowe związki, które nie są produktami ich metabolizmu. Rozkład krezoli przez mikroorganizmy może zachodzić zarówno w tlenowych jak i beztlenowych warunkach na różnych ścieżkach degradacji. Do technik, dzięki którym można określić metabolity pośrednie oraz mechanizmy zachodzących reakcji należą: CSIA – analiza izotopowa [102], HPLC, LC-MS, widmo FT-IR – potwierdzająca powstawanie mukonolaktenu podczas biodegradacji *m*-krezolu oraz GC-MS ujawniająca obecność kwasu 3-hydroksybenzoesowego i kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego [77].

Należy jednak pamiętać, że pomimo podejmowanych wielokrotnie prób wyjaśnienia mechanizmów i detalicznego poznania reakcji chemicznych zachodzących podczas biodegradacji krezoli oraz rozszyfrowania genetycznych uwarunkowań drobnoustrojów

obligujących je do rozkładu metylofenoli, toksyczność tych związków może wywierać na mikroorganizmy silny negatywny wpływ. Zatem obszar badań ukierunkowanych na zdiagnozowanie toksyczności krezoli na drobnoustroje środowiska glebowego i innych ekosystemów powinien permanentnie poszerzać swój zasięg.

9. Piśmiennictwo

- Alexieva Z., Ivanova D., Godjevargova T., Atanasov B.: Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochem.* **37**, 1215–1219 (2002)
- Alexieva Z., Yemendzhiev H., Zlateva P.: Cresols utilization by *Trametes versicolor* and substrate interactions in the mixture with phenol. *Biodegradation*, **21**, 625–635 (2010)
- Arora P.K., Bae H.: Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microb. Cell. Fact.* **13**, 1–17 (2014)
- Arutchelvan V., Kanakasabai V., Nagarajan S., Muralikrishnan V.: Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *J. Hazard. Mater. B.* **127**, 238–243 (2005)
- Atagana H.I.: Biodegradation of phenol, *o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 851–858 (2004)
- ATSDR 2013 substance priority list. Atlanta, GA, U.S.A: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/> (23.03.2016)
- Bak F., Widdel F.: Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **146**, 177–180 (1986)
- Bertoni G., Bolognesi F., Galli E., Barbieri P.: Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3704–3711 (1996)
- Biegert T., Altenschmidt U., Eckerskorn C., Fuchs G.: Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-hydroxybenzoate-CoA ligase from denitrifying *Pseudomonas* species. *Eur. J. Biochem.* **213**, 555–561 (1993)
- Boll M.: Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1707**, 34–50 (2005)
- Bonting C.F.C., Schneider S., Schmidtberg G., Fuchs G.: Anaerobic degradation of *m*-cresol via methyl oxidation to 3-hydroxybenzoate by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **164**, 63–69 (1995)
- Boopathy R.: Factors limiting bioremediation technologies Review paper. *Bioresource Technol.* **74**, 63–67 (2000)
- Bossert I.D., Rivera M.D., Young L.Y.: *p*-Cresol biodegradation under denitrifying conditions: Isolation of a bacterial coculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**, 313–319 (1986)
- Bravo L.: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317–333 (1998)
- Bronick C.J., Lal R.: Soil structure and management: a review. *Geoderma*, **124**, 3–22 (2005)
- Cafaro V., Notomista E., Capasso P., Donato D.: Phenol Hydroxylase and Toluene/*o*-Xylene Monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: Interplay between Two Enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2211–2219 (2004)
- Caspi R.T., Altman K., Dreher C.A., Fulcher P., Subhraveti I.M., Keseler A., Kothari M., Krummenacker M., Latendresse L.A., Mueller Q., Ong S., Paley A., Pujar A.G., Shearer M., Travers D., Weerasinghe P., Karp Z.P.D.: The Meta Cyc Database of metabolic pathways and enzymes and the Bio Cyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.* **40**, 742–753 (2012)
- Chi X.Q., Zhang J.J., Zhao S., Zhou N.Y.: Bioaugmentation with a consortium of bacterial nitrophenol-degraders for remediation of soil contaminated with three nitrophenol isomers. *Environ. Pollut.* **172**, 33–41 (2013)
- Colbert Ch.L., Couture M.M.J., Eltis L.D.T., Bolin J.A.: Cluster Exposed: Structure of the Rieske Ferredoxin from Biphenyl Dioxygenase and the Redox Properties of Rieske Fe-S Proteins. *Structure*, **8**, 1267–1278 (2000)
- Dercová K., Certík M., Malová A., Sejáková Z.: Effect of chlorophenols on the membrane lipids of bacterial cells. *Int. Biodeter. Biodegr.* **54**, 251–254 (2004)
- Devassy B.M., Shanbhag G.V., Lefebvre F., Halligudi S.B.: Alkylation of *p*-cresol with tert-butanol catalyzed by heteropoly acid supported on zirconia catalyst. *J. Molec. Catal. A: Chem.* **210**, 125–130 (2004)
- Dziennik Ustaw, nr 1, poz. 1800: Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014 r. w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego (2014)
- Dziennik Ustaw, nr 165, poz. 1395: Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi (2002)
- Dziennik Ustaw, nr 212, poz. 1769: Rozporządzenie Ministra Gospodarki i Pracy z dnia 10 października 2005 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy (2005)
- El Fantroussi S., Agathos S.N.: Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 268–275 (2005)
- European Commission Employment, Social Affairs and Inclusion.: Recommendation from the Scientific Committee for Occupational Exposure Limits for 4,6-dinitro-*o*-cresol SCOEL/SUM/60, 1–14 (2004)
- Flores C., Cabot P.L., Centellas F., Garrido J.A., Rodriguez R.M., Arias C., Brillas E.: Solar photo electro-Fenton degradation of cresols using a flow reactor with a boron-doped diamond anode. *Appl. Catal. B: Environm.* **75**, 17–28 (2007)
- Goswami M., Shivaraman N., Singh R.P.: Microbial metabolism of 2-chlorophenol, phenol and *rho*-cresol by *Rhodococcus erythropolis* M1 in co-culture with *Pseudomonas fluorescens* P1. *Microbiol. Res.* **160**, 101–109 (2005)
- Gregory G.L.: Method of *ortho*-alkylating phenol. General Electric Co., US Patent 4933509 (1989)
- Guzik U., Greń I., Wojcieszynska D., Łabużek S.: Dioksygenazy – główne enzymy degradacji związków aromatycznych. *Biotechnologia*, **3**, 71–88 (2008)
- Harwood C. S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G.: Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 439–458 (1999)
- Hayashi M., Nakamura A.Y., Higashi K., Kato H., Kishida F., Kaneko H.: A quantitative structure – activity relationship study of the skin irritation potential of phenols. *Toxicol. in vitro*, **13**, 915–922 (1999)
- Heider J., Fuchs G.: Microbial Anaerobic Aromatic Metabolism. *Anaerobe*, **3**, 1–22. (1997)
- Heinaru E., Merimaa M., Viggor S., Lehiste M., Leito I., Truu J., Heinaru A.: Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol – and oil-polluted area. *FEMS Microbiol. Ecol.* **51**, 363–373 (2005)

35. Heipieper H.J., Weber F.J., Sikkema J., Keweloh H., Bont J.A.M.: Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* **12**, 409–415 (1994)
36. Hollender J., Hopp J., Dott W.: Cooxidation of chloro- and methylphenols by *Alcaligenes xylooxidans* JH1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 445–450 (2000)
37. Hopper D.J., Taylor D.G.: Pathways for the degradation of *m*-cresol and *p*-cresol by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **122**, 1–6 (1975)
38. Huertas M.J., Duque E., Marques S., Ramos J.L.: Survival in soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains after solvent shock. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 38–42 (1998)
39. Hui L., Yub Qi J., Wang G., Yea F., Conga Y.: Biodegradation of phenol at high concentration by a novel yeast *Trichosporon montevidense* PHE1. *Process Biochem.* **46**, 1678–1681 (2011)
40. Huijbregts R.P.H., Kroon A.I.P.M., Kruij B.: Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1469**, 43–61 (2000)
41. Jacques R.J.S., Santos E.C., Bento F.M., Peralba M.C.R., Selbach P.A., Sa E.L.S., Camargo F.A.O.: Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *Int. Biodeter. Biodegr.* **56**, 143–150 (2005)
42. Jain R.K., Bayly R.C., Skurray R.A.: Specific deletion of a large segment of *pra* 500: a 3,5-xyleneol degradative plasmid. *Lett. Appl. Microbiol.* **12**, 216–220 (1991)
43. Jiang Y., Wen J., Li H., Yang S., Hu Z.: The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochem. Eng. J.* **24**, 243–247 (2005)
44. Johannes J., Bluschke A., Jehmlich N., Bergen M., Boll M.: Purification and characterization of active-site components of the putative *p*-cresol Methylhydroxylase Membrane Complex from *Geobacter metallireducens*. *J. Bacteriol.* **190**, 6493–6500 (2008)
45. Kaisoon O., Siriamornpun S., Weerapreeyakul N., Meeso N.: Phenolic compounds and anti-oxidant activities of edible flowers from Thailand. *J. Funct. Foods*. **3**, 88–99 (2011)
46. Kennes C., Lema J.M.: Simultaneous biodegradation of *p*-cresol and phenol by the basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Ind. Microbiol.* **13**, 311–314 (1994)
47. Keweloh H., Diefenbach R., Rehm H. J.: Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids. *Arch. Microbiol.* **157**, 49–53 (1991)
48. Khleifat M.K.: Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. *Process Biochem.* **41**, 2010–2016 (2006)
49. Kim J., Fuller J.H., Cecchini G., McIntire W.S.: Cloning, sequencing, and expression of the structural genes for the cytochrome and flavoprotein subunits of *p*-cresol methylhydroxylase from two strains of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **176**, 6349–6361 (1994)
50. Kirk P.W.: Isolation and culture of lignicolous marine fungi. *Mycologia*, **61**, 174–177 (1969)
51. Kita A., Kita S., Inaka K., Ishida T., Horiike K., Nozaki M.: Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of expressed *Pseudomonas putida* catechol 2,3-dioxygenase. *J. Biochem.* **122**, 201–204 (1997)
52. Krastanov A., Alexieva Z., Yemendzhiev H.: Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Eng. Life Sci.* **13**, 76–87 (2013)
53. Landau M.V., Kaliya M.L., Herskowitz M.: Ammoxidation of *p*-cresol to *p*-hydroxybenzoxynitrile high-performance boraphosphoria supported catalysts. *Appl. Catal. A: Gen.* **208**, 21–34 (2001)
54. Leahy J.G., Batchelor P.J., Morcomb S.Z.: Evolution of the soluble di iron monooxygenases. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 449–479 (2003)
55. Leahy J.G., Colwell R.R.: Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Rev.* **54**, 305–315 (1990)
56. Liebeg E.W., Cutright T.J.: The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* **44**, 55–64 (1999)
57. Londry K.L., Fedorak P.M.: Use of fluorinated compounds to detect aromatic metabolites from *m*-cresol in a methanogenic consortium: evidence for a demethylation reaction. *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 2229–2238 (1993)
58. Lovley D.R., Giovannoni S.J., White D.C., Champine J.E., Phillips E.J.P., Gorby Y.A., Goodwin S.: *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch. Microbiol.* **159**, 336–344 (1993)
59. Mäkelä M.R., Marinović M., Nousiainen P., Liwanag A.J.M., Benoit I., Sipilä J., Hatakka A., Vries R.P., Hildén K.S.: Aromatic Metabolism of Filamentous Fungi in Relation to the Presence of Aromatic Compounds in Plant Biomass. *Adv. Appl. Microbiol.* **91**, 1–75 (2015)
60. Marrot B., Barrios-Martinez A., Moulin P., Roche N.: Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **30**, 174–183 (2006)
61. Michałowicz J., Duda W.: Phenols-Sources and Toxicity. *Polish J. Environ. Stud.* **16**, 347–362 (2007)
62. Moridani M.Y., Siraki A., Chevaldina T., Scobie H., Obrie N.P.J.: Quantitative structure toxicity relationship for catechols in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* **147**, 297–307 (2004)
63. Mrozik A.: Zmiany w składzie bakteryjnych kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebie. Wyd. UŚ Katowice, 1–106 (2009)
64. Müller J.A., Galushko A.S., Kappler A., Schink B.: Initiation of Anaerobic Degradation of *p*-Cresol by Formation of 4-Hydroxybenzylsuccinate in *Desulfobacterium cetonicum* J. *Bacteriol.* **183**, 752–757 (2001)
65. Murray J.C., Burch J.A., Streilein R.D., Iannacchione M.A., Hall R.P., Pinnell S.R.: A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *J. Am. Acad. Dermatol.* **59**, 418–425 (2008)
66. Murray L. J., Lippard S. J.: Substrate trafficking and dioxygen activation in bacteria multicomponent monooxygenases. *Accounts Chem. Res.* **40**, 466–474 (2007)
67. Nešvera J., Rucká L., Pátek M.: Chapter Four-Catabolism of Phenol and Its Derivatives in Bacteria: Genes, Their Regulation, and Use in the Biodegradation of Toxic Pollutants. *Adv. Appl. Microbiol.* **4**, 107–160 (2015)
68. OECD SIDS.: *m*-, *p*-cresol (Screening Information Data Set-SIDS)_<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/m-p-cresols.pdf>. (2006) (23.03.2016)
69. OECD SIDS.: *o*-cresol (Screening Information Data Set-SIDS) <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/95487.pdf>. (2005) (23.03.2016)
70. Otto K., Hofstetter K., Röthlisberger W. B., Schmid A.: Biochemical Characterization of StyAB from *Pseudomonas* sp. strain VLB120 as a Two-Component Flavin-Diffusible Monooxygenase. *J. Bacteriol.* **186**, 5292–5302 (2004)
71. Pérez-Pantoja D., Iglesia D.R., Pieper D.H., Gonzalez B.: Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 736–794 (2008)
72. Porter A.W., Young L.Y.: Chapter Five-Benzoyl-CoA, a Universal Biomarker for Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds. *Adv. Appl. Microbiol.* **88**, 167–203 (2014)

73. Powlowski J., Shingler V.: Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation*, **5**, 219–236 (1994)
74. Pradhan N., Ingle A.O.: Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. *Int. Biodeter. Biodegr.* **60**, 103–108 (2007)
75. Rabus R., Nordhaus R., Widdel L.W.F.: Complete oxidation of toluene under strictly anaerobic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 1444–1451 (1993)
76. Rasmussen G., Olsen R.A.: Sorption and biological removal of creosote-contaminants from groundwater in soil/sand vegetated with orchard grass (*Dactylis glomerata*). *Adv. Environ. Res.* **8**, 313–327 (2004)
77. Ren Y., Lihua P., Zhao G., Wei Ch.: Degradation of *m*-cresol via the ortho cleavage pathway by *Citrobacter farmeri* SC01. *Biochem. Eng. J.* **88**, 108–114 (2014)
78. Riegert U., Burger S., Stolz A.: Altering catalytic properties of 3-chlorocatechol-oxidizing extradiol dioxygenase from *Sphingomonas xenophaga* BN6 by random mutagenesis. *J. Bacteriol.* **183**, 2322–2330 (2001)
79. Romantschuk M., Sarand I.T., Petänen R., Peltola M., Jonsson-Vihanne T., Koivula K., Yrjälä K., Haahtela K.: Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environ. Pollut.* **107**, 179–185 (2000)
80. Rudolphi A., Tschuch A., Fuchs G.: Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**, 238–248 (1991)
81. Saa L., Jaureguibeitia A., Largo E., Llama M.J., Serra, J.L.: Cloning, purification and characterization of two components of phenol hydroxylase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 201–211 (2010)
82. Sad M.E., Padro C.L., Apestegui C.R.: Selective synthesis of *p*-cresol by methylation of phenol. *Appl. Catal. A-Gen.* **342**, 40–48 (2008a)
83. Sad M.E., Padro C.L., Apestegui C.R.: Synthesis of cresols by alkylation of phenol with methanol on solid acids. *Catal. Today.* **133–135**, 720–728 (2008b)
84. Saravanan P., Pakshirajan K., Saha P.: Biodegradation of phenol and *m*-cresol in batch and fed batch operated internal loop airlift bioreactor by indigenous mixed microbial culture predominantly *Pseudomonas* sp. *Bioresour. Technol.* **99**, 8553–8558 (2008)
85. Sarish S., Devassy B.M., Halligudi S.B.: tert-Butylation of *p*-cresol over WO_x/ZrO₂ solid acid catalysts. *J. Molec. Catal. A: Chem.* **235**, 44–51 (2005)
86. Schmeling S., Narmandakh A., Schmitt O., Gadon N., Schühle K., Fuchs G.: Phenylphosphate Synthase: a New Phosphotransferase Catalyzing the First Step in Anaerobic Phenol Metabolism in *Thauera aromatica*. *J. Bacteriol.* **186**, 8044–8057 (2004)
87. Schmidt S., Kirby G.W.: Dioxygenative cleavage of C-methylated hydroquinones and 2,6-dichlorohydroquinone by *Pseudomonas* sp. HH35. *Biochim. Biophys. Acta.* **1568**, 83–89 (2001)
88. Shibata A., Yasushi I., Arata K.: Aerobic and anaerobic biodegradation of phenol derivatives in various paddy soils. *Sci. Total Environ.* **367**, 979–987 (2006)
89. Shingler V., Bartilson M., Moore T.: Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene Encoding the Positive Regulator (DmpR) of the Phenol Catabolic Pathway Encoded by pVI150 and Identification of DmpR as a Member of the NtrC Family of Transcriptional Activators. *J. Bacteriol.* **175**, 596–1604 (1993)
90. Shinoda Y., Akagi J., Uchihashi Y., Hiraishi A., Yukawa H., Yurimoto H.: Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1483–1491 (2005)
91. Sikkema J., Weber F.J., Heipieper H.J., Bont J.A.M.: Cellular Toxicity of Lipophilic Compounds: Mechanisms, Implications, and Adaptations. *Biocatalysis*, **10**, 113–122 (1994)
92. Silva C.D., Gomez J., Beristain-Cardoso R.: Simultaneous removal of 2-chlorophenol, phenol, *p*-cresol and *p*-hydroxybenzaldehyde under nitrifying conditions: kinetic study. *Bioresour. Technol.* **102**, 6464–6468 (2011)
93. Sparling G.P., Ord B.G., Vaughan D.: Changes in microbial biomass and activity in soils amended with phenolic acids. *Soil Biol. Biochem.* **13**, 455–460 (1981)
94. Starek A.: Krezol – mieszanina izomerów. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy*, **1**, 95–111 (2007)
95. Toxicological profile for cresols: *o*-cresol, *m*-cresol.: U.S. Department of Health and Human Services. TP-91/11 (1992)
96. Tschuch A., Fuchs G.: Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonadales. *Arch. Microbiol.* **148**, 213–217 (1987)
97. Ullrich R., Hofrichter M.: Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 271–293 (2007)
98. Valli K., Gold M. H.: Degradation of 2, 4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **173**, 345–352 (1991)
99. Van der Meer J.R., Ravatn R., Sentschilo V.: The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Arch. Microbiol.* **175**, 79–85 (2001)
100. Van der Meer J.R., Vos W.M., Harayama S., Zehnder A.J.B.: Molecular Mechanisms of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compounds. *Microbiol. Rev.* **56**, 677–694 (1992)
101. Veeresh G.S., Kumar P., Mehrotra I.: Treatment of phenol and cresols in up flow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Res.* **39**, 154–170 (2005)
102. Wei X., Gilevska T., Wetzig F., Dorer C., Richnow H.H., Vogt C.: Characterization of phenol and cresol biodegradation by compound specific stable isotope analysis. *Environ. Pollut.* **210**, 166–173 (2016)
103. Wöhlbrand L., Jacob J.H., Kube M., Musmann M., Jarling R., Beck A.: Complete genome, catabolic sub-proteomes and key-metabolites of *Desulfobacula toluolica* Tol2, a marine, aromatic compound-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Environ. Microbiol.* **15**, 1334–1355 (2013)
104. Wöhlbrand L., Wilkes H., Halder T., Rabus R.: Anaerobic degradation of *p*-ethylphenol by *Aromatoleum aromaticum* strain EbN1: Pathway, regulation, and involved proteins. *J. Bacteriol.* **190**, 5699–5709 (2008)
105. Wright A., Olsen R. H.: Self-mobilization and organization of the genes encoding the toluene metabolic pathway of *Pseudomonas mendocina* KR1. *Appl. Environ. Microb.* **60**, 235–242 (1994)
106. Yap L. F., Lee Y.K., Poh C.L.: Mechanism for phenol tolerance in phenol-degrading *Comamonas testosteroni* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 833–840 (1999)
107. Zaborina O., Seitz H.J., Sidorov I., Eberspächer J., Alexeeva E., Golovleva L., Lingens F.: Inhibition analysis of hydroxyquinol-cleaving dioxygenases from the chlorophenols degrading *Azotobacter* sp. GP1 and *Streptomyces rochei* 303. *J. Basic Microbiol.* **39**, 61–73 (1999)
108. Zhang T., Tremblay P.L., Chaurasia A.K., Smith J.A., Bain T.S., Lovley D.R.: Anaerobic benzene oxidation via phenol in *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 7800–7806 (2013)