



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Natalia Maria Filipowicz

Dyscyplina naukowa: Nauki Chemiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Izolacja i identyfikacja psychrotolerancyjnych szczepów drożdży z torfowiska Rucianka zdolnych do efektywnej biodegradacji fenolu w obecności tlenu oraz identyfikacja szlaku metabolicznego zaangażowanego w tym procesie w celu oceny potencjału biotechnologicznego badanych szczepów drożdży.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Isolation and identification of psychrotolerant yeast strains from Rucianka peatland capable for effective phenol biodegradation in the presence of oxygen and identification of the metabolic pathway involved in this process to determine the biotechnological potential of the examined yeast strains.

Promotor	Drugi promotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
dr hab. inż. Hubert Cieśliński, prof. PG	dr hab. inż. Grzegorz Boczkaj, prof. PG



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Natalia Maria Filipowicz

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę na bezpłatne korzystanie z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej: **Izolacja i identyfikacja psychrotolerancyjnych szczepów drożdży z torfowiska Rucianka zdolnych do efektywnej biodegradacji fenolu w obecności tlenu oraz identyfikacja szlaku metabolicznego zaangażowanego w tym procesie w celu oceny potencjału biotechnologicznego badanych szczepów drożdży** do celów naukowych lub dydaktycznych.¹

Gdańsk, dnia

Świadomy(a) odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. z 2006 r., nr 90, poz. 631) i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2012 r., poz. 572 z późn. zm.),² a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem dr hab. inż. Hubertem Cieślińskim, prof. PG oraz drugim promotorem dr hab. inż. Grzegorzem Boczkajem, prof. PG.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami zgodnie z art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych. Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej, Pomorskiej Bibliotece Cyfrowej oraz poddawania jej procesom weryfikacji i ochrony przed przywłaszczeniem jej autorstwa.

Gdańsk, dnia

¹ Zarządzenie Rektora Politechniki Gdańskiej nr 34/2009 z 9 listopada 2009 r., załącznik nr 8 do instrukcji archiwalnej PG.

² Ustawa z dnia 27 lipca 2005 r. Prawo o szkolnictwie wyższym: Rozdział 7 Odpowiedzialność dyscyplinarna doktorantów, Art. 226.



Pragnę złożyć serdeczne podziękowania moim Promotorom, dr hab. inż. Hubertowi Cieślińskiemu oraz dr hab. inż. Grzegorzowi Boczkajowi za zaufanie, wiarę w moje możliwości i nieustanną motywację do pracy (również nad sobą).

Dziękuję również wszystkim Koleżankom i Kolegom za nieocenioną pomoc, wspianą atmosferę, wsparcie i poczucie, że razem tworzymy zespół. W szczególności dziękuję Martynie Mroczyńskiej, Agacie Terebieniec, Monice Wickiej-Grochockiej, Ewelinie Krajewskiej-Przybyszewskiej, Marcie Skwareckiej, Malwinie Momotko oraz dr hab. inż. Annie Brillowskiej-Dąbrowskiej.

Z całego serca pragnę podziękować Kamilowi, mojej Rodzinie i najbliższym Przyjaciółom – za podnoszenie na duchu, wszystkie ciepłe słowa i ogrom cierpliwości.

Mojej Mamie

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	7
ABSTRACT.....	8
WYKAZ TABEL.....	9
WYKAZ RYSUNKÓW.....	9
WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	10
1. WPROWADZENIE.....	11
2. PRZEGLĄD LITERATURY	12
2.1 Fenol	12
2.1.1 Toksyczność fenolu	13
2.1.2 Źródła fenolu w środowisku naturalnym	14
2.2 Metody usuwania fenolu ze ścieków	14
2.2.1 Fizykochemiczne metody usuwania związków fenolowych.....	15
2.2.2 Biologiczne metody usuwania związków fenolowych	16
2.3 Mikroorganizmy zdolne do biodegradacji fenolu	18
2.4 Torfowiska	20
2.4.1 Torf	20
2.4.2 Typy torfowisk	21
2.4.3 Struktura torfowisk.....	21
2.4.4 Mikroorganizmy izolowane z terenów torfowisk	22
2.5 Metody hodowli mikroorganizmów utylizujących fenol – wpływ represji katabolicznej na asymilację fenolu (jako źródła węgla) przez mikroorganizmy.....	23
2.6 Szlaki biodegradacji fenolu	25
2.6.1 Biodegradacja fenolu w warunkach beztlenowych	25
2.6.2 Biodegradacja fenolu w warunkach tlenowych.....	26
2.6.3 Charakterystyka dioksygenaz katecholowych	27
2.7 Kwas cis,cis-mukonowy – charakterystyka związku i zastosowanie przemysłowe	30
2.8 Przyczyny opracowania testu preselekcyjnego do wykrywania mikroorganizmów zdolnych do utylizacji katecholu jako jedynego źródła węgla	32
2.9 Katechol.....	34
3. CEL I ZAKRES BADAŃ	36
4. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	37
4.1 ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHENOL-DEGRADING PSYCHROTOLERANT YEASTS (ZAŁĄCZNIK NR 1)	38
4.2 A RAPID AND SIMPLE METHOD FOR SCREENING MICROORGANISMS WITH A POTENTIAL FOR CATECHOL BIODEGRADATION (ZAŁĄCZNIK NR 2).....	40
4.3 DETERMINATION OF PHENOL BIODEGRADATION PATHWAYS IN THREE PSYCHROTOLERANT YEASTS, <i>Candida subhashii</i> A01 ₁ , <i>Candida oregonensis</i> B02 ₁ AND <i>Schizoblastosporion starkeyi-henricii</i> L01 ₂ , ISOLATED FROM RUCIANKA PEATLAND (ZAŁĄCZNIK NR 3)	42

5. SUPLEMENT - BIODEGRADACJA KATECHOLU W PODŁOŻU PŁYNNYM PRZEZ DROŹDŻE <i>Candida subhashii</i> A01₁, <i>Candida oregonensis</i> B02₁ ORAZ <i>Schizoblastosporion starkeyi-henricii</i> L01₂.....	44
6. PODSUMOWANIE.....	48
7. BIBLIOGRAFIA.....	51
8. DOROBEK NAUKOWY	59
Projekty	59
Zgłoszenia patentowe.....	59
Przyznane patenty	59
Publikacje dotyczące tematyki rozprawy doktorskiej.....	59
Pozostałe publikacje	59
Materiały konferencyjne	60
Prezentacje ustne	60
Plakaty konferencyjne	60
Stypendia (inne niż Stypendium doktoranckie).....	61

STRESZCZENIE

Fenole to grupa toksycznych węglowodorów aromatycznych, a do głównych źródeł ich emisji do środowiska można zaliczyć przemysł chemiczny, procesy przeróbki węgla kamiennego i przemysł tekstylny. Pośród nich, fenol stanowi główne zanieczyszczenie gleb i wód spowodowane związkami fenolowymi.

W wyniku realizacji badań prowadzonych w ramach mojej rozprawy doktorskiej wykazałam, że torfowiska mogą stanowić miejsce izolacji mikroorganizmów zdolnych do wydajnej biodegradacji fenolu. Stąd istotnym osiągnięciem było opublikowanie pierwszej pracy wykazującej zdolność do biodegradacji fenolu przez psychrotolerancyjne drożdże torfowiskowe z gatunków *Candida subhashii*, *Candida oregonensis* oraz *Schizoblastosporion starkeyi-henricii*. Kontynuacja badań pozwoliła określić szlak biodegradacji fenolu wykorzystywany przez te szczepy drożdży oraz wykazać zdolność badanych drożdży do produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego. Po raz pierwszy wykazałam istotny wpływ dwóch alternatywnych sposobów prowadzenia hodowli na proces biodegradacji fenolu, prowadzonej przez badane drożdże.

Powyższe osiągnięcia, wraz z opracowaną nową metodą szybkiej identyfikacji mikroorganizmów o potencjale biodegradacyjnym względem katecholu oraz potencjalnie innych związków aromatycznych, m.in fenolu, powinny przyczynić się do rozwoju dyscypliny oraz badań nad zastosowaniem drożdży psychrotolerancyjnych w bioremediacji środowiska.

ABSTRACT

Phenols are toxic aromatic compounds and the main sources of them are chemical industry, coal conversion processes and textile industry. Among them, phenol is responsible for the major pollution of water and ground.

Summarizing the results I've obtained during my studies, I've pointed out that the peatlands are regions from which the microorganisms with the potential for effective phenol biodegradation may be isolated. I've selected three psychrotolerant yeast strains, characterized as *Candida subhashii*, *Candida oregonensis* and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* and for the first time, I've confirmed that they were able to perform the biodegradation of phenol. After conducting my studies, I was able to characterize the pathway of phenol biodegradation among these yeast strains and confirm their ability to produce *cis,cis*-muconic acid, including the influence of the differences in the culture conditions on this process. Moreover, I've proposed the new, rapid and simple method for screening microorganisms with a potential for biodegradation of catechol and other aromatic compounds (including phenol).

All of the results obtained during my studies may be used as a starting point for the further development of this scientific discipline and the further experiments on the use of the psychrotolerant yeasts in the bioremediation of the environment.

WYKAZ TABEL

Tab. 1 Właściwości fizykochemiczne fenolu

Tab. 2 Czas potrzebny do przeprowadzenia biodegradacji katecholu, do stężenia poniżej granicy detekcji metody GC-FID, przez szczepy drożdży torfowiskowych *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ i *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂

WYKAZ RYSUNKÓW

Rys. 1 Struktura cząsteczki fenolu

Rys. 2 Etapy biodegradacji związków aromatycznych

Rys. 3 Produkty rozszczepienia *orto*- i *meta*- katecholu oraz końcowe produkty szlaków metabolicznych *orto*- i *meta*-, wykorzystywanych przez mikroorganizmy podczas biodegradacji fenolu w obecności tlenu

Rys. 4 Struktura 1,2-dioksygenazy katecholowej pochodzącej ze szczepu *Acinetobacter* sp. ADP1 wraz z zaznaczeniem kolorystycznym poszczególnych domen

Rys. 5 Struktura 2,3-dioksygenazy katecholowej pochodzącej ze szczepu *Pseudomonas putida* mt-2

Rys. 6 Struktura cząsteczki kwasu *cis,cis*-mukonowego

Rys. 7 Przykłady węglowodorów aromatycznych, dla których katechol jest wspólnym produktem przejściowym szlaków biodegradacji

Rys. 8 Struktura cząsteczki katecholu

Rys. 9 Zależność zmiany wartości gęstości optycznej hodowli badanych szczepów drożdży od godziny prowadzenia hodowli, w której dokonano pomiaru tej wartości, dla szczepów *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ i *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

AOPs	Technologie Zaawansowanego Utleniania (<i>ang. Advanced Oxidation Processes</i>)
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe (<i>ang. Deoxyribonucleic acid</i>)
EC	Komisja Enzymatyczna (<i>ang. Enzyme Commission</i>)
EPA USA	Agencja Ochrony Środowiska (<i>ang. U.S. Environmental Protection Agency</i>)
GC	chromatografia gazowa (<i>ang. Gas Chromatography</i>)
GC-FID	chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (<i>ang. Gas Chromatography with Flame-Ionization Detector</i>)
GC-MS	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (<i>ang. Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
IRAC	Komitet ds. Odporności na Środki Owadobójcze (<i>ang. Insecticide Resistance Action Committee</i>)
ITS	wewnętrzna sekwencja niekodująca (<i>ang. Internal Transcribed Spacer</i>)
m/v %	stężenie procentowe masowo-objętościowe (<i>ang. mass/volume percent of solution</i>)
NADH ₂	zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (<i>ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced</i>)
OD	gęstość optyczna hodowli płynnej mikroorganizmów (<i>ang. Optical Density</i>)
OD ₆₀₀	gęstość optyczna hodowli płynnej mikroorganizmów mierzona przy długości fali 600 nm (<i>ang. Optical Density measured at wavelength of 600 nm</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>ang. Polymerase Chain Reaction</i>)
PET	poli(tereftalan etylenu) (<i>ang. Polyethylene terephthalate</i>)
rDNA	rybosomalne DNA (<i>ang. ribosomal DNA</i>)
UV	promieniowanie ultrafioletowe (<i>ang. Ultraviolet radiation</i>)
YNB w/a	podłoże mikrobiologiczne, nazwa własna (<i>ang. Yeast Nitrogen base without amino acids</i>)

1. WPROWADZENIE

Fenole należą do związków szeroko stosowanych w wielu gałęziach przemysłu. Stanowią zarówno substraty, jak i produkty reakcji chemicznych zachodzących w trakcie procesów technologicznych prowadzonych na skalę przemysłową. Cechują się podobną budową chemiczną i zbliżonymi właściwościami fizykochemicznymi.

Problem związany z użyciem fenoli na skalę przemysłową oraz z ich późniejszą obecnością w ściekach i odpadach przemysłowych wynika z faktu, iż charakteryzują się toksycznością, stąd stanowią zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz dla środowiska naturalnego. Do usuwania związków fenolowych w ściekach oraz skażonych glebach i wodach stosuje się różne podejścia, tj. wykorzystuje się w tym celu różne metody fizykochemiczne, jak również metody biologiczne, które bazują na zdolności wybranych gatunków mikroorganizmów do wydajnej biodegradacji tej grupy związków. W związku z tym, oprócz istniejących rozwiązań stosowanych do obniżenia stężeń związków fenolowych obecnych w ściekach przemysłowych, wciąż poszukuje się nowych rozwiązań, a racjonalna i bezpieczna gospodarka tymi odpadami jest tematyką wielu badań naukowych.

Ponadto wykorzystanie mikroorganizmów do rozwiązywania problemów wynikających z obecności w ściekach fenoli nie musi ograniczać się tylko do opracowywania nowych metod biodegradacji tych związków. Interesującą alternatywą jest wykorzystanie mikroorganizmów metabolizujących związki fenolowe także do biotechnologicznej produkcji związków mających zastosowanie przemysłowe, takich jak np. kwas *cis,cis*-mukonowy.

W związku z powyższym w kolejnym rozdziale przedstawiłam przede wszystkim informacje dotyczące obecnego stanu wiedzy w zakresie poruszonych tematów.

2. PRZEGLĄD LITERATURY

Fenole to grupa związków organicznych, charakteryzujących się toksycznością i zdolnością do akumulacji w glebie i wodach gruntowych. Obecność tych związków potwierdzana jest także w wodzie pitnej oraz w wodach opadowych (ATSDR, 2015).

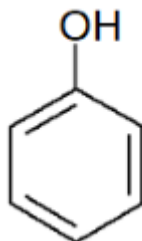
Poza naturalnymi źródłami fenoli, do głównych antropogenicznych źródeł ich emisji można zaliczyć przemysł chemiczny, procesy przeróbki węgla i przemysł tekstylny (Aleksieva i in., 2002). Mogą mieć one toksyczny wpływ na organizm człowieka, wywołowany poprzez kontakt z tymi związkami na drodze oddechowej, pokarmowej oraz przez skórę. Ponadto niektóre z nich, np. katechol, już nawet w niskich stężeniach wpływają negatywnie na środowisko naturalne oraz na organizmy ludzi i zwierząt (ATSDR, 2015).

W związku z tym wciąż poszukuje się efektywnych, a zarazem tanich metod, które umożliwią kontrolowaną redukcję ich stężeń w ściekach i odpadach przemysłowych.

2.1 Fenol

Fenol to organiczny związek chemiczny i zarazem najprostszy pod względem budowy przedstawiciel grupy fenoli. Wspólną cechą strukturalną wszystkich związków z tej grupy jest obecność przynajmniej jednej grupy hydroksylowej związanej bezpośrednio z jednym z sześciu atomów węgla o hybrydyzacji sp^2 , które tworzą pierścień aromatyczny. Ponadto dzięki obecności wiązań podwójnych (tzw. wiązań nienasyconych) cząsteczka przyjmuje strukturę płaską. W związku z tym, iż wartość kąta między wiązaniami C-C wynosi 120° , pierścień aromatyczny, pod względem geometrycznym, ma kształt sześciokąta foremnego (Morrison i Boyd, 1985).

Dzięki bezpośredniemu połączeniu pierścienia aromatycznego i grupy hydroksylowej (Rys. 1), związek cechuje się takimi właściwościami, jak: słaby charakter kwasowy oraz zdolność do tworzenia (z silnymi zasadami) związków fenolanowych.



Rys. 1 Struktura cząsteczki fenolu (opracowanie własne w programie ISIS Draw)

W temperaturze pokojowej fenol jest bezbarwnym lub białym, krystalicznym ciałem stałym. Pod wpływem światła oraz powietrza ulega częściowemu utlenieniu i zmienia swoją barwę na różową, brunatną lub czarną. Charakteryzuje się specyficznym zapachem. Najważniejsze właściwości fizykochemiczne fenolu zostały podane w tabeli (Tab. 1) (POCH, 2014).

Przemysłowo fenol otrzymuje się: a) ze smoły węglowej w wyniku ekstrakcji, b) poprzez utlenianie kumenu lub toluenu oraz c) w wyniku hydrolizy chlorobenzenu w fazie gazowej. Najpopularniejszą metodą jest utlenianie kumenu (ok. 95% produkcji w USA). Metodą mającą jedynie znaczenie historyczne jest „stapianie” kwasu benzenosulfonowego lub jego soli z wodorotlenkiem sodu lub potasu i zakwaszanie pozostałych fenolanów (CIOP, 2017).

Tab. 1 Właściwości fizykochemiczne fenolu (POCH, 2014)

Właściwości fizykochemiczne	
Forma	Krystaliczne ciało stałe
Kolor	Bezbarwna
Zapach	Ostry, słodkawy
pH	Ok. 5
Temp. topnienia [°C]	40,9
Temp. wrzenia [°C]	181,75
Temp. samozapłonu [°C]	605
Temp. zapłonu [°C]	75
Granice wybuchowości	dolna: 0,3% obj., górna: 2,4% obj.
Lepkość dynamiczna (45°C) [mPa·s]	4,036
Lepkość kinematyczna [mm²/s]	Brak danych
Ciśnienie par (20°C) [mbar]	0,2
Gęstość (20°C) [g/cm³]	1,07
Rozpuszczalność	w wodzie: 7,6% wag.
	w rozpuszczalnikach organicznych: rozpuszczany w eterze etylowym, alkoholu etylowym, glicerynie, chloroformie i benzynie
Stopień podziału woda/oktanol	1,46
Faktor biokoncentracji	7,6

2.1.1 Toksyczność fenolu

Fenol może ulec wchłonięciu do organizmu człowieka trzema drogami: drogą pokarmową, oddechową oraz przez skórę. Związek ten w stężeniu 1 gram na 1 kg masy ciała ma właściwości letalne dla ludzi oraz zwierząt, chociaż indywidualna tolerancja może być wyższa (ATSDR, 2015).

Połknięcie fenolu prowadzi do wymiotów, nudności oraz bólów brzucha. Połknięcie większych dawek prowadzi do obrzęku mózgu i płuc, a także uszkodzenia nerek i wątroby. Wdychanie oparów fenolu powoduje bóle głowy, pieczenie ust i gardła, pocenie się i nudności. Narażeni na taką formę ekspozycji odczuwają przyspieszenie oddechu i tętna, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń psychicznych, dezorientacji i drgawek. W przypadku kontaktu ze skórą fenol powoduje bezbolesne, ale groźne oparzenia. Mogą również powstać głębokie uszkodzenia skóry, czyli tzw. zgorzel fenolowa (EKOS, 2006).

Podsumowując, krótkotrwała ekspozycja na fenol może powodować przede wszystkim osłabienie mięśni, zaburzenia oddychania i koordynacji, podczas gdy długotrwała ekspozycja skutkuje poważnym uszkodzeniem organów: nerek, mózgu, wątroby, płuc i serca (ATSDR, 2015). Te patologiczne zmiany w organach powstają w wyniku utleniania lipidów, co przyczynia się do degradacji błon komórkowych. Ponadto związek działa drażniąco na skórę, powodując jej nekrozę. Uszkodzenia skóry wynikają z jej koagulacji, będącej efektem reakcji między fenolem a aminokwasami zawartymi w keratynie naskórka oraz fenolem i kolagenem obecnym w skórze właściwej (Clayton i Clayton, 1994).

W przeciwieństwie do powszechnie uznanej i dokładnie scharakteryzowanej toksyczności fenolu, ocena jego kancerogenności nie jest jednoznaczna. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) stwierdziła w 1999 r., że dowody na działanie rakotwórcze fenolu u ludzi i zwierząt są niewystarczające i zaliczyła związek do grupy 3. (czynnik niemożliwy do klasyfikacji z punktu widzenia działania rakotwórczego u ludzi) (IARC, 1999).

Pomimo tego należy mieć na uwadze, iż badania przeprowadzone na chemicznych fibroblastach wskazały jego właściwości mutagenne. Ponadto związek ten działa jako inhibitor w procesach syntezy i replikacji DNA w liniach komórkowych HeLa oraz blokuje działanie systemów naprawczych DNA w diploidalnych ludzkich fibroblastach (Painter i Howard, 1982).

Także inne fenole, nawet w niskich stężeniach (np. katechol), charakteryzują się wysoką toksycznością zarówno dla organizmu człowieka, jak i zwierząt. Odznaczają się wysoką aktywnością chemiczną, łatwym utlenianiem i stanowią poważne zagrożenie dla środowiska wodnego, m.in. wykazując szkodliwe działanie względem ryb, poprzez zdolność do akumulacji w ich mięsie, a takie mięso charakteryzuje się bardzo nieprzyjemnym smakiem i zapachem. Ponadto fenole wpływają na tzw. biologiczne procesy samooczyszczenia wód, powodując zakłócenia ich przebiegu (Puszkarewicz i in., 2015).

Podsumowując, uważa się, iż toksyczność związków fenolowych związana jest z dwoma procesami: niespecyficzną toksycznością wynikającą z hydrofobowości tych związków oraz ze zdolnością do formowania przez nie rodników fenoksylowych (Hansch i in., 2000).

2.1.2 Źródła fenolu w środowisku naturalnym

Spośród węglowodorów aromatycznych obecnych w odpadach przemysłowych, fenol należy do najczęściej występujących zanieczyszczeń środowiska spowodowanych ich emisją. Główną przyczyną detekcji fenolu w glebie czy wodzie są procesy technologiczne prowadzone w przemyśle chemicznym (np. produkcja pestycydów, farb i barwników), rafineriach i przemyśle tekstylnym (Aleksieva i in., 2002; Boczkaj i in., 2014, 2016). Ponadto fenol wykorzystywany jest jako surowiec podczas produkcji innych związków fenolowych, bisfenolu A, kwasu adypinowego i salicylowego, stosowanych w różnych gałęziach przemysłu (IARC, 1999).

Światowa produkcja fenolu to ok. 10 mln ton, gdzie ok. 3,3 mln ton związku produkuje się w Europie, 2,4 mln w Stanach Zjednoczonych i 0,2 mln w Rosji (Federal State Statistics, 2011). Do skażenia fenolem wód, gleb oraz powietrza dochodzi głównie w wyniku wycieków z instalacji przemysłowych bądź w wyniku niewłaściwej gospodarki odpadami zawierającymi związki fenolu. Ekspozycja ludzi na fenol zawarty w powietrzu wynika także z jego obecności w spalinach samochodowych oraz z wysokiego stężenia związków fenolowych w dymie papierosowym (ATSDR, 2015).

Fenol jest także produkowany podczas licznych procesów zachodzących w naturze. Jednym z nich jest kondensacja par wodnych, w wyniku której dochodzi do formowania się chmur. Powstaje także podczas biosyntezy przeprowadzanej przez rośliny oraz podczas rozkładu materii organicznej (ATSDR, 2015). Związek produkowany jest również z modyfikowanych aminokwasów, wchodzących w skład hemicelulozy roślin i jest uwalniany w wyniku reakcji między aminokwasami, a promieniowaniem UV (Davidson, 1996) oraz podczas trawienia tyrozyny w przewodzie pokarmowym ssaków (Tsuruta i in., 2000).

Fenol wykrywany jest także w wielu produktach żywnościowych. W stężeniu ok. 5 µg/kg występuje w miodzie. Jego obecność potwierdzana jest także w kawie (fenol powstaje w procesie jej palenia, w wyniku transformacji kwasu ferulowego) (Gyorik i in., 2003; Farah i Donangelo, 2006). W stosunkowo wysokim stężeniu, bo aż ok. 29 µg/kg związek wykryto w wieprzowym grillowanym mięsie. Alarmujące, ze względu na zdrowie człowieka, jest oznaczenie fenolu w stężeniu nawet 70 mg/kg w mięsach wędzonych. Ponadto związek występuje także w wielu produktach leczniczych, kosmetycznych i medycznych, takich jak płyny do płukania jamy ustnej, tabletki do ssania, płyny antyseptyczne i środki do dezynfekcji (Darisimall, 2006).

2.2 Metody usuwania fenolu ze ścieków

Jak już wspomniałam wcześniej, fenol i jego pochodne obecne są w ściekach pochodzących z różnych gałęzi przemysłu, przede wszystkim z przemysłu petrochemicznego i chemicznego. Ze względu na fakt, iż głównym sposobem transmisji fenolu do środowiska są ścieki, w konsekwencji największe zagrożenie dla organizmów zwierząt i ludzi stanowią wody skażone tym

związkiem. Ponadto negatywny wpływ fenolu i jego pochodnych na ekosystem wodny prowadzi do poszukiwania rozwiązań, które pozwolą na ich efektywne eliminowanie ze ścieków. Istnieje szereg metod pozwalających na ich usuwanie, a metody te podzielić można na dwie główne grupy: fizykochemiczne oraz biologiczne.

2.2.1 Fizykochemiczne metody usuwania związków fenolowych

Metody fizykochemiczne można podzielić na dwie podgrupy. Pierwszą z nich stanowią metody konwencjonalne, takie jak destylacja z parą wodną, ekstrakcja ciecz-ciecz, adsorpcja, ekstrakcja do fazy stałej i mokre utlenianie. Drugą grupę stanowią technologie zaawansowanego utleniania (*ang. Advanced Oxidation Processes, AOPs*), takie jak utlenianie elektrochemiczne, ozonowanie, fotoutlenianie, reakcja UV/H₂O₂, reakcja Fentona. Osobną grupę metod stanowią techniki izolacji za pomocą procesów membranowych (Villegas i in., 2016). Poniżej przedstawiłam więcej informacji o wybranych metodach.

Adsorpcja i ekstrakcja są technikami umożliwiającymi redukcję stężenia fenolu nawet w ilościach śladowych. Adsorpcja charakteryzuje się zarówno wysokimi kosztami prowadzonych procesów, jak i materiałów niezbędnych do ich przeprowadzania. Wciąż poszukuje się tańszych adsorbentów bądź możliwości modyfikacji tych już dostępnych, w celu zwiększenia wydajności procesu. Analiza dostępnej literatury i wyników przeprowadzonych badań prowadzi do wniosków, iż najbardziej skuteczną metodą fizykochemiczną usuwania fenolu ze ścieków jest adsorpcja na węglach aktywnych (aktywowanych) i wielu innych adsorbentach w formie granulowanej, włóknistej lub pylistej (Dąbrowski i in., 2005; Zhang i in., 2014).

W przypadku ekstrakcji ciecz-ciecz, zwanej także ekstrakcją konwencjonalną, dochodzi do ekstrakcji związku (bez jego przekształcenia) w szerokim zakresie stężeń. Uważa się, że metoda jest stosunkowo tania w porównaniu do innych metod fizykochemicznych (Mukherjee i De, 2014).

Procesy membranowe zaliczane są do metod wysoce niezawodnych oraz korzystnych pod względem ekonomicznym. Ich przeprowadzenie nie wymaga dużych nakładów energetycznych, a oczyszczanie ze związków fenolu jest niemal całkowite. Wadą procesów jest to, iż z czasem dochodzi do zanieczyszczenia membrany, a racjonalna gospodarka takim odpadem jest problematyczna.

Do procesów membranowych zalicza się procesy wykorzystujące reaktory, takie jak m.in. fotokatalityczne reaktory membranowe (*ang. Photocatalytic Membrane Reactors*) czy ekstrakcyjne reaktory membranowe (*ang. Extractive Membrane Reactors*) (Khazaali i in., 2014; Mohammadi i in., 2015).

Utlenianie chemiczne polega na przekształceniu związków fenolowych do innych związków chemicznych. Koszty energii oraz reagentów niezbędnych do przeprowadzenia procesów są niskie. Najczęściej wykorzystywanymi reagentami są ozon, chlor i nadtlenek wodoru (Villegas i in., 2016).

Utlenianie elektrochemiczne jest alternatywnym sposobem usuwania fenoli poprzez przekształcenie ich do innych związków chemicznych. Metoda nie wymaga nakładów finansowych na odczynniki, ale jest procesem wysoce kosztownym pod względem stosowanych w nim urządzeń oraz zużycia energii podczas jego przeprowadzania. Proces polega na adsorpcji utlenianych związków fenolowych na powierzchni anody, a najczęściej stosowanymi materiałami do tworzenia anody są Pt, PbO₂, SnO₂ oraz IrO₂ (Villegas i in., 2016).

Podsumowując, główną powtarzającą się wadą wielu metod fizykochemicznych jest produkcja wysokotoksycznych produktów ubocznych, często charakteryzujących się toksycznością zbliżoną lub wyższą niż pierwotnie usuwany związek fenolowy (Wang i in., 2000). Ponadto metody te często nie skutkują całkowitym usunięciem związku, a jedynie ograniczeniem jego stężenia w ściekach. Korzystanie z tych metod często wiąże się również z wysokim zużyciem energii (co

w konsekwencji zwiększa emisję gazów cieplarnianych), przez co metody te mogą być uważane za nieekonomiczne i nieekologiczne (Villegas i in., 2016).

Dodatkowo każda z metod charakteryzuje się indywidualnymi ograniczeniami, takimi jak np. możliwością usuwania tylko jednego typu zanieczyszczeń, wysokimi kosztami złóż i odczynników, możliwością produkcji toksycznych gazów, ograniczoną wytrzymałością mechaniczną aktywowanego węgla oraz wysokimi kosztami regeneracji sorbentu (Banat i in., 2000; Aravindhana i in., 2009; Siva Kumar i in., 2009).

2.2.2 Biologiczne metody usuwania związków fenolowych

Alternatywą dla powszechnie stosowanych fizykochemicznych metod usuwania fenolu lub innych związków fenolowych ze ścieków, są metody biologiczne. Metody biologiczne to przede wszystkim procesy usuwania fenolu (lub związków fenolowych), wykorzystujące mikroorganizmy zdolne do jego biodegradacji lub procesy wykorzystujące do tego celu enzymy zdolne do biotransformacji fenolu i innych związków fenolowych.

2.2.2.1 Metody enzymatyczne

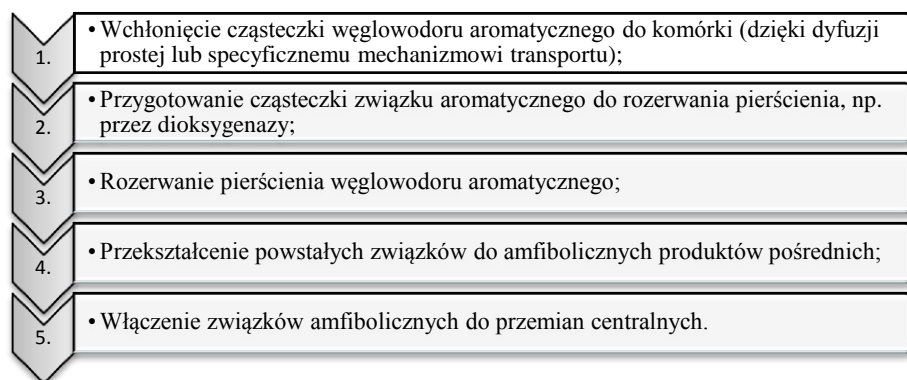
Metody enzymatyczne wykorzystują enzymy jako biokatalizatory reakcji, w wyniku których dochodzi do biotransformacji fenolu i związków fenolowych. Enzymami najczęściej stosowanymi w technikach usuwania fenolu na drodze biotransformacji są oksydoreduktazy, a w szczególności lakazy, tyrozynazy i peroksydazy. W wyniku działania tych enzymów fenol ulega polimeryzacji, co w konsekwencji prowadzi do powstania dużych cząsteczek, które łączą się w aglomeraty. Powstanie aglomeratów prowadzi do ich precypitacji, a w konsekwencji do usunięcia fenolu z roztworów zawierających ten związek (Villegas i in., 2016).

Techniki enzymatyczne stosowane są zazwyczaj jako metody wstępnie oczyszczające ze związków toksycznych bądź stosowane są w kombinacji z innymi metodami biologicznymi, co pozwala na większą wydajność procesu oczyszczania (Villegas i in., 2016).

Głównymi zaletami metod enzymatycznych są łatwość kontroli procesu, możliwość prowadzenia procesu w szerokim spektrum stężeń zredukowanych związków oraz w szerokim zakresie pH. Wadą tych metod jest przede wszystkim możliwość zbyt szybkiej inaktywacji enzymów, co ogranicza wydajność procesu usuwania wybranych związków, np. fenolu. Jednakże, w celu ograniczenia tego problemu stosuje się ochronne substancje dodawane wraz z enzymami do mieszaniny reakcyjnej, takie jak np. Triton X-100 (Villegas i in., 2016). Ponadto opłacalność prowadzenia procesów enzymatycznych uzależniona jest od kosztów produkcji enzymów, a w przypadku dużej skali procesu, także od dostępności w odpowiedniej ilości enzymów niezbędnych do prowadzenia procesu.

2.2.2.2 Metody wykorzystujące mikroorganizmy – biodegradacja fenolu i związków fenolowych

Oczyszczanie biologiczne (biodegradacja) jest jedną z powszechnie stosowanych metod oczyszczania ścieków z obecnych w nich związków toksycznych. Metoda ta jest stosunkowo tania, a przede wszystkim prosta do zaprojektowania i przeprowadzenia. W wyniku oczyszczania biologicznego toksyczne związki, np. węglowodory aromatyczne (w tym też fenole), przekształcane są w proste produkty końcowe. Ogólny proces biodegradacji związków aromatycznych przedstawiłam na Rys. 2.



Rys. 2 Etapy biodegradacji związków aromatycznych (na podstawie (Kwapisz, 2006))

Biodegradacja jest coraz częściej nie tylko rozważana, ale także badana jako metoda usuwania związków toksycznych, takich jak fenol i inne związki fenolowe. W praktyce proces biodegradacji może być realizowany z użyciem różnych rozwiązań technologicznych. Przykładowo proces ten może być przeprowadzany z użyciem biofiltrów (dla usuwania toksycznych zanieczyszczeń powietrza związkami aromatycznymi) (Woertz i in., 2001; Qi i in., 2002; García-Peña i in., 2008), bioreaktorów dla oczyszczania ścieków i wód (Järvinen i in., 1994; Puhakka i in., 1995; Juárez-Ramírez i in., 2001), bioremediacji dla zanieczyszczonych wód oraz gleby (Puhakka i in., 1995; Cordova-Rosa i in., 2009), a także atenuacji dla zanieczyszczonych wód i gleb (Holder i in., 1999; Broholm i Arvin, 2000).

Usuwanie fenolu z zanieczyszczonych gleb i wód może zostać przeprowadzone przede wszystkim w warunkach tlenowych, gdzie w procesie biodegradacji dany węglowodór, np. fenol, stanowi źródło węgla niezbędne do wzrostu mikroorganizmów. Głównymi zaletami procesu biodegradacji fenolu, w porównaniu do wcześniej wspomnianych metod fizykochemicznych używanych do tego celu, jest brak ryzyka powstawania szkodliwych produktów końcowych oraz możliwość biodegradacji fenolu w pozostałych ściekach poniżej jego poziomu toksyczności (Wang i in., 2000).

2.2.2.3 Oporność na związki toksyczne z grupy węglowodorów aromatycznych

Mikroorganizmy wykształciły szereg mechanizmów adaptacyjnych umożliwiających im przezwycięzenie toksycznego wpływu węglowodorów aromatycznych na ich komórki, co w konsekwencji pozwala na przeprowadzenie procesu ich biodegradacji i wykorzystanie przez mikroorganizmy tych związków jako źródło węgla i energii.

Głównym mechanizmem adaptacyjnym jest zmiana w składzie kwasów tłuszczowych obecnych w fosfolipidach błony komórkowej, wynikająca z izomeryzacji nienasyconych kwasów tłuszczowych do kwasów *trans*- (Neumann i in., 2004). Ponadto potwierdzono związek między obecnością węglowodorów aromatycznych w środowisku życia mikroorganizmów a aktywacją w ich komórkach systemów związanych ze stresem komórkowym (Le i in., 2006).

Kolejnym sposobem, wykorzystywanym przez mikroorganizmy w celu minimalizacji toksycznego wpływu związków aromatycznych, są energozależne pompy, które odpowiadają za utrzymanie niskiego stężenia substancji toksycznych we wnętrzu komórek (Guzik i in., 2008).

Następny mechanizm wykorzystuje zmienność płynności warstwy fosfolipidowej w błonie komórkowej. Prawdopodobnie dzięki hydrofobowemu regionowi, dioksygenazy intradiolowe (dioksygenazy 1,2-katecholowe) mają zdolność do wiązania fosfolipidów błony komórkowej lub fosfolipidów nowo zsyntetyzowanych w komórkach. Dzięki temu dochodzi do uwalniania

z błony hydrofobowych węglowodorów aromatycznych i ich wiązania w centrum aktywnym enzymu. W wyniku tego procesu wzrasta sztywność błony komórkowej, co zmniejsza jej przepuszczalność w stosunku do toksycznych związków z grupy węglowodorów aromatycznych (Guzik i in., 2008).

2.3 Mikroorganizmy zdolne do biodegradacji fenolu

Fenol jest związkiem wykazującym działanie toksyczne w stosunku do wielu mikroorganizmów. Jednakże dostępne wyniki badań wskazują na coraz większą liczbę izolatów mikroorganizmów nie tylko opornych na jego działanie, a nawet zdolnych do jego efektywnej biodegradacji. Dzięki temu w ostatnich latach prowadzonych jest wiele badań nad poszukiwaniem, identyfikacją oraz oceną potencjału aplikacyjnego mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji fenolu, jak również innych związków z grupy fenoli (Juárez-Ramírez i in., 2001; Margesin i in., 2005; Yan i in., 2005; Jiang i in., 2008; You i in., 2013).

Usuwanie fenolu z gleb oraz odpadów płynnych możliwe jest dzięki tlenowej biodegradacji, podczas której mikroorganizmy wykorzystują fenol jako jedyne źródło węgla i energii. W momencie przystępowania do badań analiza dostępnej literatury wskazywała na częste poszukiwanie do tego procesu mikroorganizmów pochodzących z próbek pobranych z terenów potencjalnie zanieczyszczonych fenolem. Przykładem mogą być badania, w których poszukiwano mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji fenolu w próbkach gleb alpejskich, zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi (Margesin i in., 2005), ścieków obecnych w linii brzegowej Oceanu Indyjskiego (Sivasubramanian i Namasivayam, 2015), ścieków z rafinerii (Rocha i in., 2007) i ścieków z koksowni (Karimi i in., 2016).

2.3.1 Bakterie zdolne do biodegradacji fenolu

Większość badań dotyczących biodegradacji fenolu skupia się na wykorzystaniu w tym procesie bakterii. Najczęściej badanymi bakteriami są bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas*, zwłaszcza często badany gatunek *Pseudomonas putida* (Bettmann i Rehm, 1984; Hinteregger i in., 1992; Hill i in., 1996; Götz i Reuss, 1997; Morasch i in., 2002; Reardon i in., 2002; Wang i in., 2008; You i in., 2013) oraz inne należące do tego samego rodzaju, tj. *Pseudomonas aeruginosa* (Oboirien i in., 2005; Ojumu i in., 2005), *Pseudomonas fluorescens* (Oboirien i in., 2005), *Pseudomonas pictorum* (Annadurai i in., 2002) oraz *Pseudomonas resinovorans* (Yang i Lee, 2007). Ponadto enzymy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* uczestniczące w biodegradacji fenolu uważane są za niespecyficzne, co pozwala na równoczesną biodegradację kilku strukturalnie podobnych związków (Hannaford i Kuek, 1999; Monteiro i in., 2000; Banerjee i in., 2001; Abuhamed i in., 2004). Pomimo wspomnianej niespecyficzności substratowej enzymów uczestniczących w biodegradacji fenolu w bakteriach z rodzaju *Pseudomonas* uważa się, że zapewniają one bardzo wydajny przebieg procesu biodegradacji fenolu (Morasch i in., 2002; Reardon i in., 2002).

Poza bakteriami z rodzaju *Pseudomonas*, wśród mikroorganizmów bakteryjnych zdolność do biodegradacji fenolu wykazano w przypadku m.in. *Acinetobacter* spp. (Paller i in., 1995; Abd-El-Haleem i in., 2003), *Alcaligenes eutrophus* (Léonard i Lindley, 1998), *Arthrobacter* spp. (Vijayaraghavan i in., 1995), *Bacillus stearothermophilus* (Buswell, 1975), *Nocardioides* sp. NSP41 (Cho i in., 2000) i *Ralstonia eutropha* (Léonard i in., 2000).

2.3.2 Drożdże zdolne do biodegradacji fenolu

Wśród drożdży gatunkiem wykazującym zdolność do biodegradacji fenolu w szerokim zakresie stężeń jest *Candida tropicalis* (Yan i in., 2005; Rocha i in., 2007). Ponadto

badania dotyczące biodegradacji fenolu wskazały na możliwość wykorzystania w tym celu także szczepów drożdży należących do m.in. *Fusarium flocciferum* (Anselmo i in., 1985; Mendonça i in., 2004), *Trichosporon cutaneum* (Gaal i Neujahr, 1981), *Rhodotorula* spp. i *Trichosporon* spp. (Kurtz i Crow, 1997; Sampaio, 1999).

2.3.3 Mikroorganizmy zimnolubne w procesie biodegradacji fenolu

Większość badań dotyczących biodegradacji fenolu skupia się na mikroorganizmach mezofilnych (Chakraborty i in., 2010; Boroujeni i in., 2014). Jednakże ze względu na fakt, iż temperatura wód i gleb większości rejonów świata jest niższa niż temperatura niezbędna do efektywnego wzrostu organizmów mezofilnych (Bergauer i in., 2005), w ostatnich latach rośnie liczba badań, w których poszukuje się mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji fenolu pośród mikroorganizmów zimnolubnych, dla których zakres temperatur wzrostu wynosi 0–35°C (Keenleyside, 2019).

Zespół pod kierownictwem Kotturi (1991) wykazał zdolność do biodegradacji fenolu przez psychrofilny szczep bakterii *Pseudomonas putida* Q5, wyizolowany z Jeziora Ontario. Margesin i współpracownicy (2004) opisali zimnolubny szczep bakterii *Arthrobacter* sp. AGG31 wyizolowany z jaskini lodowej z Salzburga (Austria) zdolny do biodegradacji fenolu, a także innych związków z grupy fenoli, jak *o*- i *m*-krezolu, katecholu i hydrochinonu. Sepehr i współpracownicy (2019) wykazali zdolność do biodegradacji fenolu przeprowadzanej przez psychrotolerancyjne szczepy bakterii należące do rodzajów *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* oraz *Shinella*, wyizolowanych z próbek pobranych z terenów alpejskich w Iranie. Tengku-Mazuki i współpracownicy (2020) zbadali proces biodegradacji fenolu dla szczepu bakterii należącego do rodzaju *Rhodococcus*, wyizolowanego z próbki pobranej z terenów Antarktycznych (Wyspa Króla Jerzego).

W przypadku badania potencjału drożdży psychrotolerancyjnych do biodegradacji fenolu, analiza dostępnej literatury dostarcza mniej danych niż w przypadku bakterii. W badaniach Bergauer (2005) opisano zdolność do biodegradacji 18 monoaromatycznych węglowodorów będących pochodnymi fenolu przez zimnolubne i psychrotolerancyjne szczepy drożdży należące do gatunków *Cryptococcus terricola*, *Rhodotorula lusitaniae*, *Rhodotorula creatinivora*, *Rhodotorula ingeniosa*, *Mastigobasidium intermedium* i *Sporobolomyces roseus* oraz podklasy *Microbotryomycetidae*, które wyizolowane zostały z próbek pobranych z terenów alpejskich, tj. kopalni łupków naftowych oraz torowiska linii kolejowej w Brenner (Austria). 100% badanych szczepów wykazywało zdolność do biodegradacji fenolu, 91% do biodegradacji hydrochinonu, a 75% do biodegradacji katecholu.

Margesin (2007) zidentyfikowała trzy nowe gatunki drożdży psychrotolerancyjnych: *Rhodotorula psychrophila*, *Rhodotorula psychrophenolica* oraz *Rhodotorula glacialis*, wyizolowane kolejno z torów jednej z alpejskich linii kolejowych, z rejonu rozmrażania lodowca oraz z lodowcowych kriokonitów, które wykazywały zdolność do biodegradacji fenolu w szerokim spektrum stężeń.

Fernandez (2017) dokonał izolacji drożdży psychrotolerancyjnych zdolnych do biodegradacji fenolu, a szczepy te pochodziły zarówno z terenów naturalnych, nieskażonych działalnością człowieka, jak i z terenów potencjalnie skażonych działalnością człowieka. Próbkę pobierane były z okolic Argentyńskiej Stacji Badawczej na Wyspie Króla Jerzego (Antarktyka), a miejscami ich poboru były m.in. tereny jadalni stacji badawczej, miejsca tankowania paliwa oraz tereny plaż, które nie były poddawane stałej działalności człowieka.

Ponadto jednym z czynników wpływających na ukierunkowanie badań realizowanych podczas pracy doktorskiej, dotyczących badań potencjału psychrotolerancyjnych drożdży do biodegradacji fenolu, była konkluzja zawarta w jednej z prac Margesin i współpracowników

(2003). W cytowanej pracy zwrócono uwagę na drożdże wyizolowane z terenów zimnych jako na organizmy charakteryzujące się większą wszechstronnością w biodegradacji tzw. ropopochodnych węglowodorów aromatycznych w porównaniu z organizmami mezofilnymi.

2.4 Torfowiska

Kluczowym aspektem planowania badań dotyczących opracowania biologicznej metody biodegradacji fenolu jest wybór miejsca izolacji mikroorganizmów, które docelowo mają znaleźć zastosowanie w takim procesie. Podstawowe kryteria, którymi kierowałam się przy wyborze drożdży psychrotolerancyjnych jako interesujących mikroorganizmów do prowadzenia procesu biodegradacji fenolu (oraz, jak zostanie później zaznaczone, możliwego procesu jego biotransformacji do kwasu *cis,cis*-mukonowego) omówiłam we wcześniejszych rozdziałach mojej rozprawy doktorskiej.

Po wybraniu drożdży psychrotolerancyjnych, kolejnym kryterium poszukiwania mikroorganizmów o potencjale biodegradacyjnym względem fenolu było wybranie nowego miejsca ich izolacji, które nie było dotąd badane pod tym kątem lub badane było w bardzo ograniczonym stopniu.

Po analizie dostępnej literatury wybrałam torfowiska, w których stwierdzono obecność fenolu i jego pochodnych jako produktów powstałych na skutek rozkładu biomasy zachodzącego w tym środowisku (Pind i in., 1994; Freeman i in., 2004). Co ważne, jak zostanie to przedstawione szerzej w dalszej części tego rozdziału, bioróżnorodność oraz potencjał biotechnologiczny mikroorganizmów torfowiskowych są, w mojej ocenie, wciąż bardzo słabo poznane. W związku z tym, w wyborze torfowiska jako źródła drożdży psychrotolerancyjnych do przeprowadzenia badań w ramach pracy doktorskiej, dostrzegłam dużą możliwość wniesienia nowości naukowej w zakresie badań nad biologicznymi metodami usuwania fenolu zawartego w ściekach oraz zanieczyszczającego gleby i środowisko wodne. Poniżej przedstawiłam, w moim przekonaniu, swoiste „kompilum wiedzy” dotyczące torfowisk, ich tworzenia i mikroorganizmów izolowanych dotąd z tego źródła.

2.4.1 Torf

Torf tworzy się poprzez gromadzenie szczątków roślin i zwierząt w warunkach o dużym stopniu wilgotności. Rozkład następuje w warunkach ograniczonego dostępu tlenu i nie jest całkowity. Różne elementy roślin biorą udział w tworzeniu się torfu, a najczęściej w procesie tym biorą udział liście, elementy zdrewniałe i korzenie (Rydin i Jeglum, 2015). Do akumulacji torfu dochodzi, gdy na danym obszarze rozkład szczątków organicznych następuje wolniej niż ich powstawanie. Spowolnienie tempa rozkładu wynika z dwóch głównych czynników, którymi są niska temperatura i małe napowietrzenie podłoża. Warto zauważyć, że względu na charakter prowadzonych przeze mnie badań, że niska temperatura podczas rozkładu materii organicznej wskazuje na możliwość zaangażowania mikroorganizmów zimnolubnych w proces powstawania torfu (Rydin i Jeglum, 2015).

Gromadzenie się martwej materii organicznej w procesie powstawania torfu powoduje, że torfowiska nazywane są czasami „magazynami” węgla. Ilość węgla zmagazynowanego w torfowiskach jest dwukrotnie większa niż w biomase wszystkich lasów świata, mimo że torfowiska zajmują jedynie 3% powierzchni łądów (Parish i in., 2008). Ponadto torf magazynuje także dwa inne kluczowe pierwiastki biogenne, tj. azot i fosfor.

Termin torfowisko odnosi się do terenu pokrytego torfem, a minimalna głębokość warstwy torfowej to 40 cm (wymagania dla Kanady) bądź 30 cm (wymagania dla większości rejonów świata). W Polsce występuje ok. 50 tysięcy torfowisk, zajmujących łącznie około 12 500 km², co

stanowi 4% całej powierzchni kraju (Okruszko, 1996). Wśród torfowisk wyraźnie dominują torfowiska niskie (95% całkowitej powierzchni wszystkich torfowisk), co wynika z uwarunkowań klimatycznych Polski.

2.4.2 Typy torfowisk

Istnieje wiele różnych systemów klasyfikacji typów torfowisk, natomiast najczęściej stosowanym jest podział torfowisk ze względu na sposób zasilania przez wodę i składniki odżywcze. Wyróżnia się:

- Torfowiska niskie

znajdują się przede wszystkim w dolinach rzecznych, zasilane są przez wody gruntowe i płynące o ruchu poziomym. Bogate są w węglan wapnia i uznawane za eutroficzne. Ich odczyn jest słabo kwaśny do lekko zasadowego. Na ich terenach powstają szuwary, zbiorowiska mszysto-turzycowe, łąki, zbiorowiska leśne i krzewiaste (Ilnicki i Żurek, 1996).

- Torfowiska wysokie

znajdują się na terenach nieprzepuszczalnych dla wody, zasilane są jedynie wodami opadowymi. Powstają zazwyczaj na wododziałach i wzniesieniach terenu. Ubogie są w węglan wapnia i uznawane za oligotroficzne. Ich odczyn jest kwaśny. Na ich terenach rozwijają się przede wszystkim mchy, ze znaczącą dominacją mchów torfowców, co w konsekwencji prowadzi do powstania mszar. Torfowiska wysokie powstające w klimacie wilgotnym przybierają kształt wypukły. Nazywane są torfowiskami kopułowymi lub bałtyckimi (Herbichowa i in., 2007).

- Torfowiska przejściowe

znajdują się na terenach, gdzie proporcja pomiędzy wodami opadowymi a wodami powierzchniowymi (lub podziemnymi) jest wyrównana. To najrzadziej spotykany typ torfowisk, posiadający cechy zarówno torfowiska niskiego, jak i wysokiego. Na ich terenach występują przede wszystkim mchy torfowce, które mają tendencje do tworzenia struktur pływających kozuchów (tzw. pło), co stanowi podłoże do rozwoju innych mchów i roślin. Powierzchnia torfowisk przejściowych może być płaska, a nawet wklęsła (Mróz, 2012).

2.4.3 Struktura torfowisk

Ze względu na fakt, iż torfowiska zawierają torf, heterologiczny produkt częściowego rozkładu biomasy roślinnej, pełnią istotną funkcję w obiegu węgla w przyrodzie. Wstępny rozkład obumarłej masy roślinnej i równoczesne tworzenie torfu zachodzi głównie z udziałem grzybów w warstwie akrotelmowej oraz bakterii w warstwie katotelmowej. Skład chemiczny i właściwości torfu różnią się w zależności od głębokości, z której pobiera się jego próbki oraz od samego miejsca poboru, gdyż specyfika torfowiska zależy zarówno od roślin tworzących obumarłą biomasę, jak i od stopnia jej rozkładu (Rydin i Jeglum, 2015).

2.4.3.1 Akrotelm

Akrotelm jest górną (powierzchniową) żywą i aktywną częścią torfu o głębokości około 0,5–0,7 m. Charakteryzuje się zmienną zawartością wody i dostępnością tlenu. Warstwa ta jest bardzo zróżnicowana pod względem budowy. Jej górną część tworzą przede wszystkim darnie utworzone z przylegających do siebie łądzynek torfowców, a jej struktura jest luźna, z wieloma przerwami, które nie są wypełnione wodą. Poniżej tej warstwy znajduje się częściowo obumarły materiał roślinny, a pod nim coraz bardziej zwarta masa szczątków roślinnych i humusu (Herbichowa i in., 2007).

Ze względu na dostępność tlenu w tej warstwie, akrotelm charakteryzuje się dużą aktywnością mikrobiologiczną, co w konsekwencji prowadzi do rozkładu i mineralizacji materii organicznej. Ponadto stopień rozkładu materii zwiększa się w najniższych partiach akrotelmu i to właśnie tam ostatecznie formuje się torf. W wyniku zwiększającego się nacisku biomasy torf stopniowo przechodzi do coraz głębszych warstw, aż ostatecznie przechodzi do warstwy katotelmowej (Herbichowa i in., 2007).

Podsumowując, bazując na informacjach dotyczących struktury torfowisk, a także w związku z dużą aktywnością mikrobiologiczną oraz z dostępnością tlenu w warstwie akrotelmowej, ważnego dla wydajnego przebiegu procesu biodegradacji fenolu, próbki torfu i wody użyte do izolacji drożdży psychrotolerancyjnych zdolnych do utylizacji fenolu zostały pobrane z akrotelmu torfowiska Rucianka.

2.4.3.2 Katotelm

Katotelm jest dolną częścią w dwuwarstwowym modelu torfowiska. Jest pozbawiony tlenu i stale nasycony wodą, może zawierać metan i siarkowodór oraz stanowi większość kopuły torfowiska. Katotelm nazywany jest martwą częścią torfowiska (uwzględniając stopień aktywności mikrobiologicznej między tą warstwą, a warstwą akrotelmu), a rozkład biomasy zachodzi jedynie z udziałem nielicznych mikroorganizmów beztlenowych (Herbichowa i in., 2007).

2.4.3.3 Zarys procesów biologicznych odpowiedzialnych za formowanie torfowisk

Sam proces rozkładu biomasy roślinnej w warstwie akrotelmowej przeprowadzany jest głównie przez różne grupy grzybów, między którymi dochodzi do wielu wzajemnych oddziaływań. Zazwyczaj jedna grupa wykorzystuje jako składniki odżywcze jedynie pewną grupę związków, przekształcając je w takie, które mogą stać się substratem przydatnym do wzrostu dla komórek kolejnej grupy mikroorganizmów. Między mikroorganizmami występują także działania antagonistyczne oraz konkurencyjne, które również mają wpływ na skład torfu (Tokumasu, 1994; Lumley i in., 2001; Thormann i in., 2003, 2004). Rozkład biomasy roślinnej i tworzenie torfowisk jest procesem trzyetapowym. Rozpoczyna się wyflukaniem rozpuszczalnej frakcji organicznej, po której następuje utrata masy roślinnej, następująca w wyniku asymilacji materii organicznej przez mikroorganizmy lub zwierzęta. Ostatni etap polega na zmianie struktury biomasy wraz z jednoczesną zmianą składu chemicznego pozostałej frakcji organicznej (Clymo, 1983).

2.4.4 Mikroorganizmy izolowane z terenów torfowisk

2.4.4.1 Bakterie

Różnorodność gatunków bakterii izolowanych z terenów torfowisk jest bardzo duża. W zależności od typu torfowiska czy też położenia geograficznego, a nawet głębokości, z których pobierano próbki torfu, bioróżnorodność wyizolowanych gatunków jest znacząca. Rodzajami bakterii dominujących wśród izolatów uzyskanych z próbek pobranych z torfowisk są: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Cytophaga*, *Micrococcus*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Micromonospora* oraz *Nocardia* (Williams i Crawford, 1983).

2.4.4.2 Grzyby strzępkowe

Wśród grzybów strzępkowych wyizolowanych z terenów torfowisk dominują takie rodzaje jak: *Penicillium*, *Acremonium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* (Thormann, 2006).

2.4.4.3 Drożdże

Pomimo izolacji i identyfikacji wielu gatunków grzybów z terenów torfowisk, bardzo mało badań poświęcono izolacji, identyfikacji i charakterystyce drożdży i grzybów drożdżopodobnych. W dostępnych bazach literatury naukowej, zgodnie z moją wiedzą, w momencie rozpoczynania badań znajdowało się jedynie kilkanaście publikacji dotyczących drożdży torfowiskowych i zaledwie kilka, w których dokonano chociażby ich wstępnej identyfikacji taksonomicznej. Do gatunków drożdży wyizolowanych z próbek pobranych z terenów torfowisk, zalicza się: *Cryptococcus*, *Candida*, *Pichia* i *Rhodotorula* (Thormann i in., 2007).

Ponadto przeprowadzona analiza literatury wskazała, iż drożdże wyizolowane z torfowisk są zdolne do biodegradacji prostych i złożonych cukrów (np. maltozy, maltotriozy, trehalozy i galaktozy), kwasów organicznych (np. kwasu glukonowego, kwasu maleinowego), alkoholi cukrowych (np. mannitolu, arabitolu, glicerolu, sorbitolu), aminokwasów i glikozydów (Thormann i in., 2007). Jednakże, w przypadku złożonych polimerów, takich jak celuloza, pektyna czy lignina nie potwierdzono zaangażowania drożdży w procesy ich biodegradacji (Barnett i in., 1983; Chernov 1985). Nie odnotowano także publikacji badających zdolność drożdży torfowiskowych do biodegradacji fenolu czy innych węglowodorów monoaromatycznych, pomimo że ten węglowódor aromatyczny i jego pochodne występują w torfowiskach jako produkt rozkładu biomasy lignocelulozowej (Pind i in., 1994; Freeman i in., 2004).

2.5 Metody hodowli mikroorganizmów utylizujących fenol – wpływ represji katabolicznej na asymilację fenolu (jako źródła węgla) przez mikroorganizmy

Jak zostało to przedstawione rozdziale 3, jednym z celów pracy doktorskiej była wstępna ocena wpływu warunków prowadzenia hodowli badanych psychrotolerancyjnych torfowiskowych drożdży na biodegradację fenolu oraz, w przypadku detekcji szlaku *orto-*, na produkcję kwasu *cis,cis*-mukonowego. Działanie to było podyktowane wynikiem analizy literatury dotyczącej sposobu prowadzenia hodowli w badaniach nad biodegradacją węglowodorów aromatycznych przez mikroorganizmy, która dostarczyła informacji o dwóch głównych metodach przygotowywania inokulum. Zasadnicza różnica pomiędzy obiema metodami przygotowywania inokulum wynika z uwzględniania lub pomijania możliwego wpływu represji katabolicznej na asymilację źródeł węgla obecnych w pożywce (badanych węglowodorów aromatycznych, np. fenolu) w obecności łatwiej przyswajalnego źródła węgla, którym najczęściej jest glukoza. Poniżej przedstawiłam bardzo krótką charakterystykę obu wspomnianych metod oraz krótki przegląd opublikowanych wyników dotyczących badania zdolności wybranych mikroorganizmów do przyswajania fenolu jako jedyne źródła węgla.

Pierwsza z metod uwzględnia tzw. etap głodzenia komórek. W metodzie tej komórki badanego mikroorganizmu, przed wprowadzeniem ich jako inokulum do podłoża zawierającego badany węglowódor jako jedyne źródło węgla, poddawane są procesowi głodzenia, a więc inkubowane w podłożu minimalnym, które nie zawiera żadnego źródła węgla. W badaniach prowadzonych przez Fialová i współpracowników (2004) mikroorganizmy hodowane były w podłożu minimalnym do uzyskania fazy eksplotencjalnej, co powinno umożliwić im wykorzystanie do wzrostu dostępnych materiałów zapasowych zgromadzonych w ich komórkach. Dopiero tak przygotowane inokulum służyło jako materiał do kolejnej hodowli, gdzie badane

związki aromatyczne stanowiły jedyne źródło węgla. W badaniach prowadzonych przez Margesin (2004) mikroorganizmy również preinkubowano w podłożu minimalnym (bez dodatku glukozy) i tak przygotowane inokulum wykorzystywano w dalszych badaniach.

Drugim często stosowanym sposobem przygotowywania inokulum jest hodowla mikroorganizmów w podłożu zawierającym glukozę. Tak wstępnie przygotowane inokulum przenoszone jest do podłoża minimalnego, zawierającego badany związek jako jedyne źródło węgla (Yan i in., 2005; Jiang i in., 2008). W przeciwieństwie do pierwszej metody, zastosowanie pożywki zawierającej glukozę zazwyczaj zapewnia uzyskanie większej biomasy badanych mikroorganizmów, które zostają wprowadzone w postaci inokulum do pożywki, zawierającej badany związek jako jedyne źródło węgla.

Analiza literatury wykazała, iż w przypadku większości związków aromatycznych, w tym fenolu, ekspresja genów, których produkty uczestniczą w ich metabolizmie ulega inhibicji w obecności niektórych alternatywnych źródeł węgla w podłożu hodowlanym. Ten negatywny wpływ na metabolizm związków aromatycznych wywiera przede wszystkim obecność glukozy, octanu oraz intermediatów szlaków kwasu trikarboksylowego (Szököl i in., 2014).

W przypadku szczepów bakterii należących do *Pseudomonas putida* potwierdzono negatywny wpływ glukozy, pirogronianu, cytrynianu i bursztynianu na biodegradację fenolu, spowodowany inhibicją ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w biodegradację fenolu, co w konsekwencji wpływa limitująco na jej postęp. Jednakże mechanizm ustalania hierarchii wykorzystywania dostępnych w podłożu związków jako źródeł węgla i energii przez badany mikroorganizm nie jest do końca poznany (Müller i in., 1996).

Dla szczepu bakterii *Rhodococcus erythropolis* CCM2595 wykazano, iż równoczesna obecność fenolu i glukozy w podłożu powoduje zmniejszenie aktywności enzymów odpowiedzialnych za biodegradację fenolu do ok. 64%, a dodatek bursztynianu do medium zawierającego fenol powoduje spadek aktywności tych enzymów do 18% (Szököl i in., 2014).

Santos i współpracownicy (2001) wykazali, iż dodatek glukozy do podłoża zawierającego fenol powoduje zahamowanie jego biodegradacji przez *Trichosporon* sp. LE3, natomiast dodatek benzoesanu wpływa ograniczająco na stopień jego biodegradacji, jednak oba związki biodegradowane były jednocześnie. Ponadto glukoza nie zawsze całkowicie hamuje biodegradację innych związków stanowiących alternatywne źródło energii i węgla, natomiast może powodować ograniczenie stopnia ich biodegradacji. Jednakże warto zauważyć, że osiągnęte wartości gęstości optycznej i biomasy są znacząco wyższe w przypadku hodowli z obecnością glukozy w pożywce niż w przypadku hodowli, gdzie pojedynczy związek aromatyczny stanowi jedyne dostępne źródło węgla.

Gaal i Neujahr (1981) wykazali, iż glukoza hamuje biodegradację fenolu dla szczepu należącego do drożdży *Trichosporon cutaneum*. Ponadto w przypadku *Candida maltosa* L4 (Hofmann i Vogt, 1987) wykazano, iż biodegradacja fenolu i glukozy odbywa się w sposób jednoczesny. Jednakże Rozich i Colvin (1998) udowodnili preferencję do biodegradacji glukozy nad fenolem i szybkie przestawienie metabolizmu mieszanych populacji mikroorganizmów na wykorzystywanie związku łatwiej przyswajalnego w obecności obu związków w pożywce.

Podsumowując, literatura poświęcona badaniom wpływu warunków hodowli bakterii i drożdży potwierdza występowanie zjawiska represji katabolicznej fenolu jako źródła węgla w obecności lepiej przyswajalnej glukozy. Nie dotyczy to jednak wszystkich mikroorganizmów, a dla szczepu *Candida maltosa* L4 Hofmann i Vogt (1987) potwierdzili jednoczesną biodegradację glukozy oraz fenolu znajdujących się w podłożu hodowlanym.

Faworyzowanie biodegradacji związku innego niż związek aromatyczny może wynikać ze specyficznych właściwości tej grupy związków, a przede wszystkim z trudności rozszczepienia

stabilnego pierścienia węglowodoru aromatycznego. Utrudnienia te powodują, że związki aromatyczne uznawane są za trudno biodegradowalne (Kwapisz, 2006).

Również różnice w budowie związków aromatycznych mają wpływ na prawdopodobieństwo potencjalnej biodegradacji. Pierwszy etap biodegradacji polega na przyłączeniu grupy hydroksylowej do pierścienia. Etap ten jest łatwiejszy do przeprowadzenia w przypadku związków aromatycznych z podstawnikami, jednakże duża liczba podstawników może utrudniać ten proces. Mimo to biodegradacja związków z podstawnikami polega głównie na utlenieniu łańcucha bocznego, a następnie na rozszczepieniu pierścienia. W przypadku związków aromatycznych bez podstawników pierwszy etap biodegradacji wymaga udziału dioksygenaz hydroksylujących. W związku z tym, związki aromatyczne bez podstawników trudniej ulegają biodegradacji niż związki z podstawnikami (Kwapisz, 2006).

2.6 Szlaki biodegradacji fenolu

Mikroorganizmy zdolne są do biodegradacji fenolu do związków nietoksycznych w warunkach anaerobowych (przy braku dostępu tlenu) oraz w warunkach aerobowych (przy dostępie tlenu). Proces beztlenowy zachodzi z udziałem jednej znanej ścieżki asymilacji fenolu, natomiast w warunkach tlenowych biodegradacja zachodzi z udziałem enzymów z jednej z dwóch znanych ścieżek jego asymilacji: ścieżki *orto*- lub ścieżki *meta*-.

Jak wskazuje literatura, większość poznanych mikroorganizmów przeprowadza biodegradację fenolu w warunkach tlenowych. Z praktycznego punktu widzenia biodegradacja fenolu w warunkach tlenowych jest procesem pozwalającym na redukcję stężeń fenolu poniżej stężenia, w którym fenol jest uznawany za związek toksyczny. W związku z powyższym, postanowiłam zastosować warunki tlenowe prowadzenia hodowli na etapie poszukiwania i oceny potencjału biodegradacji fenolu przez czyste izolaty kultur drożdży, wyizolowane z próbek wody i torfu z terenu torfowiska Rucianka. Stąd w pracy doktorskiej postanowiłam szerzej opisać znane szlaki metaboliczne zaangażowane w proces biodegradacji fenolu prowadzonej przez mikroorganizmy w warunkach tlenowych oraz bardzo krótko omówić znany szlak metaboliczny zaangażowany w proces biodegradacji fenolu w mikroorganizmach efektywnie rozwijających się w warunkach beztlenowych.

2.6.1 Biodegradacja fenolu w warunkach beztlenowych

Biodegradacja fenolu w warunkach beztlenowych opisana została przede wszystkim dla denitryfikującego szczepu bakterii *Thauera aromatica* (Lack i Fuchs, 1992; Lack i Fuchs, 1994; Aresta i in., 2010).

Proces biodegradacji rozpoczyna się poprzez karboksylację fenolu, na którą składają się dwa etapy, ściśle od siebie zależne. Pierwszy z nich polega na fosforylacji fenolu, co prowadzi do powstania fosforanu fenylu – pierwszego produktu pośredniego beztlenowej biodegradacji (Lack i Fuchs, 1992; Lack i Fuchs, 1994). W drugim etapie dochodzi do karboksylacji fosforanu fenylu przez karboksylazę (wymagającą do swojego działania kationów Mn^{2+}) w celu utworzenia 4-hydroksybenzoesu, który ulega przekształceniu do kwasu protokatechowego, a w konsekwencji do acetylokoenzymu A oraz bursztynlokoenzymu A.

W przypadku drożdży zdolność do beztlenowej biodegradacji fenolu zbadano dla szczepu *Candida albicans* PDY-07 (Wang i in., 2009) i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Najafpoor i in., 2015).

2.6.2 Biodegradacja fenolu w warunkach tlenowych

Pierwszy etap biodegradacji fenolu polega na przyłączeniu drugiej grupy hydroksylowej w pozycji *orto*- (w stosunku do już obecnej grupy) do pierścienia aromatycznego i utworzenia katecholu, głównego produktu pośredniego obu szlaków biodegradacji fenolu przebiegającej w warunkach aerobowych. Hydroksylacja ta zachodzi w obecności tlenu, a enzymem odpowiedzialnym za jej przebieg jest hydroksylaza fenolowa. Reakcja wymaga również zredukowanej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH₂) (Basha i in., 2010). Utworzenie głównego produktu pośredniego jest etapem kluczowym procesu biodegradacji, a szybkość biodegradacji fenolu jest ściśle zależna od szybkości utworzenia katecholu (Shingler, 2003).

Hydroksylazy fenolowe, enzymy odpowiedzialne za pierwszy etap biodegradacji, zostały wyizolowane ze szczepów wielu gatunków mikroorganizmów, między innymi *Diaphorobacter* sp. J5-51, *Acinetobacter* sp. SJ-15, *Acinetobacter* sp. SJ-16, *Acidovorax* sp. J5-66, *Corynebacterium* sp. JOR-20 (Sun i in., 2014) i *Acinetobacter* sp. AQ5NOL 1 (Ahmad i in., 2012).

Kolejnym etapem biodegradacji jest rozszczepienie pierścienia katecholu, które może zajść na jednej z dwóch dróg. Pierścień katecholu ulega rozszczepieniu między dwiema grupami hydroksylowymi (rozszczepienie *orto*-, tzw. droga β -*keto*dypinowa), które przeprowadzane jest z udziałem 1,2-dioksygenaz katecholowych, bądź w pozycji *meta*- w stosunku do pierwszej grupy hydroksylowej (rozszczepienie *meta*-), zachodzące z udziałem 2,3-dioksygenaz katecholowych. W efekcie tego rozszczepienia powstają specyficzne produkty rozszczepienia: kwas *cis,cis*-mukonowy (w przypadku rozszczepienia na drodze *orto*-) oraz semialdehyd 2-hydroksymukonowy (powstały w przypadku rozszczepienia na drodze *meta*-) (Rys. 3).

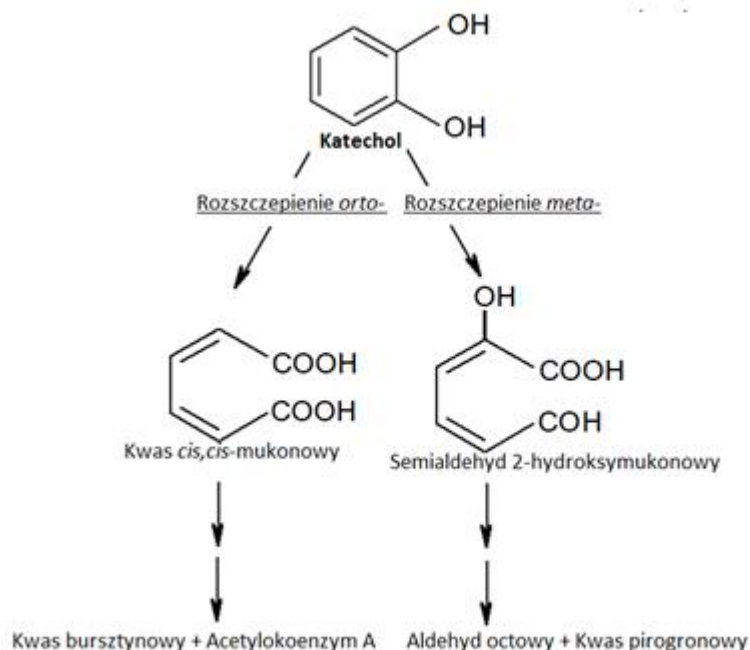
W szlaku *orto*-, kwas *cis,cis*-mukonowy ulega następnie laktonizacji, w wyniku czego produkowany jest mukonolakton. Związek ten ulega późniejszej rearanżacji z udziałem izomerazy, co prowadzi do powstania 3-oksoadypinoenolaktonu, który ulega degradacji, w wyniku której powstaje 3-oksoadypinylokoenzym A. Związek ten ulega przekształceniu do kwasu bursztynowego i acetylokoenzymu A, które zostają włączone do cyklu Krebsa (Basha i in., 2010) (Rys. 3).

W przypadku alternatywnego szlaku biodegradacji (szlaku *meta*-) semialdehyd 2-hydroksymukonowy zostaje przekształcony do kwasu 2-hydroksymukonowego. Związek ten ulega transformacji do kwasu 2-keto-4-heksenodiowego, który ulega następnie przekształceniu do kwasu 2-ketopent-4-enowego, a ten do kwasu 4-hydroksy-2-keto-walerianowego. Ostatecznie powstają aldehyd octowy i kwas pirogronowy, które również włączone są do cyklu Krebsa (Basha i in., 2010) (Rys. 3).

Ze względu na kluczową rolę 1,2- i 2,3-dioksygenaz katecholowych w zapoczątkowaniu dwóch alternatywnych szlaków biodegradacji fenolu przebiegających poprzez ich wspólny substrat - katechol, oznaczanie aktywności tych enzymów (testy enzymatyczne) w ekstraktach komórkowych (ewentualnie też w płynach pochodowlanych) badanych mikroorganizmów oraz oznaczanie obecności w płynach pochodowlanych produktów katalizowanych przez nie reakcji, tj. odpowiednio kwasu *cis,cis*-mukonowego bądź semialdehydu 2-hydroksymukonowego, stanowi podstawę metody stosowanej do identyfikacji, który ze szlaków biodegradacji fenolu jest wykorzystywany przez badany mikroorganizm. W związku z tym, w prowadzonych badaniach (Publikacja nr 3) zastosowałam obie strategie badawcze do ustalenia, który z dwóch szlaków metabolizmu fenolu występuje w badanych drożdżach psychrotolerancyjnych.

W związku z tak kluczową rolą w szlakach metabolizmu fenolu obu typów dioksygenaz katecholowych, postanowiłam opisać je szerzej, niż zostało zrobione to w Publikacji nr 3, poświęconej identyfikacji szlaków metabolicznych zaangażowanych w biodegradację fenolu

przez drożdże *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ oraz *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂.



Rys. 3 Produkty rozszczepienia *orto*- i *meta*- katecholu oraz końcowe produkty szlaków metabolicznych *orto*- i *meta*- wykorzystywanych przez mikroorganizmy podczas biodegradacji fenolu w obecności tlenu (na podstawie (Basha i in., 2010)) (opracowanie własne w programie ISIS Draw)

2.6.3 Charakterystyka dioksygenaz katecholowych

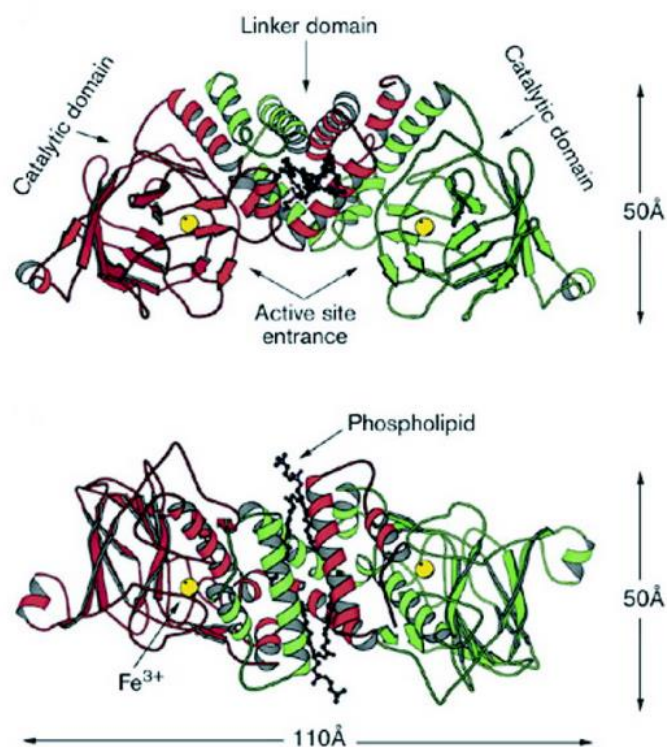
1,2-dioksygenazy katecholowe to tzw. dioksygenazy intradiolowe (katalizujące rozszczepienie *orto*- w cząsteczce katecholu), natomiast 2,3-dioksygenazy katecholowe to tzw. dioksygenazy ekstradiolowe (katalizujące rozszczepienie *meta*- w cząsteczce katecholu). Mimo początkowego przekonania naukowców o podobieństwie ich właściwości, enzymy te okazały się charakteryzować odmienną strukturą budowy ich cząsteczek, jak i mechanizmem działania.

2.6.3.1 Dioksygenazy intradiolowe

Analizując struktury oraz sekwencje poznanych dioksygenaz intradiolowych ustalono, iż wszystkie opisane enzymy należą do jednej linii ewolucyjnej. Uwzględniając ich specyfikę substratową podzielono je na trzy klasy: 1,2-dioksygenazy katecholowe [EC 1.13.11.1], 3,4-dioksygenazy kwasu protokatechowego [EC 1.13.11.3] i 1,2-dioksygenazy hydroksyhydrochinonowe [EC 1.13.11.37]. Ze względu na prowadzone przeze mnie badania, poniżej opisałam jedynie dioksygenazy katecholowe, wśród których wyróżnia się dwie podklasy. Pierwsza podklasa skupia enzymy o stosunkowo restrykcyjnych wymaganiach substratowych. Enzymy tej klasy transformują katechol i tylko jedną jego chlorowcopochodną, jaką jest 4-chlorokatechol (Van der Meer i in., 1991). Druga podklasa gromadzi enzymy o szerszym powinowactwie substratowym, zdolne do transformacji poza katecholem, także jego podstawionych pochodnych (Vetting i Ohlendorf, 2000).

Enzymy należące do dioksygenaz intradiolowych są głównie homodimerami (Potrawfke i in., 2001) zbudowanymi z podjednostek, gdzie każda ma masę ok. 30–40 kDa. Podjednostki 1,2-dioksygenaz katecholowych zawierają około 300 reszt aminokwasowych, tworzących dwie

domeny, domenę katalityczną oraz domenę N-terminalną. Domena N-terminalna zbudowana jest z ok. 100 reszt aminokwasowych, które tworzą do pięciu helis. Helisy dwóch podjednostek przenikają się wzajemnie, tworząc strukturę dimeru i jednocześnie hydrofobowy tunel, z dołączonymi cząsteczkami fosfolipidów. Domena posiada charakterystyczny motyw helikalnego zamka błyskawicznego (*ang. helical-zipper*), który pojawia się we wszystkich enzymach z rodziny 1,2-dioksygenaz katecholowych (Rys. 4) (Vetting i Ohlendorf, 2000; Bugg i Lin, 2001; Bugg, 2003; Vaillancourt i in., 2006).



Rys. 4 Struktura 1,2-dioksygenazy katecholowej pochodzącej ze szczepu *Acinetobacter* sp. ADP1 wraz z zaznaczeniem kolorystycznym poszczególnych domen (Vetting i Ohlendorf, 2000)

Mechanizm rozszczepienia pierścienia aromatycznego z udziałem dioksygenaz intradiolowych jest procesem wieloetapowym, którego ostatecznym etapem jest zastąpienie aksjalnej reszty tyrozyny i ekwatorialnego jonu hydroksylowego 1,2-dioksygenazy przez jon katecholanowy, efektem czego jest jego aktywacja. W wyniku ataku żelaza na tlen dochodzi do redukcji żelaza z +3 na +2 stopień utlenienia i powstania Fe^{2+} -semichinonu, który reaguje bezpośrednio z dwoma atomami tlenu, dzięki czemu wytwarza się struktura nadtlenku C-O-O-Fe. Następnie, w związku hydronadtlenkowym dochodzi do przegrupowania Criegee'a względem wiązania węgiel-węgiel poprzez migrację grupy acylowej, w którego konsekwencji powstaje nietrwała struktura laktonowa. Efektem hydrolizy bezwodnika laktonowego jest uwolnienie produktu reakcji rozszczepienia pierścienia aromatycznego, czyli kwasu *cis,cis*-mukonowego (Orville i in., 1997; Bugg i Lin, 2001; Vaillancourt i in., 2006).

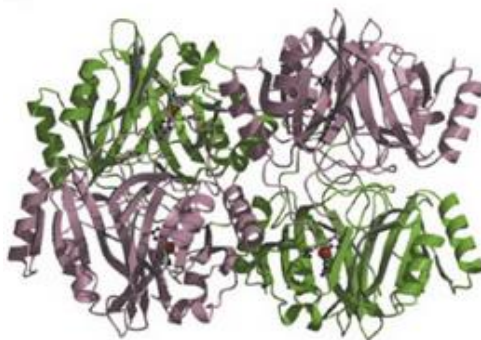
Aktywność dioksygenaz intradiolowych potwierdzono dla wybranych szczepów bakterii należących do rodzajów *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Geobacillus* i *Rhodococcus* (Strachan i in., 1998; Barbe i in., 2004; Saxena i Thakur, 2005; Giedraityte i Kalédienė, 2009). W odniesieniu do drożdży, aktywność tych enzymów zbadano dla wybranych szczepów drożdży należących do *Candida tropicalis* (Vilimková i in., 2008; Long i in., 2016),

Candida albicans (Tsai i in., 2005) i *Trichosporon cutaneum* (Aleksieva i in., 2002). Aktywność potwierdzono także dla drożdży psychrotolerancyjnych, wyizolowanych z lodowcowego kriokonitu oraz z Austrii (z terenów torowiska kolejowego) zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi (Margesin i in., 2003, 2005).

2.6.3.2 Dioksygenazy ekstradiolowe

Enzymy należące do dioksygenaz ekstradiolowych, ze względu na powinowactwo do szerszej grupy substratów, uważane są za bardziej uniwersalne niż dioksygenazy intradiolowe. Do tej pory dokonano kilku podziałów enzymów, które przeprowadzają rozszczepienie pierścienia katecholu na drodze *meta*-. Najnowszy przeprowadzony został na podstawie analizy sekwencji aminokwasowych oraz struktury przestrzennej enzymów. W podziale tym wyróżniono trzy typy: pierwszy obejmuje dioksygenazy jedno- i dwudomenowe, a do tego typu należy 2,3-dioksygenaza katecholowa wyizolowana z *Pseudomonas putida* mt-2 (Rys. 5), drugi obejmuje enzymy multimeryczne, zbudowane z jednego lub dwóch rodzajów podjednostek, a trzeci typ dioksygenaz ekstradiolowych należy do nadrodziny białek cupin (Vaillancourt i in., 2006).

Dioksygenazy ekstradiolowe są zazwyczaj multimerami, gdzie każda katalityczna podjednostka zawiera jon dwuwartościowego metalu. Ligandami jonu metalu są dwie reszty histydyny oraz reszta glutaminianu, tworzące motyw 2-His-1-karboksylowy. Motyw ten, wraz z dwoma cząsteczkami wody, jest koordynacyjnie połączony z żelazem na +2 stopniu utlenienia (Bugg, 2001; Vaillancourt i in., 2006).



Rys. 5 Struktura 2,3-dioksygenazy katecholowej pochodzącej ze szczepu *Pseudomonas putida* mt-2 (Kita i in., 1999)

Aby możliwe było rozszczepienie pierścienia aromatycznego przez 2,3-dioksygenazy katecholowe, konieczne jest utworzenie kompleksu Fe^{2+} -substrat. Dzięki jego utworzeniu dochodzi do zmian w centrum aktywnym enzymu – usunięcia dwóch cząsteczek wody oraz do związania, poprzez dwie grupy hydroksylowe, substratu i jonu Fe^{2+} . Aksjalne ligandy miejsca wiązania stanowią reszta histydyny i grupa hydroksylowa, natomiast ekwatorialne ligandy stanowią druga grupa hydroksylowa substratu, reszty histydyny i glutaminianu. Dwa atomy tlenu wiążą się w pustym miejscu w położeniu ekwatorialnym. Podczas wiązania substratu z jonami Fe^{2+} , jedna z grup hydroksylowych substratu jest deprotonowana i oddziałuje z resztą tyrozyny miejsca aktywnego, natomiast druga grupa hydroksylowa tworzy wiązanie wodorowe z resztą histydyny miejsca aktywnego. Następnie, w wyniku ataku na węgiel C2 połączonej cząsteczki tlenu z jonem Fe^{2+} , dochodzi do powstania semichinonowego produktu pośredniego nadtlenku żelaza. W kolejnym etapie, w wyniku przegrupowania Criegee'a powstaje nienasycony lakton, który ulega hydrolizie, co prowadzi do powstania produktu końcowego reakcji enzymatycznej prowadzonej przez 2,3-dioksygenazy katecholowe (Bugg i Lin, 2001; Sato i in., 2002; Vaillancourt i in., 2006).

Aktywność 2,3-dioksygenaz katecholowych potwierdzono dla bakterii należących do rodzaju *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Rhodococcus* i *Bacillus* (Müller i in., 1996; Sei i in., 1999; Fialová i in., 2004; Jiang i in., 2004; Li i in., 2004; Viggiani i in., 2004; Kasuga i in., 2007; Wei i in., 2010). Wśród drożdży aktywność ta jest bardzo rzadko odnotowywana, a przykładem szczepu posiadającym ten enzym jest szczep A43, należący do rodzaju *Rhodotorula* (Margesin i in., 2003), który wyizolowany został z austriackiego kriokonitu i należy do drożdży zimnolubnych.

2.6.3.2 Szlaki biodegradacji innych węglowodorów aromatycznych oraz możliwość wykorzystania mikroorganizmów utylizujących fenol do produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego

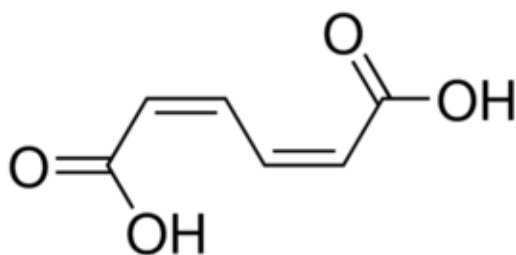
Jak wspominałam powyżej, identyfikacja szlaku metabolicznego zaangażowanego w proces biodegradacji fenolu w warunkach tlenowych przez badane mikroorganizmy posiada zarówno aspekt poznawczy, jak i aspekt praktyczny (Publikacja nr 3). Analizując literaturę w kierunku innej możliwości wykorzystania szczepów psychrotolerancyjnych drożdży, pochodzących z terenów torfowiska Rucianka i biodegradujących fenol, niż tylko redukcja jego stężenia w ściekach bądź w skażonym środowisku, zwróciłam uwagę na możliwość ich praktycznego wykorzystania do rozwoju badań nad ich zastosowaniem do biotechnologicznej produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego. Jak zostało pokazane na rysunku (Rys. 3), mikroorganizmy zdolne do biodegradacji fenolu jako źródła węgla na drodze szlaku *orto*-, zdolne są także do produkcji tego kwasu w reakcjach katalizowanych przez 1,2-dioksygenazy katecholowe.

Dostępna literatura jednoznacznie wskazuje na duże prawdopodobieństwo izolacji ze środowiska drożdży psychrotolerancyjnych utylizujących fenol na drodze szlaku *orto*- ze względu na fakt, iż jest to szlak dominujący wśród dotąd przebadanych gatunkach drożdży (Broderick i O'Halloran, 1991; Latus i in., 1995).

Jednakże, w publikacji Margesin (2003), doniesiono o istnieniu psychrotolerancyjnych drożdży z gatunku *Rhodotorula* metabolizujących fenol na drodze szlaku *meta*-. Stąd, dla wstępnej oceny pełnego potencjału biotechnologicznego psychrotolerancyjnych drożdży z torfowiska Rucianka, wykonałam możliwie najbardziej wiarygodną, potwierdzoną kilkoma metodami badawczymi, identyfikację wykorzystywanych przez nie szlaków metabolizmu fenolu (Publikacja nr 3).

2.7 Kwas *cis,cis*-mukonowy – charakterystyka związku i zastosowanie przemysłowe

Kwas *cis,cis*-mukonowy jest sześciowęglowym związkiem zawierającym wiązanie podwójne wewnątrz swojej struktury oraz dwie grupy karboksylowe, po jednej na każdym z jego końców (Rys. 6). Wartość obrotu handlowego tym związkiem wynosiła około 80 milionów dolarów w roku 2019, a w roku 2024, według dostępnych prognoz, będzie wynosić około 120 milionów dolarów (Muconic Acid Market).



Rys. 6 Struktura cząsteczki kwasu *cis,cis*-mukonowego (opracowanie własne w programie ISIS Draw)

Tak duże znaczenie ekonomiczne kwasu *cis,cis*-mukonowego wynika z faktu jego zastosowania w produkcji przemysłowej kwasu adypinowego oraz kwasu tereftalowego. Kwas adypinowy wykorzystywany jest w produkcji nylonu i farb (Draths i Frost, 1994). Kwas tereftalowy służy natomiast jako substrat do produkcji poli(tereftalanu etyleny) (PET), syntetycznego polimeru o bardzo szerokim wykorzystaniu w wielu gałęziach przemysłu (Draths i Frost, 1994).

Obecnie podstawowym źródłem tego kwasu jest dwustopniowa synteza chemiczna. Niestety, proces ten wymaga dużych nakładów energetycznych oraz skutkuje wysoką emisją gazów cieplarnianych. W związku z tym poszukuje się nowych alternatywnych metod produkcji tego kwasu, a doskonałą alternatywą względem metody chemicznej wydaje się jego produkcja z wykorzystaniem mikroorganizmów (Draths i Frost, 1994).

Pierwsze doniesienia dotyczące zdolności mikroorganizmów do produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego dotyczyły badań przeprowadzonych przez badaczy Draths i Frost (1994). Ponadto przeprowadzono wiele badań, w których wykazano zdolność gatunku *Escherichia coli* do produkcji tego kwasu przy wykorzystaniu dostępnej w podłożu glukozy, a przekształcenie to zachodzi z udziałem szlaku szikimowego (Parke, 1993; Draths i Frost, 1994; Niu i in., 2002). Produkcja kwasu z wykorzystaniem glukozy jako źródła węgla potwierdzona została również dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Wang i in., 2020) i bakterii *Pseudomonas putida* (Jung i in., 2015) oraz *Klebsiella pneumonia* (Johnson i in., 2017). Zdolność do produkcji kwasu wykazano także dla wielu szczepów należących do *Corynebacterium glutamicum*, m.in. szczepów MA-2 i STR001-011 (Becker i in., 2018). Wykazano, że szczepy te są zdolne do produkcji wspomnianego kwasu z glukozy, ale co ciekawe, również w kontekście moich badań, z produktów pochodzących z hydrotermalnego przetwarzania lignin, bogatych w związki z grupy fenoli.

Stąd, ze względu na prowadzone przeze mnie badania, szczególnie interesującym kierunkiem badań nad opracowaniem biotechnologicznej produkcji wspomnianego kwasu jest wykorzystanie mikroorganizmów zdolnych do jego produkcji z węglowodorów aromatycznych. W porównaniu do alternatywnych metod biotechnologicznych bazujących na substracie, takim jak glukoza lub inne cukry, to rozwiązanie podnosi atrakcyjność opracowanej technologii, ponieważ potencjalnie pozwala na zagospodarowanie odpadów przemysłowych zawierających te związki. Dotychczasowe badania prowadzone w tym kierunku potwierdziły zdolność bakterii (wybranych szczepów) należących do rodzaju *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, i *Sphingobacterium* do produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego, poprzez tworzenie katecholu z benzoesanu i następnie jego rozszczepienie na drodze *orto*- (Choi i in., 2020). Ponadto wykazano możliwość użycia bakterii *Pseudomonas putida* i *Corynebacterium glutamicum* do produkcji tego kwasu w oparciu o metabolizm takich źródeł węgla, jak katechol (Becker i in., 2018; Kohlstedt i in., 2018) i toluen (Chua i Hsieh, 1990).

W związku z zaprezentowanymi informacjami, podczas realizacji badań nad identyfikacją szlaków utylizacji fenolu zbadalam również potencjalną przydatność wytypowanych szczepów

drożdży psychrotolerancyjnych do wytwarzania kwasu *cis,cis*-mukonowego z wykorzystaniem fenolu jako substratu oraz różnych warunków prowadzenia hodowli (Publikacja nr 3).

W przyszłości dla wybranego szczepu badanych drożdży zdolnego do potencjalnej produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego w najwyższym stężeniu (porównując do pozostałych dwóch szczepów, a także z uwzględnieniem różnych warunków prowadzenia hodowli (z etapem głodzenia komórek bądź bez tego etapu)), warto byłoby przeprowadzić zaawansowane badania genomowe i metaboliczne w celu wybrania strategii modyfikacji genomu badanych drożdży pod kątem zwiększenia wydajności biotechnologicznej produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego. Jak dotąd, wykorzystanie inżynierii genetycznej przyniosło zwiększenie zdolności produkcji tego kwasu i oporności na różne warunki prowadzenia procesu biotechnologicznego w modyfikowanych genetycznie szczepach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz bakterii *Escherichia coli* (Wang i in., 2020; Choi i in., 2020).

2.8 Przyczyny opracowania testu preselekcyjnego do wykrywania mikroorganizmów zdolnych do utylizacji katecholu jako jedyne źródła węgla

Przeprowadzenie badań poświęconych identyfikacji i izolacji psychrotolerancyjnych drożdży z torfowiska Rucianka zdolnych do wzrostu w wysokich stężeniach fenolu i jego utylizacji do poziomu poniżej stężenia wykrywalności (Publikacja nr 1) uwidocznilo, iż etapem czasochłonnym i obciążonym dużym ryzykiem błędu był etap selekcji izolatów. W tym celu, wykorzystując metodę Middelhovena (1991), sprawdziłam zdolność izolatów do wykorzystywania fenolu jako jedyne źródła węgla. Metoda ta pozwala, przy stosunkowo niskich kosztach, przebadac dużą ilość izolatów. Dokonuje się w niej posiewu mikroorganizmów na podłożu wylanym w probówkach w formie skosu, a roztwór badanego związku, stanowiący jedyne źródło węgla dla testowanych mikroorganizmów, umieszcza się na dnie probówki. Związek dostarczany jest do mikroorganizmów na drodze dyfuzji w podłożu bądź przez fazę gazową. Jednakże wadą wspomnianej metody jest możliwość zaobserwowania wzrostu mikroorganizmów, który nie jest spowodowany równoczesną biodegradacją badanego związku. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach (Publikacja nr 1) odsetek fałszywie pozytywnych wyników izolacji drożdży potencjalnie zdolnych do biodegradacji fenolu stanowił aż 50%. Stąd postanowiłam przeanalizować dostępną literaturę pod względem alternatywnych rozwiązań stosowanych do selekcji mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji węglowodorów aromatycznych.

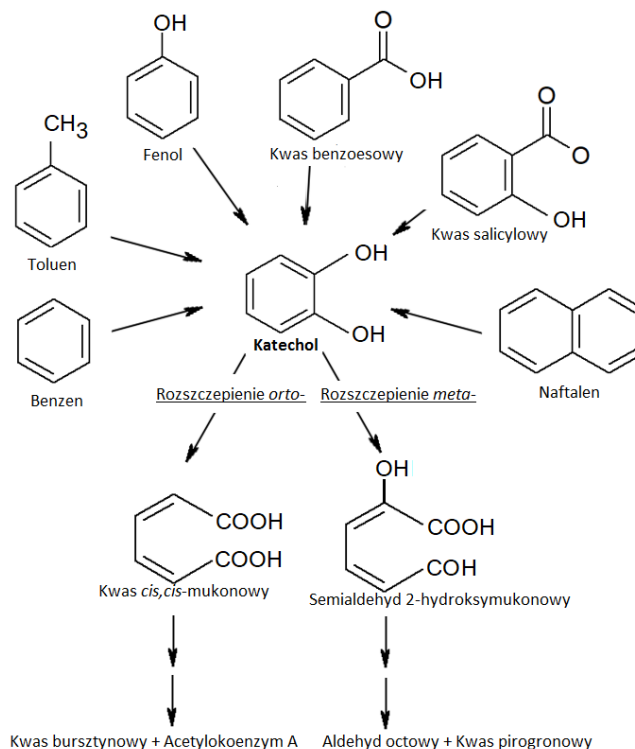
Kolejną metodą jest technika polegająca na bezpośredniej izolacji mikroorganizmów z próbek wody bądź gleby na podłożu stałym, suplementowanym badanym związkiem jako jedyne źródłem węgla (Wang i in., 2012). Jednakże również w przypadku tej metody istnieje możliwość uzyskania fałszywie pozytywnych wyników.

Inna metoda polega na wymieszaniu pobranej próbki, np. gleby z podłożem płynnym suplementowanym danym związkiem i obserwowaniu wzrostu mikroorganizmów w hodowli płynnej (Kafilzadeh i in., 2010). Niestety, metoda ta nie pozwala na jednoznaczna identyfikację, które szczepy wykazują potencjał biodegradacyjny, ponieważ nie dokonuje się w niej izolacji czystych kultur izolatów, a bada się potencjał biodegradacyjny całej próbki. W związku z tym, metoda ta nie była przydatna do moich celów.

Podsumowując, po przeprowadzeniu badań przesiewowych (Publikacja nr 1) oraz po analizie metod możliwych do użycia na tym etapie badań zauważyłam, że ich główna wada wynika z faktu, iż czynnikiem selekcyjnym jest jedynie brak lub wzrost testowanych izolatów na podłożach mikrobiologicznych, zawierających badany związek jako jedyne źródło węgla. Czynnikiem ten jest niewystarczający, ponieważ nie wskazuje jednoznacznie na wykorzystanie badanego związku do wzrostu mikroorganizmów. W związku z tym postanowiłam wprowadzić

dotatkowy element selekcyjny, który pozwoli w prosty i szybki sposób potwierdzić, iż wzrost mikroorganizmów jest równoznaczny z biodegradacją badanego związku. W tym celu opracowałam metodę hodowli płytkowej, połączonej z zalewaniem płytek roztworem czynnika selekcyjnego, co w konsekwencji prowadzi do powstania barwnych kompleksów związku badanego z dodanym czynnikiem tworzącym z nim kompleks w całej objętości podłoża, za wyjątkiem otoczenia kolonii izolatów nie tylko zdolnych do wzrostu w obecności testowanego toksycznego związku, ale przede wszystkim zdolnych do pobierania go z otoczenia i wykorzystania go jako jedyne dostępne dla nich źródła węgla do wzrostu. W przypadku spełnienia obu wymienionych kryteriów, ze względu na biodegradację badanego związku wokół kolonii mikroorganizmów wykorzystujących go jako źródło węgla, powstaje wyraźnie odcinające się halo (brak powstania kompleksów pomiędzy badanym związkiem a roztworem czynnika selekcyjnego).

Ponadto analizując dane zaczerpnięte z literatury zauważyłam, że fenol jest jednym z wielu związków aromatycznych, które ulegają biodegradacji z wykorzystaniem katecholu jako głównego produktu pośredniego tego procesu (Rys. 7). Biodegradacja wielu związków aromatycznych zachodzi poprzez wytworzenie tego związku, który ulega następnie rozszczepieniu na drodze *ortho*- lub *meta*-. Związki aromatyczne podstawione pojedynczo bądź podwójnie w pierścieniu (głównie w pozycji 1,2-) ulegają przekształceniu do katecholu, zanim ulegną dalszemu metabolizmowi (Rys. 7). Przykładami takich związków, poza fenolem, są toluen (Duetz i in., 1994; Yeomt i Yoo, 2002; Surendra i in., 2017), benzen (Duetz i in., 1994; Yeomt i Yoo, 2002; Surendra i in., 2017), etylobenzen (Surendra i in., 2017), benzoesan (Loh i Chua, 2002) i nitrobenzen (Arora i Sharma, 2015). Dowiedziono również, iż dalsze rozszczepienie katecholu zachodzi z udziałem głównie dioksygenaz 1,2-katecholowych, co potwierdzono dla m.in. benzenu, toluenu i etylobenzenu (Duetz i in., 1994; Yeomt i Yoo, 2002; Surendra i in., 2017). Rozszczepienie na drodze *meta*- zostało potwierdzone dla nitrobenzenu (Arora i Sharma, 2015).



Rys. 7 Przykłady węglowodorów aromatycznych, dla których katechol jest wspólnym produktem pośrednim szlaków biodegradacji (rysunek powstał w programie ISIS Draw)

Stąd uznałam, że z punktu widzenia rozwoju nowych biotechnologicznych metod produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego, bardziej wskazane jest opracowanie testu preselekcyjnego opartego na zdolności do wzrostu na podłożu z katecholem jako jedynym źródłem węgla przy jednoczesnej możliwości wizualnego potwierdzeniu tego faktu, niż wyłączenie skupienie się na tworzeniu testu do identyfikacji mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji fenolu. Dzięki temu mikroorganizmy wykazujące zdolność do biodegradacji katecholu mogłyby potencjalnie zostać wykorzystane do badań dotyczących degradacji fenolu oraz innych związków, np. toluenu, etylobenzenu, gdyż ich metabolizm uwzględnia przekształcenie do katecholu, a następnie jego rozszczepienie przez 1,2-dioksygenazy katecholowe do kwasu *cis,cis*-mukonowego. W efekcie można będzie zbadać wybrane próbki środowiskowe pod kątem większej gamy interesujących biotechnologicznie izolatów, a szczególnie pod kątem poszukiwania mikroorganizmu zdolnego do przekształcania jak najszerszej gamy związków monoaromatycznych do kwasu *cis,cis*-mukonowego.

Ze względu na rolę katecholu w biodegradacji węglowodorów aromatycznych, a w szczególności w szlakach biodegradacji fenolu (Publikacja nr 3) oraz z uwagi na oparcie o ten związek testu opracowanego i opisanego w Publikacji nr 2, wchodzącej w skład pracy doktorskiej, postanowiłam przedstawić więcej informacji o tym związku aromatycznym.

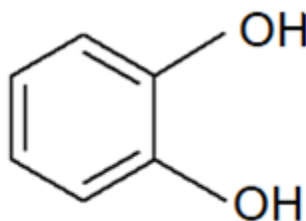
2.9 Katechol

Katechol to organiczny związek chemiczny należący do grupy polifenoli. Nazywany jest również pirokatechiną bądź *o*-dihydroksybenzenem (Rys. 8). Związek zbudowany jest z pierścienia benzenowego z dwoma grupami hydroksylowymi, przyłączonymi w pozycji *ortho*-względem siebie. Katechol jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, a uzyskany roztwór ma kwaśny odczyn oraz właściwości redukujące. W temperaturze pokojowej jest ciałem stałym o białym, bądź delikatnie beżowym zabarwieniu i charakterystycznym zapachu (MSDS for Pyrocatechol, 2017). Stosowany jest przede wszystkim jako wywoływacz w fotografii, środek dezynfekujący, środek rozjaśniający w produktach do farbowania włosów oraz przy produkcji gum, plastików oraz leków.

Katechol, tak jak wcześniej opisany fenol, ulega wchłonięciu do organizmu człowieka trzema drogami: oddechową, pokarmową oraz przez skórę. W przypadku tego związku ważna jest także szczególna ochrona oczu. Ekspozycja na katechol może powodować uszkodzenie płuc, układu pokarmowego, utratę przytomności czy śmierć (MSDS for Pyrocatechol, 2017). Związek został także zaklasyfikowany przez agencję IRAC jako kancerogenny i zaliczony do grupy 2B. Ponadto ze względu na jego wysoką toksyczność i kancerogenność, został uznany za jedno z najważniejszych zanieczyszczeń środowiska według EPA USA (Bramhachari i in., 2016).

Katechol uważany jest za związek bardziej toksyczny niż fenol (Kumar i in., 2005), co może mieć wpływ na ilość badań dotyczących biodegradacji katecholu. Dostępna literatura skupia się na badaniu biodegradacji tego związku głównie przez bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas* (Kumar i in., 2005; Zeyallah i in., 2009; Aresta i in., 2010). Do mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji katecholu należą także niektóre szczepy bakterii należące do *Sphingomonas subarctica*, *Ralstonia pickettii* oraz *Comamonas testosteroni* (Di Gioia i in., 2002) oraz szczep należący do *Achromobacter xylosoxidans* (Bramhachari i in., 2016).

Wśród grzybów zdolność do biodegradacji pirokatechiny wykazuje *Aspergillus awamori* (Stanchev i in., 2008) oraz *Candida parapsilosis* (Rigo i in., 2010).



Rys. 8 Struktura cząsteczki katecholu (opracowanie własne w programie ISIS Draw)

Podsumowując, dzięki danym zaczerpniętym z literatury, dotyczącym znaczącej toksyczności katecholu, jego obecności w odpadach przemysłowych i prowadzonych badaniach nad poszukiwaniem mikroorganizmów zdolnych do jego efektywnej biodegradacji oraz dzięki jego właściwościom opisanym w punkcie 2.9 rozprawy doktorskiej postanowiłam skupić się na opracowaniu prostego testu przesiewowego służącemu izolacji mikroorganizmów zdolnych do utylizacji katecholu jako jedyne źródła węgla.

W związku z tym przeanalizowałam informacje o właściwościach fizykochemicznych katecholu w celu stworzenia szybkiego przesiewowego testu selekcyjnego. Po analizie dostępnych informacji na temat właściwości fizykochemicznych tego związku założyłam, iż można w tym celu wykorzystać fakt, że katechol tworzy stabilne barwne kompleksy z takimi jonami, jak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Zn^{2+} , Ti^{3+} oraz Ti^{2+} . W przypadku interakcji katecholu z jonami żelaza Fe^{3+} powstają sole zabarwione na zielono (Tewari i Malviya, 2002; Al-Abadleh, 2015). Właściwość ta została wykorzystana podczas projektowania testu, który służy szybkiej identyfikacji mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji katecholu (Publikacja nr 2) oraz potencjalnie innych węglowodorów aromatycznych (Rys. 7). Istota działania testu oraz warunki jego przeprowadzenia zostały szerzej omówione we wspomnianej publikacji.

3. CEL I ZAKRES BADAŃ

Głównym celem pracy badawczej realizowanej w ramach pracy doktorskiej była izolacja czystych kultur drożdży psychrotolerancyjnych z terenu torfowiska Rucianka, ich identyfikacja oraz ocena potencjału biodegradacyjnego i biotransformacyjnego w stosunku do fenolu, związku o istotnym znaczeniu przemysłowym (obecny w odpadach przemysłowych).

Zakres prac badawczych wykonanych na potrzeby realizacji głównego celu badawczego przedstawiłam szerzej w poniższych punktach:

- **izolacja z torfowiska Rucianka drożdży psychrotolerancyjnych zdolnych do biodegradacji fenolu** – cel cząstkowy obejmował izolację, z próbek wody i gleby pochodzących z terenów torfowiska Rucianka, drożdży psychrotolerancyjnych, ich identyfikację oraz badanie zdolności do biodegradacji fenolu obecnego w pożywce hodowlanej w stężeniach z zakresu 500–2000 mg l⁻¹;
- **określenie szlaku biodegradacji fenolu w gatunkach drożdży wyizolowanych z torfowiska Rucianka** – cel zrealizowałam poprzez przeprowadzenie trzech rodzajów testów służących identyfikacji szlaków biodegradacji fenolu, tj. szlaku *orto-* i *meta-* w warunkach aerobowego wzrostu mikroorganizmów: wstępnego testu identyfikującego aktywność enzymatyczną, właściwego testu badającego aktywność 1,2- oraz 2,3-dioksygenaz katecholowych poprzez analizę spektrofotometryczną wskazującą na obecność poszczególnych produktów reakcji enzymatycznych prowadzonych przez te enzymy wobec substratu, jakim był katechol oraz analizę wybranych produktów szlaków biodegradacji fenolu z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GC-MS). W badaniach uwzględniłam wpływ dwóch sposobów prowadzenia hodowli (z etapem głodzenia bądź bez tego etapu) na przebieg biodegradacji fenolu oraz powstawanie wybranych produktów pośrednich szlaków *orto-* i *meta-*;
- **wstępna ocena potencjału wyizolowanych drożdży psychrotolerancyjnych z torfowiska Rucianka jako producentów kwasu *cis,cis*-mukonowego, na drodze biotransformacji fenolu z wykorzystaniem szlaku *orto-* asymilacji węglowodorów aromatycznych** – cel cząstkowy zrealizowałam poprzez ocenę zdolności badanych szczepów drożdży do produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego podczas biodegradacji fenolu w hodowlach, do których użyto inokulum drożdży przygotowywanych z etapem głodzeniem komórek lub bez tego etapu. Analizę przeprowadziłam z wykorzystaniem techniki GC-MS;
- **opracowanie testu przesiewowego badającego potencjał biodegradacji węglowodorów aromatycznych wśród mikroorganizmów, wykorzystującego właściwości katecholu – głównego produktu pośredniego szlaków biodegradacji *orto-* i *meta-*** – cel cząstkowy obejmował zaproponowanie nowej metody, bazującej na zdolności katecholu do tworzenia barwnych kompleksów z jonami żelaza Fe³⁺. Katechol wybrany został ze względu na jego kluczową rolę w szlakach biodegradacji wielu węglowodorów aromatycznych w warunkach aerobowych, wynikającą z faktu, iż związek ten jest wspólnym produktem pośrednim tych szlaków. Zaproponowana metoda w sposób szybki i jednoznaczny wskazuje mikroorganizmy o potencjale biodegradacyjnym w stosunku do katecholu oraz wskazuje na możliwość biodegradacji innych związków aromatycznych, w tym fenolu.

4. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Publikacja nr 1 – dane (Załącznik 1)

Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., Cieśliński, H. (2017). Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(6): 210

IF w roku publikacji 1,769; Q3

doi: 10.1007/s11270-017-3391-8

Otrzymana: 02.02.2017; zaakceptowana: 09.05.2017; opublikowana online: 22.05.2017

16 cytowań w bazie SCOPUS na dzień 21.10.2021

Publikacja nr 2 – dane (Załącznik 2)

Filipowicz, N., Cieśliński, H. (2020). A Rapid and Simple Method for Screening Microorganisms with a Potential for Catechol Biodegradation. *International Journal of Environmental Research*, 14: 87-92

IF w roku publikacji 2,007; Q3

doi: 10.1007/s41742-019-00239-z

Otrzymana: 15.04.2019; zaakceptowana: 30.10.2019; opublikowana online: 09.12.2019

1 cytowanie w bazie SCOPUS na dzień 21.10.2021

Publikacja nr 3 – dane (Załącznik 3)

Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Cieśliński, H. (2020). Determination of phenol biodegradation pathways in three psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, isolated from Rucianka peatland. *Enzyme and Microbial Technology*, 141: 109663

IF w roku publikacji 3,448; Q2

doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109663

Otrzymana: 22.04.2020; zaakceptowana: 02.09.2020; opublikowana online: 06.09.2020

2 cytowania w bazie SCOPUS na dzień 21.10.2021

4.1 ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHENOL-DEGRADING PSYCHROTOLERANT YEASTS (ZAŁĄCZNIK NR 1)

Pierwszym etapem prowadzonych badań było poszukiwanie mikroorganizmów potencjalnie zdolnych do przeprowadzania biodegradacji fenolu. Jak wskazuje literatura, miejsce izolacji mikroorganizmów nie może być przypadkowe, a wybór miejsca jest kluczowy w kontekście kolejnych etapów badań. Zdolności do biodegradacji związków aromatycznych poszukuje się przede wszystkim wśród mikroorganizmów zdolnych do bytowania w ich obecności w środowisku naturalnym. Testy przesiewowe pozwalają wytypować mikroorganizmy charakteryzujące się potencjałem biodegradacyjnym, które następnie poddaje się bardziej szczegółowym badaniom, w celu potwierdzenia ich zdolności do biodegradacji danego związku, np. w hodowlach płynnych mikroorganizmów, gdzie badany związek stanowi jedyne źródło węgla i energii.

W pierwszej publikacji opublikowanej w *Water, Air, and Soil Pollution* poruszyłam tematykę izolacji i charakterystyki psychrotolerancyjnych drożdży oraz potwierdziłam zdolność czystych kultur wytypowanych izolatów do efektywnej biodegradacji fenolu.

Badania rozpoczęłam poprzez izolację mikroorganizmów z próbek wody i gleby, pochodzących z torfowiska Rucianka. Torfowisko Rucianka zaliczane jest do torfowisk wysokich, występujących rzadko na terytorium Polski. Zlokalizowane jest w okolicy wsi o tej samej nazwie, w gminie Młynary, powiecie elbląskim, województwie warmińsko-mazurskim.

Przystępując do analizy literatury dotyczącej izolacji i identyfikacji mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji fenolu i innych związków fenolowych, dokonałam kilku założeń mających na celu wprowadzenie w tym zakresie badań ważnych elementów nowości naukowej. Po pierwsze przeanalizowałam, z jakich źródeł naturalnych oraz tych poddanych działalności człowieka (np. gleby skażone produktami ropopochodnymi zawierającymi fenole) izolowano mikroorganizmy zdolne do biodegradacji fenolu. Pozwoliło to na wybranie naturalnego środowiska charakteryzującego się potwierdzoną obecnością związków fenolowych, które dotąd nie było badane (lub badane było w niewielkim stopniu) jako źródło mikroorganizmów biodegradujących fenol.

Wybór torfowiska jako miejsca poboru prób był oparty o potwierdzony badaniami fakt, iż torfowiska naturalnie bogate są w związki aromatyczne, z grup fenoli i polifenoli, powstałe w wyniku rozkładu biomasy lignocelulozowej. W związku z tym przyjąłm założenie, iż mikroorganizmy naturalnie bytujące w takim środowisku powinny być zdolne do wykorzystania podobnych źródeł węgla w warunkach laboratoryjnych.

Próbki torfu oraz wody z torfowiska Rucianka pobierane były zimą, tzn. 5 stycznia 2015 roku oraz wiosną, tzn. 4 kwietnia 2015 roku, w celu izolacji mikroorganizmów zdolnych do efektywnego wzrostu w niskich temperaturach. Preferencje temperaturowe wyizolowanych szczepów zbadałam poprzez hodowlę prowadzoną w płytkach Petriego w temperaturze: 4, 18, 30 i 37°C. Testy pozwoliły na izolację 39 szczepów drożdży psychrotolerancyjnych (z optymalną temperaturą wzrostu równą 18°C, rozumianą jako temperatura charakteryzująca się najbardziej efektywnym wzrostem mikroorganizmów spośród czterech badanych temperatur). 21 izolatów pochodziło z próbek wody z torfowiska, natomiast 18 z próbek torfu pobranych z warstwy akrotelmu.

Izolaty (po uzyskaniu czystych kultur) poddałam następnie zmodyfikowanemu badaniu przesiewowemu (Middelhoven i in., 1991), którego głównym celem było wytypowanie drożdży potencjalnie zdolnych do biodegradacji fenolu. W tym celu wykorzystałam hodowle na skosach podłoża minimalnego, gdzie jedyne dostępne źródło węgla stanowił roztwór fenolu umieszczony na dnie skosu. Związek docierał do mikroorganizmów na zasadzie dyfuzji w podłożu bądź za pośrednictwem fazy gazowej. Dla 6 z badanych 39 szczepów zaobserwowałam intensywny

wzrost na całej powierzchni skosu, co w stosowanej metodzie oznaczało zdolność do asymilacji związku jako jedyne źródła węgla. Szczepy te poddałam kolejnym badaniom.

Kolejny etap badań uwzględniał hodowlę mikroorganizmów w minimalnym podłożu płynnym, zawierającym fenol jako źródło węgla w stężeniu 500, 750, 1000, 1500 i 2000 mg l⁻¹. Podczas hodowli prowadzonej w temperaturze 18°C dokonywałam pomiarów gęstości optycznej hodowli przy długości fali 600 nm wraz z jednoczesnym pomiarem stężenia pozostałego w hodowlach fenolu, z wykorzystaniem chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID).

Z sześciu przebadanych izolatów, trzy wykazywały korelację między zwiększającymi się wartościami gęstości optycznej a spadającym stężeniem pozostałego w hodowli płynnej fenolu. **Szczepy A01₁, B02₁ oraz L01₂ wykazywały zdolność do biodegradacji fenolu poniżej poziomu oznaczalności dla początkowego stężenia w podłożu hodowlanym: 500 mg l⁻¹ w czasie krótszym niż 30 godzin, 750 mg l⁻¹ po upływie 24 godzin inkubacji (dla szczepu A01₁) oraz 48 godzin (dla szczepów B02₁ oraz L01₂). W przypadku stężenia 1000 mg l⁻¹ tylko dwa szczepy wykazały zdolność do jego biodegradacji (szczep A01₁ oraz L01₂) w czasie 48 godzin. Żaden z badanych szczepów nie wykazał zdolności do biodegradacji fenolu w stężeniach wyższych niż 1000 mg l⁻¹.**

Dla wytypowanych trzech izolatów drożdży dokonałam identyfikacji taksonomicznej opartej o badania wykonane na bazie analiz wybranych sekwencji DNA genomowego badanych izolatów. Pierwszy krok polegał na amplifikacji z wykorzystaniem reakcji PCR (*ang. Polymerase Chain Reaction*) regionów D1/D2 rDNA oraz 5.8S-ITS rDNA. Oczyszczone produkty amplifikacji poddałam sekwencjonowaniu, a uzyskane sekwencje DNA porównałam z innymi sekwencjami DNA, dostępnymi w bazie GenBank. Następnie skonstruowałam drzewa filogenetyczne dla obu badanych fragmentów DNA. Dzięki tym działaniom **udało się sklasyfikować izolat A01₁ jako należący do gatunku *Candida subhashii*, B02₁ do gatunku *Candida oregonensis* oraz L01₂ do gatunku *Schizoblastosporion starkeyi-henricii*.**

Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, **uzyskane wyniki po raz pierwszy poruszają tematykę oceny zdolności psychrotolerancyjnych drożdży torfowiskowych do biodegradacji fenolu.** Ze względu na fakt, iż temperatura większości gleb i wód Polski jest niższa (minimalna temperatura gleb wynosi około -1°C, maksymalna 22°C, średnia w okresie wegetacyjnym 15°C (Rojek i Usowicz, 2018)) niż temperatura niezbędna do efektywnego wzrostu mikroorganizmów mezofilnych (najczęściej badanych głównie pod względem zdolności do biodegradacji związków z grupy fenoli i innych związków monoaromatycznych), to właśnie mikroorganizmy zimnolubne mogą potencjalnie znaleźć szersze zastosowanie w procesach biodegradacji także innych związków toksycznych w środowisku.

W ramach badań prowadzonych podczas studiów doktoranckich, **po raz pierwszy podjęłam ten temat, co wprowadza zarówno element nowości do aktualnego stanu wiedzy dotyczącej mikroorganizmów torfowiskowych, jak i biodegradacji fenolu. Uzyskane wyniki i ich analiza wzbogacają współczesną wiedzę dotyczącą mikroorganizmów psychrotolerancyjnych biodegradujących fenol, jak również dotyczącą mikroorganizmów izolowanych z terenów torfowisk.** Jak dotąd, w badaniach dotyczących różnorodności mikroorganizmów torfowiskowych, badacze skupiali się głównie na izolacji i identyfikacji bakterii i grzybów strzępkowych (Andersen i in., 2013; Elliott i in., 2015), a dostępna literatura naukowa nie dostarcza wielu informacji dotyczących drożdży pochodzących z torfowisk.

Przedstawione wyniki badań stanowią **pierwsze doniesienie o zdolności szczepów należących do gatunku *Candida subhashii*, *Candida oregonensis* oraz *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* do biodegradacji fenolu, znajdującego się w pożywce hodowlanej. Stężenie fenolu biodegradowanego przez badane drożdże wynosiło nawet**

1000 mg l⁻¹, a związek ten stanowił jedyne dostępne dla wzrostu mikroorganizmów źródło węgla w pożywce.

4.2 A RAPID AND SIMPLE METHOD FOR SCREENING MICROORGANISMS WITH A POTENTIAL FOR CATECHOL BIODEGRADATION (ZAŁĄCZNIK NR 2)

Kolejnym z etapów prowadzonych badań było opracowanie nowej, szybkiej i prostej metody przesiewowej, która pozwoli w sposób bardziej precyzyjny, w stosunku do aktualnie stosowanych metod, wskazać mikroorganizmy o potencjale biodegradacyjnym względem katecholu, a także potencjalnie innych związków fenolowych.

Współcześnie najczęściej stosowaną metodą przesiewową jest technika, którą zaproponował Middelhoven wraz z zespołem (1991). Została ona wykorzystana także jako test przesiewowy w pierwszej publikacji będącej elementem rozprawy doktorskiej, podczas izolacji mikroorganizmów z terenu torfowiska Rucianka, a odsetek fałszywie pozytywnych wyników wynosił 50%. W rezultacie, błędy testów przesiewowych powodują straty czasu (poświęconego m.in. na hodowlę mikroorganizmów) i środków finansowych (np. koszty pożywek), a także narażenie się podczas pracy badawczej na niepotrzebnie wydłużoną w czasie ekspozycję na toksyczne właściwości fenolu.

W związku z tym postanowiłam opracować nową metodę badań przesiewowych, generującą mniejszy procent fałszywie pozytywnych wyników, która umożliwiłaby w prosty sposób wytypowanie mikroorganizmów biodegradujących fenol. W czasie prowadzenia pracy nad testem, dzięki pogłębieniu wiedzy na temat znanych szlaków metabolizmu fenolu w organizmach aerobowych, dostrzegłam możliwość stworzenia testu przesiewowego, nie tylko służącego poszukiwaniu mikroorganizmów biodegradujących fenol, ale także potencjalnie inne związki aromatyczne, metabolizowane poprzez wspólny produkt pośredni, tj. katechol.

Nowa metoda została opracowana i opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Environmental Research* i stanowi drugą publikację (w kolejności wynikającej z daty przyjęcia i opublikowania pracy) dotyczącą badań prowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej.

W zaproponowanej metodzie wykorzystałam zdolność katecholu do formowania barwnych kompleksów z solami żelaza, a jej istotę opisałam we wstępie.

W celu optymalizacji metody zastosowałam różne stężenia katecholu w podłożu hodowlanym: 500, 750, 1000, 1500 oraz 2000 mg l⁻¹. Zmieniałam także stężenie roztworu chlorku żelaza (III), który w reakcji w katecholem powoduje zmianę zabarwienia podłoża z lekko żółtego do ciemnozielonego. W tym celu stosowałam stężenia 1%, 5% i 10% (m/v) oraz różne objętości roztworu chlorku żelaza (III), którym zalewałam płytki (2,5 ml, 5,0 ml oraz 7,0 ml). Różny był także czas inkubacji roztworu z podłożem (1, 2, 3 oraz 5 minut).

Przeprowadzone testy wskazały, iż **optymalne warunki prowadzenia testu przesiewowego z zastosowaniem zaproponowanej metody to: stosowanie płytek suplementowanych katecholem w stężeniu 500 mg l⁻¹, zalewanych 7,0 ml roztworu chlorku żelaza (III) w stężeniu 5% oraz inkubacja z roztworem chlorku żelaza (III) trwająca 5 minut.**

W celu zbadania użyteczności metody dokonałam izolacji mikroorganizmów z próbek gleby pochodzących z terenu gdańskiej Rafinerii Lotos oraz torfowiska niskiego zlokalizowanego w rejonach Bydgoszczy. Po wysianiu mikroorganizmów na podłoże suplementowane katecholem i po inkubacji zalewałam hodowlę płytkowe roztworem chlorku żelaza (III). Pierwszym wskaźnikiem potencjalnej zdolności do biodegradacji był wzrost kolonii na podłożu, natomiast w wyniku zalania płytek roztworem soli, w bezpośrednim otoczeniu niektórych z kolonii (obecnych na powierzchni płytek Petriego po ich inkubacji) obserwowałam przejaśnienia. Wystąpienie przejaśnień wynika z biodegradacji katecholu w otoczeniu rosnącej kolonii izolatu środowiskowego

(spowodowane wykorzystaniem związku do wzrostu przez mikroorganizmy), a więc brakiem możliwości utworzenia kompleksu katechol-jony Fe^{3+} . **Dwuetapowa weryfikacja (wzrost mikroorganizmów oraz pojawienie się przejaśnień w otoczeniu kolonii) pozwala na jednoznaczne wskazanie mikroorganizmów o potencjale biodegradacyjnym i zmniejsza prawdopodobieństwo nieprawidłowego wytypowania takich szczepów**, które może wystąpić w przypadku bazowania jedynie na obserwacji wzrostu mikroorganizmów na podłożu suplementowanym katecholem.

Ponadto użyteczność metody sprawdziłam także dla trzech szczepów drożdży pochodzących z terenów torfowiska Rucianka, wytypowanych w ramach pierwszej publikacji jako zdolnych do biodegradacji fenolu metodą Middelhovena (1991). Dla każdego ze szczepów obserwowano pojawienie się przejaśnień, charakterystyczne dla biodegradacji katecholu w podłożu hodowlanym.

Co więcej, w celu potwierdzenia zdolności wybranych szczepów do biodegradacji tego związku, przeprowadziłam hodowle płynne w podłożu suplementowanym katecholem. Uzyskane wyniki nie zostały opublikowane, natomiast dołączyłam je do rozprawy doktorskiej w postaci suplementu (**Rozdział 5, Suplement**) i krótko omówiłam ze względu na istotność uzyskanych wyników.

Zaproponowana **metoda pozwala w sposób szybki i prosty wskazać mikroorganizmy zdolne do biodegradacji katecholu, ale także potencjalnie innych związków aromatycznych** (Rys. 7). W związku z tym, iż katechol znajduje się w szlakach biodegradacji wielu związków aromatycznych, **metoda może znaleźć zastosowanie w przypadku poszukiwania mikroorganizmów, które warto zbadać w kierunku ich potencjału biodegradacyjnego dla tych węglowodorów, w których szlakach katechol jest wspólnym produktem pośrednim.**

4.3 DETERMINATION OF PHENOL BIODEGRADATION PATHWAYS IN THREE PSYCHROTOLERANT YEASTS, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ AND *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, ISOLATED FROM RUCIANKA PEATLAND (ZAŁĄCZNIK NR 3)

Kluczowym etapem prowadzonych badań była identyfikacja szlaków biodegradacji fenolu dla trzech wytypowanych wcześniej szczepów drożdży psychrotolerancyjnych, pochodzących z terenu torfowiska Rucianka.

Dostępne badania dotyczące identyfikacji szlaków biodegradacji fenolu skupiają się przede wszystkim na bakteriach mezofilnych. Dla porównania, literatura dotycząca mikroorganizmów psychrotolerancyjnych jest bardziej ograniczona, a tematyka psychrotolerancyjnych drożdży poruszana w bardzo niewielkim stopniu. Ponadto zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, wyniki opublikowane w załączonej publikacji stanowią pierwsze doniesienia dotyczące identyfikacji szlaków biodegradacji fenolu wśród drożdży pochodzących z torfowiska, należących do gatunków *Candida subhashii*, *Candida oregonensis* oraz *Schizoblastosporion starkeyi-henricii*.

Praca dotycząca identyfikacji szlaków biodegradacji fenolu wśród szczepów drożdży *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ oraz *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, wyizolowanych z terenów torfowiska Rucianka została opublikowana w czasopiśmie *Enzyme and Microbial Technology*.

W pracy wykorzystałam dwa sposoby przygotowywania inokulum drożdżowego. W pierwszym z nich pomijałam etap głodzenia komórek, a hodowle przygotowywałam w podłożu z dodatkiem glukozy. W drugim ze sposobów inokulum przygotowywałam poprzez hodowle drożdży w podłożu minimalnym, bez żadnego źródła węgla. Właściwe hodowle prowadziłam w podłożu minimalnym suplementowanym fenolem w stężeniu 500, 750 oraz 1000 mg l⁻¹. Inokulum stanowiło 5% objętości prowadzonych hodowli. W przypadku innych opublikowanych prac dotyczących biodegradacji fenolu nie porównywano wpływu obu wariantów przygotowania hodowli na wydajność biodegradacji fenolu oraz na zdolność do przekształcania fenolu do katecholu i specyficznych produktów drogi *orto*- oraz *meta*- przez badane mikroorganizmy.

W celu zbadania aktywności enzymatycznej oraz identyfikacji szlaków biodegradacji fenolu przeprowadziłam trzy rodzaje testów: wstępny test identyfikujący aktywność enzymatyczną dioksygenaz katecholowych, właściwy test badający aktywność enzymatyczną 1,2- oraz 2,3-dioksygenaz katecholowych oraz analizę obecności wybranych produktów pośrednich szlaków biodegradacji fenolu w płynach pochodzących z hodowli oraz ekstraktach komórkowych z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

Wstępny test selekcyjny pozwalał na wizualną ocenę zmiany zabarwienia mieszaniny reakcyjnej, a tym samym na określenie możliwej obecności odpowiednio enzymów 1,2-dioksygenaz katecholowych bądź 2,3-dioksygenaz katecholowych w hodowlach badanych drożdży. Test ten zastosowałam jedynie jako etap przesiewowy. Na tym etapie dla wszystkich badanych szczepów, niezależnie od sposobu prowadzenia hodowli oraz stężenia katecholu w hodowli, obserwowałam zmianę zabarwienia mieszaniny reakcyjnej na kolor charakterystyczny dla obecności 1,2-dioksygenaz katecholowych.

Właściwy test enzymatyczny polegał na badaniu obecności charakterystycznych produktów rozkładu katecholu na drodze *orto*-, a więc kwasu *cis,cis*-mukonowego bądź na drodze *meta*-, tj. semialdehydu 2-hydroksymukonowego. W teście wykorzystałam hodowle drożdżowe bądź surowe frakcje enzymatyczne, otrzymane z hodowli prowadzonych z etapem głodzenia lub bez tego etapu i badałam ich zdolność do rozszczepienia pierścienia katecholu, będącego głównym substratem reakcji enzymatycznej. Obecność charakterystycznych produktów monitorowałam

poprzez badania spektrofotometryczne i zwiększające się wartości absorbancji dla fali długości 260 nm (dla kwasu *cis,cis*-mukonowego) bądź 375 nm (dla semialdehydu 2-hydroksymukonowego). Uzyskane wyniki potwierdziły te, które otrzymałam podczas testów wstępnych. **Wszystkie badane szczepy drożdży, niezależnie od sposobu prowadzenia reakcji, zarówno dla surowych frakcji enzymatycznych, jak i dla hodowli wykazały zdolność do biodegradacji fenolu na drodze *orto*-, a tym samym zdolność do produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego.** Najwyższą aktywność specyficzną uzyskałam dla surowej frakcji enzymatycznej szczepu B02₁ uzyskanej podczas hodowli prowadzonej bez etapu głodzenia, gdzie podłoże suplementowane było fenolem w stężeniu 750 mg l⁻¹. **Ponadto w publikacji opisałam znaczące różnice między aktywnością enzymatyczną 1,2-dioxygenaz katecholowych dla poszczególnych badanych szczepów drożdży oraz wpływ sposobu przygotowywania inokulum i stężenia fenolu w hodowli na otrzymane wyniki aktywności.**

Kolejnym etapem badań była identyfikacja wybranych produktów biodegradacji fenolu na drodze *orto*- i *meta*- z wykorzystaniem techniki GC-MS. Badania przeprowadziłam zarówno dla płynów pohodowlanych poddanych derywatywacji, jak i dla deratyzowanych ekstraktów komórkowych, natomiast w przypadku tych drugich nie zaobserwowałam charakterystycznych produktów biodegradacji.

Analiza produktów biodegradacji w przypadku płynów pohodowlanych wskazała, iż każdy z badanych szczepów zdolny był do biodegradacji fenolu jedynie na drodze *orto*-. Obserwowałam powstawanie katecholu – głównego produktu pośredniego szlaków biodegradacji fenolu, a następnie kwasu *cis,cis*-mukonowego, produktu charakterystycznego dla biodegradacji na drodze *orto*-. Nie zaobserwowałam powstania produktu charakterystycznego dla biodegradacji fenolu na drodze *meta*-, tj. semialdehydu 2-hydroksymukonowego.

Najwyższe stężenie kwasu *cis,cis*-mukonowego uzyskałam dla szczepu B02₁, podczas hodowli prowadzonej w warunkach bez etapu głodzenia, gdzie stężenie suplementowanego fenolu wynosiło 750 mg l⁻¹. W publikacji opisałam także znaczące różnice między stężeniami powstałych produktów biodegradacji dla badanych szczepów, z uwzględnieniem wpływu stężenia fenolu oraz sposobu przygotowywania inokulum.

Uzyskane wyniki pozwalają wstępnie wytypować szczep *Candida oregonensis* B02₁, jako szczep, który mógłby znaleźć zastosowanie w badaniach nad uzyskaniem mikroorganizmu modyfikowanego genetycznie, dedykowanego produkcji biotechnologicznej kwasu *cis,cis*-mukonowego z substratu, takiego jak fenol. Kwas ten wykorzystywany jest w m.in. do produkcji tworzyw sztucznych, tj. nylonu i PET, a konwencjonalne metody jego wykorzystywania są kosztowne i mają negatywny wpływ na środowisko naturalne.

5. SUPLEMENT - BIODEGRADACJA KATECHOLU W PODŁOŻU PŁYNNYM PRZEZ DROŹDŻE *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ ORAZ *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂

W Publikacji nr 2, będącej elementem rozprawy doktorskiej, opisałam i zoptymalizowałam nową metodę selekcji mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji katecholu oraz potencjalnie innych węglowodorów aromatycznych, opartą o badanie ich zdolności do biodegradacji katecholu. Publikacja ta przedstawia również rezultaty testu uzyskane dla trzech szczepów drożdży torfowiskowych, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ oraz *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, których identyfikacja i zdolność do biodegradacji fenolu została przedstawiona w Publikacji nr 1. W Publikacji nr 2 zamieszczono zdjęcia przedstawiające w sposób wizualny degradację katecholu poprzez badane szczepy drożdży i pojawienie się stref przejaśnień w okolicach posiewu i wzrostu wspomnianych mikroorganizmów. W publikacji wspominałam także o tym, iż zdolność wytypowanych szczepów drożdży do biodegradacji katecholu została potwierdzona także dla hodowli płynnych, suplementowanych katecholem jako jedynym źródłem węgla. Dane te nie zostały przedstawione w żadnej z publikacji, dlatego poniżej postanowiłam przedstawić najważniejsze wnioski wynikające z tych badań. Uważam, że stanowią one ważne uzupełnienie dla przedstawienia całkowitego obrazu moich badań zaprezentowanych w publikacjach 1–3, będących elementem rozprawy doktorskiej.

Analizę zdolności wytypowanych szczepów do biodegradacji katecholu przeprowadziłam poprzez ich hodowlę w podłożu płynnym YNB w/a (*ang. Yeast Nitrogen base without amino acids*) suplementowanym katecholem w stężeniu 500–2000 mg l⁻¹. Hodowle prowadzone były przez okres 9 dni w temperaturze 18°C, a w trakcie ich prowadzenia dokonywałam jednoczesnych pomiarów spektrofotometrycznych wartości gęstości optycznej hodowli przy długości fali 600 nm (OD₆₀₀), w celu oceny przyrostu biomasy badanych szczepów drożdży w czasie trwania prowadzonej hodowli oraz pomiaru stężenia pozostałego w podłożu katecholu z wykorzystaniem chromatografii gazowej (GC-FID).

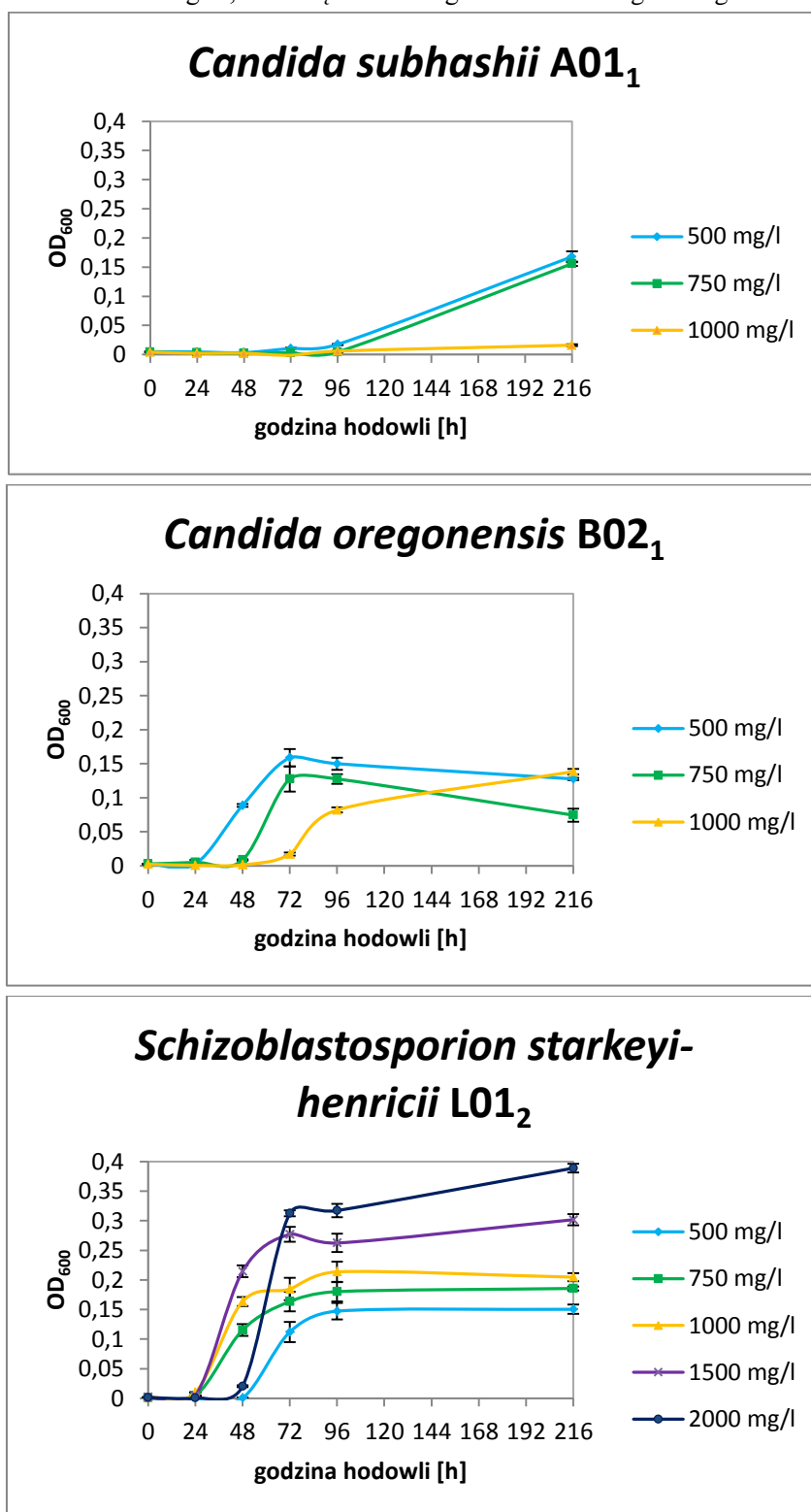
Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność trzech szczepów drożdży pochodzących z torfowiska Rucianka do wzrostu w podłożu płynnym suplementowanym katecholem, który stanowił jedyne źródło węgla w podłożu (Rys. 9), co potwierdziło wyniki uzyskane w opracowanym przeze mnie teście przesiewowym bazującym na katecholu (Publikacja nr 2).

Zgodnie z uzyskanymi parametrami gęstości optycznej hodowli wskazałam, iż szczep *Candida subhashii* A01₁ wykazywał zdolność do wzrostu, wykorzystując katechol w stężeniu 500 mg l⁻¹ oraz 750 mg l⁻¹. Osiągane wartości parametru OD₆₀₀ były jednak niskie, a czas adaptacji do warunków prowadzenia hodowli bardzo długi. Pierwsze istotne zmiany wartości parametru OD₆₀₀ można było zaobserwować dopiero po upływie ok. 120 godzin hodowli. Wyraźnie wskazuje to na trudność w przyswajaniu katecholu przez ten szczep drożdży psychrotolerancyjnych.

W przypadku szczepu *Candida oregonensis* B02₁ wzrastające wartości parametru OD₆₀₀ zaobserwowałam dla trzech badanych stężeń katecholu w podłożu hodowlanym: 500 mg l⁻¹, 750 mg l⁻¹ oraz 1000 mg l⁻¹. Wartości parametru OD₆₀₀ również nie były wysokie, ale czas adaptacji do warunków hodowli był zdecydowanie krótszy niż dla szczepu A01₁. W przypadku szczepu B02₁ pierwsze zmiany wartości OD₆₀₀ obserwowałam odpowiednio dla stężenia katecholu 500 mg l⁻¹, 750 mg l⁻¹ oraz 1000 mg l⁻¹ po 24, 48 i 68 godzinach hodowli.

Szczepem drożdży psychrotolerancyjnych, który wykazywał najwyższe wartości parametru OD₆₀₀ dla szerokiego spektrum stężeń katecholu w podłożu hodowlanym był szczep *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂. Wykazywał on zdolności do wzrostu w podłożu suplementowanym katecholem w stężeniu 500 mg l⁻¹, 750 mg l⁻¹, 1000 mg l⁻¹, 1500 mg l⁻¹

oraz 2000 mg l⁻¹. Osiągał znacznie wyższe wartości parametru OD₆₀₀ niż wcześniej opisane szczepy drożdży wyizolowane z terenu torfowiska Rucianka. Ponadto czas adaptacji potrzebny do przystosowania mikroorganizmu do biodegradacji katecholu, wynosił odpowiednio 24 godziny dla stężeń 750, 1000 oraz 1500 mg l⁻¹, a dla stężeń 500 mg l⁻¹ oraz 2000 mg l⁻¹ 48 godzin.



Rys. 9 Zależność zmiany wartości gęstości optycznej hodowli badanych szczepów drożdży od godziny prowadzenia hodowli, w której dokonano pomiaru tej wartości, dla szczepów *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ i *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂

Wyniki uzyskane dla analizy stężenia katecholu pozostałego w płynie pohodowlanym (Tab. 2) zgodne były z wynikami uzyskanymi dla badania gęstości optycznej hodowli (Rys. 9).

Analiza chromatograficzna potwierdziła, iż szczep *Candida subhashii* A01₁ zdolny był do przeprowadzenia biodegradacji katecholu w stężeniach 500 mg l⁻¹ oraz 750 mg l⁻¹. Biodegradacja była procesem bardzo powolnym, a spadek katecholu poniżej granicy detekcji obserwowaliśmy w próbkach pobranych po 216 godzinach hodowli. Potwierdziło to hipotezę, iż dla tego szczepu katechol nie był preferowanym źródłem węgla, a czas potrzebny do adaptacji do takich warunków prowadzenia reakcji był długi, a wydajność przyrostu biomasy niższa niż dla pozostałych badanych szczepów.

W przypadku szczepu *Candida oregonensis* B02₁, dla stężeń katecholu 500, 750 i 1000 mg l⁻¹ biodegradację obserwowaliśmy odpowiednio dla wzrastającego stężenia związku, po 48, 72 i 216 godzinach. Tabela zamieszczona poniżej wyraźnie wskazuje, iż szczep ten preferował niższe stężenia katecholu w pożywce, w przypadku których biodegradacja była procesem stosunkowo szybkim, co znajdowało potwierdzenie w wynikach uzyskanych dla wartości OD₆₀₀.

Na szczególną uwagę zasługuje szczep *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, zdolny do biodegradacji katecholu w bardzo szerokim spektrum stężeń w podłożu hodowlanym. Co istotne, biodegradacja tego związku jest procesem szybkim w porównaniu do dwóch pozostałych szczepów drożdży. Stężenia graniczne, tj. 500 mg l⁻¹ oraz 2000 mg l⁻¹ biodegradowane były po ok. 72 godzinach hodowli, a pozostałe po 48 godzinach.

Tab. 2 Czas potrzebny do przeprowadzenia biodegradacji katecholu, do stężenia poniżej granicy detekcji metody GC-FID, przez szczepy drożdży torfowiskowych *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ i *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂

Szczep:	<i>Candida subhashii</i> A01 ₁			<i>Candida oregonensis</i> B02 ₁			<i>Schizoblastosporion starkeyi-henricii</i> L01 ₂				
Stężenie katecholu [mg l ⁻¹]	500	750	1000	500	750	1000	500	750	1000	1500	2000
Czas potrzebny do przeprowadzenia biodegradacji [h]	216	216	-	48	72	216	72	48	48	48	72

Wyniki pomiarów gęstości optycznej ściśle korelują z wynikami uzyskanymi dla badania stężenia katecholu pozostałego w medium hodowlanym. Dla wszystkich trzech szczepów drożdży wzrost w podłożu równoznaczny był z wykorzystaniem katecholu jako jedyne źródła węgla. Ponadto badania w hodowlach płynnych potwierdzają wyniki uzyskiwane w ramach testu selekcyjnego (Publikacja nr 2). Mikroorganizmy zdolne do wzrostu na podłożu stałym suplementowanym katecholem (test selekcyjny) zdolne są do jego biodegradacji w hodowlach płynnych, jednakże wykazują się znaczącymi różnicami w tempie adaptacji do warunków hodowli, opornością na toksyczność katecholu, tempem wzrostu i wydajności wzrostu biomasy oraz czasem, po którym stężenie katecholu w hodowli spada poniżej poziomu oznaczalności.

Porównując wyniki uzyskane dla biodegradacji fenolu oraz katecholu można zauważyć, iż każdy ze szczepów drożdży torfowiskowych wykazuje różne preferencje do biodegradacji obu badanych związków, jak również różną oporność na toksyczne działanie obu badanych związków w odniesieniu do wzrastającego ich stężenia w hodowli, gdzie stanowiły jedyne dostępne źródła węgla dla hodowanych drożdży.

Szczep *Candida subhashii* A01₁ zdolny był do biodegradacji fenolu w stężeniach 500, 750 oraz 1000 mg l⁻¹. W przypadku katecholu, biodegradacja związku obserwowana była jedynie

dla dwóch stężeń związku, 500 i 750 mg l⁻¹. Wyższe stężenie katecholu nie ulegało biodegradacji, w związku z tym można uznać, iż związkiem łatwiej biodegradowalnym dla tego szczepu jest fenol.

W przypadku szczepu *Candida oregonensis* B02₁ biodegradacja fenolu następowała jedynie dla stężeń 500 i 750 mg l⁻¹, natomiast w przypadku katecholu szczep ten wykazywał również zdolność do biodegradacji stężenia 1000 mg l⁻¹. Mimo faktu, iż katechol uznawany jest za związek o wyższej toksyczności niż fenol, w przypadku tego szczepu zaobserwowałam zdolność do biodegradacji wyższych stężeń katecholu niż fenolu.

Dla szczepu *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂ biodegradacja fenolu możliwa była dla stężeń 500, 750 i 1000 mg l⁻¹. Co ciekawe, w przypadku katecholu obserwowałam zdolność do biodegradacji związku nawet w stężeniu 2000 mg l⁻¹.

Podsumowując, szczepem charakteryzującym się zdolnością do biodegradacji obu związków w bardzo szerokim spektrum stężeń był szczep *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂. W przypadku szczepu A01₁, biodegradacja stężenia 1000 mg l⁻¹ następowała jedynie w przypadku fenolu, co może wynikać z wysokiej toksyczności katecholu. W przypadku szczepu B02₁, obserwowałam zdolność do biodegradacji katecholu w pożywce w wyższych stężeniach niż fenol.

W związku z tym uważam, iż w przypadku badań dotyczących możliwości produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego z wykorzystaniem toksycznych węglowodorów aromatycznych należałoby założyć, iż potencjalnie oba związki mogłyby znaleźć zastosowanie w tym procesie, jednak możliwe, że jego wydajność zależałaby od specyficznych preferencji (w tym zdolności do biodegradacji różnych stężeń tych związków) wykazywanych przez poszczególne szczepy torfowiskowych drożdży psychrotolerancyjnych.

6. PODSUMOWANIE

Węglowodory aromatyczne to grupa związków organicznych obecnych w odpadach pochodzących z licznych procesów przemysłowych i zdolnych do akumulacji w glebie i wodach gruntowych. Wśród tych węglowodorów istotną grupę, pod względem możliwości skażenia środowiska naturalnego, stanowią fenole i ich pochodne. W badaniach prowadzonych w ramach pracy doktorskiej skupiłam się głównie na fenolu, najbardziej powszechnym i szeroko badanym przedstawicielu związków fenolowych. Ponadto ze względu na kluczową rolę katecholu (główny produkt pośredni szlaków biodegradacji wielu węglowodorów aromatycznych, obecność w ściekach przemysłowych, wysoka toksyczność), część uwagi poświęciłam także badaniom dotyczącym biodegradacji katecholu.

W swoich badaniach prowadzonych w ramach pracy doktorskiej skupiłam się na poszukiwaniu psychrotolerancyjnych drożdży torfowiskowych zdolnych do biodegradacji fenolu oraz katecholu, obecnych w prowadzonych hodowlach w szerokim zakresie stężeń. Najważniejsze wyniki moich badań zostały opublikowane w ramach trzech publikacji, ściśle ze sobą powiązanych oraz zostały uzupełnione danymi z dołączonego suplementu.

W pierwszej z nich (**Załącznik nr 1**) dokonałam izolacji i identyfikacji trzech szczepów drożdży pochodzących z terenu torfowiska Rucianka, zdolnych do biodegradacji fenolu. Szczepy te oznaczone zostały jako A01₁, B02₁ i L01₂ oraz sklasyfikowane odpowiednio jako należące do gatunków: *Candida subhashii*, *Candida oregonensis* oraz *Schizoblastosporion starkeyi-henricii*. Zgodnie z moją wiedzą, wyniki po raz pierwszy wskazują na obecność gatunków *Candida subhashii* oraz *Candida oregonensis* w próbkach pobranych z terenów torfowiska. Dla gatunku *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* jest to również jedno z pierwszych doniesień dotyczących izolacji tego gatunku z torfowiska (Thormann i Rice, 2007). Ponadto praca po raz pierwszy opisuje potencjał tych mikroorganizmów do przeprowadzania biodegradacji fenolu. Co więcej, w swoich badaniach hodowle prowadziłam w temperaturze 18°C (wybranej dla zapewnienia efektywnego wzrostu mikroorganizmów psychrotolerancyjnych), a uzyskane wyniki poszerzają współczesną wiedzę dotyczącą biodegradacji fenolu przez mikroorganizmy zimnolubne.

Kolejnym ważnym aspektem opublikowanych badań jest fakt, iż mikroorganizmy wykazywały zdolność do biodegradacji fenolu, który obecny był w hodowlach w wysokich stężeniach. Wszystkie szczepy zdolne były do biodegradacji fenolu w stężeniach: 500 i 750 mg l⁻¹, a dwa (A01₁ i L01₂) w stężeniu 1000 mg l⁻¹. Biodegradacja fenolu poniżej poziomu oznaczalności następowała w czasie krótszym niż 48 godzin.

Druga publikacja (**Załącznik nr 2**) zawiera opis nowej metody służącej jako test selekcyjny w kierunku badania mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji katecholu oraz potencjalnie innych węglowodorów aromatycznych. Do opracowania tej metody wykorzystałam fakt, iż katechol jest wspólnym produktem pośrednim szlaków biodegradacji wielu węglowodorów aromatycznych, w tym fenolu. Ponadto ze względu na jego właściwości i zdolność do tworzenia barwnych kompleksów z solami żelaza (III), wykorzystanie tego związku pozwala na jednoznaczną interpretację wyników. W porównaniu do innych metod selekcyjnych, co zostało opisane w sekcji 2.8, zaproponowana metoda cechuje się dwoma czynnikami pozwalającymi na wytypowanie mikroorganizmów o potencjale biodegradacyjnym. To wzrost na płytkach suplementowanych katecholem, ale również obserwacja stref przejaśnień wokół kolonii, które wykorzystują katechol jako źródło węgla (strefy przejaśnień powstają w wyniku braku możliwości tworzenia kompleksów katechol-Fe³⁺). Wykorzystanie dwóch czynników selekcyjnych pozwala na ograniczenie potencjalnie fałszywie pozytywnych wyników i pozwala na selekcję tych mikroorganizmów, których kolonie bezpośrednio wskazują na zdolność do biodegradacji katecholu.

Opracowana metoda jest stosunkowo tania, szybka, prosta w ujęciu wykonania badania i nie wymaga specjalistycznej aparatury. Ponadto pozwala na bezpośrednią izolację mikroorganizmów z próbek wody czy gleby, bez konieczności wykorzystywania czystych kultur izolatów. Może również służyć nie tylko jako test selekcyjny do poszukiwania mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji katecholu, ale potencjalnie również wielu innych związków, które w warunkach tlenowych biodegradowane są poprzez wytworzenie katecholu, jako głównego produktu pośredniego omawianych w pracy szlaków *orto*- i *meta*-. W konsekwencji, próbki środowiskowe można badać pod kątem większej gamy interesujących biotechnologicznie izolatów, a szczególnie pod kątem poszukiwania mikroorganizmu zdolnego do przekształcania jak najszerszej gamy związków monoaromatycznych do kwasu *cis,cis*-mukonowego lub wybranie mikroorganizmów szczególnie predysponowanych do przetwarzania konkretnego węglowodoru aromatycznego do tego kwasu.

W pracy doktorskiej zawarłam również wyniki dotyczące badania zdolności trzech wytypowanych szczepów drożdży torfowiskowych do biodegradacji katecholu w hodowlach płynnych (**Suplement**). Przedstawione wyniki są potwierdzeniem, iż mikroorganizmy zdolne do biodegradacji katecholu podczas testu selekcyjnego, wykazują także zdolność do jego biodegradacji w hodowlach płynnych, co może zostać wykorzystane w dalszych badaniach nad potencjałem biotechnologicznym wybranego szczepu drożdży psychrotolerancyjnych np. do usuwania katecholu z wybranego typu ścieków przemysłowych.

W trzeciej publikacji (**Załącznik nr 3**) będącej elementem rozprawy doktorskiej dokonałam identyfikacji szlaków biodegradacji fenolu przeprowadzanej przez trzy wytypowane szczepy drożdży: *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ oraz *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂. Najważniejszym elementem nowości tej publikacji jest fakt, iż jest to pierwsze doniesienie dotyczące identyfikacji szlaków biodegradacji fenolu przeprowadzanej przez te gatunki drożdży. Ponadto praca wzbogaca współczesną wiedzę dotyczącą szlaków metabolicznych uczestniczących w procesie biodegradacji fenolu wśród drożdży psychrotolerancyjnych i jest pierwszym doniesieniem uwzględniającym drożdże torfowiskowe, których potencjał biodegradacyjny i biotransformacyjny w odniesieniu do węglowodorów aromatycznych jest wciąż zbadany w bardzo małym stopniu. Praca potwierdza również wyniki innych badań naukowych, wskazujących na szlak *orto*- jako dominujący, wśród dotąd przebadanych, gatunków drożdży.

W pracy zawarłam porównanie dwóch różnych metod przygotowywania inokulum drożdżowego (z etapem głodzenia komórek bądź bez tego etapu), co zgodnie z moją wiedzą nie było poruszane w przypadku innych publikacji dotyczących tej tematyki i stanowi kolejny element nowości naukowej. Praca ukazuje, jak duży wpływ na proces biodegradacji i produkcji późniejszych jej metabolitów (katecholu oraz kwasu *cis,cis*-mukonowego) ma pierwszy etap hodowli mikroorganizmów, a więc przygotowanie inokulum.

Ponadto praca wskazuje kolejny kierunek możliwych badań, którym jest wykorzystanie szczepu *Candida oregonensis* B02₁ do produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego, głównego produktu biodegradacji fenolu (i wielu innych węglowodorów aromatycznych) poprzez szlak *orto*-, będącego substratem wykorzystywanym do produkcji farb, nylonu i tworzywa sztucznego PET.

Podsumowując, najważniejsze elementy nowości naukowej mojej rozprawy doktorskiej to:

- wykazanie przydatności torfowiska Rucianka jako miejsca izolacji mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji fenolu oraz katecholu, ze względu na obecność w tym środowisku związków fenolowych i polifenolowych powstałych w wyniku rozkładu biomasy lignocelulozowej;
- izolacja dwóch szczepów drożdży należących do gatunków, które wcześniej nie były izolowane z terenów torfowisk, tj. *Candida subhashii* oraz *Candida oregonensis*;

- pierwsze badania dotyczące zdolności szczepów drożdży należących do gatunków *Candida subhashii*, *Candida oregonensis* oraz *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* do biodegradacji fenolu;
- opracowanie nowej metody selekcyjnej, pozwalającej na izolację mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji katecholu, ale także potencjalnie innych związków aromatycznych, w których szlakach biodegradacji w warunkach tlenowych katechol stanowi główny produkt pośredni;
- pierwsze doniesienie dotyczące identyfikacji szlaku biodegradacji fenolu (szlaku *orto-*) przez wytypowane szczepy psychrotolerancyjnych drożdży torfowiskowych;
- pierwsze badania porównujące wpływ przygotowywania inokulum drożdżowego na proces biodegradacji fenolu, adaptację do warunków hodowli, tempo przyrostu biomasy oraz spadek stężenia fenolu w płynie hodowlanym wykonane dla psychrotolerancyjnych drożdży;
- wykazanie, również po raz pierwszy, możliwości wykorzystania szczepów drożdży torfowiskowych (szczególnie szczepu *Candida oregonensis* B02₁) do produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego z fenolu;
- wskazanie szczepu *Candida oregonensis* B02₁ jako szczepu wytypowanego do dalszych badań, których celem będzie, dzięki zastosowaniu inżynierii genetycznej, uzyskanie rekombinantowego szczepu o zdolności do wysokowydajnej produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego w procesie biotechnologicznym z wykorzystaniem substratów, takich jak np. fenol lub w dalszej perspektywie, z wybranych ścieków przemysłowych zawierających ten związek.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abd-El-Haleem, D., Beshay, U., Abdelhamid, A.O., Moawad, H., Zaki, S., 2003. Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter* sp. strain W-17. *African J. Biotechnol.* 2, 8–12. doi:10.5897/AJB2003.000-1002
- Abuhamed, T., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, T., Mehmetoğlu, Ü., 2004. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochem.* 39, 983–988. doi:10.1016/S0032-9592(03)00210-3
- Ahmad, S.A., Shamaan, N.A., Arif, N.M., Koon, G.B., Shukor, M.Y.A., Syed, M.A., 2012. Enhanced phenol degradation by immobilized *Acinetobacter* sp. strain AQ5NOL 1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 347–352. doi:10.1007/s11274-011-0826-z
- Al-Abadleh, H.A., 2015. Review of the bulk and surface chemistry of iron in atmospherically relevant systems containing humic-like substances. *RSC Adv.* 5, 45785–45811. doi:10.1039/C5RA03132J
- Aleksieva, Z., Ivanova, D., Godjevargova, T., Atanasov, B., 2002. Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochem.* 37, 1215–1219. doi:10.1016/S0032-9592(01)00336-3
- Andersen, R., Chapman, S.J., Artz, R.R.E., 2013. Microbial communities in natural and disturbed peatlands: A review. *Soil Biol. Biochem.* 57, 979–994. doi:10.1016/j.soilbio.2012.10.003
- Annadurai, G., Juang, R.S., Lee, D.J., 2002. Factor optimization for phenol removal using activated carbon immobilized with *Pseudomonas putida*. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 37, 149–161. doi:10.1081/ESE-120002579
- Anselmo, A.M., Mateus, M., Cabral, J.M.S., Novais, J.M., 1985. Degradation of phenol by immobilized cells of *Fusarium flocciferum*. *Biotechnol. Lett.* 7, 889–894. doi:10.1007/BF01088011
- Aravindhan, R., Rao, J.R., Nair, B.U., 2009. Application of a chemically modified green macro alga as a biosorbent for phenol removal. *J. Environ. Manage.* 90, 1877–1883. doi:10.1016/j.jenvman.2008.12.005
- Aresta, M., Quaranta, E., Liberio, R., Dileo, C., Tommasi, I., 2010. Enzymatic Synthesis of 4-OH-Benzoic Acid from Phenol and CO₂: The First Example of a Biotechnological Application of a Carboxylase Enzyme. *ChemInform* 29, doi:10.1002/chin.199844045
- Arora, P.K., Sharma, A., 2015. New metabolic pathway for degradation of 2-nitrobenzoate by *Arthrobacter* sp. SPG. *Front. Microbiol.* 6, 551. doi:10.3389/fmicb.2015.00551
- ATSDR, 2015. Toxicological Profile for Phenol.
- Banat, F., Al-Bashir, B., Al-Asheh, S., Hayajneh, O., 2000. Adsorption of phenol by bentonite. *Environ. Pollut.* 107, 391–398. doi:10.1016/S0269-7491(99)00173-6
- Banerjee, I., Modak, J.M., Bandyopadhyay, K., Das, D., Maiti, B.R., 2001. Mathematical model for evaluation of mass transfer limitations in phenol biodegradation by immobilized *Pseudomonas putida*. *J. Biotechnol.* 87, 211–223. doi:10.1016/S0168-1656(01)00235-8
- Barbe, V., Vallenet, D., Fonknechten, N., Kreimeyer, A., Oztas, S., Labarre, L., Cruveiller, S., Robert, C., Duprat, S., Wincker, P., Ornston, L.N., Weissenbach, J., Marlière, P., Cohen, G.N., Médigue, C., 2004. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res.* 32, 5766–5779. doi:10.1093/nar/gkh910
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 1983. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Basha, K.M., Aravindan, R., Thangavelu, V., 2010. Recent advances in the Biodegradation of Phenol: A review. *Asian J. EXP. BIOL. SCI.* 1, 219–223.
- Becker, J., Kuhl, M., Kohlstedt, M., Starck, S., Wittmann, C., 2018. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of *cis, cis*-muconic acid from lignin. *Microb. Cell Fact.* 17. doi:10.1186/s12934-018-0963-2
- Bergauer, P., Fonteyne, P.-A., Nolard, N., Schinner, F., Margesin, R., 2005. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere* 59, 909–918. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.011
- Bettmann, H., Rehm, H.J., 1984. Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20, 285–290. doi:10.1007/BF00270587
- Boczkaj, G., Makoś, P., Przyjazny, A., 2016. Application of dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography with mass spectrometry for the determination of oxygenated volatile organic compounds in effluents from the production of petroleum bitumen. *J. Sep. Sci.* 39, 2604–2615. doi:10.1002/jssc.201501355
- Boczkaj, G., Przyjazny, A., Kamiński, M., 2014. New Procedures for Control of Industrial Effluents Treatment Processes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53, 1503–1514. doi:10.1021/ie402126d

- Boroujeni, N.A., Hassanshahian, M., Mohammad, S., Khoshrou, R., 2014. Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from Persian Gulf. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* 2, 408–416.
- Bramhachari, P.V., Reddy, D.R.S., Kotresha, D., 2016. Biodegradation of catechol by free and immobilized cells of *Achromobacter xylosoxidans* strain 15DKVB isolated from paper and pulp industrial effluents. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 36–44. doi:10.1016/j.bcab.2016.05.003
- Broderick, J.B., O'Halloran, T. V., 1991. Overproduction, purification, and characterization of chlorocatechol dioxygenase, a non-heme iron dioxygenase with broad substrate tolerance. *Biochemistry* 30, 7349–7358. doi:10.1021/bi00243a040
- Broholm, M.M., Arvin, E., 2000. Biodegradation of phenols in a sandstone aquifer under aerobic conditions and mixed nitrate and iron reducing conditions. *J. Contam. Hydrol.* 44, 239–273. doi:10.1016/S0169-7722(00)00103-0
- Bugg, T.D.H., 2003. Dioxygenase enzymes: Catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron.* doi:10.1016/S0040-4020(03)00944-X
- Bugg, T.D.H., 2001. Oxygenases: Mechanisms and structural motifs for O₂ activation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* doi:10.1016/S1367-5931(00)00236-2
- Bugg, T.D.H., Lin, G., 2001. Solving the riddle of the intradiol and extradiol catechol dioxygenases: How do enzymes control hydroperoxide rearrangements? *Chem. Commun.* doi:10.1039/b100484k
- Buswell, J.A., 1975. Metabolism of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 124, 1077–1083. doi:10.1128/jb.124.3.1077-1083.1975
- Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Patel, T.N., Tiwari, K.K., 2010. Biodegradation of phenol by native microorganisms isolated from coke processing wastewater. *J. Environ. Biol.* 31, 293–296.
- Chernov, I.Y., 1985. Synecological analysis of yeast groupings in the Taimyr tundra. *Ekologiya* 1:54–608.
- Cho, Y.G., Rhee, S.K., Lee, S.T., 2000. Influence of phenol on biodegradation of p-nitrophenol by freely suspended and immobilized *Nocardioides* sp. NSP41. *Biodegradation* 11, 21–28. doi:10.1023/A:1026512922238
- Choi, S., Lee, H.N., Park, E., Lee, S.J., Kim, E.S., 2020. Recent advances in microbial production of *cis,cis*-muconic acid. *Biomolecules.* doi:10.3390/biom10091238
- Chua, J.W., Hsieh, J.H., 1990. Oxidative bioconversion of toluene to 1,3-butadiene-1,4-dicarboxylic acid (*cis,cis*-muconic acid). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 127–143. doi:10.1007/BF01200932
- CIOP, 2017. Centralny Instytut Ochrony Pracy, fenol.
- Clayton G.D., Clayton F.E., 1994. Patty's industrial hygiene and Toxicology. John Wiley & sons Inc, New York, 2A: 132.
- Clymo, R.S., 1983. Peat. *Ecosystems of the World 4A, Mires: Swamp, Bog, Fen, and Moor*, Elsevier, New York
- Cordova-Rosa, S.M., Dams, R.I., Cordova-Rosa, E.V., Radetski, M.R., Corrêa, A.X.R., Radetski, C.M., 2009. Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *J. Hazard. Mater.* 164, 61–66. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.07.120
- Darisimall, 2006. Sore throat lozenges and sprays.
- Davidson, R.S., 1996. The photodegradation of some naturally occurring polymers. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 33, 3–25. doi:10.1016/1011-1344(95)07262-4
- Dąbrowski, A., Podkościelny, P., Hubicki, Z., Barczak, M., 2005. Adsorption of phenolic compounds by activated carbon - A critical review. *Chemosphere* 58, 1049–1070. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.09.067
- Di Gioia, D., Barberio, C., Spagnesi, S., Marchetti, L., Fava, F., 2002. Characterization of four olive-mill-wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* 178, 208–217. doi:10.1007/s00203-002-0445-z
- Draths, K.M., Frost, J.W., 1994. Environmentally Compatible Synthesis of Adipic Acid from d-Glucose. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 399–400. doi:10.1021/ja00080a057
- Duetz, W.A., De Jong, C., Williams, P.A., Van Andel, J.G., 1994. Competition in Chemostat Culture between *Pseudomonas* Strains That Use Different Pathways for the Degradation of Toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2858–2863. doi:10.1128/aem.60.8.2858-2863.1994
- EKOS, 2016. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji. Fenol.
- Elliott, D.R., Caporn, S.J.M., Nwaishi, F., Nilsson, R.H., Sen, R., 2015. Bacterial and fungal communities in a degraded ombrotrophic peatland undergoing natural and managed re-vegetation. *PLoS One* 10. doi:10.1371/journal.pone.0124726
- Farah, A., Donangelo, C.M., 2006. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian J. Plant Physiol.* doi:10.1590/S1677-04202006000100003

- Federal State Statistics Service: Russia Federation, 2011.
- Fernández, P.M., Martorell, M.M., Blaser, M.G., Ruberto, L.A.M., de Figueroa, L.I.C., Mac Cormack, W.P., 2017. Phenol degradation and heavy metal tolerance of Antarctic yeasts. *Extremophiles* 21, 445–457. doi:10.1007/s00792-017-0915-5
- Fialová, A., Boschke, E., Bley, T., 2004. Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 69–76. doi:10.1016/j.ibiod.2004.02.004
- Filipowicz, N., Cieśliński, H. (2020). A Rapid and Simple Method for Screening Microorganisms with a Potential for Catechol Biodegradation. *International Journal of Environmental Research.* 14, 87–92. doi:10.1007/s41742-019-00239-z
- Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Cieśliński, H. (2020). Determination of phenol biodegradation pathways in three psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, isolated from Rucianka peatland. *Enzyme and Microbial Technology.* 141, 109663. doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109663.
- Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., Cieśliński, H. (2017). Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, and Soil Pollution.* 228(6), 210. doi:10.1007/s11270-017-3391-8
- Freeman, C., Ostle, N.J., Fenner, N., Kang, H., 2004. A regulatory role for phenol oxidase during decomposition in peatlands. *Soil Biology and Biochemistry.* Elsevier Limited, 1663–1667. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.012
- Gaal, A., Neujahr, H.Y., 1981. Induction of phenol-metabolizing enzymes in *Trichosporon cutaneum*. *Arch. Microbiol.* 130, 54–58. doi:10.1007/BF00527072
- García-Peña, I., Ortiz, I., Hernández, S., Revah, S., 2008. Biofiltration of BTEX by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 62, 442–447. doi:10.1016/j.ibiod.2008.03.012
- Giedraityte, G., Kalėdienė, L., 2009. Catechol 1,2-dioxygenase from α -naphthol degrading thermophilic *Geobacillus* sp. strain: purification and properties. *Open Life Sci.* 4. doi:10.2478/s11535-008-0049-y
- Götz, P., Reuss, M., 1997. Dynamics of microbial growth: Modeling time delays by introducing a polymerization reaction. *J. Biotechnol.* 58, 101–114. doi:10.1016/S0168-1656(97)00141-7
- Guzik, U., Greń, I., Wojcieszynska, D., 2008. Dioksygenazy-główne enzymy degradacji związków aromatycznych. *Biotechnologia.* 3, 71–88.
- Gyorik, M., Herpai, Z., Szécsényi, I., Varga, L., Szigeti, J., 2003. Rapid and sensitive determination of phenol in honey by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5222–5225. doi:10.1021/jf0343635
- Hannaford, A.M., Kuek, C., 1999. Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22, 121–126. doi:10.1038/sj.jim.2900617
- Hansch, C., McKarns, S.C., Smith, C.J., Doolittle, D.J., 2000. Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 127, 61–72. doi:10.1016/S0009-2797(00)00171-X
- Herbichowa, M., Pawlaczyk, P., Stańko, R., 2007. Ochrona wysokoich torfowisk bałtyckich na pomorzu. Wydawnictwo klubu przyrodników.
- Hill, G.A., Milne, B.J., Nawrocki, P.A., 1996. Cometabolic degradation of 4-chlorophenol by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 163–8. doi: 10.1007/s002530050799
- Hinteregger, C., Leitner, R., Loidl, M., Ferschl, A., Streichsbier, F., 1992. Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 252–259. doi:10.1007/BF00178180
- Hofmann, K.H., Vogt, U., 1987. Induction of phenol assimilation in chemostat cultures of *Candida maltosa* L4. *J. Basic Microbiol.* 27, 441–447. doi:10.1002/jobm.3620270809
- Holder, A.W., Bedient, P.B., Hughes, J.B., 1999. Modeling the Impact of Oxygen Reaeration on Natural Attenuation. *Bioremediat. J.* 3, 137–149. doi:10.1080/10889869991219451
- IARC, 1999. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: catechol. 32: 423.
- Illicki, P., Żurek, S., 1996. Peat resources in Poland. *Global peat resources.. International Peat Society, UNESCO, Geological Survey of Finland, Jyskä,* 119–125.
- Järvinen, K.T., Melin, E.S., Puhakka, J.A., 1994. High-rate bioremediation of chlorophenol-contaminated groundwater at low temperatures. *Environ. Sci. Technol.* 28, 2387–2392. doi:10.1021/es00062a025
- Jiang, Y., Ren, N., Cai, X., Wu, D., Qiao, L., Lin, S., 2008. Biodegradation of Phenol and 4-Chlorophenol by the Mutant Strain CTM 2. *Chinese J. Chem. Eng.* 16, 796–800. doi:10.1016/S1004-9541(08)60158-5
- Jiang, Y., Yang, X., Liu, B., Zhao, H., Cheng, Q., Cai, B., 2004. Catechol 2,3-dioxygenase from

- Pseudomonas* sp. strain ND6: Gene sequence and enzyme characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1798–1800. doi:10.1271/bbb.68.1798
- Johnson, C.W., Abraham, P.E., Linger, J.G., Khanna, P., Hettich, R.L., Beckham, G.T., 2017. Eliminating a global regulator of carbon catabolite repression enhances the conversion of aromatic lignin monomers to muconate in *Pseudomonas putida* KT2440. *Metab. Eng. Commun.* 5, 19–25. doi:10.1016/j.meteno.2017.05.002
- Juárez-Ramírez, C., Ruiz-Ordaz, N., Cristiani-Urbina, E., Galíndez-Mayer, J., 2001. Degradation kinetics of phenol by immobilized cells of *Candida tropicalis* in a fluidized bed reactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 697–705. doi:10.1023/A:1012979100827
- Jung, H.M., Jung, M.Y., Oh, M.K., 2015. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* for the production of *cis,cis*-muconic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5217–5225. doi:10.1007/s00253-015-6442-3
- Kafilzadeh, F., Farhangdoost, M.-S., Tahery, Y., 2010. Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. *African Journal of Biotechnology.* 9, 6721–6726. doi:10.5897/AJB10.665
- Karimi, M., Hassanshahian, M., Karimi, M., Hassanshahian, M., 2016. Isolation and characterization of phenol degrading yeasts from wastewater in the coking plant of Zarand, Kerman. *Brazilian J. Microbiol.* 47, 18–24. doi:10.1016/j.bjm.2015.11.032
- Kasuga, I., Nakajima, F., Furumai, H., 2007. Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 449–458. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00347.x
- Keenleyside, W., 2019. *Microbiology: Canadian Edition*, 9.6 Temperature and Microbial Growth.
- Khazaali, F., Kargari, A., Rokhsaran, M., 2014. Application of low-pressure reverse osmosis for effective recovery of bisphenol A from aqueous wastes. *Desalin. Water Treat.* 52, 7543–7551. doi:10.1080/19443994.2013.831795
- Kita, A., Kita, S. ichi, Fujisawa, I., Inaka, K., Ishida, T., Horiike, K., Nozaki, M., Miki, K., 1999. An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: The crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure* 7, 25–34. doi:10.1016/S0969-2126(99)80006-9
- Kohlstedt, M., Starck, S., Barton, N., Stolzenberger, J., Selzer, M., Mehlmann, K., Schneider, R., Pleissner, D., Rinkel, J., Dickschat, J.S., Venus, J., B.J.H. van Duuren, J., Wittmann, C., 2018. From lignin to nylon: Cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Metab. Eng.* 47, 279–293. doi:10.1016/j.ymben.2018.03.003
- Kotturi, G., Robinson, C., Inniss, W., 1991. Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 539–543. doi:10.1007/BF00180585
- Kumar, A., Kumar, S., Kumar, S., 2005. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem. Eng. J.* 22, 151–159. doi:10.1016/j.bej.2004.09.006
- Kurtz, A.M., Crow, S.A., 1997. Transformation of chlororesorcinol by the hydrocarbonoclastic yeasts *Candida maltosa*, *Candida tropicalis*, and *Trichosporon oivide*. *Curr. Microbiol.* 35, 165–8.
- Kwapisz, E., 2006. Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej. *Biotechnologia.* 73, 166–188. doi:10.1007/s002849900232
- Lack, A., Fuchs, G., 1994. Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Arch. Microbiol.* 161, 132–139. doi:10.1007/BF00276473
- Lack, A., Fuchs, G., 1992. Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism. *J. Bacteriol.* 174, 3629–3636. doi:10.1128/jb.174.11.3629-3636.1992
- Latus, M., Seitz, H., Eberspacher, J., Lingens, F., 1995. Purification and Characterization of Hydroxyquinol 1,2-Dioxygenase from *Azotobacter* sp. Strain GP1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2453–60. doi: 10.1128/aem.61.7.2453-2460.1995
- Le, T.T., Eymann, C., Albrecht, D., Sietmann, R., Schauer, F., Hecker, M., Antelmann, H., 2006. Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* 8, 1408–1427. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01034.x
- Léonard, D., Lindley, N.D., 1998. Carbon and energy flux constraints in continuous cultures of *Alcaligenes eutrophus* grown on phenol. *Microbiology* 144, 241–248. doi:10.1099/00221287-144-1-241
- Léonard, D., Youssef, C.B., Destruhaut C., Lindley N.D., Queinnec I., 2000. Phenol degradation by *Ralstonia eutropha*: colorimetric determination of 2-hydroxymuconate semi aldehyde accumulation to control feed strategy in fed batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 65, 407–415.

- Li, W., Shi, J., Wang, X., Han, Y., Tong, W., Ma, L., Liu, B., Cai, B., 2004. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Gene* 336, 231–240. doi:10.1016/j.gene.2004.03.027
- Loh, K.C., Chua, S.S., 2002. Ortho pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: Induction of meta pathway at high substrate concentrations. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 620–626. doi:10.1016/S0141-0229(02)00016-9
- Long, Y., Yang, S., Xie, Z., Cheng, L., 2016. Cloning, expression, and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from a phenol-degrading *Candida tropicalis* JH8 strain. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 46, 673–678. doi:10.1080/10826068.2015.1135449
- Lumley, T.C., Gignac, L.D., Currah, R.S., 2001. Microfungus communities of white spruce and trembling aspen logs at different stages of decay in disturbed and undisturbed sites in the boreal mixedwood region of Alberta. *Can. J. Bot.* 79, 76–92. doi:10.1139/b00-135
- Margesin, R., Bergauer, P., Gander, S., 2004. Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: a comparison of cold-tolerant *Arthrobacter* sp. and mesophilic *Pseudomonas putida*. *Extremophiles*. 8, 201–207. doi:10.1007/s00792-004-0378-3
- Margesin, R., Fonteyne, P.-A., Redl, B., 2005. Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by *Rhodococcus* spp. and basidiomycetous yeasts. *Res. Microbiol.* 156, 68–75. doi:10.1016/j.resmic.2004.08.002
- Margesin, R., Fonteyne, P.A., Schinner, F., Sampaio, J.P., 2007. *Rhodotorula psychrophila* sp. nov., *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov. and *Rhodotorula glacialis* sp. nov., novel psychrophilic basidiomycetous yeast species isolated from alpine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2179–2184. doi:10.1099/ijs.0.65111-0
- Margesin, R., Gander, S., Zacke, G., Gounot, A.M., Schinner, F., 2003. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles*. 7, 451–458. doi:10.1007/s00792-003-0347-2
- Mendonça, E., Martins, A., Anselmo, A.M., 2004. Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by *Fusarium flocciferum*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7. doi:10.2225/vol7-issue1-fulltext-3
- Middelhoven, W.J., de Jong, I.M., de Winter, M., 1991. *Arxula adenivorans*, a yeast assimilating many nitrogenous and aromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* 59, 129–137. doi:10.1007/BF00445657
- Mohammadi, S., Kargari, A., Sanaeepur, H., Abbassian, K., Najafi, A., Mofarrah, E., 2015. Phenol removal from industrial wastewaters: a short review. *Desalin. Water Treat.* 53, 2215–2234. doi:10.1080/19443994.2014.883327
- Monteiro, Á.A.M.G., Boaventura, R.A.R., Rodrigues, A.E., 2000. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. *Biochem. Eng. J.* 6, 45–49. doi:10.1016/S1369-703X(00)00072-3
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., Vieth, A., Meckenstock, R.U., 2002. Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5191–4. doi:10.1128/aem.68.10.5191-5194.2002
- Morrison, R.T., Boyd R., 1985. *Chemia organiczna*. PWN, Warszawa, Tom 1, 380–398.
- Mróz, W., 2012. Monitoring siedlisk przyrodniczych. Przewodnik metodyczny. GIOŚ, Warszawa. Część III.
- MSDS for Pyrocatechol, (2017). Safety data Sheet, Merck
- Muconic Acid Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2019–2024. <https://www.researchandmarkets.com/reports/4775781/muconic-acid-marketglobal-industry-trends>
- Mukherjee, R., De, S., 2014. Adsorptive removal of phenolic compounds using cellulose acetate phthalate-alumina nanoparticle mixed matrix membrane. *J. Hazard. Mater.* 265, 8–19. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.11.012
- Müller, C., Petruschka, L., Cuypers, H., Burchhardt, G., Herrmann, H., 1996. Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas putida* is mediated by the inhibition of the activator protein PhIR. *J. Bacteriol.* 178, 2030–2036. doi: 10.1128/jb.178.7.2030-2036.1996
- Najafpoor, A.A., Sadeghi, A., Alidadi, H., Davoudi, M., Mohebrad, B., Hosseinzadeh, A., Jafarpour, S., Zarei, A., 2015. Biodegradation of high concentrations of phenol by baker's yeast in anaerobic sequencing batch reactor. *Environ. Health Eng. Manag.* 2, 79–86.
- Neumann, G., Teras, R., Kivisaar, M., Schauer, F., Heipieper H., 2004. Simultaneous degradation of atrazine and phenol by *Pseudomonas* sp. strain ADP: effects of toxicity and adaptation. *Appl Environ Microbiol.* 70, 1907–1912. doi:10.1128/AEM.70.4.1907-1912.2004
- Niu, W., Draths, K.M., Frost, J.W., 2002. Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnol. Prog.* 18,

201–211. doi:10.1021/bp010179x

- Oboirien, B.O., Amigun, B., Ojumu, T.V., Ogunkunle, O.A., Adetunji, O.A., Betiku, E., Solomon, B.O., 2005. Substrate inhibition kinetics of phenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescence*. *Biotechnology* 4, 56–61. doi:10.3923/biotech.2005.56.61
- Ojumu, T. V., Bello, O.O., Solomon, B.O., 2005. Evaluation of microbial systems for bioremediation of petroleum refinery effluents in Nigeria. *African J. Biotechnol.* 4, 31–35.
- Okruszko, H., 1996. Uwarunkowania rozwoju roślinności zaroślowej i leśnej na torfowiskach niskich. Potrzeby i możliwości kierowania rozwojem roślinności zaroślowo-leśnej na torfowiskach niskich. *Osowiec*: 2-11.
- Orville, A.M., Lipscomb, J.D., Ohlendorf, D.H., 1997. Crystal structures of substrate and substrate analog complexes of protocatechuate 3,4-dioxygenase: Endogenous Fe³⁺ ligand displacement in response to substrate binding. *Biochemistry* 36, 10052–10066. doi:10.1021/bi970469f
- Painter, R.B., Howard, R., 1982. The HeLa DNA-synthesis inhibition test as a rapid screen for mutagenic carcinogens. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 92, 427–437. doi:10.1016/0027-5107(82)90241-X
- Paller, G., Hommel, R.K., Kleber, H. -P, 1995. Phenol degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250. *J. Basic Microbiol.* 35, 325–335. doi:10.1002/jobm.3620350508
- Parish, F., Sirin, A., Charman, D., Joosten, H., Minayeva, T., Silviu, M., Stringer, L., 2008. Assessment on Peatlands, Biodiversity and Climate Change: Main Report; Global Environment Centre, Kuala Lumpur and Wetlands International; Wageningen.
- Parke, D., 1993. Positive regulation of phenolic catabolism in *Agrobacterium tumefaciens* by the *pcaQ* gene in response to β -carboxy-cis,cis-muconate. *J. Bacteriol.* 175, 3529–3535. doi:10.1128/jb.175.11.3529-3535.1993
- Pind, A., Freeman, C., Lock, M.A., 1994. Enzymic degradation of phenolic materials in peatlands - measurement of phenol oxidase activity. *Plant Soil* 159, 227–231. doi:10.1007/BF00009285
- POCH, 2014. Polskie Odczynniki Chemiczne. Karta charakterystyki substancji, fenol C₆H₅OH.
- Potrawfke, T., Armengaud, J., Wittich, R.M., 2001. Chlorocatechols substituted at positions 4 and 5 are substrates of the broad-spectrum chlorocatechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas chlororaphis* RW71. *J. Bacteriol.* 183, 997–1011. doi:10.1128/JB.183.3.997-1011.2001
- Puhakka, J.A., Melin, E.S., Järvinen, K.T., Koro, P.M., Rintala, J.A., Hartikainen, P., Shieh, W.K., Ferguson, J.F., 1995. Fluidized-bed biofilms for chlorophenol mineralization. *Water Sci. Technol.* 31, 227–235. doi:10.1016/0273-1223(95)00170-R
- Puszkawicz, A., Kaleta, J., Papiak, D., 2015. Usuwanie fenolu w procesie adsorpcji. *JCEEAI.* 62, 351–362.
- Qi, W. Moe, K. Kinney, B., Moe, W.M., Kinney, K.A., 2002. Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 684–689. doi:10.1007/s00253-002-0938-3
- Reardon, K.F., Mosteller, D.C., Rogers, J.B., DuTeau, N.M., Kim, K.-H., 2002. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. *Environ. Health Perspect.* 1005–1011. doi: 10.1289/ehp.02110s61005
- Rigo, M., Alegre, R.M., Bezerra, J.R.M.V., Coelho, N., Bastos, R.G., 2010. Catechol biodegradation kinetics using *Candida parapsilopsis*. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 53, 481–486. doi:10.1590/S1516-89132010000200029
- Rocha, L.L., de Aguiar Cordeiro, R., Cavalcante, R.M., do Nascimento, R.F., Martins, S.C.S., Santaella, S.T., Melo, V.M.M., 2007. Isolation and characterization of phenol-degrading yeasts from an oil refinery wastewater in Brazil. *Mycopathologia* 164, 183–188. doi:10.1007/s11046-007-9043-6
- Rojek, E., Usowicz, B., 2018. Spatial variability of soil temperature in Poland. *Acta Agrophysica* 25, 289–305. doi:10.31545/aagr/95026
- Rydin, H., Jeglum, J.K., 2015. *The Biology of Peatlands, The Biology of Peatlands.* Oxford University Press. doi:10.1093/acprof:osobl/9780199602995.001.0001
- Rozich, A.F., Colvin, R.J., 1998. Design and Operational Considerations for Thermophilic Aerobic Reactors Treating High Strength Wastes and Sludges. *Proceedings of the 52nd INDUSTRIAL WASTE CONFERENCE* May 5–7, 1997, Imprint CRC Press.
- Rydin, H., Jeglum, J.K., 2015. *The Biology of Peatlands.* Oxford University Press. doi:10.1093/acprof:osobl/9780199602995.001.0001
- Sampaio, J.P., 1999. Utilization of low molecular weight aromatic compounds by heterobasidiomycetous yeasts: taxonomic implications. *Can. J. Microbiol.* 45, 491–512. doi:10.1139/w99-020
- Santos, V.L., Heilbuth, N.M., Linardi, V.R., 2001. Degradation of phenol by *Trichosporon* sp. LE3 cells immobilized in alginate. *J. Basic. Microbiol.* 41, 171–178. doi:10.1002/1521-4028(200107)41:3/4<171::aid-jobm171>3.0.co;2-c.
- Sato, N., Uragami, Y., Nishizaki, T., Takahashi, Y., Sazaki, G., Sugimoto, K., Nonaka, T., Masai, E.,

- Fukuda, M., Senda, T., 2002. Crystal structures of the reaction intermediate and its homologue of an extradiol-cleaving catecholic dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 321, 621–636. doi:10.1016/S0022-2836(02)00673-3
- Saxena, P., Thakur, I.S., 2005. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas fluorescens* for degradation of 4-chlorobenzoic acid. *Indian Journal of Biotechnology.* 4, 134-138.
- Sei, K., Asano, K., Tateishi, N., Mori, K., Ike, M., Fujita, M., 1999. Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 542–550. doi:10.1016/s1389-1723(00)87673-2
- Sepehr, S., Shahnavaz, B., Asoodeh, A., Karrabi, M., 2019. Biodegradation of phenol by cold-tolerant bacteria isolated from alpine soils of Binaloud Mountains in Iran. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 54, 367–379. doi:10.1080/10934529.2018.1553818
- Shingler, V., 2003. Integrated regulation in response to aromatic compounds: From signal sensing to attractive behaviour. *Environ. Microbiol.* 5, 1226-1241. doi:10.1111/j.1462-2920.2003.00472.x
- Siva Kumar, N., Venkata Subbaiah, M., Subba Reddy, A., Krishnaiah, A., 2009. Biosorption of phenolic compounds from aqueous solutions onto chitosan-abrus precatorius blended beads. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 972–981. doi:10.1002/jctb.2120
- Sivasubramanian, S., Namasivayam, S.K.R., 2015. Phenol degradation studies using microbial consortium isolated from environmental sources. *J. Environ. Chem. Eng.* 3, 243–252. doi:10.1016/j.jece.2014.12.014
- Stanchev, V., Stoilova, I., Krastanov, A., 2008. Biodegradation dynamics of high catechol concentrations by *Aspergillus awamori*. *J. Hazard. Mater.* 154, 396–402. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.10.038
- Strachan, P.D., Freer, A.A., Fewson, C.A., 1998. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its catA gene. *Biochem. J.* 333, 741–747. doi: 0.1042/bj3330741
- Sun, J.Q., Xu, L., Tang, Y.Q., Chen, F.M., Zhao, J.J., Wu, X.L., 2014. Bacterial pyridine hydroxylation is ubiquitous in environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 455–464. doi:10.1007/s00253-013-4818-9
- Surendra, S.V., Mahalingam, B.L., Velan, M., 2017. Degradation of monoaromatics by *Bacillus pumilus* MVSV3. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 60, 16160319. doi:10.1590/1678-4324-2017160319
- Szőkö, J., Rucká, L., Šimčíková, M., Halada, P., Nešvera, J., Pátek, M., 2014. Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8267–8279. doi:10.1007/s00253-014-5881-6
- Tengku-Mazuki, T.A., Subramaniam, K., Zakaria, N.N., Convey, P., Abdul Khalil, K., Lee, G.L.Y., Zulkharnain, A., Shaharuddin, N.A., Ahmad, S.A., 2020. Optimization of phenol degradation by Antarctic bacterium *Rhodococcus* sp. *Antarct. Sci.* 32, 486–495. doi:10.1017/S0954102020000358
- Tewari, L., Yush Malviya, P., 2002. Biodegradation of Catechol by Fluorescent *Pseudomonas* for Sustainable Environment, *Journal of Scientific & Industrial Research.* 61, 70–74
- Thormann, M.N., 2006. Diversity and function of fungi in peatlands: A carbon cycling perspective. *Can. J. Soil Sci.* 86, 281–293. doi:10.4141/s05-082
- Thormann, M.N., Currah, R.S., Bayley, S.E., 2004. Patterns of distribution of microfungi in decomposing bog and fen plants. *Can. J. Bot.* 82, 710–720. doi:10.1139/b04-025
- Thormann, M.N., Currah, R.S., Bayley, S.E., 2003. Succession of microfungi assemblages in decomposing peatland plants. *Plant Soil* 250, 323–333. doi:10.1023/A:1022845604385
- Thormann, M.N., Rice, A., (2007). Fungi from peatlands. *Fungal Diversity.* 24, 241-299.
- Tokumasu, S., 1994. Trophodynamic structure of a swampy bog at the climax stage of limnological succession III. Filamentous fungi associated with the standing leaves of *Typha latifolia*. *Water, Air, Soil Pollut.* 76, 491–499. doi:10.1007/BF00482721
- Tsai, S.C., Tsai, L.D., Li, Y.K., 2005. An isolated *Candida albicans* TL3 capable of degrading phenol at large concentration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2358–2367. doi:10.1271/bbb.69.2358
- Tsuruta, Y., Kitai, S., Watanabe, S., Inoue, H., 2000. 2-Methoxy-4-(2-phthalimidinyl)phenylsulfonil Chloride as a Fluorescent Labeling Reagent for Determination of Phenols in High-Performance Liquid Chromatography and Application for Determination of Urinary Phenol and p-Cresol. *Anal. Biochem.* 280, 36–41. doi:10.1006/abio.2000.4492
- Vaillancourt, F., Bolin, J., Eltis, L., 2006. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 241–267. doi:10.1080/10409230600817422
- Van der Meer, J.R., Eggen, R.I.L., Zehnder, A.J.B., De Vos, W.M., 1991. Sequence analysis of the *Pseudomonas* sp. strain P51 tcb gene cluster, which encodes metabolism of chlorinated catechols: Evidence for specialization of catechol 1,2-dioxygenases for chlorinated substrates. *J. Bacteriol.*

- 173, 2425–2434. doi:10.1128/jb.173.8.2425-2434.1991
- Vetting, M.W., Ohlendorf, D.H., 2000. The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. *Structure* 8, 429–440. doi:10.1016/S0969-2126(00)00122-2
- Viggiani, A., Siani, L., Notomista, E., Birolo, L., Pucci, P., Di Donato, A., 2004. The role of the conserved residues His-246, His-199, and Tyr-255 in the catalysis of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *J. Biol. Chem.* 279, 48630–48639. doi:10.1074/jbc.M406243200
- Vijayaraghavan, S., Srinivasaraghavan, T., Musti, S., Kar, S., Swaminathan, T., Baradarajan, A., 1995. Biodegradation of phenol by arthrobacter and modelling of the kinetics. *Bioprocess Eng.* 12, 227–229. doi:10.1007/BF00369495
- Vilimková, L., Páca, J., Kremláèková, V., Páca, J., Stiborová, M., 2008. Isolation of cytoplasmic NADPH-dependent phenol hydroxylase and catechol-1,2-dioxygenase from *Candida tropicalis* yeast. *Interdiscip. Toxicol.* 1, 225–230. doi:10.2478/v10102-010-0046-7
- Villegas, L.G.C., Mashhadi, N., Chen, M., Mukherjee, D., Taylor, K.E., Biswas, N., 2016. A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater. *Curr. Pollut. Reports.* 2, 157–167 doi:10.1007/s40726-016-0035-3
- Wang, C.C., Lee, C.M., Lu, C.J., Chuang, M.S., Huang, C.Z., 2000. Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in the presence of primary substrate by immobilized pure culture bacteria. *Chemosphere* 41, 1873–9. doi:10.1016/s0045-6535(00)00090-4
- Wang, G., Øzmerih, S., Guerreiro, R., Meireles, A.C., Carolas, A., Milne, N., Jensen, M.K., Ferreira, B.S., Borodina, I., 2020. Improvement of *cis, cis*-Muconic Acid Production in *Saccharomyces cerevisiae* through Biosensor-Aided Genome Engineering. *ACS Synth. Biol.* 9, 634–646. doi:10.1021/acssynbio.9b00477
- Wang, G., Wen, J., Li, H., Qiu, C., 2009. Biodegradation of phenol and m-cresol by *Candida albicans* PDY-07 under anaerobic condition. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 809–814. doi:10.1007/s10295-009-0555-6
- Wang, J., Ma, X., Liu, S., Sun, P., Fan, P., Xia, C., 2012. Biodegradation of Phenol and 4-Chlorophenol by *Candida tropicalis* W1. *Procedia Environ. Sci.* 16, 299–303. doi:10.1016/j.proenv.2012.10.042
- Wang, L., Qiao, N., Sun, F., Shao, Z., 2008. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. *Extremophiles* 12, 335–342. doi:10.1007/s00792-007-0136-4
- Wei, J., Zhou, Y., Xu, T., Lu, B., 2010. Rational design of catechol-2, 3-dioxygenase for improving the enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 116–126. doi:10.1007/s12010-009-8720-y
- Williams, R.T., Crawford, R.L., 1983. Microbial diversity of Minnesota peatlands. *Microb. Ecol.* 9, 201–214. doi:10.1007/BF02097737
- Woertz, J.R., Kinney, K.A., McIntosh, N.D.P., Szanislo, P.J., 2001. Removal of toluene in a vapor-phase bioreactor containing a strain of the dimorphic black yeast *Exophiala lecanii-corni*. *Biotechnol. Bioeng.* 75, 550–558. doi:10.1002/bit.10066
- Yan, J., Jianping, W., Hongmei, L., Suliang, Y., Zongding, H., 2005. The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochem. Eng. J.* 24, 243–247. doi:10.1016/j.bej.2005.02.016
- Yang, C.F., Lee, C.M., 2007. Enrichment, isolation, and characterization of phenol-degrading *Pseudomonas resinovorans* strain P-1 and *Brevibacillus* sp. strain P-6. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59, 206–210. doi:10.1016/j.ibiod.2006.09.010
- Yeomt, S.H., Yoo, Y.J., 2002. Analysis of microbial adaptation at enzyme level for enhancing biodegradation rate of BTX. *Korean J. Chem. Eng.* 19, 780–782. doi:10.1007/bf02706967
- You, Y., Shim, J., Cho, C.-H., Ryu, M.-H., Shea, P.J., Kamala-Kannan, S., Chae, J.-C., Oh, B.-T., 2013. Biodegradation of BTEX mixture by *Pseudomonas putida* YNS1 isolated from oil-contaminated soil. *J. Basic Microbiol.* 53, 469–475. doi:10.1002/jobm.201200067
- Zeyaulah, M., Ahmad, R., Naseem, A., Islam, B., Hasan, H.M.I., Abdelkafe, A.S., Benkhayal, F.A., Rizvi, M.A., Ali, A., 2009. CATECHOL BIODEGRADATION BY *PSEUDOMONAS* STRAIN : A CRITICAL ANALYSIS. *Int. J. Chem. Sci* 7, 2211–2221.
- Zhang, Y., Liu, Y., Wang, X., Sun, Z., Ma, J., Wu, T., Xing, F., Gao, J., 2014. Porous graphene oxide/carboxymethyl cellulose monoliths, with high metal ion adsorption. *Carbohydr. Polym.* 101, 392–400. doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.066

8. DOROBEK NAUKOWY

Projekty

Nowa, zintegrowana platforma produkcji i oczyszczania białek rekombinantowych w oparciu o komórki drożdżowe, Projekt PBS1/A9/7/2012 Narodowe Centrum Badań i Rozwoju z dnia 13 października 2012.

Zgłoszenia patentowe

Wanarska, M., Cieśliński, H., Krajewska, E., Wicka-Grochocka, M., Pawlak-Szukalska, A., **Filipowicz, N.**, Gromek, E., Turkiewicz, M., Białkowska, A., Krysiak, J., Florczak, T.: Expression system for production of a heterologous protein, plasmid expression vectors, method of construction of a recombinant strain of psychrotolerant yeast *Debaryomyces macquariensis* and method of protein production by the recombinant yeast strain, Europejskie Zgłoszenie Patentowe nr EP 18460010 z dnia 22 lutego 2018 r.

Przyznane patenty

Wanarska, M., Cieśliński, H., Krajewska, E., Wicka-Grochocka, M., Pawlak-Szukalska, A., **Filipowicz, N.**, Gromek, E., Turkiewicz, M., Białkowska, A., Krysiak, J., Florczak, T.: Expression system for production of a heterologous protein, plasmid expression vectors, method of construction of a recombinant strain of psychrotolerant yeast *Debaryomyces macquariensis* and method of protein production by the recombinant yeast strain, Patent EP 3530739 z dnia 17 lipca 2020 r.

Publikacje dotyczące tematyki rozprawy doktorskiej

Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., Cieśliński, H. (2017). Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(6): 210, doi:10.1007/s11270-017-3391-8 (IF: 1,769; Q3);

Filipowicz, N., Cieśliński, H. (2020). A Rapid and Simple Method for Screening Microorganisms with a Potential for Catechol Biodegradation. *International Journal of Environmental Research*, 14: 87-92, doi:10.1007/s41742-019-00239-z (IF: 2,007; Q3);

Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Cieśliński, H. (2020). Determination of phenol biodegradation pathways in three psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, isolated from Rucianka peatland. *Enzyme and Microbial Technology*, 141: 109663, doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109663 (IF: 3,448; Q2).

Pozostałe publikacje

Kucińska-Lipka, J., Gubańska, I., Strankowski, M., Cieśliński, H., **Filipowicz, N.**, Janik, H. (2017). Synthesis and characterization of cycloaliphatic hydrophilic polyurethanes, modified with l-ascorbic acid, as materials for soft tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications*, 1(75): 671-681, doi:10.1016/j.msec.2017.02.052 (IF: 5,080; Q1);

Kucińska-Lipka, J., Gubańska, I., Pokrywczyńska, M., Cieśliński, H., **Filipowicz, N.**, Drewa, T., Janik, H. (2018). Polyurethane porous scaffolds (PPS) for soft tissue regenerative medicine applications. *Polymer Bulletin*, 75: 1957-1979, doi:10.1007/s00289-017-2124-x (IF: 1,858; Q2);

Hejna, A., Piszcz-Karaś, K., **Filipowicz, N.**, Cieśliński, H., Namieśnik, J., Marć, M., Klein, M., Formela, K. (2018). Structure and performance properties of environmentally-friendly biocomposites based on poly(ϵ -caprolactone) modified with copper slag and shale drill

cutting wastes. *Science of The Total Environment*, 640-641: 1320-1331, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.05.385 (IF: 5,589; Q1);

Borowska, M., Glinka, M., **Filipowicz, N.**, Terebieniec, A., Szarlej, P., Kot-Wasik, A., Kucińska-Lipka, J. (2019). Polymer biodegradable coatings as active substance release systems for urological applications. *MONATSHEFTE FÜR CHEMIE*, 150: 1697-1702, doi:10.1007/s00706-019-02474-8 (IF: 1,349; Q3);

Carayon, I., Terebieniec, A., Łapiński, M., **Filipowicz, N.**, Kucińska-Lipka, J. (2020). Ciprofloxacin-modified degradable hybrid polyurethane-poly lactide porous scaffolds developed for potential use as an antibacterial scaffold for regeneration of skin. *Polymers*, 12(1): 171, doi:10.3390/polym12010171 (IF: 4,329; Q1).

Materialy konferencyjne

Wicka-Grochocka, M., Cieśliński, H., Krajewska, E., **Filipowicz, N.**, Wanarska, M., Kur, J.: Expression of a GDSE esterase from *Pseudomonas* sp. S9 in *Pichia pastoris*. Konferencja: 17TH European Congress on Biotechnology 3–6 July 2016, Kraków, Poland. *New Biotechnology*, 33, Supplement, doi: 10.1016/j.nbt.2016.06.1404;

Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Cieśliński, H., Krajewska, E., Wicka-Grochocka, M., Wanarska, M.: Study on a polish peat bog “Rucianka” as a source of yeast strains capable of effective phenol biodegradation. Konferencja: 17TH European Congress on Biotechnology 3–6 July 2016, Kraków, Poland. *New Biotechnology*, 33, Supplement, doi: 10.1016/j.nbt.2016.06.1216;

Krajewska, E., Wanarska, M., Szukalska-Pawlak, A., Wicka-Grochocka, M., **Filipowicz, N.**, Cieśliński, H., Kur, J.: Construction of recombinant *Pichia pastoris* strains producing cold-adapted β -galactosidase from *Paracoccus* sp. 32d. Konferencja: 17TH European Congress on Biotechnology 3–6 July 2016, Kraków, Poland. *New Biotechnology*, 33, Supplement, doi: 10.1016/j.nbt.2016.06.1417.

Prezentacje ustne

Filipowicz, N., Momotko, M., Cieśliński, H., Boczkaj, G., Wicka-Grochocka, M., Wanarska, M., Kur, J.: Fenol jako związek modelowy w badaniach dotyczących biodegradacji toksycznych węglowodorów monoaromatycznych (BTEX). Konferencja: Drobnoustroje i ich metabolity - hipotezy, fakty, nadzieje;

Filipowicz, N., Momotko, M., Krajewska, E., Terebieniec, A., Wicka-Grochocka, M., Boczkaj, G., Cieśliński, H.: Degradacja związków fenolowych przez wybrane szczepy drożdży. Konferencja: Biomillennium 2017;

Filipowicz, N., Momotko, M., Terebieniec, A.: Katechol – najważniejszy produkt pośredni szlaków biodegradacji węglowodorów monoaromatycznych. Konferencja: Nowe wyzwania dla Polskiej Nauki. Druga edycja. Sobieszewo;

Filipowicz, N., Narazińska, D., Terebieniec, A., Klein, M., Cieśliński, H.: Biosolubilization of lignite by yeast strains isolated from Polish peatland. Konferencja: 45th Annual Conference on Yeast, Smolenice, Bratysława.

Plakaty konferencyjne

Filipowicz, N., Pawlikowski, T., Cieśliński, H., Kur, J., Boczkaj, G., Momotko, M.: Badanie zdolności do biodegradacji fenolu przez wybrane szczepy drożdży psychrotolerancyjnych. Konferencja: Mikrobiologia w Medycynie, Przemysle i Ochronie Środowiska, III edycja;

Momotko, M., **Filipowicz, N.**, Boczkaj, G., Cieśliński, H.: An effective phenol degradation for water and soil bioremediation by means of selected strains of psychrotolerant yeast.

- Konferencja: 2 nd South East European Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment System.r;
- Momotko, M., **Filipowicz, N.**, Boczkaj, G., Cieśliński, H.: Studies of phenol degradation in water and soil bioremediation processes aided by selected strains of psychrotolerant yeast using gas chromatography. Konferencja: 18th International Symposium on Advances in Extraction Technologies & 22nd International Symposium on Separation Sciences;
- Momotko, M., **Filipowicz, N.**, Fernandes, A., Boczkaj, G., Cieśliński, H.: Novel phenol containing wastewater bioremediation using selected strains of psychrotolerant yeast. Konferencja: 1st International Conference on Sustainable Water Processing;
- Krajewska, E., Wicka-Grochocka, M., **Filipowicz, N.**, Wanarska, M., Cieśliński, H., Kur, J.: Ekspresja genu β -galaktozydazy *Paracoccus* sp. 32d w komórkach rekombinantowych drożdży *Pichia pastoris*. Konferencja: Drobnoustroje i ich metabolity - hipotezy, fakty, nadzieje;
- Wicka-Grochocka, M., Krajewska, E., **Filipowicz, N.**, Cieśliński, H., Wanarska, M., Kur, J.: Konstrukcja rekombinantowych szczepów *Pichia pastoris* produkujących aktywną w niskiej temperaturze esterazę z *Pseudomonas* sp. S9. Konferencja: Drobnoustroje i ich metabolity - hipotezy, fakty, nadzieje;
- Terebieniec, A., Roszko, M., **Filipowicz N.**, Cieśliński, H.: Isolation of psychrotolerant yeast strains and their ability to N-phosphonomethylglycine utilization. Konferencja: BioTech 2017 and 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition;
- Filipowicz, N.**, Momotko, M., Boczkaj, G., Terebieniec, A., Cieśliński, H.: Polish peat bog „Rucianka” as a source of psychrotolerant yeast with ability to biodegradation of phenolic compounds. Konferencja: BioTech 2017 and 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition;
- Filipowicz, N.**, Terebieniec, A., Cieśliński H.: Isolation of psychrotolerant yeast strains and their biodegradation potential. Konferencja: The 7th Congress of European Microbiologists, FEMS 2017;
- Terebieniec, A., Malinowska, K., **Filipowicz, N.**, Cieśliński, H.: Cellulolytic activity of psychrotolerant *Tausonia pullulans* M 3.1.9.yeast strain. Konferencja: 45th Annual Conference on Yeast, Smolenice, Bratysława.

Stypendia (inne niż Stypendium doktoranckie)

2017 - 2018 Stypendium Rektora Politechniki Gdańskiej

PUBLIKACJA NR 1 – DANE (ZAŁĄCZNIK 1)

Filipowicz, N., Momotko, M., Boczka, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., Cieśliński, H. (2017). Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(6): 210, doi: 10.1007/s11270-017-3391-8

Gdańsk, 21.09.2021

Mgr inż. Natalia Filipowicz
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Politechnika Gdańska
Budynek C Wydziału Chemicznego pokój 101
filipowicz.natalia@wp.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., Cieśliński, H. (2017). Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(6): 210, doi:10.1007/s11270-017-3391-8

Polegał na: analizie dostępnej literatury i opracowaniu metodologii badań, na zaplanowaniu i wykonywaniu eksperymentów oraz na analizie i interpretacji uzyskanych wyników. Przygotowałam również zarówno wstępną, jak i finalną wersję publikacji.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 60%

Filipowicz

Gdańsk, 21.09.2021

Mgr inż. Malwina Momotko
Katedra Inżynierii Procesowej i Technologii Chemicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
malmomot@student.pg.edu.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Momotko, M., Boczka, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., Cieśliński, H. (2017). Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(6): 210, doi:10.1007/s11270-017-3391-8

Polegał na udziale w opracowaniu metodyki badań techniką chromatografii gazowej i przeprowadzeniu analiz chromatograficznych badanych próbek.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 7%



Gdańsk, 21.09.2021

dr hab. inż. Grzegorz Boczkaj
Katedra Inżynierii Procesowej i Technologii Chemicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
grzegorz.boczkaj@pg.edu.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., Cieśliński, H. (2017). Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(6): 210, doi:10.1007/s11270-017-3391-8

Polegał na udziale w opracowaniu metodyki badań techniką chromatografii gazowej i przeprowadzeniu analiz chromatograficznych badanych próbek.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 10%



Gdańsk, 06.10.2021

Tomasz Pawlikowski
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Politechnika Gdańska
Adres katedry: ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
Adres mailowy osoby: tomek910907@gmail.com
Obecne miejsce pracy: Instytut Biotechnologii i Medycyny Molekularnej
Adres miejsca pracy: ul. Kampinoska 25, 80-180 Gdańsk

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Momotko, M., Boczka, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., Cieśliński, H. (2017). Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(6): 210, doi:10.1007/s11270-017-3391-8

Polegał na: pomocy w realizacji badań objętych publikacją - w ramach realizacji mojej pracy magisterskiej.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 8%

Tomasz Pawlikowski

Gdańsk, 27.09.2021

Dr hab. inż. Marta Wanarska
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Politechnika Gdańska
Budynek C Wydziału Chemicznego pokój 1.6
marwanar@pg.edu.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., Cieśliński, H. (2017). Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(6): 210, doi:10.1007/s11270-017-3391-8

Polegał na: pomocy merytorycznej przy izolacji psychrotolerancyjnych drożdży z prób gleby i wody oraz ich hodowli, a także przy przygotowywaniu izolatów do przechowywania w -80°C.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 5%



Gdańsk, 21.09.2021

dr hab. inż. Hubert Cieśliński
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Politechnika Gdańska
Budynek C Wydziału Chemicznego pokój 116
hcieslin@pg.edu.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI


Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., Cieśliński, H. (2017). Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(6): 210, doi:10.1007/s11270-017-3391-8

Polegał na: zainicjowaniu tematyki badań, przeprowadzaniu z Doktorantką konsultacji dotyczących sposobu prowadzenia eksperymentów oraz analizy uzyskanych wyników. Ponadto dokonywałem popraw redakcyjnych i merytorycznych wstępnej i recenzowanej wersji publikacji oraz pełniłem rolę autora korespondencyjnego.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 10%

Handwritten signature of Hubert Cieśliński in blue ink.

Isolation and Characterization of Phenol-Degrading Psychrotolerant Yeasts

Natalia Filipowicz · Malwina Momotko ·
Grzegorz Boczkaj · Tomasz Pawlikowski ·
Marta Wanarska · Hubert Cieśliński 

Received: 2 February 2017 / Accepted: 9 May 2017 / Published online: 22 May 2017
© The Author(s) 2017. This article is an open access publication

Abstract In this study, the potential of selected psychrotolerant yeast strains for phenol biodegradation was studied. From 39 strains isolated from soil and water samples from Rucianka peat bog, three psychrotolerant yeast strains, A01₁, B02₁, and L01₂, showed the ability to

degrade phenol. The result shows that all three yeast strains could degrade phenol at 500 and 750 mg l⁻¹ concentration, whereas strains A01₁ and L01₂ could degrade phenol at 1000 mg l⁻¹ concentration. The time needed for degradation of each phenol concentration was no longer than 2 days. Strains A01₁, B02₁, and L01₂ were identified based on 26S rDNA and ITS sequence analysis as belonging to species *Candida subhashii*, *Candida oregonensis*, and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii*, respectively.

N. Filipowicz · T. Pawlikowski · M. Wanarska ·
H. Cieśliński (✉)
Department of Molecular Biotechnology and Microbiology,
Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12,
80-233 Gdańsk, Poland
e-mail: hcieslin@pg.gda.pl

N. Filipowicz
e-mail: natfilip@student.pg.gda.pl

T. Pawlikowski
e-mail: tomek070991@wp.pl

M. Wanarska
e-mail: marwanar@pg.gda.pl

M. Momotko · G. Boczkaj
Department of Chemical and Process Engineering, Gdańsk
University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk,
Poland

M. Momotko
e-mail: malwina.momotko@wp.pl

G. Boczkaj
e-mail: grzegorz.boczkaj@gmail.com

Present Address:
T. Pawlikowski
Fermentum Mobile Sp. z o.o. [Ltd.], 20 Podwale Przedmiejskie,
80-824 Gdańsk, Poland

Keywords Biodegradation · Phenol · Psychrotolerant · Yeast · Peatland

1 Introduction

Phenol is one of the most widely distributed environmental pollutants which can be found mostly in wastewaters and industrial effluents. World annual production of this chemical compound is around 10 million tons, while 3.3 million tons are produced in European countries, 2.4 million tons in the USA, and 0.2 million tons in Russia (Federal State Statistics 2011). By the end of 2016, global phenol production is expected to increase by 2.1 million tons (ICIS 2016). Main sources of this hazardous compound are chemical industry, coal conversion processes, crude oil refineries, textile industry, and production of pesticides (Aleksieva et al. 2002; Boczkaj et al. 2016a, b, 2014). Also, it is an ingredient in many customer products like mouthwashes or anti-septic lotions. Phenol is present in food, especially in



smoked, grilled, and fried meat, and is also detected in honey and coffee. Moreover, phenol is also formed during the decomposition of biomass and is released into the atmosphere during volcanic eruptions (ATSDR 2015). It is also formed during chemical reactions which lead to cloud formation. Some levels of phenols are also produced during UV irradiation (sunlight) from amino acids in plant's hemicellulose and tyrosine transformation in digestive track (Davidson 1996; Tsuruta et al. 2000).

The important fact, in respect of environmental aspects, is that phenol is stable and resistant to self-degradation in water solutions. Moreover, it tends to accumulate in soil and groundwater and is able to move from soil to water. Phenol can be also detected in rain-water, surface water, and drinking water.

Due to its toxicity, phenol could become life-threatening to living organisms if proper precautions are not taken. When discharged into water, it can become a danger for fish life at low concentration 5–25 mg l⁻¹ (Chung et al. 2003; Kibret et al. 2000; Kumar et al. 2005). Phenol at the concentration level of 1 g/kg of body weight is lethal to humans and animals but individual tolerance for this chemical compound can be higher (ATSDR 2015). Exposure to phenol occurs through breathing, skin contact, or ingestion.

The water or soil treatment of this toxic compound is focused on physical and chemical methods such as solvent extraction, adsorption, ion exchange, and advanced oxidation processes (AOPs) (preferably by ozonation) (Aksu 2001; Aksu et al. 1999; Banat et al. 2000; Gimeno et al. 2005; Hameed and Rahman 2008; Lin and Juang 2009; Rengaraj et al. 2002; Roostaei and Tezel 2004). For this purpose, adsorption of phenol on activated carbon is one of the most common methods. However, the major problems associated with this method are: (i) limited mechanical strength of activated carbon, (ii) high regeneration cost of this sorbent, and (iii) intraparticle resistance (Aravindhan et al. 2009; Siva Kumar et al. 2009). Besides, in all mentioned above methods, there is a risk of formation of hazardous by-products (Wang et al. 2000). In comparison with these methods, biological treatment of phenol has two major advantages: (i) low cost of mineralization process (Zümriye et al. 1999; Bux et al. 1999) and (ii) rare possibility of toxic secondary metabolite production (Wang et al. 2000). Hence, biodegradation of phenol is an attractive alternative for recently used physical and chemical methods of phenol removing. It could be

carried out using biofilters for gaseous pollutions (García-Peña et al. 2008; Qi et al. 2002; Woertz et al. 2001), bioreactors for industrial effluents treatment (Jarvinen et al. 1994; Juárez-Ramírez et al. 2001), bioremediation techniques for contaminated waters (Puhakka et al. 1995) and soil (Cordova-Rosa et al. 2009), and natural attenuation for both water and soil samples (Broholm and Arvin 2000; Holder et al. 1999). Removal of phenol from contaminated soil and industrial effluents by bioremediation techniques can be achieved through aerobic biodegradation, by microorganisms utilizing this toxic aromatic compound as a sole source of carbon and energy. *Pseudomonas putida* has been the most extensively studied bacterium for aromatic compound biodegradation (Morasch et al. 2002; Reardon et al. 2002; Wang et al. 2008; You et al. 2013). *Alcaligenes eutrophus* (NRRL B 75940) (Hill et al. 1996), *Bacillus stearothermophilus* BR219 (Gurujejalakshmi and Oriol 1989), and some bacterial strains belonging to *Acinetobacter* spp., *Citrobacter* spp., and *Shigella* spp. (Kafilzadeh et al. 2010) are also capable of degrading phenol at low concentration. Among yeast, *Candida tropicalis* is known to degrade high initial phenol concentration (beyond 1700 and 2000 mg l⁻¹, respectively) in a relatively short period of time (Jiang et al. 2008; Yan et al. 2005). Moreover, *C. tropicalis* strains, for, e.g., strain CC1 (Galíndez-Mayer et al. 2008) and strain LB-L20 (Juárez-Ramírez et al. 2001), were successfully used in bioreactors for the removal of phenol. Yeast strains belonging to *Rhodotorula* spp. and *Trichosporon* spp. are also capable of phenol degradation (Kurtz and Crow 1997; Sampaio 1999). Advantages of using yeasts in bioremediation include rapid growth and ability to resist unfavorable environmental conditions (Yu and Wen 2005). Cold-adapted yeasts, with higher metabolic versatility than bacteria to biodegradation of petroleum hydrocarbon fractions (Margesin et al. 2003), are excellent candidates in studies on phenol bioremediation for contaminated soil and water in cold climatic regions.

On the other hand, most of the studied hydrocarbon-degrading microorganisms are mesophiles (Boroujeni et al. 2014; Chakraborty et al. 2010). However, the temperature of groundwater and soils in most regions of the world is lower than optimum of the growth temperature for mesophilic microorganisms (Bergauer et al. 2005). Therefore, in recent years, the interest in research on the use of psychrotolerant microorganisms to biodegradation of monoaromatic compounds has

increased. Kotturi et al. (1991) showed the ability to degrade phenol by psychrophilic *P. putida* strain Q5. Margesin et al. (2004) described cold-tolerant *Arthrobacter* sp. strain AGG31 with the ability to use as sole source of carbon: phenol, *o*-cresol, *m*-cresol, catechol, hydroquinone, and salicylate. But there is still little known about psychrotolerant yeasts and their potential in aromatic compound biodegradation (Bergauer et al. 2005). Bergauer et al. (2005) described the ability to degrade monoaromatic compounds by cold-tolerant and psychrophilic yeast strains. Phenol and 18-phenol-related compounds were tested. None of 32 isolated strains were able to utilize any of the highly volatile monoaromatic compounds. Compounds which were easily utilized were phenol (100% of strains), hydroquinone (91% of strains), resorcinol (88% of strains), and catechol (75% of strains). However, in comparison to analogous research on bacteria, all compounds were utilized for yeast strains by growth at low concentration (50–200 mg l⁻¹, depending on the compound).

Another significant factor, which should be considered, is the origin of yeast strain isolation. Microorganisms with the ability to degradation of phenol and other monoaromatic compounds are usually isolated from hydrocarbon contaminated sites caused by human activity, such as petroleum hydrocarbon-contaminated alpine soils (Margesin et al. 2005), sewage (Sivasubramanian and Namasivayam 2015; Wang et al. 2012), activated sludge (Jiang et al. 2008; Yan et al. 2005), oil-shale mine and railway area (Bergauer et al. 2005), oil refinery wastewaters (Rocha et al. 2007), or wastewater from coking plants (Karimi et al. 2016). Some investigations about ability of microorganisms from natural sources to aromatic compounds degradation were made (Kotturi et al. 1991; Margesin et al. 2004; Wang et al. 2008). Presumably, screening of microorganisms with potential for phenol and its derivatives biodegradation from other natural sources can be an alternative solution. In this study, yeast strains were isolated from peatland. Peatlands are rich in polyphenols and phenol derivatives which are products of lignocellulosic biomass decomposition (Thormann et al. 2007). Furthermore, it has been shown that yeast species which are involved in the process of biomass decomposition are also able to degrade simple and complex sugars, selected sugar alcohols, organic acids, and glycosides (Thormann and Rice 2007). Hence, we assumed that the soil and water samples from peat bogs could be an attractive source of microorganisms, especially psychrotolerant yeast

species which are capable of biodegrading this class of monoaromatic compounds. However, there is still a lack of information about studies on yeasts isolated from peatlands with the ability to degrade phenol and its derivatives (Thormann et al. 2007).

Therefore, the purpose of this study was to isolate and identify psychrotolerant yeast strains from water and soil samples derived from Rucianka peatland, which are capable of utilizing phenol (at a wide range of concentration 500–2000 mg l⁻¹) as the sole source of carbon.

2 Materials and Methods

2.1 Sample Collection

Soil and water samples were collected from Rucianka raised bog, located in northern-east Poland (54° 15' 22" N, 19° 44' 14") on January 5 and on April 7, 2015. Rucianka bog covers an area of 240 ha. It was formed during Vistulian glaciation and was filled by a lake. The bog was formed on sandy deposition and consists of two materials: fen and sphagnum peat. The exploration of peat started before Second World War, and by now, 60% of bog area consists of peat mine (Pawłat 1996).

Sterile 50-ml conical centrifuge tubes (Sarstedt, AG & Co., Germany) were used to collect samples. Soil samples were collected from 30 locations and each sample was collected only once from each place from depth about 5 cm. Water samples were collected from 19 locations such as drainage ditches, pipelines, and puddles, and each sample was collected only once from each place from depth about 2 cm. All samples were transported straight after a collection to the laboratory in the ice box to maintain the temperature around 4–8 °C.

2.2 Isolation of Yeast Strains

One gram of each soil sample was transferred to sterile 50-ml conical centrifuge tube and mix vigorously with 9-ml sterile 0.9% saline solution for 10 s. After soil sedimentation, 100 µl of each sample was collected from 2 to 3 cm under water meniscus and spread with a sterile glass rod on YPD plates supplemented with chloramphenicol (stock solution = 34 mg ml⁻¹) and ampicillin (stock solution = 100 mg ml⁻¹). For water samples, 100 µl of each sample was transferred directly on YPD plate and spread with sterile glass rod. All

plates were incubated at 18 °C for 6 days. After this period, colonies which differed from the other by morphological appearance (color, size, and shape of the colony) and microscopic examination were three times streak plating on YPD plates and incubated at 18 °C for 6 days to obtain a pure colony. Strain's ability to grow on different temperature (4, 18, 30, and 37 °C) was tested.

Yeast extract peptone dextrose (YPD) contained (per liter) glucose 20 g, yeast extract 10 g, casein peptone 20 g, and bacteriological agar 20 g supplemented with 1 ml of each antibiotic: chloramphenicol (stock solution = 34 mg ml⁻¹) and ampicillin (stock solution = 100 mg ml⁻¹).

2.3 Assimilation Tests—Screening for Yeast Strain Capable of Utilizing Phenol

Screening for yeast strains capable of utilizing phenol was done using a slant culture method (Middelhoven et al. 1991) with some modifications. Phenol was a sole source of carbon for yeast growth and the agar slants inoculated with tested yeast strains were incubated at 18 °C. If tested yeast strain was capable of utilizing phenol, a growth of yeast appeared on a slant surface. The growth intensity of tested strain on a slant surface depended on the toxicity of phenol towards this strain and the efficiency of utilization of phenol by this strain. Criteria used for evaluation the slant culture method were (++) for an intensive growth of yeast strain without inhibition zone, (+) for a weak growth of yeast strain with small inhibition zone (5–7 mm), and (–) for no growth or weak growth of yeast strain with inhibition zone >10 mm.

2.4 Phenol Biodegradation

The first step of an experiment was a preparation of inoculation for each yeast isolate selected from assimilation test. This was achieved by inoculating 3-ml YPD medium with the single colony of examined yeast strain from actively growing YPD plate. For all yeast isolates, test tubes were incubated at 18 °C on the rotary shaker at the speed 170 rpm for 1 day. After this period, 80 µl of each yeast culture was transferred to 20 ml of fresh YPD medium in 200-ml Erlenmeyer flasks. Flasks were incubated at 18 °C on the rotary shaker at the speed 170 rpm for 3 days. Next, yeast cells were harvested and used as an inoculum. In all the experiments, 5% of subculture

(1 ml) was inoculated into 20 ml of mineral salt medium (MSM) (Yan et al. 2005) in 200-ml Erlenmeyer flasks, supplemented with phenol at concentration 500, 750, 1000, 1500, and 2000 mg l⁻¹, respectively. Mineral salt medium contained (per liter) (NH₄)₂SO₄ 0.4 g, K₂HPO₄ 0.4 g, KH₂PO₄ 0.2 g, NaCl 0.1 g, MgSO₄ 0.1 g, MnSO₄·H₂O 0.01 g, Fe₂(SO₄)₃·nH₂O 0.01 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.01 g, and casein peptone 0.25 g, supplemented with 1 ml of each antibiotics: chloramphenicol (stock solution = 34 mg ml⁻¹) and ampicillin (stock solution = 100 mg ml⁻¹). The pH of the medium was adjusted to 6.0. At the start of incubation, OD of cultures were 0.2–0.3. All flasks were incubated at 18 °C on a rotary shaker at the speed 170 rpm for 5 days.

2.5 Analytical Methods

The optical density of growing yeast cultures was measured spectrophotometrically by measuring the absorbance at wavelength 600 nm (Feng et al. 2002) using 96-well plate VIS 96/F-PS (Eppendorf) and Eppendorf PlateReader AF2200. One hundred microliters of each yeast culture was placed on a well plate. For every well, five measurements were done according to parameters: type, xy; size, 3 × 3; and border, 1350 µm.

2.6 Process Control of Phenol Concentration During Biodegradation

To measure the concentration of phenol during biodegradation, simultaneously during optical density measurements, samples of suspended cultures were collected and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. One milliliter of each sample supernatant was placed in a 2-ml glass vial and 25 µl of 4-chlorophenol internal standard (IS) solution was added. The concentration of phenol in cell-free supernatant samples was determined by gas chromatography with a flame ionization detector (Clarus 580 GC, PerkinElmer, USA). An internal standard method was used. Detailed conditions of analysis are listed below.

Column: 60.0 m × 0.32 mm (ID) × 1.8 µm (DB-624) (Agilent, USA)

Carrier gas: nitrogen

Flow rate (a constant flow mode): 2.0 ml min⁻¹.

The temperature program: initial temperature 60 °C, then a constant rate of 10 °C min⁻¹ to final

temperature 250 °C and then isothermally for 10 min

Temperature of injector and detector (FID): 275 °C
Sample injection: by autosampler, injection volume 2.0 ml, in splitless mode (for 1 min and after split mode 25:1)

2.7 Identification of Yeast Strains by Sequencing of the D1/D2 Region and ITS Region

For genomic DNA isolation from selected yeast strains, one colony of each strain was used to inoculate 4-ml sterile YPD medium. All yeast cultures were grown at 18 °C on a rotary shaker at the speed 170 rpm for 4 days. Afterward, each yeast culture was harvested, and the cell pellets were used for genomic DNA isolation with ExtractMe DNA yeast kit according to manufacturer's instructions (Blirt S.A., Poland).

For yeast identification, two different genomic DNA regions were amplified by PCR, using DNA polymerase *Pwo* HyperNova (Blirt S.A., Poland). First was D1/D2 rDNA region which was amplified using the following primer pair: forward NL-1 (5'-GCATATCAATAAGC GGAGGAAAAG-3') and reverse NL-4 (5'-GGTC CGTGTTC AAGACGG-3') (Hesham et al. 2006).

PCR was performed for 30 cycles including an initial denaturation at 95 °C for 60 s, subsequent denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 59 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 45 s followed by final extension at 72 °C for 5 min and holding at 4 °C.

The second region was 5.8S-ITS rDNA region which was amplified using the following primer pair: forward ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and reverse ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Kurtzman and Robnett 1998).

PCR was performed for 30 cycles including an initial denaturation at 95 °C for 60 s, subsequent denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 60 s, and extension at 72 °C for 45 s followed by final extension at 72 °C for 5 min and holding at 4 °C.

Next, PCR amplification products were purified using ExtractMe DNA Clean-up Kit (Blirt S.A., Poland) according to manufacturer's instructions. PCR products were sent to Genomed S.A., Poland and directly sequenced using 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies). PCR primers NL-1 and NL-4 of the D1/D2 26S rRNA gene and ITS1 and ITS4 of 5.8S-ITS region were used in the sequencing reactions to reading both DNA

strands. The resulting DNA sequences were compared to the appropriate DNA sequences of the GenBank database using the basic local alignment search tool (BLAST) at the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Phylogenetic trees for studied yeast strains were constructed with MEGA version 6.0 using a neighbor-joining algorithm and bootstrap analysis (1000) (Tamura et al. 2013).

3 Results and Discussion

3.1 Isolation of Yeast Strains

A total of 39 psychrotolerant yeasts were isolated from water and soil samples of Rucianka raised bog. Twenty-one isolates were obtained from water samples and 18 isolates were isolated from soil samples. For each isolate, a morphology of colony and cell morphology were studied. The pure cultures of all isolates were deposited in yeast strain collection of the Department of Molecular Biotechnology and Microbiology, Gdańsk University of Technology. All of the isolates were cryoconserved and kept under -80 °C.

3.2 Isolation of Phenol Utilizing Yeasts

After 1 week of slant incubation, growth density was estimated. For 6 from 39 examined yeast strains, intensive growth on the whole surface of slant was observed. Moreover, for these strains, there was no zone of growth inhibition on slants and turbidity of water-phenol solution present above slant surface was observed. For 23 yeast strains, growth on slants was classified as weak. Intensity was low and zone of growth inhibition was 5–7 mm. For 10 yeast strains, no growth or growth of few single yeast colonies was observed. For those strains, the zone of inhibition was greater than 10 mm (Table 1).

Based on this method, six strains were selected for further studies. These strains were resistant to toxic properties of phenol, and presumably, these strains were able to use phenol as a sole carbon source.

4 Phenol Biodegradation—Results and Discussion

As mentioned above, most investigations are focused on phenol degradation by mesophilic microorganisms. Among them, bacteria are the most extensively

Table 1 Growth intensity on slants

Strain number	Collection number	Growth intensity
A02 ₃ , A02 ₅ , B01 ₂ , F03 ₂ , G02 ₁ , J02 ₁ , M03 ₃ , P02 ₁ , S01 ₂ , S01 ₃	373, 374, 375, 353, 376, 358, 366, 367, 377, 378	–
A03 ₁ , C02 ₁ , C02 ₂ , C03 ₁ , D01 ₁ , D01 ₄ , D01 ₅ , D02 ₁ , F03 ₁ , F03 ₄ , I02 ₂ , J02 ₂ , K01 ₁ , K01 ₂ , L01 ₁ , M03 ₁ , M03 ₂ , N02 ₁ , P03 ₁ , R01 ₁ , R01 ₂ , R01 ₃ , S01 ₁	326, 328, 329, 379, 380, 381, 351, 350, 352, 382, 385, 359, 360, 361, 362, 364, 365, 383, 368, 369, 370, 371, 384	+
A01 ₁ , B02 ₁ , I02 ₁ , L01 ₂ , S01 ₄ , A02 ₁	323, 324, 357, 363, 372, 325	++

Strain number: number assigned to pure culture after isolation from water or soil sample. Collection number: number assigned to strain (pure culture) deposited in the collection of Department of Molecular Biotechnology and Microbiology, Gdańsk University of Technology. Growth intensity: according to 1.2.3 in “Materials and Methods”

examined. Bacteria are able to mineralize phenol at 100–1200 mg l⁻¹ concentration (Polymenakou and Stephanou 2005) but the greater part of publications is focused on study of ability to use of phenol at 200 mg l⁻¹ concentration. Also, several yeast strains were reported as capable of phenol biodegradation. The highest phenol concentration was degraded by *Candida maltosa* (1700 mg l⁻¹ concentration) (Fialová et al. 2004) and *C. tropicalis* (up to 2000 mg l⁻¹) (Yan et al. 2005). Therefore, for our selected psychrotolerant yeast strains, we decided to test their ability to degrade phenol at 500, 750, 1000, 1500, and 2000 mg l⁻¹ concentration, respectively.

Figure 1a shows growth of selected six yeast strains during incubation time (76 h). For three of six examined strains, a significant increase of OD₆₀₀ values and a decrease of residual phenol concentrations were observed. Strains A01₁, B02₁, and L01₂ showed an increase in the values of OD₆₀₀ between 10 and 48 h of culture incubation (logarithmic phase of growth). After this period, OD₆₀₀ values remained stable on the same level or decreased slightly with time. Strains B02₁ and L01₂ exhibited an adaptation phase which lasted for around 10 h when for strain A01₁ OD₆₀₀ values started to increasing since of the beginning of its culture incubation. For strains A02₁ and I02₁, slightly increasing OD₆₀₀ values were observed but it was not associated with decreasing of residual phenol concentration. For

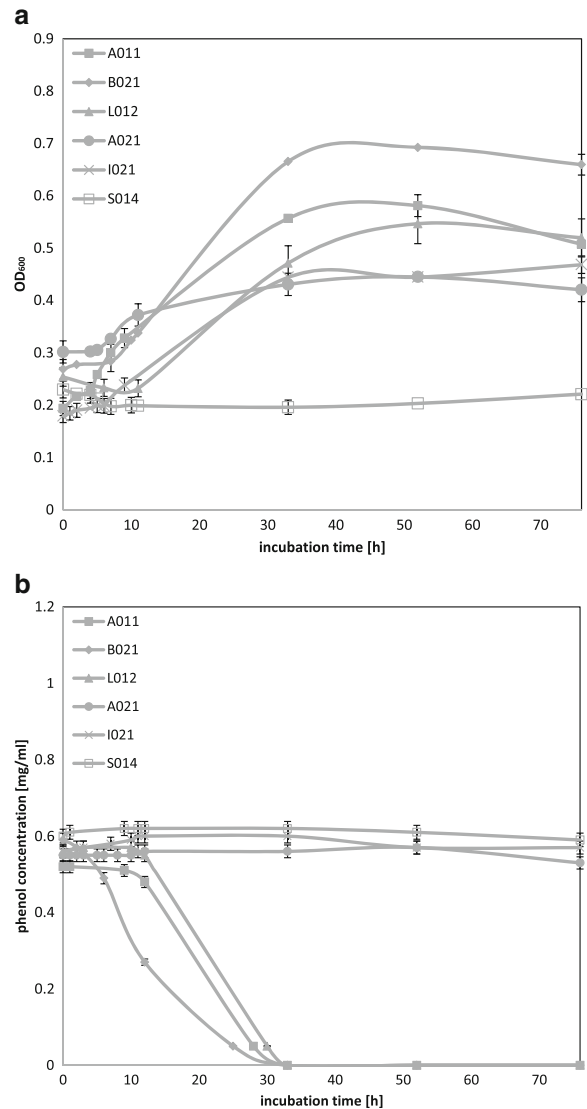


Fig. 1 Growth curves for yeast strains in MSM medium supplemented with phenol at 500 mg l⁻¹ concentration (a) and residual phenol concentration curves (b). Each strain has defined marker pointed out on figure

strain S01₄, no connection between OD₆₀₀ values and residual phenol concentration was observed and it is likely that phenol is toxic for this microorganism. Strains A02₁, I02₁, and S01₄ were excluded from further studies.

Analysis of residual phenol concentration chart (Fig. 1b) leads to conclusions that strains A01₁, B02₁, and L01₂ were able to reduce phenol from 500 mg l⁻¹ concentration to below the detection limits in less than 30 h of the culture incubation. Reduction of phenol corresponded with increasing OD₆₀₀ values. After

utilization of phenol as a sole source of carbon, no significant changes of OD_{600} values were observed.

The next examined phenol concentration was 750 mg l^{-1} . Only three strains, selected on 500 mg l^{-1} phenol concentration, were tested. Isolate A01₁ exhibited an adaptation phase which lasted around 24 h, whereas, for strains B02₁ and L01₂, OD_{600} values started to increase directly after starting of the culture incubation (Fig. 2a). Moreover, during the culture incubation time, the largest increase of OD_{600} values was observed for strain A01₁ (logarithmic growth phase between 24 and 48 h), whereas for strains B02₁ and L01₂, the increase of OD_{600} values was less significant and lower yeast

biomasses were yielded. Highest OD_{600} values were reached around 48 h of culture cultivation for strains A01₁ and L01₂ and around 70 h for strain B02₁. After this period, OD_{600} values remained stable on the same level or decreased slightly.

Chart of residual phenol concentration (Fig. 2b) reveals that all three strains were able to reduce phenol below detectable concentration. For isolate A01₁, reduction of phenol followed after 24 h of incubation and for strains B02₁ and L01₂ after around 48 h, respectively. Isolates B02₁ and L01₂ used phenol from the beginning of incubation, what corresponded with changes of

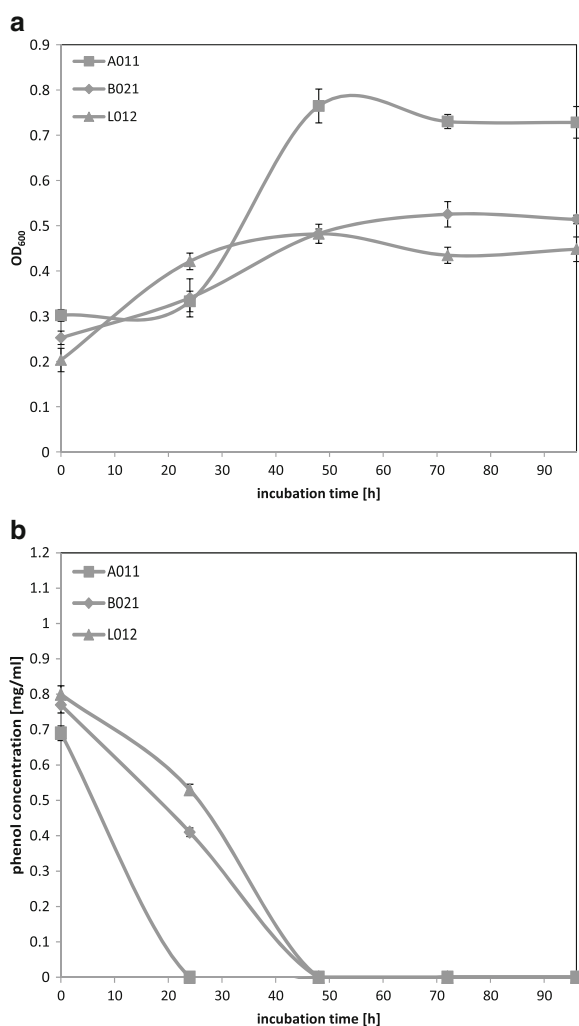


Fig. 2 Growth curves for yeast strains in MSM medium supplemented with phenol at 750 mg l^{-1} concentration (a) and residual phenol concentration curves (b). Each strain has defined marker pointed out on figure

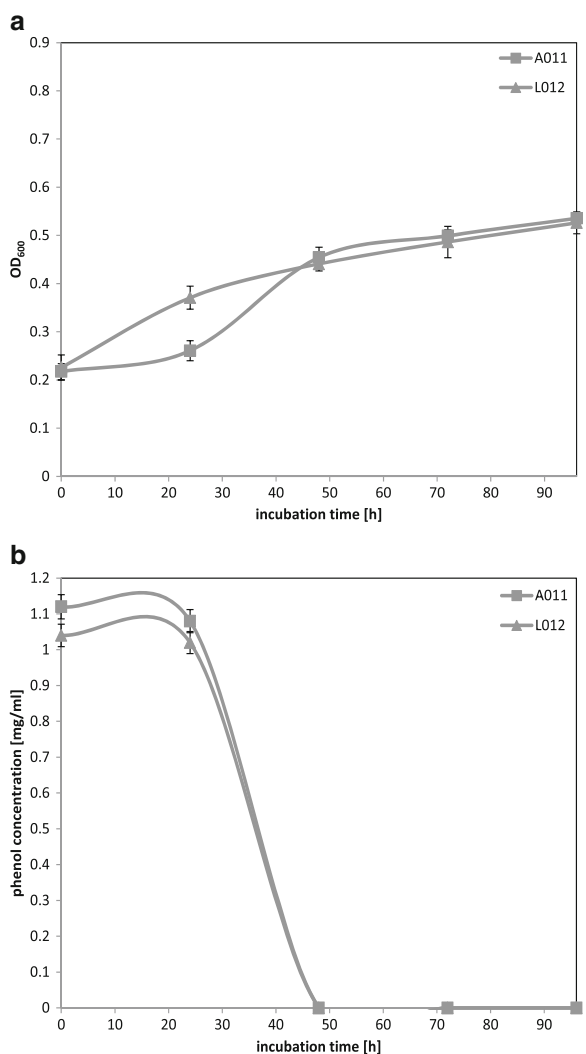


Fig. 3 Growth curve for yeast strains in MSM medium supplemented with phenol at 1000 mg l^{-1} concentration (a) and residual phenol concentration curves (b). Each strain has defined marker pointed out on figure

OD₆₀₀ values. For strain A01₁, the OD₆₀₀ values increased faster and reached much higher levels, and along with these changes, phenol degradation was faster than for the other strains. In comparison to results obtained from previous chart of residual phenol concentration, for strain A01₁, incubation time needed for degradation of phenol at 500 and 750 mg l⁻¹ was similar, whereas for strains B02₁ and L01₂, reduction of phenol at 750 mg l⁻¹ concentration below detectable level took twice as much time as for 500 mg l⁻¹ concentration.

The next tested phenol concentration was 1000 mg l⁻¹. Only two strains, A01₁ and L01₂ (Fig. 3a), were able to grow in the presence of high concentration of phenol. For both strains, A01₁ and L01₂, OD₆₀₀ values at the beginning and the end of the incubation, were comparable. For isolate A01₁, similarly to 750 mg l⁻¹ concentration, adaptation phase lasted for 24 h whereas for isolate L01₂ OD₆₀₀ values started to increase immediately after starting of incubation. Chart of residual phenol concentration (Fig. 3b) revealed that curves for each strain were similar. Both strains were able to reduce phenol concentration below the detectable level in around 48 h.

To sum up, the analysis of Figs. 1 and 2 leads to main conclusions. Three psychrotolerant yeast strains A01₁, B02₁, and L01₂ exhibited an effective degradation of phenol at 500 and 750 mg l⁻¹ concentration. Two strains (Fig. 3), A01₁ and L01₂, were able to grow in the presence of phenol at 1000 mg l⁻¹ concentration. In all experiments, complete degradation of phenol was possible in around 2 days. For all analyzed yeast strains, higher initial phenol concentration required longer incubation time what could be associated with potential toxic phenol influence on this yeast metabolism. None of the selected strain was able to grow in the presence of phenol concentration (at 1500 or 2000 mg l⁻¹, respectively). Presumably, phenol at these concentrations had a toxic influence on a growth rate of all examined strains. Besides, the production and accumulation of other intermediates of phenol degradation pathways may be responsible for decreasing cell mass yield and toxicity of phenol (Allsop et al. 1993).

Among psychrotolerant microorganism, some strains of *Rhodococcus* spp. were able to mineralize phenol in a concentration ranging from 1 to 12.5 mM (around 94–1176 mg l⁻¹) (Margesin et al. 2005). Degradation was done within 5 days while higher concentration was done

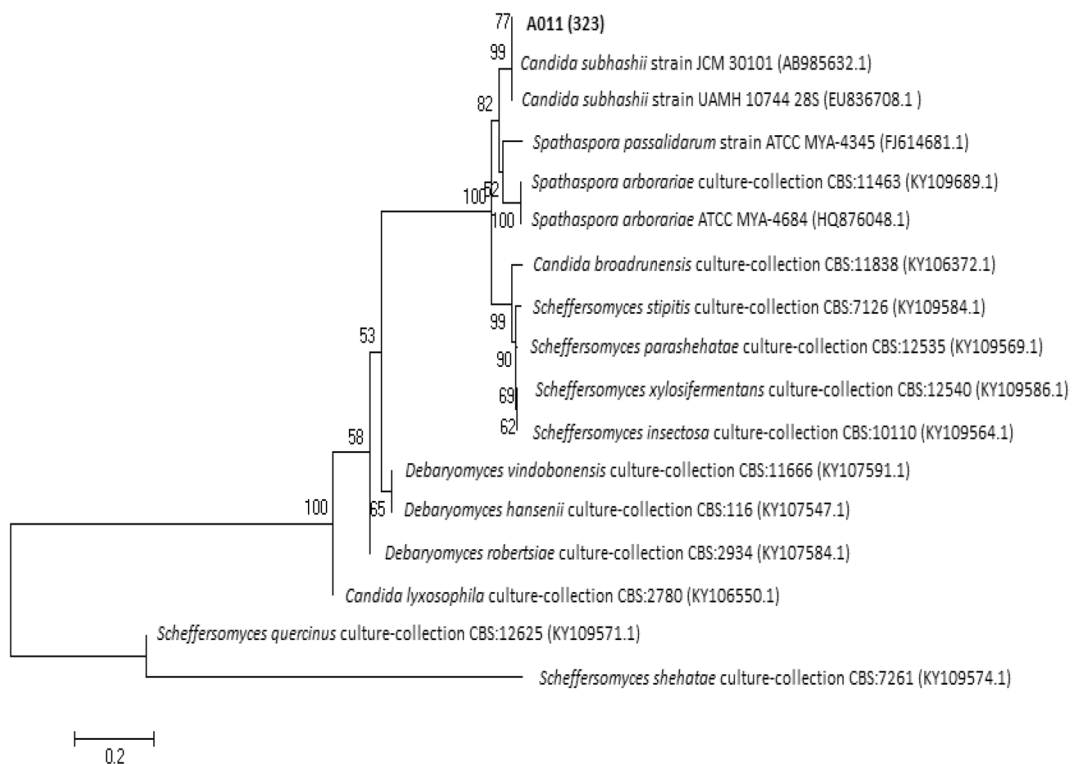


Fig. 4 Phylogenetic tree based on the D1/D2 region of rDNA for strain A01₁

in 14 days. Considering yeast strains, 400 mg Γ^{-1} concentration was investigated (Bergauer et al. 2005). Moreover, Margesin et al. (2005) pointed out yeast isolates able to degrade phenol concentration as high as 15 mM (around 1412 mg Γ^{-1}). Phenol up to 5 mM (around 470 mg Γ^{-1}) was degraded within 3 days and 7.5 mM (around 705 mg Γ^{-1}) within 7 days. The time which was needed to effectively degrade was longer than the results obtained for yeast strains presented in this study. Strains isolated from peat bog exhibited effective phenol degradation in less than 2 days. These comparisons should be considered only as an overview, because specific methodology of each investigation effect on the time and specific rate of phenol degradation.

4.1 Identification of Yeast Strains

Appropriate PCR products (for ITS region or D1/D2 region) were purified, sequenced, and analyzed for nucleotide matching by BLAST (Nucleotide BLAST, high similar sequences—megablast).

For D1/D2 rDNA region of strain A01₁ (613 bp fragment), the highest DNA sequence identity (99%) and cover (100%) was found with *Candida subhashii* strain UAMH 10744 (GenBank accession number EU836708.1). Strain UAMH 10744 is a type strain, which was deposited in the University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium, Edmonton, Canada. It was also deposited in CBS-KNAW (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands) as CBS 10753 and in Mycobank as MB 512099. For this *C. subhashii* strain, both conventional fermentation and assimilation tests in liquid were performed (Adam et al. 2009). Analysis of D1/D2 rDNA-based phylogenetic tree (Fig. 4) revealed that strain A01₁ clustered not only with *C. subhashii* strain UAMH 10744 but also with *C. subhashii* strain ATY945 (AB985632.1). However, the characterization of strain ATY945 with biochemical tests was not done (Tanimura et al. 2015).

For analyzed ITS sequence (565 bp fragment), this strain showed highest DNA sequence identity (96%) and cover (100%) with *C. subhashii* type strain UAMH 10744 (NR_073356.2). Also a phylogenetic tree based

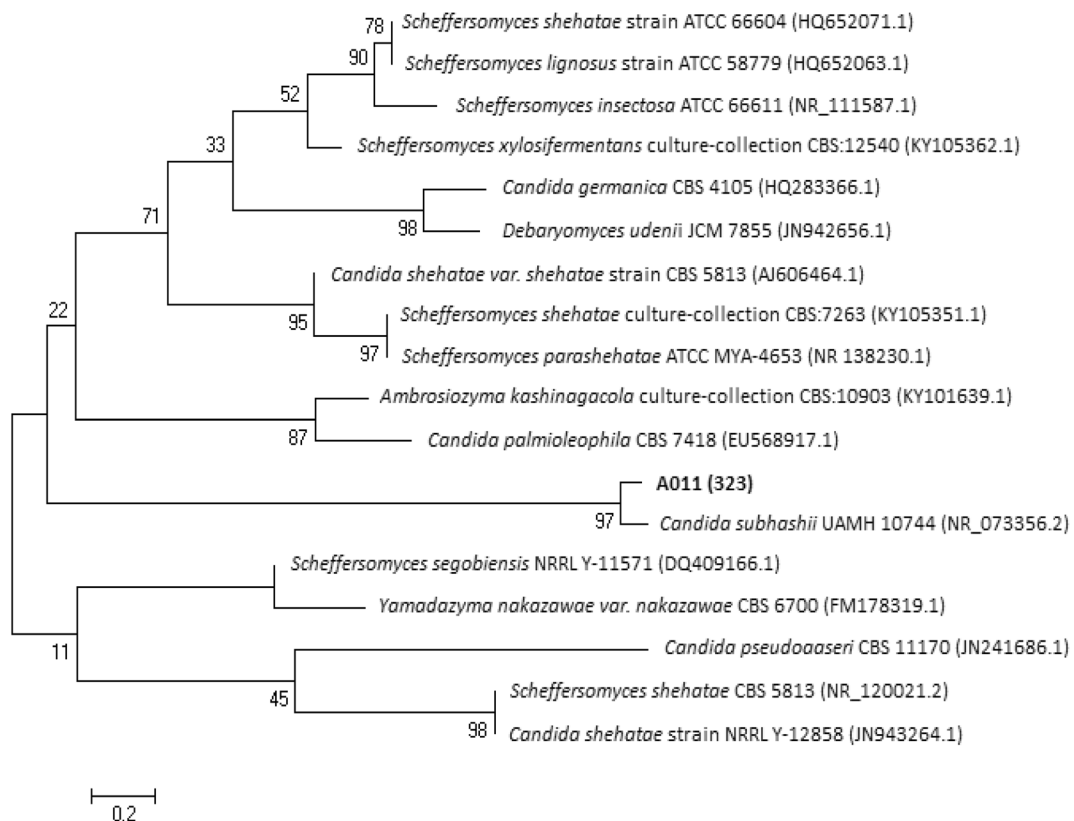


Fig. 5 Phylogenetic tree based on the ITS region of rDNA for strain A01₁

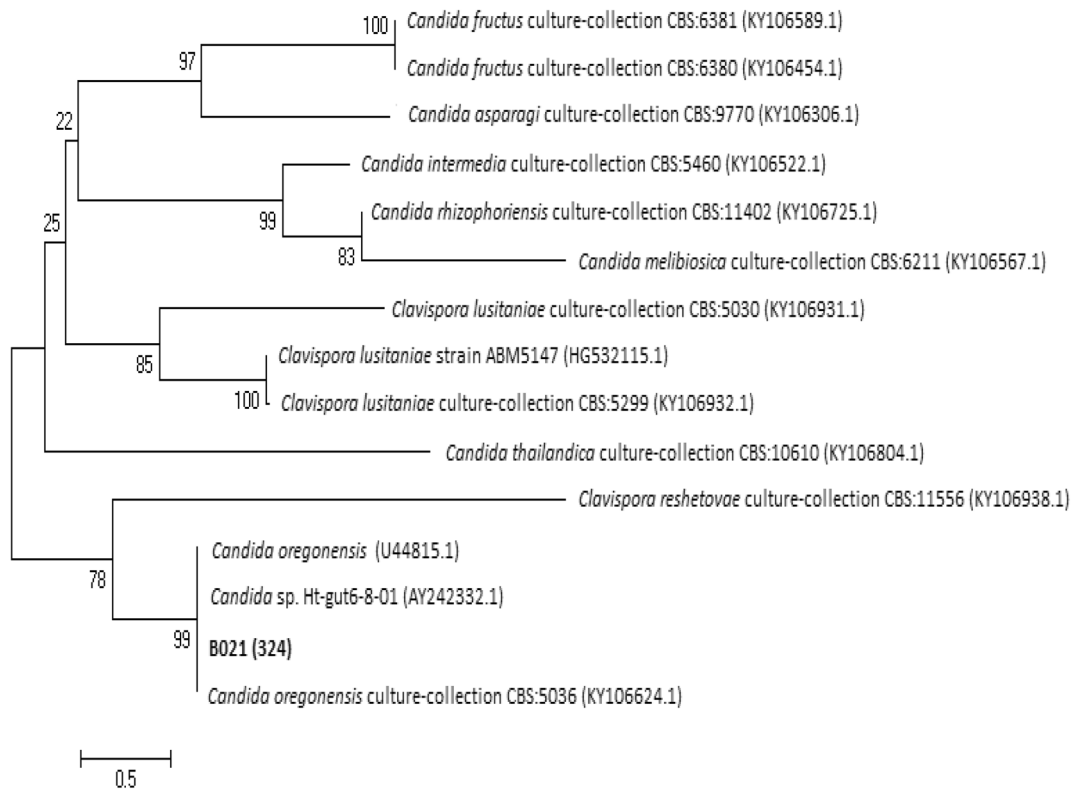


Fig. 6 Phylogenetic tree based on the D1/D2 region of rDNA for strain B02₁

on ITS sequences analysis shows that analyzed strain clustered with strain UAMH 10744 (Fig. 5).

To sum up, results obtained after above-mentioned analysis show that the strain A01₁ might belong to

C. subhashii. Although the distance and composition of trees branches and clusters led to the hypothesis that clustered might be connected with different yeast species than *Candida* spp. (Fig. 4 and Fig. 5). Cluster

Fig. 7 Phylogenetic tree based on the ITS region of rDNA for strain B02₁

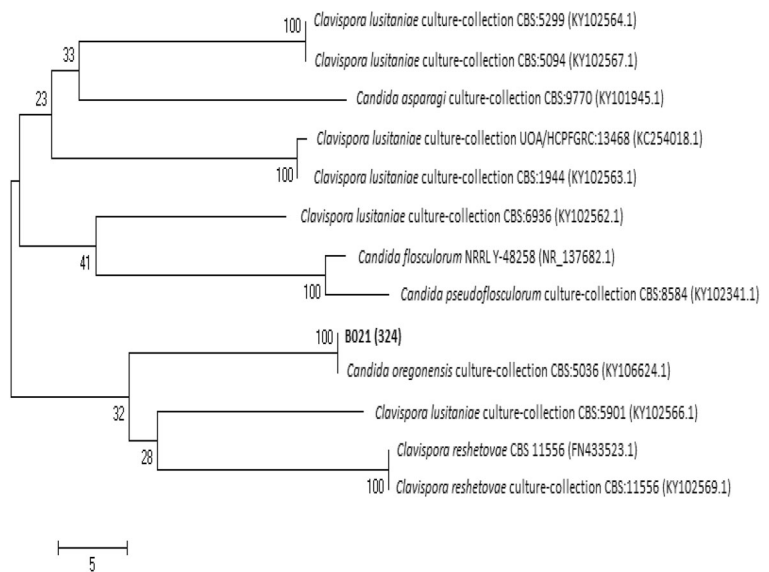
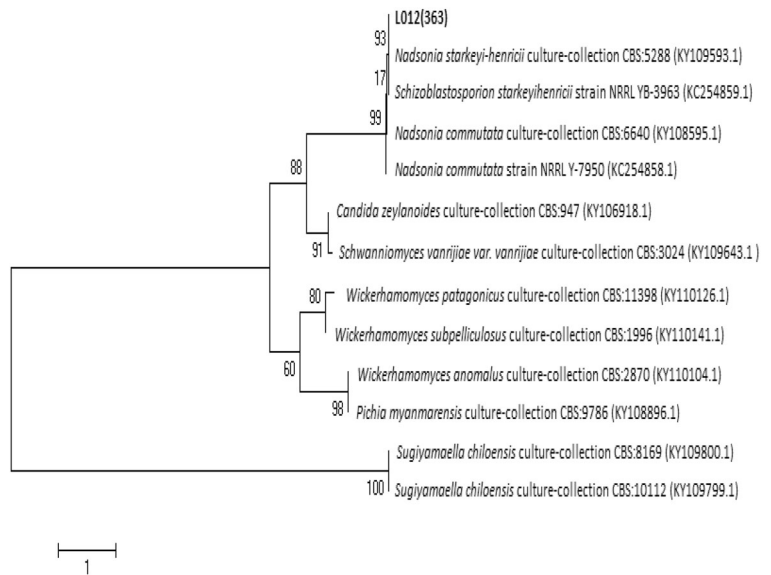


Fig. 8 Phylogenetic tree based on the D1/D2 region of rDNA for strain L01₂

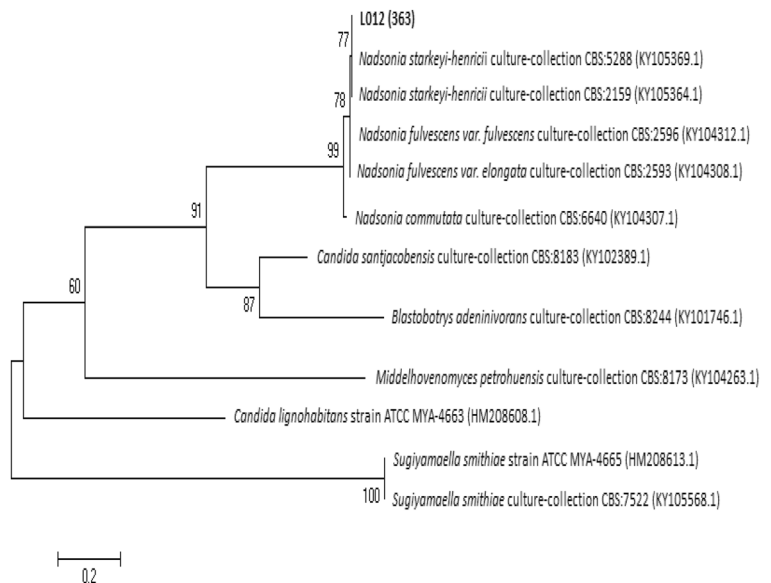


contained strain A01₁ adjoined with major clusters gathered strains of different species. It was also suggested by Adam et al. (2009) where *C. subhashii* strain UAMH 10744 belonged to a different branch than other *Candida* sp. strains.

For D1/D2 rDNA region of strain B02₁ (558 bp fragment), the highest DNA sequence identity (100%) and cover (96%) was found with *Candida oregonensis* strain (KY106624.1). This strain was deposited in CBS-KNAW culture collection as CBS 5036. Phylogenetic tree based on D1/D2 region

(Fig. 6) shows that selected strain clustered with strain *Candida* sp. Ht-gut 6-8-01 (AY242332.1) and *C. oregonensis* (U44815.1), where both sequences show 100% identity between each other. Identification of strain Ht-gut 6-8-01 based on D1/D2 loop sequence of the LSU rRNA gene. Only some of isolates from each LSU genotype were deposited in collections and morphological observations and metabolic tests were performed (Suh et al. 2004). In case of type strain deposited in GenBank as U44815.1, it was maintained in the Agricultural Research Service

Fig. 9 Phylogenetic tree based on the ITS region of rDNA for strain L01₂



Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peonia, III (NRRL Y-5850) and was also deposited in CBS-KNAW as CBS 5036 (Kurtzman and Robnett 1997).

For ITS region (381 bp fragment), analyzed DNA sequence of strain showed 99% identity and 100% cover also with *C. oregonensis* strain CBS 5036. ITS region-based phylogenetic tree shows that selected strain clustered also with *C. oregonensis* strain CBS 5036 (Fig. 7).

According to these results, strain B02₁ may be classified as *C. oregonensis*.

For the D1/D2 rDNA region of strain L01₂ (613 bp fragment), the highest DNA sequence identity (99%) and cover (100%) were found with *Nadsonia starkeyi-henricii* culture collection strain CBS 5288 (KY109593.1). For this yeast species, authority name is *N. starkeyi-henricii* and synonymic names are *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* and *Schizoblastosporion starkeyihenricii* (Kurtzman and Robnett 2013). Phylogenetic tree generated from the analysis of other closely related D1/D2 rDNA nucleotide sequence revealed that this strain clustered with *S. starkeyi-henricii* strain NRRL YB-3963 (KC254859.1) and also above-mentioned *N. starkeyi-henricii* strain CBS 5288 (KY109593.1) (Fig. 8).

For ITS region BLAST analysis, the L01₂ strain (571 bp fragment) shows 99% identity of DNA sequence with 99% of cover with analogous DNA sequence *N. starkeyi-henricii* culture collection strain CBS 5288 (KY109593.1), the same strain which revealed the highest DNA sequence identity for D1/D2 region DNA sequence analysis. ITS region-based phylogenetic tree shows that strain L01₂ clustered with two *N. starkeyi-henricii* strains—strain CBS 5288 (KY109593.1) and CBS 2159 (KY105364.1) (Fig. 9).

To sum up, analysis of D1/D2 rDNA and ITS region led to the hypothesis that strain L01₂ may be a member of species *S. starkeyi-henricii* (*N. starkeyi-henricii*). Moreover, reference strain of *S. starkeyi-henricii* (ATCC 24615) was also isolated from soil collected from a peat bog. Furthermore, this yeast genus appeared in multiple studies on peats and fens in Europe, Canada, Asia, and New Zealand and in most reports about peat bog microorganisms (Babjeva and Blagodatskaia 1971; Hong et al. 2006; Polyakova et al. 2001). It is considered as a rare genus with not fully classified taxonomy and isolated

mainly on peatlands (Golubev and Pfeiffer 2014; Polyakova et al. 2001).

To date, there is no information about studies focused on the evaluation of the usefulness of strains belonging to *C. subhashii* (Adam et al. 2009; Fricova et al. 2010; Tanimura et al. 2015; Valach et al. 2011; Watanabe et al. 1998) and *C. oregonensis* (Dohet et al. 2016; Lou et al. 2014; Phaff and do Carmo-Sousa 1962, Rivera et al. 2007) to biodegradation of aromatic hydrocarbons. In this connection, some yeast strains (G28 and G38) belonging to species *S. starkeyi-henricii* exhibited a potential of assimilation of benzene derivative compounds. According to culture slant method, strain G28 assimilated phenol, catechol, resorcinol, hydroquinone, gentisic acid, and 3-hydroxybenzoic acid at 25 °C. Yeast strain G38 was able to degrade phenol at 10 °C based on yeast enrichment cultures on solid media (Middelhoven et al. 1992).

5 Conclusions

In this study, the potential of psychrotolerant yeasts isolated from peatland to biodegrade phenol was studied for the first time. Phenol as the only carbon source was degraded by three yeast strains isolated from soil and water samples collected from Rucianka peat bog. Each strain was able to degrade phenol at 500 and 750 mg l⁻¹ concentration and two strains at 1000 mg l⁻¹ concentration in the mineral salt medium during incubation at 18 °C. All phenol concentrations were degraded below detectable levels in less than 48 h. None of the strains were able to degrade higher phenol concentration (1500 or 2000 mg l⁻¹).

The data obtained in this study shows that the contribution of cold-adapted yeasts to biodegradation of phenol is underestimated. Most investigations on low temperatures are focused on bacteria, whereas knowledge about yeasts is limited. Moreover, according to literature, biodiversity of yeast isolated from peatlands has received little attention. This study pointed out a new direction to search of psychrotolerant yeasts with biodegradation of organic compound potential. Selected strains, especially strain L01₂ and strain A01₁, may be useful for examination of degradation for other monoaromatic toxic compounds, like BTEX group.

Compliance with Ethical Standards

Funding This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Adam, H., Groenewald, M., Mohan, S., Richardson, S., Bunn, U., Gibas, C. F. C., Poutanen, S., & Sigler, L. (2009). Identification of a new species, *Candida subhashii*, as a cause of peritonitis. *Medical Mycology*, 47(3), 305–311. doi:10.1080/13693780802380545.
- Aksu, Z. (2001). Equilibrium and kinetic modelling of cadmium(II) biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: effect of temperature. *Separation and Purification Technology*, 21(3), 285–294. doi:10.1016/S1383-5866(00)00212-4.
- Aksu, Z., Akpinar, D., Kabasakal, E., & Köse, B. (1999). Simultaneous biosorption of phenol and nickel(II) from binary mixtures onto dried aerobic activated sludge. *Process Biochemistry*, 35(3), 301–308. doi:10.1016/S0032-9592(99)00072-2.
- Aleksieva, Z., Ivanova, D., Godjevargova, T., & Atanasov, B. (2002). Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochemistry*, 37(11), 1215–1219. doi:10.1016/S0032-9592(01)00336-3.
- Allsop, P. J., Chisti, Y., Moo-Young, M., & Sullivan, G. R. (1993). Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(5), 572–580. doi:10.1002/bit.260410510.
- Aravindhan, R., Rao, J. R., & Nair, B. U. (2009). Application of a chemically modified green macro alga as a biosorbent for phenol removal. *Journal of Environmental Management*, 90(5), 1877–1883. doi:10.1016/j.jenvman.2008.12.005.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2015). Toxicological profile for phenol. Accessed 20 December 2016.
- Babjeva, I. P., & Blagodatskaia, V. M. (1971). Physiological characteristics and ecology of the yeast *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* Ciferri. *Mikrobiologiya*, 41(1), 99–104.
- Banat, F., Al-Bashir, B., Al-Asheh, S., & Hayajneh, O. (2000). Adsorption of phenol by bentonite. *Environmental Pollution*, 107(3), 391–398. doi:10.1016/S0269-7491(99)00173-6.
- Bergauer, P., Fonteyne, P.-A., Nolard, N., Schinner, F., & Margesin, R. (2005). Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere*, 59(7), 909–918. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.011.
- Boczkaj, G., Makoś, P., & Przyjazny, A. (2016a). Application of dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography with mass spectrometry for the determination of oxygenated volatile organic compounds in effluents from the production of petroleum bitumen. *Journal of Separation Science*, 39(13), 2604–2615. doi:10.1002/jssc.201501355.
- Boczkaj, G., Makoś, P., & Przyjazny, A. (2016b). Application of dynamic headspace and gas chromatography coupled to mass spectrometry (DHS-GC-MS) for the determination of oxygenated volatile organic compounds in refinery effluents. *Analytical Methods*, 8(17), 3570–3577. doi:10.1039/C5AY03043A.
- Boczkaj, G., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2014). New procedures for control of industrial effluents treatment processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(4), 1503–1514. doi:10.1021/ie402126d.
- Boroujeni, N. A., Hassanshahian, M., Mohammad, S., & Khoshrou, R. (2014). Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from Persian Gulf. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(2), 408–416.
- Broholm, M. M., & Arvin, E. (2000). Biodegradation of phenols in a sandstone aquifer under aerobic conditions and mixed nitrate and iron reducing conditions. *Journal of Contaminant Hydrology*, 44(3–4), 239–273. doi:10.1016/S0169-7722(00)00103-0.
- Bux, F., Atkinson, B., & Kusan, H. C. (1999). Zinc biosorption by waste activated and digested sludges. *Water Science and Technology*, 39(10), 127–130. doi:10.1016/S0273-1223(99)00262-0.
- Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Patel, T. N., & Tiwari, K. K. (2010). Biodegradation of phenol by native microorganisms isolated from coke processing wastewater. *Journal of Environmental Biology*, 31(3), 293–296.
- Chung, T.-P., Tseng, H.-Y., & Juang, R.-S. (2003). Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process Biochemistry*, 38(10), 1497–1507. doi:10.1016/S0032-9592(03)00038-4.
- Cordova-Rosa, S. M., Dams, R. I., Cordova-Rosa, E. V., Radetski, M. R., Corrêa, A. X. R., & Radetski, C. M. (2009). Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*, 164(1), 61–66. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.07.120.
- Davidson, R. S. (1996). The photodegradation of some naturally occurring polymers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 33(1), 3–25. doi:10.1016/1011-1344(95)07262-4.
- Dohet, L., Grégoire, J.-C., Berasategui, A., Kaltenpoth, M., & Biedermann, P. H. W. (2016). Bacterial and fungal symbionts of parasitic *Dendroctonus* bark beetles. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(9). doi:10.1093/femsec/fw129.
- Federal State Statistics Service: Russia Federation. (2011). http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/en/main/. Accessed 20 Dec 2016.

- Feng, Z., Kunyan, C., Jiamo, F., Guoying, S., & Huifang, Y. (2002). Biodegradability of di(2-ethylhexyl) phthalate by *Pseudomonas fluorescens* FS1. *Water, Air, and Soil Pollution*, 140(1/4), 297–305. doi:10.1023/A:1020108502776.
- Fialová, A., Boschke, E., & Bley, T. (2004). Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), 69–76. doi:10.1016/j.ibiod.2004.02.004.
- Fricova, D., Valach, M., Farkas, Z., Pfeiffer, I., Kucsera, J., Tomaska, L., & Nosek, J. (2010). The mitochondrial genome of the pathogenic yeast *Candida subhashii*: GC-rich linear DNA with a protein covalently attached to the 5' termini. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 7), 2153–2163. doi:10.1099/mic.0.038646-0.
- Galíndez-Mayer, J., Ramón-Gallegos, J., Ruiz-Ordaz, N., Juárez-Ramírez, C., Salmerón-Alcocer, A., & Poggi-Varaldo, H. M. (2008). Phenol and 4-chlorophenol biodegradation by yeast *Candida tropicalis* in a fluidized bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 38(2), 147–157. doi:10.1016/j.bej.2007.06.011.
- García-Peña, I., Ortiz, I., Hernández, S., & Revah, S. (2008). Biofiltration of BTEX by the fungus *Paecilomyces variotii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(4), 442–447. doi:10.1016/j.ibiod.2008.03.012.
- Gimeno, O., Carbajo, M., Beltran, F., & Rivas, F. (2005). Phenol and substituted phenols AOPs remediation. *Journal of Hazardous Materials*, 119(1–3), 99–108. doi:10.1016/j.jhazmat.2004.11.024.
- Golubev, W. I., & Pfeiffer, I. (2014). A study of *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* isolates from northern and southern hemispheres of the Earth. *Microbiology*, 83(5), 661–665. doi:10.1134/S0026261714050117.
- Gurujeyalakshmi, G., & Oriel, P. (1989). Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(2), 500–502.
- Hameed, B. H., & Rahman, A. A. (2008). Removal of phenol from aqueous solutions by adsorption onto activated carbon prepared from biomass material. *Journal of Hazardous Materials*, 160(2), 576–581. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.03.028.
- Hesham, A. E.-L., Khan, S., Liu, X., Zhang, Y., Wang, Z., & Yang, M. (2006). Application of PCR–DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast*, 23(12), 879–887. doi:10.1002/yea.1401.
- Hill, G. A., Milne, B. J., & Nawrocki, P. A. (1996). Cometabolic degradation of 4-chlorophenol by *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(2), 163–168. doi:10.1007/s002530050799.
- Holder, A. W., Bedient, P. B., & Hughes, J. B. (1999). Modeling the impact of oxygen re-aeration on natural attenuation. *Bioremediation Journal*, 3(2), 137–149. doi:10.1080/10889869991219451.
- Hong, S. G., Lee, K. H., Kwak, J., & Bae, K. S. (2006). Diversity of yeasts associated with *Panax ginseng*. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 44(6), 674–679.
- ICIS. (2016). Phenol and acetone—under pressure. Market outlook. Accessed 27 March 2016.
- Jarvinen, K. T., Melin, E. S., & Puhakka, J. A. (1994). High-rate bioremediation of chlorophenol-contaminated groundwater at low temperatures. *Environmental Science and Technology*, 28, 2387–2392. doi:10.1021/es00062a025.
- Jiang, Y., Ren, N., Cai, X., Wu, D., Qiao, L., & Lin, S. (2008). Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by the mutant strain CTM 2. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(5), 796–800. doi:10.1016/S1004-9541(08)60158-5.
- Juárez-Ramírez, C., Ruiz-Ordaz, N., Cristiani-Urbina, E., & Galíndez-Mayer, J. (2001). Degradation kinetics of phenol by immobilized cells of *Candida tropicalis* in a fluidized bed reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(7), 697–705. doi:10.1023/A:1012979100827.
- Kafilzadeh, F., Farhangdoost, M.-S., & Tahery, Y. (2010). Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. *African Journal of Biotechnology*, 9(40), 6721–6726. doi:10.5897/AJB10.665.
- Karimi, M., Hassanshahian, M., Karimi, M., & Hassanshahian, M. (2016). Isolation and characterization of phenol degrading yeasts from wastewater in the coking plant of Zarand, Kerman. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 18–24. doi:10.1016/j.bjm.2015.11.032.
- Kibret, M., Somitsch, W., & Robra, K.-H. (2000). Characterization of phenol degrading mixed population by enzyme assay. *Water Research*, 34(4), 1127–1134. doi:10.1016/S0043-1354(99)00248-1.
- Kotturi, G., Robinson, C., & Inniss, W. (1991). Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(4), 539–543. doi:10.1007/BF00180585.
- Kumar, A., Kumar, S., & Kumar, S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal*, 22(2), 151–159. doi:10.1016/j.bej.2004.09.006.
- Kurtz, A. M., & Crow, S. A. (1997). Transformation of chlororesorcinol by the hydrocarbonoclastic yeasts *Candida maltosa*, *Candida tropicalis*, and *Trichosporon ovoides*. *Current Microbiology*, 35(3), 165–168. doi:10.1007/s002849900232.
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeast based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(5), 1216–1223.
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73(4), 331–371. doi:10.1023/A:1001761008817.
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (2013). *Alloascoidea hylecoeti* gen. nov., comb. nov., *Alloascoidea africana* comb. nov., *Ascoidea tarda* sp. nov., and *Nadsonia starkeyi-henricii* comb. nov., new members of the Saccharomycotina (Ascomycota). *FEMS Yeast Research*, 13(5), 423–432. doi:10.1111/1567-1364.12044.
- Lin, S.-H., & Juang, R.-S. (2009). Adsorption of phenol and its derivatives from water using synthetic resins and low-cost natural adsorbents: a review. *Journal of Environmental Management*, 90(3), 1336–1349. doi:10.1016/j.jenvman.2008.09.003.

- Lou, Q.-Z., Lu, M., & Sun, J.-H. (2014). Yeast diversity associated with invasive *Dendroctonus valens* killing *Pinus tabulaeformis* in China using culturing and molecular methods. *Microbial Ecology*, 68(2), 397–415. doi:10.1007/s00248-014-0413-6.
- Margesin, R., Bergauer, P., & Gander, S. (2004). Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: a comparison of cold-tolerant *Arthrobacter* sp. and mesophilic *Pseudomonas putida*. *Extremophiles*, 8(3), 201–207. doi:10.1007/s00792-004-0378-3.
- Margesin, R., Fonteyne, P.-A., & Redl, B. (2005). Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by *Rhodococcus* spp. and basidiomycetous yeasts. *Research in Microbiology*, 156(1), 68–75. doi:10.1016/j.resmic.2004.08.002.
- Margesin, R., Gander, S., Zacke, G., Gounot, A. M., & Schinner, F. (2003). Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles*, 7(6), 451–458. doi:10.1007/s00792-003-0347-2.
- Middelhoven, W. J., de Jong, I. M., & de Winter, M. (1991). *Arxula adenivorans*, a yeast assimilating many nitrogenous and aromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 59(2), 129–137. doi:10.1007/BF00445657.
- Middelhoven, W. J., Koorevaar, M., & Schuur, G. W. (1992). Degradation of benzene compounds by yeasts in acidic soils. *Plant and Soil*, 145(1), 37–43. doi:10.1007/BF00009539.
- Morasch, B., Richnow, H. H., Schink, B., Vieth, A., & Meckenstock, R. U. (2002). Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5191–5194. doi:10.1128/aem.68.10.5191-5194.2002.
- Pawłat, H. (1996). Ocena oddziaływania projektowanej eksploatacji torfu i rekultywacji potorfii obiektu “Rucianka” na środowisko przyrodnicze. Ocena Oddziaływania Inwestycji na Środowisko, (Environmental impact evaluation of the peat mining and reclamation of the post-mining pits at the Rucianka peat-bog. Evaluation of the investment environmental impact). Warszawa (in Polish).
- Phaff, H. J., & do Carmo-Sousa, L. (1962). Four new species of yeast isolated from insect frass in bark of *Tsuga heterophylla* (Raf.) Sargent. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 28(1), 193–207. doi:10.1007/BF02538734.
- Polyakova, A. V., Chernov, I. Y., & Panikov, N. S. (2001). Yeast diversity in hydromorphic soils with reference to a grass-sphagnum wetland in western Siberia and a hummocky tundra region at Cape Barrow (Alaska). *Microbiology*, 70(5), 617–623. doi:10.1023/A:1012328710111.
- Polymenakou, P. N., & Stephanou, E. G. (2005). Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonas*. *Biodegradation*, 16(5), 403–413.
- Puhakka, J. A., Melin, E. S., Järvinen, K. T., Koro, P. M., Rintala, J. A., Hartikainen, P., Shieh, W. K., & Ferguson, J. F. (1995). Fluidized-bed biofilms for chlorophenol mineralization. *Water Science and Technology*, 31(1), 227–235. doi:10.1016/0273-1223(95)00170-R.
- Qi, B., Moe, W. M., & Kinney, K. A. (2002). Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), 684–689. doi:10.1007/s00253-002-0938-3.
- Reardon, K. F., Mosteller, D. C., Rogers, J. B., DuTeau, N. M., & Kim, K.-H. (2002). Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. *Environmental Health Perspectives*, 110(Suppl 6), 1005–1011.
- Rengaraj, S., Moon, S.-H., Sivabalan, R., Arabindoo, B., & Murugesan, V. (2002). Agricultural solid waste for the removal of organics: adsorption of phenol from water and wastewater by palm seed coat activated carbon. *Waste Management*, 22(5), 543–548. doi:10.1016/S0956-053X(01)00016-2.
- Rivera, F. N., Gómez, Z., González, E., López, N., Hernández Rodríguez, C. H., & Zúñiga, G. (2007). Yeasts associated with bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): molecular identification and biochemical characterization. In: *Proceedings from the Third Workshop on Genetics of Bark Beetles and Associated Microorganisms*. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, 45–48.
- Rocha, L. L., de Aguiar Cordeiro, R., Cavalcante, R. M., do Nascimento, R. F., Martins, S. C. S., Santaella, S. T., & Melo, V. M. M. (2007). Isolation and characterization of phenol-degrading yeasts from an oil refinery wastewater in Brazil. *Mycopathologia*, 164(4), 183–188. doi:10.1007/s11046-007-9043-6.
- Roostaie, N., & Tezel, F. H. (2004). Removal of phenol from aqueous solutions by adsorption. *Journal of Environmental Management*, 70(2), 157–164. doi:10.1016/j.jenvman.2003.11.004.
- Sampaio, J. P. (1999). Utilization of low molecular weight aromatic compounds by heterobasidiomycetous yeasts: taxonomic implications. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(6), 491–512. doi:10.1139/w99-020.
- Siva Kumar, N., Venkata Subbaiah, M., Subba Reddy, A., & Krishnaiah, A. (2009). Biosorption of phenolic compounds from aqueous solutions onto chitosan-*abrus precatorius* blended beads. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(7), 972–981. doi:10.1002/jctb.2120.
- Sivasubramanian, S., & Namasivayam, S. K. R. (2015). Phenol degradation studies using microbial consortium isolated from environmental sources. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 243–252. doi:10.1016/j.jece.2014.12.014.
- Suh, S.-O., McHugh, J. V., & Blackwell, M. (2004). Expansion of the *Candida tanzawaensis* yeast clade: 16 novel *Candida* species from basidiocarp-feeding beetles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2409–2429. doi:10.1099/ijs0.63246-0.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Tanimura, A., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Kishino, S., Ogawa, J., & Shima, J. (2015). Direct ethanol production from starch using a natural isolate, *Scheffersomyces shehatae*: toward consolidated bioprocessing. *Scientific Reports*, 5, 9593. doi:10.1038/srep09593.
- Thormann, M. N., & Rice, A. V. (2007). Fungi from peatlands. *Fungal Diversity*, 24, 241–299.
- Thormann, M. N., Rice, A. V., & Beilman, D. W. (2007). Yeasts in peatlands: a review of richness and roles in peat

- decomposition. *Wetlands*, 27(3), 761–773. doi:10.1672/0277-5212(2007)27[761:YIPARO]2.0.CO.
- Tsuruta, Y., Kitai, S., Watanabe, S., & Inoue, H. (2000). 2-Methoxy-4-(2-phthalimidinyl)phenylsulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent for determination of phenols in high-performance liquid chromatography and application for determination of urinary phenol and *p*-cresol. *Analytical Biochemistry*, 280(1), 36–41. doi:10.1006/abio.2000.4492.
- Valach, M., Farkas, Z., Fricova, D., Kovac, J., Brejova, B., Vinar, T., Pfeiffer, I., Kucsera, J., Tomaska, L., Lang, B. F., & Nosek, J. (2011). Evolution of linear chromosomes and multipartite genomes in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 39(10), 4202–4219. doi:10.1093/nar/gkq1345.
- Wang, C. C., Lee, C. M., Lu, C. J., Chuang, M. S., & Huang, C. Z. (2000). Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in the presence of primary substrate by immobilized pure culture bacteria. *Chemosphere*, 41(12), 1873–1879. doi:10.1016/S0045-6535(00)00090-4.
- Wang, J., Ma, X., Liu, S., Sun, P., Fan, P., & Xia, C. (2012). Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by *Candida tropicalis* W1. *Procedia Environmental Sciences*, 16, 299–303. doi:10.1016/j.proenv.2012.10.042.
- Wang, L., Qiao, N., Sun, F., & Shao, Z. (2008). Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. *Extremophiles*, 12(3), 335–342. doi:10.1007/s00792-007-0136-4.
- Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H., & Harayama, S. (1998). Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4396–4402.
- Woertz, J. R., Kinney, K. A., McIntosh, N. D. P., & Szaniszló, P. J. (2001). Removal of toluene in a vapor-phase bioreactor containing a strain of the dimorphic black yeast *Exophiala lecanii-corni*. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(5), 550–558. doi:10.1002/bit.10066.
- Yan, J., Jianping, W., Hongmei, L., Suliang, Y., & Zongding, H. (2005). The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal*, 24(3), 243–247. doi:10.1016/j.bej.2005.02.016.
- You, Y., Shim, J., Cho, C.-H., Ryu, M.-H., Shea, P. J., Kamala-Kannan, S., Chae, J. C., & Oh, B. T. (2013). Biodegradation of BTEX mixture by *Pseudomonas putida* YNS1 isolated from oil-contaminated soil. *Journal of Basic Microbiology*, 53(5), 469–475. doi:10.1002/jobm.201200067.
- Yu, Z., & Wen, X. (2005). Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56(2), 109–114. doi:10.1016/j.ibiod.2005.05.006.
- Zümriye, A., Derya, A., Elif, K., & Burcin, K. (1999). Simultaneous biosorption of phenol and nickel(II) from binary mixtures onto dried aerobic activated sludge. *Process Biochemistry*, 35, 301–308. doi:10.1016/S0032-9592(99)00072-2.

PUBLIKACJA NR 2 – DANE (ZAŁĄCZNIK 2)

Filipowicz, N., Cieśliński, H. (2020). A Rapid and Simple Method for Screening Microorganisms with a Potential for Catechol Biodegradation. *International Journal of Environmental Research*, 14: 87-92; doi: 10.1007/s41742-019-00239-z

Gdańsk, 21.09.2021

Mgr inż. Natalia Filipowicz
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Politechnika Gdańska
Budynek C Wydziału Chemicznego pokój 101
filipowicz.natalia@wp.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Cieśliński, H. (2020). A Rapid and Simple Method for Screening Microorganisms with a Potential for Catechol Biodegradation. *International Journal of Environmental Research*, 14: 87-92, doi:10.1007/s41742-019-00239-z

Polegał na: analizie dostępnej literatury i opracowaniu metodologii badań, na zaplanowaniu i wykonywaniu eksperymentów oraz na analizie i interpretacji uzyskanych wyników. Przygotowałam również zarówno wstępną, jak i finalną wersję publikacji oraz pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 85%

Filipowicz

Gdańsk, 21.09.2021

dr hab. inż. Hubert Cieśliński
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Politechnika Gdańska
Budynek C Wydziału Chemicznego pokój 116
hcieclin@pg.edu.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Cieśliński, H. (2020). A Rapid and Simple Method for Screening Microorganisms with a Potential for Catechol Biodegradation. *International Journal of Environmental Research*, 14: 87-92, doi:10.1007/s41742-019-00239-z

Polegał na: przeprowadzaniu z Doktorantką konsultacji dotyczących sposobu prowadzenia eksperymentów oraz analizy uzyskanych wyników. Ponadto dokonywałem popraw redakcyjnych i merytorycznych wstępnej i recenzowanej wersji publikacji oraz uczestniczyłem w przygotowaniu odpowiedzi na komentarze recenzentów i edytora.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 15%

Cieśliński Hubert

Reprinted by permission from University of Teheran, Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer, **International Journal of Environmental Research; Filipowicz, N., Cieśliński, H. (2020)**. A Rapid and Simple Method for Screening Microorganisms with a Potential for Catechol Biodegradation. **14: 87-92, 2020**. doi: 10.1007/s41742-019-00239-z

© University of Teheran, 2021

Title: A Rapid and Simple Method for Screening Microorganisms With a Potential for Catechol Biodegradation

Authors: Natalia Filipowicz^{a*}, Hubert Cieśliński^a

^aDepartment of Molecular Biotechnology and Microbiology, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland

Hubert Cieśliński: hcieslin@pg.edu.pl

*Corresponding author

Natalia Filipowicz

E-mail: filipowicz.natalia@wp.pl

Abstract

Catechol is a highly toxic compound that is also a key intermediate in biodegradation pathways of various aromatic compounds. In this paper, a new screening method for isolation of microorganisms with the potential for catechol biodegradation is reported. The method described is based on the ability of catechol to form a color complex with Fe^{3+} ions. For this purpose, basal medium that is widely used for classification of microorganisms by carbon requirements was used. Specifically, minimal Bushnell Haas medium plates supplemented with catechol at 500 mg l^{-1} concentration were used for both yeast and bacteria cultivation. After appearance of microorganism colonies on the growth medium, each plate was flooded with 7.0 ml of 5% (w/v) of FeCl_3 and incubated for a period of 5 min at room temperature. Flooding with this solution led to the formation of a green color from Fe^{3+} -catechol complexes in the growth medium and an appearance of clear zones around colonies of microorganisms that utilize catechol as a sole source of carbon. Based on this, the presented method could be useful as a screening step for microorganisms with a potential for catechol biodegradation.

Article highlights

- A new screening method for isolation of microorganisms with the potential for catechol biodegradation has been proposed.
- The presented method is based on the ability of catechol to form a color complex of catechol and Fe^{3+} ions and appearance of clear zone around colonies of microorganisms which utilize catechol.
- Described method is simple, not labor-intensive, does not require a long period of time to achieve unmistakable results.
- This method may be also used as a starting point for screening microorganisms with the potential for other aromatic hydrocarbons degradation, in cases when catechol acts like a key intermediate in their biodegradation pathway.

Keywords

Catechol utilizing microorganisms, screening method, catechol- Fe^{3+} complex, clear-zone, Petri-dish assay



Introduction

Aromatic compounds are widely distributed in the environment and are the main cause of water and soil pollution. High concentrations of these compounds are found mostly in industrial effluents, such as from oil refineries and coal conversion plants (Aleksieva et al. 2002).

One of the most important hazardous aromatic compounds, based on its toxicity, is catechol. Catechol is an aromatic hydrocarbon with two hydroxyl residues at the first and second carbon positions, known also as pyrocatechol or 1,2-dihydroxybenzene. Because of the fact that it is widely used (IARC 1999; Schweigert et al. 2001), catechol contaminated wastewaters are generated by chemical, dye, photographic and cosmetic industries. Besides industry, catechol can be used to detect and determine concentration of many metal ions in analytical laboratories (Lee 2016). In comparison with other aromatic hydrocarbons, especially phenol, catechol biodegradation has not been well investigated. This is likely due to the fact that catechol is considered more toxic than phenol (Kumar et al. 2005). Only a few studies have focused on the catechol biodegradation process by various microbes including *Pseudomonas* spp. (Kumar et al. 2005; Mroziak et al. 2007; Tewari and Malviya 2002; Zeyauallah et al. 2009), *Achromobacter xylosoxidans* (Bramhachari et al. 2016), *Aspergillus awamorii* (Stanchev et al. 2008), *Candida parapsilosis* (Rigo et al. 2010), *Sphingomonas subarctica*, *Ralstonia pickettii* and *Comamonas testosteroni* (Di Gioia et al. 2002).

Regarding the biodegradation process, it is crucial to search for microorganisms with high potential to utilize toxic aromatic compounds, both monocyclic, e.g. catechol, and polycyclic aromatic hydrocarbons. These microorganisms may be isolated from areas that are potentially contaminated with these compounds. Microorganism that are able to grow in such harsh conditions may also be able to degrade these toxic compounds in laboratory studies and may further be used to reduce level of toxic compound in soil or groundwater of other polluted sites (Shishir et al. 2019, Farahani et al. 2010).

To the best of our knowledge, a rapid and simple method that could identify microorganisms with the potential of catechol biodegradation is lacking. To date, the isolation of catechol degrading microorganisms is performed using the method dedicated for screening of microorganisms for the ability of aromatic hydrocarbon biodegradation. For this purpose, one of the most commonly used methods is the slant culture method (Middelhoven et al. 1991). Briefly, in this method, microorganisms are inoculated on the slant surface and compounds



being tested reach strains through diffusion or gas phase. Another widely applied method involves isolation of microorganisms directly from soil or water samples with a use of solidified growth medium supplemented with selected aromatic compounds that are the sole carbon source for microorganisms in growth medium (Wang et al. 2012). In another common method, the environmental sample is mixed with liquid medium supplemented with a selected aromatic compound (enrichment step), and then, isolation of microorganisms degrading this compound is conducted using the procedure described above (Kafilzadeh et al. 2010).

Catechol is able to form stable, strong and reversible complexes with metal ions, like Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Zn^{2+} , Ti^{3+} and Ti^{2+} . Moreover, catechol is not only able to form these complexes with soluble metal ions but also with metal oxide surfaces (Meng et al. 2015). In case of interactions with Fe^{3+} , catechol gives green color with ferric salts, for example, FeCl_3 . In the pH range 2–4, mixing Fe^{3+} and catechol results in a formation of an intense green color (Al-Abadleh 2015; Tewari and Malviya 2002).

The ability of catechol to form complexes with Fe^{3+} is also observed in nature. Catechol- Fe^{3+} complexes were detected in the pigment of mushroom, *Cortinarius violaceus*. Interestingly, the color of the pigment changes in a pH-dependent fashion. This occurs due to the change of a cation:ligand ratio. An increase in the pH leads to the typical pigment color changes from green (pH 3, 1:1) to blue–violet (pH 6, 1:2) and finally bordeaux (pH 9, 1:3) (von Nussbaum et al. 1998).

Based on these properties of catechol, the purpose of this study was to develop and test the suitability of a simple method to detect catechol biodegradation by microorganisms, based on formation of a colored complex between catechol and Fe^{3+} in solid growth medium, and an appearance of a clear halo around colonies of microorganisms which utilize catechol as a sole source of carbon.

Materials and Methods

All experiments were carried on Bushnell Haas (BH) plates. It is a minimal medium recommended for microbial examination of fuels and microbial biodegradation of hydrocarbons that are added to this medium as a sole source of carbon (Hemalatha and Veeramanikandan 2011; Jayanthi and Hemashenpagam 2015).

Bushnell Haas plates contained 0.2 g of magnesium sulfate, 0.02 g of calcium chloride, 1.0 g of monopotassium phosphate, 1.0 g of dipotassium phosphate, 1.0 g of ammonium nitrate, 0.05 g of ferric chloride, and 20 g of bacteriological agar per liter.

Method Development

To determine the optimal conditions for the test, the following experiments were performed. Each BH plate was supplemented with catechol at final concentrations of 500 mg l⁻¹, 750 mg l⁻¹, 1000 mg l⁻¹, 1500 mg l⁻¹, or 2000 mg l⁻¹. A stock solution of catechol (10 g l⁻¹) was sterilized by filtration. Each plate, containing a different catechol concentration, was flooded with a FeCl₃ solution. Three FeCl₃ solutions of 1%, 5% and 10% were applied. Each solution was used in a volume of 2.5 ml, 5.0 ml, or 7.0 ml. Plates were incubated with the FeCl₃ solutions for 1, 2, 3, or 5 min. After the specified period of incubation, the FeCl₃ solutions were decanted from plates.

Method Optimization

The results indicated that the optimal conditions for the test were BH plates supplemented with catechol at 500 mg l⁻¹ concentration, plates flooding with 7.0 ml of the 5% FeCl₃ solution and incubation for 5 min. These parameters were selected due to the intensity of the resulting green complex of catechol-Fe³⁺ ions and the fact that catechol is highly toxic, even more than phenol or resorcinol. Moreover, the green color tends to darken during the incubation time to dark green or even a black color. Hence, after 5 min, FeCl₃ solution was removed from plates.

Because of that, for further experiments, a concentration of catechol equal to 500 mg l⁻¹ was selected as a concentration which should not be lethal for microorganisms with an effective biodegradation potential (Kumar et al. 2005).

Method Usability Determination

To determine the usability of the test, microorganisms from soil samples from two locations were isolated. One of them was an area of oil refinery Lotos Gdańsk (Pomeranian Voivodeship, Poland, 54° 20' 43" N 18° 43' 43" E) that may be contaminated with petroleum-derived waste. The second location was peat land located near Bydgoszcz (Kuyavian Pomeranian Voivodeship, Poland, 53° 03' 32" N 17° 54' 17" E). Peat lands are naturally rich in polyphenols and phenol derivatives which are products of lignocellulosic biomass decomposition (Thormann et al. 2007).

Sterile 50 ml conical centrifuge tubes (Sarstedt, AG & Co., Germany) were used to collect samples from depth about 5 cm. All samples were transported immediately after collection to the laboratory, and kept on ice to maintain the temperature around 4–8°C.

For microorganism isolation, 1 g of each soil sample was transferred to a sterile 50 ml conical centrifuge tube and mix vigorously with 9 ml sterile 0.9% saline solution for 10 s (Kim et al. 2008; Soudi and Kolahchi 2011; Wang et al. 2012). After soil sedimentation, 100 µl of each sample was spread with a sterile rod on BH plates supplemented with catechol at 500 mg l⁻¹. For quality assurance, each sample was tested three times. All plates were incubated at 18°C for 2–3 days. After this period, the growth of microorganisms could be seen as colonies on the surface of the plates. Next, plates were flooded with 7.0 ml of 5% FeCl₃ and incubated for 5 min. During this period of time, the growth medium changed from light amber to dark green. After that, the FeCl₃ solution was decanted and plates were analyzed for the presence of microorganism colonies with the ability to degrade catechol, characterized by the presence of a clear halo around each of them.

To ensure quality of the detection process, in cases where colonies grew close to each other with no possibility of precisely determining which colony caused the halo appearance, the presented procedure was modified. After soil sedimentation, 100 µl of each sample was used for preparation of serial dilutions in sterile 0.9% saline solution. Then, 100 µl of 10⁻²–10⁻⁵ dilutions were spread with a sterile rod on BH plates supplemented catechol at 500 mg l⁻¹. The remaining steps of the assay were the same as presented above.

Moreover, to obtain reproducible test results, it is important to use freshly poured Petri dishes with BH medium supplemented with catechol. For this purpose, the catechol solution should be prepared and added to BH medium immediately before pouring Petri plates. The FeCl₃ can

be prepared occasionally, then stored at room temperature in glass bottles, and used as needed. Both catechol and FeCl_3 solutions need to be prepared with freshly sterile deionized water and then sterilized using filter sterilization (0.2 μm diameter, VWR International Sp. z o.o., Poland).

Results and Discussion

The first indicator demonstrating that isolates from both locations should be able to utilize catechol as the sole source of carbon was their growth on minimal medium BH plates supplemented only with catechol. More importantly, when isolates had an ability to degrade catechol, clear zones appeared around their colonies as a consequence of both catechol consumption and a lack of the possibility of catechol- Fe^{3+} complex formation (Fig. 1). Some colonies of microorganisms isolated from both locations were able to grow on plates supplemented with catechol, but no clear zones around them were observed. In these cases, after the second or third streaking on the test medium, no growth was observed, which resulted from the inability of these isolates to utilize catechol for growth. To confirm the microorganisms' ability of biodegradation of catechol, colonies were streaked once a week (three times), the FeCl_3 test was repeated and the clear zones around colonies were examined.

In summary, the proposed method allows for the rapid and simple identification of microorganisms with the potential for catechol degradation. The appearance of the clear zone around a growing colony, due to a lack of catechol in sites where microorganism utilized that compound as a carbon source, gives an unambiguous visual effect. In comparison to previously described, widely used screening methods aimed at detection of microorganisms with the potential for aromatic hydrocarbons biodegradation, the procedure here stands out as having several advantages. First, the possibility of observing both microorganism colony appearance and reduction of catechol from solid media by this colony (clear halo around a colony), allows the unmistakable selection of microorganism that have the ability to degrade catechol. In the cases of the slant culture method or of plates supplemented with appropriate aromatic hydrocarbons, the appearance of colony growth is not necessarily equivalent to compound biodegradation. In both plate and slant methods, colony growth is detected, while a visible effect of biodegradation of certain aromatic compounds is not observed. Moreover, tests based on the growth, or absence of growth, of colonies do not always allow selection of microorganisms exhibiting biodegradation potential. For example, during our previous study, we found that some microorganisms can grow on minimal medium supplemented with the



aromatic compound phenol (Filipowicz et al. 2017). Six yeast strains were identified based on their intensive growth on slants supplemented with phenol, but only three of them exhibited intense growth in liquid medium with simultaneous reduction of phenol concentration, which was confirmed by gas chromatography. This leads to the conclusion that growth of isolates on slants or plates supplemented with the analyzed compound is not sufficient for determining that certain microorganisms performed biodegradation, because some isolates may grow using their storage material. Therefore, the slant method needs the next passage of the isolates on the selective medium to reduce false-positive results. Furthermore, the use of the other method based on the mixing of the environmental sample and broth medium supplemented with a selected aromatic hydrocarbon, the sole source of carbon for microorganisms growth (Kafilzadeh et al. 2010; Wang et al. 2012), there is no possibility of direct selection of specific isolates that are able to biodegrade the selected aromatic compound. These methods are useful mainly to indicate the biodegradation potential of the whole analyzed sample, which contains a mixture of microorganisms. In comparison to those methods, the method proposed here uses chemical properties of catechol to identify microorganisms that are able to use this highly toxic monocyclic aromatic compound as a sole source of carbon. In our opinion, the growth of a microorganism colony on the selective medium using catechol as a sole carbon source, and the visual effect of catechol biodegradation in growth medium, which can be visualized by lack of the presence of dark green color of Fe^{3+} -catechol complex, may minimize the possibility of selecting microorganisms that gave the false-positive results during the screening step. Moreover, after the screening for potential catechol degradation by microorganism, all of the selected strains were cultivated in a liquid medium and their ability to degrade catechol was confirmed by gas chromatography (data not shown).

Additionally, compared with methods based on the use of liquid culture supplemented with catechol, the method presented here allows for direct isolation of microorganisms with biodegradation ability from the analyzed environmental sample. In the case of catechol supplemented liquid culture, there is no possibility of direct selection of specific isolates with the ability to biodegrade catechol, and this method is useful only to indicate the potential of the whole sample to carry out this process (Kafilzadeh et al. 2010; Middelhoven et al. 1991; Wang et al. 2012).

From a technical perspective, the proposed method is not labor-intensive and does not require a long period of time to achieve unmistakable results, whereas these issues are associated with the methods already established.



Moreover, this method could also be valuable for detection of microorganisms with potential for degrading other aromatic hydrocarbons, in cases when catechol acts as a key intermediate in their biodegradation pathway, for example phenol. Catechol plays an important role in the biodegradation pathways of various aromatic hydrocarbons. It is a crucial intermediate in the biodegradation pathways of both substituted (mono or in 1,2-orientation) and non-substituted mono and polyaromatic hydrocarbons (Fig. 2) (Bull and Ballou 1981; Nair et al. 2002). Aerobic biodegradation of aromatic compounds involves their conversion into dihydroxylated intermediates (catechol or its substituted derivatives). For example, in the case of phenol, this step involves phenol hydroxylase (monooxygenase), which initiates the oxygenation whereby the aromatic ring is monohydroxylated by a phenol hydroxylase at a position *ortho* to the phenol hydroxyl group to form catechol. In the next step, catechol as a major ring cleavage intermediate is degraded by catechol-1,2-dioxygenase or catechol-2,3-dioxygenase via the *ortho*- or *meta*-pathways, respectively (Fig. 2). The final products of both pathways are molecules that can enter the tricarboxylic acid cycle (Tsai et al. 2005; Zeyaulah et al. 2009). For this purpose, three psychrotolerant yeast strains, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁, and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, which are able to degrade phenol in liquid cultures at a wide spectrum of concentration (500 mg l⁻¹–1000 mg l⁻¹) (Filipowicz et al. 2017), were tested using the procedure described above. In previous experiments, these three strains were selected according to Middelhoven method (1991). For all three psychrotolerant yeast strains with the confirmed ability to utilize of phenol, the proposed method demonstrated their potential for catechol degradation. Each strain was able to grow on BH plates supplemented with catechol at 500 mg l⁻¹ concentration, and after plates were flooded and incubated with a FeCl₃ solution, the clear zones appeared (Fig. 3). On the other hand, due to the fact that catechol is a common intermediate in biodegradation pathways of many environmental pollutants such as phenol, toluene and benzene (Fig. 2), this method may be also used as a starting point in screening for microorganisms with the biodegradation potential for the above-mentioned and other aromatic compounds.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Compliance with Ethical Standards

- **Conflicts of interest**

On behalf of all authors, the corresponding author states that there are no conflicts of interest.

- **Research involving human participants and/or animals**

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

- **Informed consent**

N/A.

References

- Al-Abadleh HA (2015) Review of the bulk and surface chemistry of iron in atmospherically relevant systems containing humic-like substances. *RSC Adv* 5:45785–45811. <https://doi.org/10.1039/C5RA03132J>
- Aleksieva Z, Ivanova D, Godjevargova T, Atanasov B (2002) Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochem* 37:1215–1219. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00336-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00336-3)
- Bramhachari PV, Reddy DRS, Kotresha D (2016) Biodegradation of catechol by free and immobilized cells of *Achromobacter xylosoxidans* strain 15DKVB isolated from paper and pulp industrial effluents. *Biocatal Agric Biotechnol* 7:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.003>
- Bull C, Ballou DP (1981) Purification and properties of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida*. A new iron to subunit stoichiometry. *J Biol Chem* 256:12673–12680
- Di Gioia D, Barberio C, Spagnesi S, Marchetti L, Fava F (2002) Characterization of four olive-mill-wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds. *Arch Microbiol* 178:208–217. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0445-z>
- Farahani M, Mirbagheri SA, Javid AH, Karbassi AR, Khorasani N, Nouri J (2010) Biodegradation and leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil column. *J Food Agric Environ* 8:870–875. <https://doi.org/10.1234/4.2010.1867>
- Filipowicz N, Momotko M, Boczka G, Pawlikowski T, Wanarska M, Cieśliński H (2017) Isolation and characterization of phenoldegrading psychrotolerant yeasts. *Water Air Soil Pollut* 228:210. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3391-8>
- Hemalatha S, VeeraManikandan P (2011) Characterization of aromatic hydrocarbon rading bacteria from petroleum contaminated sites. *J Environ Prot* 2:243–254. <https://doi.org/10.4236/jep.2011.23028>
- IARC (1999) Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. IARC monographs on the evaluation of cancerogenic risk to humans. 71:433–435

- Jayanthi R, Hemashenpagam N (2015) Optimization of BH medium for efficient biodegradation of benzene, toluene and xylene by a *Bacillus cereus*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 4:807–881
- Kafilzadeh F, Farhangdoost M-S, Tahery Y (2010) Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. *Afr J Biotechnol* 9:6721–6726. <https://doi.org/10.5897/AJB10.665>
- Kim JM, Le NT, Chung BS, Park JH, Bae J-W, Madsen EL, Jeon CO (2008) Influence of soil components on the biodegradation of benzene, toluene, and o-, m-, and p-xylenes by the newly isolated bacterium *Pseudomonas spadix* BD-a59. *AEM* 74:7313–7320
- Kumar A, Kumar S, Kumar S (2005) Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem Eng J* 22:151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.006>
- Lee BP (2016) Mussel adhesive-inspired polymers. In: Bruns N, Kilbinger AFM (eds) *Bio-inspired polymers*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 322–353. <https://doi.org/10.1039/9781782626664-00322>
- Meng H, Liu Y, Cencer MM, Lee BP (2015) Adhesives and coatings inspired by mussel adhesive proteins. In: Bianco-Peled H, Davidovich-Pinhas M (eds) *Bioadhesion and biomimetics*. Pan Stanford, Singapore, pp 131–166
- Middelhoven WJ, de Jong IM, de Winter M (1991) *Arxula adenivorans*, a yeast assimilating many nitrogenous and aromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* 59:129–137. <https://doi.org/10.1007/BF00445657>
- Mrozik A, Piotrowska-Seget Z, Labuzek S (2007) FAME profiles in *Pseudomonas vesicularis* during catechol and phenol degradation in the presence of glucose as an additional carbon source. *Pol J Microbiol* 56:157–164
- Nair C, Jayachandran K, Shashidhar S (2002) Biodegradation of phenol. *Afr J Biotechnol* 7:4951–4958. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00176.x>
- Rigo M, Alegre RM, Bezerra JRMV et al (2010) Catechol biodegradation kinetics using *Candida parapsilopsis*. *Braz Arch Biol Technol* 53:481–486. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000200029>

- Schweigert N, Zehnder AJB, Eggen RIL (2001) Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. Minireview. *Environ Microbiol* 3:81–91. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00176.x>
- Shishir TA, Mahbub N, Kamal NE (2019) Review on bioremediation: a tool to resurrect the polluted rivers. *Pollution* 5:555–568. <https://doi.org/10.22059/poll.2019.272339.558>
- Soudi MR, Kolahchi N (2011) Bioremediation potential of phenol degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* SKO-1. *Prog Biol Sci* 1:31–70. <https://doi.org/10.22059/PBS.2011.22457>
- Stanchev V, Stoilova I, Krastanov A (2008) Biodegradation dynamics of high catechol concentrations by *Aspergillus awamori*. *J Hazard Mater* 154:396–402. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.038>
- Tewari L, Malviya P (2002) Biodegradation of catechol by fluorescent *Pseudomonas* for sustainable environment. *J Sci Ind Res India* 61:70–74
- Thormann MN, Rice AV, Beilman DW (2007) Yeasts in peatlands: a review of richness and roles in peat decomposition. *Wetlands* 27:761–773. [https://doi.org/10.1672/0277-5212\(2007\)27%5b761:YIPAR O%5d2.0.CO](https://doi.org/10.1672/0277-5212(2007)27%5b761:YIPAR O%5d2.0.CO)
- Tsai S-C, Tsai L-D, Li Y-K (2005) An isolated *Candida albicans* TL3 capable of degrading phenol at large concentration. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:2358–2367. <https://doi.org/10.1271/ bbb.69.2358>
- von Nussbaum F, Spiteller P, R uth M, Steglich W, Wanner G, Gamblin B et al (1998) An iron(III)-catechol complex as a mushroom pigment. *Angew Chemie Int Ed* 37:3292–3295. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19981217\)37:23%3c3292:AIDANIE3292%3e3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19981217)37:23%3c3292:AIDANIE3292%3e3.0.CO;2-N)
- Wang J, Ma X, Liu S, Sun P, Fan P, Xia C (2012) Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by *Candida tropicalis* W1. *Proc Environ Sci* 16:299–303. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.042>

Zeyaulah M, Ahmad R, Naseem A, Islam B, Hasan HMI, Abdelkafe AS et al (2009)

Catechol biodegradation by *Pseudomonas* strain: a critical analysis. Int J Chem Sci

7:2211–2221

Figures

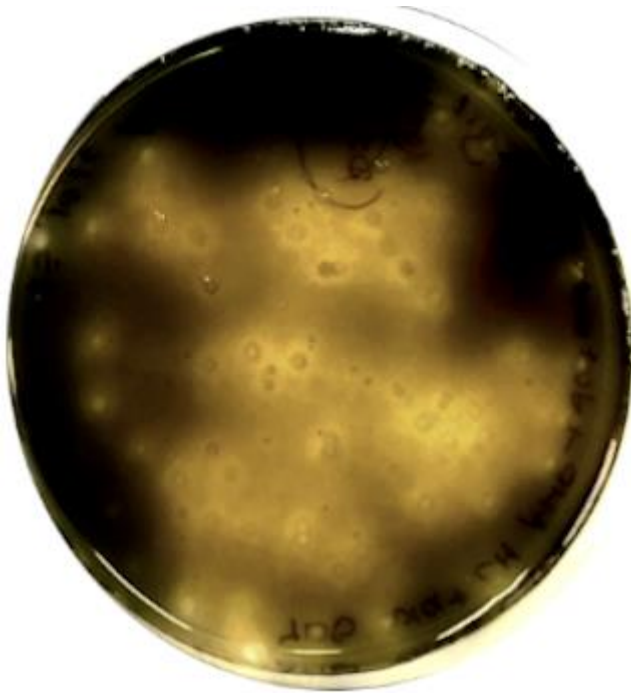


Fig. 1 Growth of isolates from a sample of soil from peat land located near Bydgoszcz, Poland (53°03'32"N 17°54'17"E) on BH plate supplemented with catechol at 500 mg l⁻¹, after plate was flooded with a 5% FeCl₃ solution. Clear halos indicate the growth of isolates with the ability to utilize catechol as a sole source of carbon

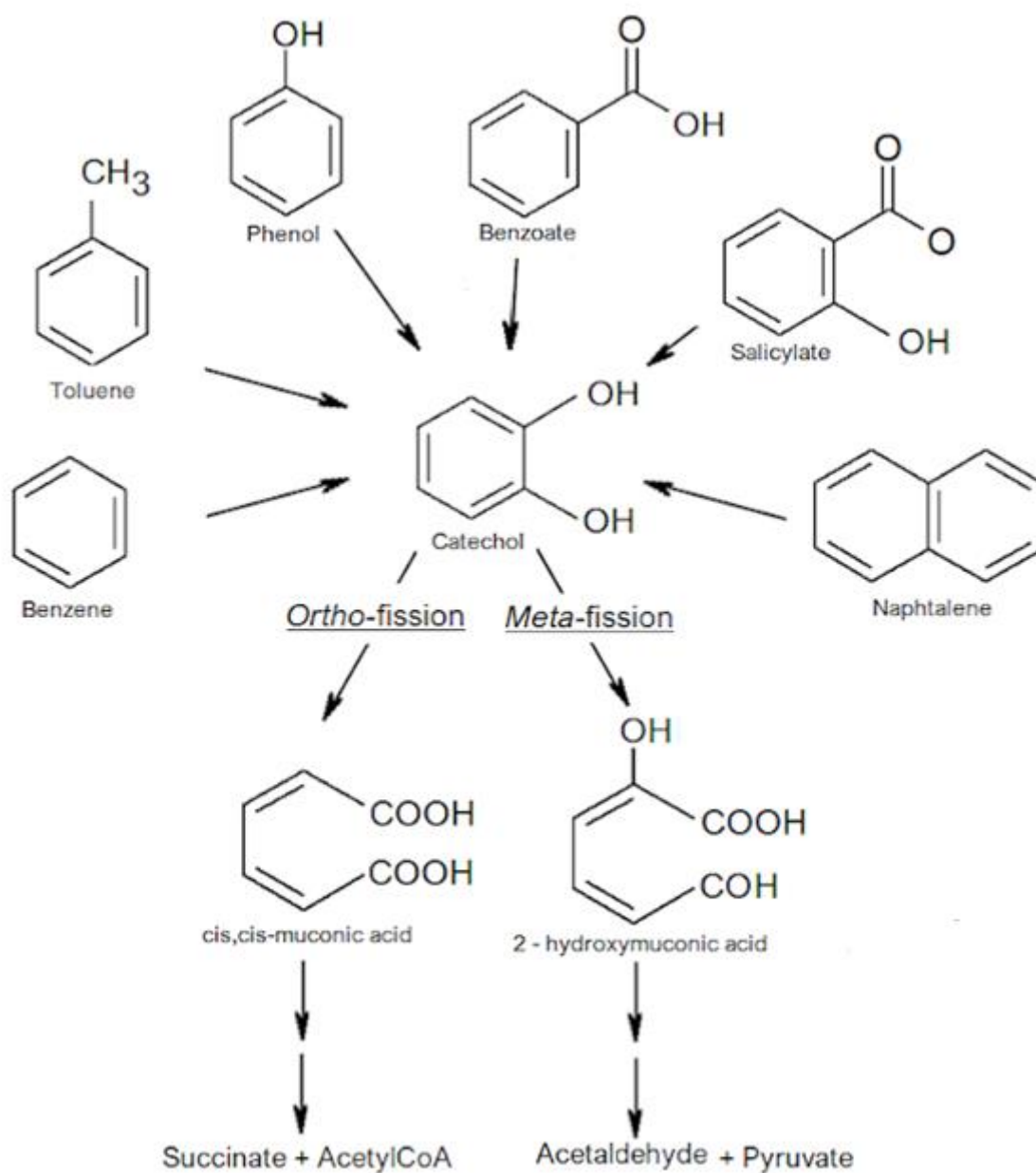


Fig. 2 Examples of aromatic compounds, e.g. benzene, toluene, naphthalene, benzoate, salicylate and phenol, biodegraded by microorganisms with catechol as the main intermediate of *ortho*- and *meta*- biodegradation pathways

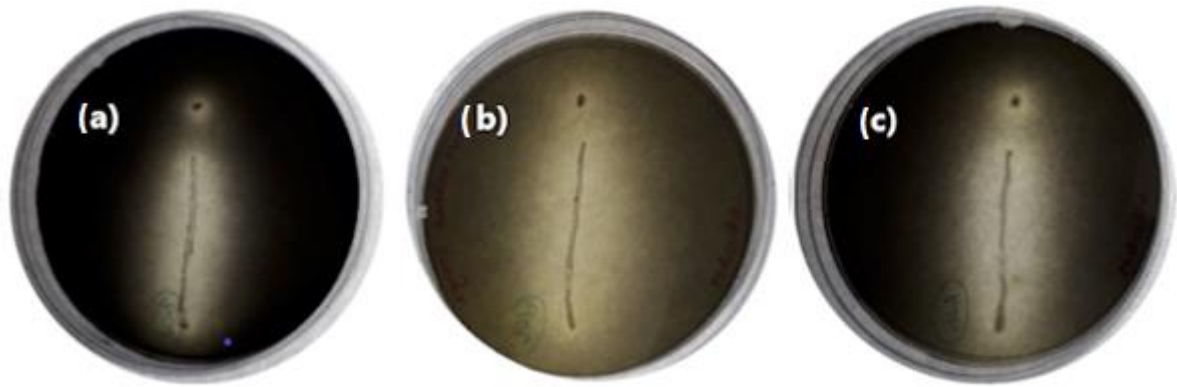


Fig. 3 Growth of phenol degrading yeast strains (single colony and line streak) isolated from Rucianka peatland **a** *Candida oregonensis* B02₁, **b** *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂ and **c** *Candida subhashii* A01₁ on BH plates supplemented with catechol at 500 mg l⁻¹, after plate was flooded with 5% FeCl₃ solution. The appearance of clear halos around growing yeast strains indicates that they also utilize catechol (intermediate of phenol biodegradation) as a sole source carbon

PUBLIKACJA NR 3 – DANE (ZAŁĄCZNIK 3)

Filipowicz, N., Momotko, M., Boczka, G., Cieśliński, H. (2020). Determination of phenol biodegradation pathways in three psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, isolated from Rucianka peatland. *Enzyme and Microbial Technology*, 141: 109663; doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109663

Gdańsk, 21.09.2021

Mgr inż. Natalia Filipowicz
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Politechnika Gdańska
Budynek C Wydziału Chemicznego pokój 101
filipowicz.natalia@wp.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Cieśliński, H. (2020). Determination of phenol biodegradation pathways in three psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, isolated from Rucianka peatland. *Enzyme and Microbial Technology*, 141: 109663, doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109663

Polegał na: analizie dostępnej literatury i opracowaniu metodologii badań, na zaplanowaniu i wykonywaniu eksperymentów oraz na analizie i interpretacji uzyskanych wyników. Przygotowałam również zarówno wstępną, jak i finalną wersję publikacji oraz pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 70%

Filipowicz

Gdańsk, 21.09.2021

Mgr inż. Malwina Momotko
Katedra Inżynierii Procesowej i Technologii Chemicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
malmomot@student.pg.edu.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Cieśliński, H. (2020). Determination of phenol biodegradation pathways in three psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁, and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, isolated from Rucianka peatland. *Enzyme and Microbial Technology*, 141: 109663, doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109663

Polegał na udziale w doborze warunków oraz przeprowadzeniu analiz chromatograficznych badanych próbek.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 10%

Momotko

Gdańsk, 21.09.2021

dr hab. inż. Grzegorz Boczkaj
Katedra Inżynierii Procesowej i Technologii Chemicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
grzegorz.boczkaj@pg.edu.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Mamatko, M., Boczkaj, G., Cieśliński, H. (2020). Determination of phenol biodegradation pathways in three psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ and *Schizoblastosporium starkeyi-henricii* L01₂, isolated from Rucińska peatland. *Enzyme and Microbial Technology*, 141: 109663, doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109663

Polegał na udziale w doborze warunków i przeprowadzeniu analiz chromatograficznych badanych próbek.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 10%



Gdańsk, 21.09.2021

dr hab. inż. Hubert Cieśliński
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
Politechnika Gdańska
Bucynek C Wydziału Chemicznego pokój 116
hcieślin@pg.edu.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład autorski w publikację: Filipowicz, N., Mornatko, M., Boczka, G., Cieśliński, H. (2020). Determination of phenol biodegradation pathways in three psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A01, *Candida oregonensis* B02, and *Schizoblastosporion starkeyi-henicijii* L01, isolated from Rucianka peatland. *Enzyme and Microbial Technology*, 141: 109663, doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109663

Polegał na: przeprowadzaniu z Doktorantką konsultacji dotyczących sposobu prowadzenia eksperymentów oraz analizy uzyskanych wyników. Ponadto dokonywałem popraw merytorycznych i redakcyjnych wstępnej i recenzowanej wersji publikacji oraz uczestniczyłem w redagowaniu odpowiedzi na komentarze recenzentów i edytora.

Procentowy wkład autorski w publikację wynosił: 10%

Cieśliński Hubert

Reprinted by permission from Elsevier: **Enzyme and Microbial Technology**; Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Cieśliński, H. (2020). Determination of phenol biodegradation pathways in three psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, isolated from Rucianka peatland. *Enzyme and Microbial Technology*, **141**: 109663. doi: 10.1016/j.enzymtec.2020.109663

© Elsevier. License: CC-BY-NC-ND, 2021

Title: Determination of phenol biodegradation pathways in three psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A01₁, *Candida oregonensis* B02₁ and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, isolated from Rucianka peatland

Authors: Natalia Filipowicz^{a*}, Malwina Momotko^b, Grzegorz Boczkaj^b, Hubert Cieśliński^a

^aDepartment of Molecular Biotechnology and Microbiology, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland

^bDepartment of Process Engineering and Chemical Technology, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland

Malwina Momotko: malwina.momotko@wp.pl

Grzegorz Boczkaj: grzegorz.boczkaj@pg.edu.pl

Hubert Cieśliński: hcieslin@pg.edu.pl

*Corresponding author

Natalia Filipowicz

E-mail: filipowicz.natalia@wp.pl

ABSTRACT

In this study, three psychrotolerant phenol-degrading yeast strains *Candida subhashii* (strain A01₁), *Candida oregonensis* (strain B02₁) and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* (strain L01₂) isolated from Rucianka peatland were examined to determine which alternative metabolic pathway for phenol biodegradation is used by these microorganisms. All yeast strains were cultivated in minimal salt medium supplemented with phenol at 500, 750 and 1000 mg l⁻¹ concentration with two ways of conducting phenol biodegradation experiments: with and without the starving step of yeast cells. For studied yeast strains, no catechol 2,3-dioxygenase activities were detected by enzymatic assay and no products of catechol *meta*-cleavage in yeast cultures supernatants (GC–MS analysis), were detected. The detection of catechol 1,2-dioxygenase activity and the presence of *cis,cis*-muconic acid in the analyzed samples revealed that all studied psychrotolerant yeast strains were able to metabolize phenol via the *ortho*-cleavage pathway. Therefore, they may be tested in terms of their use to develop biotechnology for the production of *cis,cis*-muconic acid, a substrate used in the production of plastics (PET) and other valuable goods

Keywords

catechol 1,2- and 2,3-dioxygenases activity assays; *ortho*-cleavage pathway, *cis,cis*-muconic acid, gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), enzymatic assay, phenol biodegradation by psychrotolerant peatland yeasts

1. Introduction

Phenol and phenolic compounds are widely used in industry for production of e.g. polymeric resin, oil refining and various cosmetic and medical products [1]. Moreover, these compounds are the main by-products formed during certain industrial processes [2,3], and are detected mostly in plants and industrial effluents, for example from coal conversion – as well as refinery and pharmaceutical industries [4]. Other than many known physical and chemical methods for phenols removal, biological methods play an important role in wastewater and soil treatment. In respect to chemical methods, Advanced Oxidation Processes (AOPs) are widely used for degradation of phenol and its derivatives [5–7]. In comparison with physical and chemical methods, biological methods possess advantageous attributes due to their relatively low processing costs and minimization of secondary pollutant formation [8–10]. Therefore, aerobic biodegradation of phenol has been the subject of numerous investigations [11].

Aerobic biodegradation of phenolic compounds is accomplished via pathways, where catechol or its derivatives play a key role. These intermediates are then further metabolized by intradiol or extradiol dioxygenases [12].

In the case of phenol, the first step of biodegradation involves the transformation of phenol into catechol via phenol hydroxylases, which involves the attachment of a hydroxyl group at the *ortho*-position of an aromatic ring [13]. Catechol is further degraded via *ortho*- or *meta*-cleavage by 1,2-catechol dioxygenases or 2,3-catechol dioxygenases, respectively (Fig. 1). These enzymes add two oxygen atoms to the aromatic ring of catechol, followed by a cleavage of chemical bonds and an opening of the aromatic ring [14].

Catechol 1,2-dioxygenase (C12O) (EC 1.13.11.1) contains Fe^{3+} as a prosthetic group and belongs to the enzymes that enable cleavage of catechol as intradiol (*ortho*-cleavage),



producing *cis,cis*-muconic acid [15]. In the case of catechol 2,3-dioxygenase (C23O) (EC 1.13.11.2), it contains Fe^{2+} as a prosthetic group or the use of other two-valent metal ions to cleave the aromatic ring of catechol as extradiol (*meta*-cleavage). This leads to the production of 2-hydroxymuconic semialdehyde. During the next steps of the degradation process, these products of ring cleavage are converted to aliphatic compounds which can enter the tricarboxylic acid cycle [15,16].

Over the last decades, catechol 1,2-dioxygenases and catechol 2,3-dioxygenases have been extensively studied due to their key role in the cleavage of catechol's aromatic ring. Catechol 1,2-dioxygenases play an important role in the degradation pathways of various aromatic compounds and are ubiquitous in microorganisms [17,18]. Furthermore, they are active in some bacterial strains belonging to genus *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Geobacillus* and *Rhodococcus* [19–22]. In the case of yeasts, the activity of these dioxygenases was found, among others, in *Candida tropicalis* [23,24], *Candida albicans* [15] and *Trichosporon cutaneum* [25]. In the light of current research, it is worth noting that Margesin et al. [26,27] isolated and characterized cold-adapted phenol degrading yeasts with C12O enzymatic activity from Alpine glacier cryoconite and petroleum hydrocarbon contained alpine soils in Austria, respectively.

For comparison, catechol 2,3-dioxygenases activity was detected in bacteria from genus *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Rhodococcus* and *Bacillus* [28-35]. However, so far, among yeasts, the activity of catechol 2,3-dioxygenase is very rarely detected. Interestingly, C23Os activity was confirmed in cold-adapted yeast strain belonging to *Rhodotorula* sp. [26] isolated from Alpine glacier cryoconite.

Summarizing, the literature study indicates that studies on phenol metabolism have been mainly conducted for bacteria. Hence, the information regarding studying enzymatic activities



of catechol 1,2- and 2,3-dioxygenases enzymes involved in phenol metabolism and the investigation of their products among yeast strains is rather limited. On the other hand, despite the limited number of studies, we found two different approaches to investigate the activity of these enzymes among yeast strains. The first approach is focused on the examination of enzymatic activities of pure native or recombinant yeast catechol dioxygenases [23,24]. Second approach is focused on determining which of possible catechol dioxygenases activities is present in examined yeast strains. However, in the second approach, the enzymatic activity of specific enzymes or the concentration of the biodegradation products of were not examined [26,27].

In this research, we decided to combine these two approaches. Firstly, we determined which of the above mentioned enzymatic activities is present in the tested yeast strains, which allowed us to point out which of the phenol metabolism pathways is used by them. We also decided to determine the presence of products of catechol 1,2- and 2,3-dioxygenases enzymatic activity in yeast cultures, i.e. *cis,cis*-muconic acid and 2-hydroxymuconic semialdehyde, respectively.

Currently, *cis,cis*-muconic acid is one of the possible industrial substrates for the production of terephthalic acid - monomer of the high-demand plastic polymer polyethylene terephthalate (PET). Moreover, this compound may be also used for the production of adipic acid, which is a well-known precursor for the production of nylon, lubricants, coatings, plastics, and plasticizers. Nowadays, *cis,cis*-muconic acid production is based on the two-stage chemical synthesis process which requires a high input of energy and leads to the production of large amounts of greenhouse gas N₂O. Compared with the chemical production of *cis,cis*-muconic acid from catechol, biotechnological processes show the advantages of high productivity and selectivity, with a final yield of 100% in comparison to less than 35% and low purity obtained with the chemical cleavage of catechol [40].



Therefore, recently there is a growing interest in developing microbial technology to synthesize *cis,cis*-muconic acid as an alternative for currently used technology for its synthesis. For this purpose, the possibility of using genetically modified microorganisms e.g. *Pseudomonas putida* and *Corynebacterium glutamicum* utilizing such carbon sources as catechol [41,55] and toluene [42] and *Escherichia coli* [43] and *Saccharomyces cerevisiae* utilizing glucose as a carbon source [44,45] has been investigated. More importantly, genetically modified *Pseudomonas putida* or *Corynebacterium glutamicum* strains which produce *cis,cis*-muconic acid from aromatics compounds offer the use of lignin hydrolysates as starting material [41,55]. Lignin (the second most abundant polymer in nature) can be processed into the mixtures of small aromatics compounds, such as e.g. phenol and catechol, through biological and thermochemical depolymerization, respectively [41,55].

In summary, the presence of C12Os and C23Os activities in cold-adapted yeast strains [26,27] and the biotechnological potential of microorganisms metabolizing catechol via *ortho*-cleavage pathway for their future developing in the plastic industry, encouraged us to conduct the presented study on cold-adapted yeasts strains isolated from Rucianka peatland. These yeast strains were characterized as microorganisms which enable the effective utilization of phenol [36] and catechol [46] as a sole source of carbon. Therefore, the main purpose of this study was the identification of catechol dioxygenases activities (C12Os or C23Os activity) and the products of the enzymatic reaction of catechol ring cleavage (Fig. 1) catalyzed by them (*cis,cis*-muconic acid and 2-hydroxymuconic semialdehyde, respectively) and hence, which metabolic pathway (*ortho*-cleavage or *meta*-cleavage pathway) is involved in phenol biodegradation by *Candida subhashii* strain A01₁, *Candida oregonensis* strain B02₁ and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* strain L01₂.

Moreover, according to the literature, during the biodegradation experiments examined microorganisms are preincubated in basal medium without any carbon source (starving step)



and then used as an inoculum of a culture medium with phenol as the sole source of carbon [28,37]. However, in analogous studies, the starving step is not involved as a part of phenol biodegradation experiments [38,39]. Therefore, this study also includes a comparison of the different preparation types of yeast cells inoculum and evaluation of their possible impact on catechol dioxygenases activities in the examined yeast strains.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

The phenol degrading psychrotolerant yeast strains, including *Candida subhashii* (strain A01₁), *Candida oregonensis* (strain B02₁) and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* (strain L01₂), were examined during this study and isolated from water and soil samples collected from Rucianka peatland. All strains were characterized in our previous publication, see ref. [36]. A01₁ and L01₂ strains were able to degrade phenol as a sole source of carbon at 500, 750 and 1000 mg l⁻¹ in culture medium. B02₁ strain was able to degrade phenol also at 500 and 750 mg l⁻¹ but not at 1000 mg l⁻¹.

2.2. Culture growth conditions

2.2.1. Culture growth of yeast strains without the starving step

In this type of cultivation, the first step of an experiment involved the preparation of inoculum for each analyzed yeast strains. This was achieved by the inoculation of 3 ml of YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) medium with the single colony of the examined yeast strain. In this study, YPD contained (per liter): glucose 20 g, yeast extract 10 g and casein peptone 20 g, and was also supplemented with 1 mL (per liter) of each antibiotic: chloramphenicol (stock solution: 34 mg ml⁻¹) and ampicillin (stock solution: 100 mg ml⁻¹). The addition of antibiotics



was aimed at inhibiting bacterial growth caused by an accidental contamination of YPD medium.

Then, test tubes were incubated at 18 °C on the rotary shaker at 170 rpm for 1 day. After this period, 80 µl of each yeast culture was transferred to 20 mL of sterile YPD medium in 200 mL Erlenmeyer flasks. The flasks were incubated at 18 °C on the rotary shaker at 170 rpm for 3 days. Next, these cultivated yeast cells were used as an inoculum. In all experiments 5% of subculture was inoculated into sterile 80 mL of mineral salt medium (MSM) in 500 mL Erlenmeyer flasks, supplemented with phenol (Sigma Aldrich, USA) at a concentration of 500 mg l⁻¹, 750 mg l⁻¹, and 1000 mg l⁻¹, respectively. Mineral salt medium contained (per liter); 0.4 g of (NH₄)₂SO₄, 0.4 g of K₂HPO₄, 0.2 g of KH₂PO₄, 0.1 g of NaCl, 0.1 g of MgSO₄, 0.01 g of MnSO₄·H₂O, 0.01 g of Fe₂(SO₄)₃·nH₂O, (all purchased from POCH S.A., Poland) 0.01 g of Na₂MoO₄·2H₂O (Todini Europe Sp. z o.o., Kraków, Poland), and 0.25 g of casein peptone (BTL Sp. z o.o., Łódź, Poland), supplemented with 1 mL (per liter) of each antibiotics: chloramphenicol (stock solution: 34 mg ml⁻¹) and ampicillin (stock solution: 100 mg ml⁻¹). The pH of the medium was adjusted to 6.0.

All yeast strains were cultivated until yeast cultures obtained the stationary phase of growth.

2.2.2. Culture growth of yeast strains with starving step

In this type of cultivation, an inoculum of each yeast strain was prepared by cultivation of microorganisms in Yeast Nitrogen base without an amino acid medium (Sigma Aldrich, USA) which was not supplemented with any source of carbon. YNB w/a contained (per liter): 6.7 g of YNB w/a base, supplemented with 1 mL (per liter) of each antibiotic: chloramphenicol (stock solution: 34 mg ml⁻¹) and ampicillin (stock solution: 100 mg ml⁻¹).

For the inoculum preparation, 4 mL of YNB w/a medium was inoculated with a single colony of each analyzed yeast strain. Then, test tubes with all examined yeast strains were incubated



at 18 °C on a rotary shaker at 170 rpm for 4 days. Next, the cultivated yeast cells were used as an inoculum. In all the experiments 5% of subculture was inoculated into sterile 80 mL of mineral salt medium in 500 mL Erlenmeyer flasks, supplemented with phenol at a concentration of 500, 750, and 1000 mg l⁻¹, respectively.

All yeast strains were cultivated until yeast cultures obtained the stationary phase of growth.

To avoid repeating the “initial phenol concentration in culture medium” term, abbreviations ipc 500, ipc 750 and ipc 1000 (for 500, 750 and 1000 mg l⁻¹ initial phenol concentration, respectively) were employed throughout the manuscript.

2.3. Preliminary screening of catechol dioxygenases activities in phenol degrading yeast cultures

To determine the presence of catechol 1,2- or 2,3-dioxygenases activities, respectively, the analyzed yeast cultures were tested using 96-well plates (qualitative assay). Catechol 1,2-dioxygenase activity was tested according to Neidle and Ornston [48] and Birger et al. [49]. The first step of examination involved the preparation of a solution containing 0.004% phenol red (Sigma Aldrich, USA), 1 mM EDTA (POCH S.A., Poland) and 10 mM catechol (Sigma Aldrich, USA) (pH = 7.5, adjusted with ammonium hydroxide). To 150 µl of this solution, 50 µl of the liquid yeast culture of each phenol-degrading yeasts (OD₆₀₀ was adjusted to 1) was added. The color of the analyzed samples changed from red to yellow/orange occurred within 10 min when placed in the dark at room temperature, which was due to the presence of catechol 1,2-dioxygenase.

Catechol 2,3-dioxygenase activity was determined as described by Morgan et al. [50] and Birger et al. [49]. 150 µL of solution containing 90 mM catechol in 50 mM tris-acetate buffer (pH 7.5) was added to 50 µl of the liquid culture of each yeast strains (OD₆₀₀ was adjusted to 1). The formation of a green-brownish color occurred within 2 h in the analyzed samples

when placed in the dark at room temperature, which was associated with catechol 2,3-dioxygenase activity. Reagents for tris-acetate preparation were purchased from POCH S.A., Poland.

2.4. Preparation of crude enzyme extracts

Crude enzyme extracts were obtained by yeast cells disruption with glass beads and then removal of cell debris. Cells of each yeast strain were cultivated in the conditions presented above, respectively, until the yeast strains obtained the stationary phase of cultures growth. Then, the yeast cultures were harvested and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. Subsequently, the cell pellets were suspended in sterile deionized water and centrifuged at conditions presented above. The “cells washing” step was repeated twice. Then, the cell pellets were suspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer and disrupted with glass beads with 425-600 μm diameter (Sigma Aldrich, USA). Disruption was performed ten times: 30 s incubation on ice and 30 s of vortexing of each analyzed sample. Next, the cell debris was removed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. The cleared crude enzyme extracts were used for the enzymatic assays, total protein concentration assay and GC-MS analysis. Reagents for Tris-HCl preparation were purchased from POCH S.A., Poland.

2.5. Enzymatic assays

Enzyme activities for catechol 1,2-dioxygenases (C12Os) and catechol 2,3-dioxygenases (C23Os) were determined for both, yeast cultures and crude enzyme extracts, respectively.

C12Os and C23Os activities were determined according to the methods described in ref. [27,51,52] with some modifications. 100 μL of crude enzyme extracts or yeast cultures were mixed with 750 μL of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 50 μL of 4 mM catechol. The activity of C12Os was determined by increasing the absorbance values at 260 nm using a



spectrophotometer due to the cleavage of catechol into *cis,cis*-muconic acid. In the case of C23Os, the activity was determined by increasing the absorbance values at 375 nm due to the conversion of catechol into 2-hydroxymuconic semialdehyde (2-HMS). The formation of *cis,cis*-muconic acid or 2-HMS was monitored for 5 min. Control reactions without yeast cultures or crude enzyme extracts, respectively, were performed for each assay.

For crude enzyme extracts, total protein concentration was determined using the Bradford assay [53].

One unit (U) of C12Os or C23Os activity was defined as the amount of enzyme that generates 1 μmol of specific product, respectively, per min under the assay conditions. Specific activities were expressed as units each enzymatic activity (U) per mg of total cell proteins.

2.6. Detection of phenol degradation intermediates by GC-MS technique

2.6.1. Extraction and derivatization of phenol biodegradation intermediates

Derivatization and detection of phenol degradation intermediates were performed for crude cell extracts and supernatants of yeast cultures. Crude cell extracts after derivatization were labeled as “derivatized cell extracts”.

After 24, 48 and 96 h of yeast cultures growth without the starving step and after 24, 48, 96 and 168 h of cultures growth with this step, all yeast cultures were centrifuged at 12,000 rpm for 10 min, and supernatants collected. In the case of using crude cell extracts, after the cultures were centrifuged, cell pellets were suspended in 10 mL of MSM medium and disrupted with glass beads. The same procedure as described in section 2.4. was used for this purpose.

Next, 10 mL of each supernatant or crude cell extract was acidified to pH 2–3 with 6 M HCl and extracted with 10 mL ethyl acetate (POCH S.A., Poland). Next, each of the collected



ethyl acetate phases were dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated using a rotary evaporator to a volume of 1 mL. Derivatization was performed at 60 °C for 30 min using 0.1 mL N,O-bis(trimethylsilyl) acetamide [54]. 25 µL of 4-chlorophenol (Sigma Aldrich, Poland) internal standard solution was added to each sample before derivatization (IS, final concentration: 0.006 mg/mg H₂O).

2.6.2. *Detection of phenol degradation intermediates by gas chromatography - GC-MS analysis*

To confirm the presence of phenol biodegradation intermediates and measure their concentration, derivatized cell extracts or derivatized supernatants of each yeast culture were analyzed by GC-MS technique. 1 mL of each sample after derivatization was placed in a 2 mL glass vial (SHIM-POL A. M. Borzymowski, Poland). Samples were analyzed using a QP2010 GC-MS SE gas chromatograph-mass spectrometer (Shimadzu, Japan) equipped with a combi-PAL AOC 5000 autosampler (Shimadzu, Japan) and DB-624ms capillary column (60 m x 0.25 mm x 1.40 µm) (Restek, USA).

Chromatographic conditions:

Temperature program: 50 °C (5 min) – ramped at 5 °C/min to 250 °C (5 min); injection port temperature 300 °C; purge off time 2 min (split-less mode); 1 µL of the extract was injected into the GC system; detector temperature 280 °C; ion source temperature (EI, 70 eV) 220 °C; GC-MS transfer line temperature 280 °C; the carrier gas was hydrogen (1 mL/min). The mass spectrometer was operated in single ion monitoring mode (SIM). Quantitative analysis: internal standard method.

Phenol, catechol and *cis,cis*-muconic acid in the derivatized samples obtained from yeast culture supernatants and cell extracts were identified by GC-MS technique on the basis of



retention time values and characteristic ratio of fragmentation ions (mass to charge ratio values, m/z) determined for each compound during the method development stage using analytical standards. The concept of additional identification in SIM mode based on calculated ratio of multiple m/z value specific to each analyte was described in our previous paper [3]. The GC-MS spectrum of main derivatized products of phenol degradation has been presented on Fig. 2.

3. Result and discussion

3.1. Preliminary screening of catechol dioxygenases activities in cultures of phenol degrading yeast strains

C12Os activity was detected in cultures of all analyzed yeast strains, independently of the initial phenol concentration in the culture medium and the presence or absence of starving step during phenol biodegradation experiments. A yellow or orange color appeared in all wells (96-well plates), which contained the samples of phenol-degrading yeast cultures mixed with the reaction solution. Hence, all analyzed yeast strains were probably able to utilize phenol via *ortho*-cleavage pathway.

However, C23Os activity was not detected in the cultures of any examined yeast strains, under the same experimental conditions as C12Os, as shown above. The examined yeast strains displayed no change in the reaction mixtures color in the wells of 96-well plates during the preliminary screening. Furthermore, these yeast strains were probably not capable of utilizing phenol via *meta*-cleavage pathway.

3.2. Enzymatic assays

In general, for yeast cultures, independently of initial phenol concentration in medium or the presence or absence of starving step during phenol biodegradation experiments, no activity of



catechol 2,3-dioxygenases was detected (data not shown). In the case of the second examined enzyme, all analyzed yeast cultures exhibited low catechol 1,2-dioxygenase activities (Table 1 and Table 3). However, according to Tsai et al. [15], enzymes involved in phenol degradation should be not secret to the culture medium but remain inside of the yeast cells. Hence, the same assays for both enzymes were conducted for crude enzyme extracts of analyzed yeast strains (Table 2 and Table 4). The comparison of the total 1,2-dioxygenase activity value for each strain of yeast (Table 1 with Table 2 and Table 3 with Table 4, respectively) confirmed the conclusions presented by Tsai et al. [15].

In the case of crude enzyme extracts obtained after experiments without the starving step, higher specific activities of catechol 1,2-dioxygenases were observed for two yeast strains as well as increased phenol concentration (Table 2). This was observed for strain *Candida subhashii* A01₁ and *Candida oregonensis* B02₁ in which the highest activities were for 1000 mg l⁻¹ and 750 mg l⁻¹ initial phenol concentration and reached almost 0.25 U mg⁻¹ and 2.17 U mg⁻¹, respectively. In the case of strain *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L01₂, the highest specific enzyme activity (0.16 U mg⁻¹) was observed for ipc 750, however, the subject ipc 500 and ipc 1000 obtained enzymatic activities were comparable but much lower than for ipc 750 (Table 2). Among all examined yeast strains and different initial phenol concentration in the culture medium, the highest C12O enzyme activity was detected for strain B02₁ and phenol at 750 mg l⁻¹ concentration – 2.17 U mg⁻¹.

For experiments including the starving step, no clear correlation between increasing initial phenol concentrations in the culture medium and higher specific enzymatic activities of C12Os was determined (Table 4). All yeast strains performed at the highest enzymatic activity for specific concentration – A01₁ for ipc 1000, both B02₁ and L01₂ for ipc 750.



Unfortunately, at this point it was impossible to unambiguously determine the exact way that yeast cultures cultivation promoted higher enzymatic activity or to point out the one common pattern according to which yeasts' enzymatic activity changed during the cultivation with different conditions and initial phenol concentration. Other conclusions determined for the analysis were: *i*) in the case of inoculums prepared without the starving step, almost always, other than one yeast strains – L01₂, increasing initial phenol concentration was associated with increasing specific activity values of C12Os; *ii*) for strain A01₁ in the case of ipc 500 and 1000, specific C12O activities of crude enzyme extracts obtained for this strain cultivated with the starving step were at least twice as high than those cultivated without this step; *iii*) the highest activity among all variants of yeast cultivation were observed for strain B02₁ cultivated without the starving step and ipc 750; *iv*) for strain B02₁, catechol 1,2-dioxygenase activity was almost 100 times higher for its cultivation without the starving step.

As it was mentioned in the Introduction section, because of the limited number of studies dedicated for characterization of yeast catechol dioxygenases [15,23-27] the comparison of our results with previously published research results offers a limited possibility for a discussion. Nevertheless, we decided to show the similarity between results for specific enzymatic activities of yeast catechol 1,2-dioxygenases obtained during our study and with analogous results obtained by Tsai et al. [15] for yeast *Candida albicans* strain TL3. The compared values of specific C12O enzymatic activities, for example for strains A01₁ (ipc 750), B02₁ (ipc 500) presented in Table 2 and for A01₁ (ipc 500) and L01₂ (ipc 500) in Table 4, had the same order of magnitude (10^{-1}) as the analogous values of yeast specific C12O enzymatic activities from *C. albicans* strain TL3 revealed by Tsai for initial phenol concentration range from 5 mM to 22 mM. Moreover, we may conclude that the order of magnitude 10^{-2} was observed for enzymatic activity of catechol 1,2-dioxygenase for *C. albicans* TL3 for initial phenol concentration 24 mM and e.g. strain A01₁ (ipc 500) and



L01₂ (ipc 1000), presented in Table 2. One fact which is worthy of consideration is that in case of experiments conducted by Tsai et al., the highest enzymatic activity was equal to 0.734 U mg⁻¹ (ipc 10 mM), whereas in our study the highest enzymatic activities obtained for the cultures conducted without the starving step were: 2.17 U mg⁻¹ (ipc 750) for strain B02₁, 0.25 U mg⁻¹ (ipc 1000) for strain A01₁ and 0.16 U mg⁻¹ (ipc 750) for strain L01₂ (Table 2). In case of the cultures conducted with the starving step, the highest obtained enzymatic activities were: 0.57 U mg⁻¹ (ipc ,000) for strain A01₁, 0.023 U mg⁻¹ (ipc 750) for strain B02₁ and 0.47 U mg⁻¹ (ipc 750) for strain L01₂ (Table 4).

3.3. Detection of phenol degradation intermediates by GC-MS

The presence of selected possible intermediates, which may be produced during the catabolism of phenol in yeast cells was analyzed by GC-MS [54]. For this purpose, the presence of catechol, *cis,cis*-muconic acid and 2-hydroxymouconic semialdehyde was examined in samples taken from yeast cultures without the starving step after 24, 48 and 96 h of cultures growth, as well as those taken from yeast cultures with the starving step after 24, 48, 96 and 168 h of cultures growth, respectively. These times of sampling correspond to the growth rate of yeast strains in the experiments without the starving step (Fig. 3a, 3b and 3c) and in the experiments which included the starving step (Fig. 4a, 4b and 4c), respectively. The detection of phenol degradation intermediates was performed for both derivatized yeast cultures supernatants and cell extracts. For derivatized cell extracts, no characteristic products for *ortho*- or *meta*-cleavage were observed (data not shown).

However, for samples of derivatized yeast cultures supernatants, independently of presence or absence of the starving step during the growth of yeast cultures, GC-MS analysis revealed the presence of *cis,cis*-muconic acid (Fig. 5b and 6b). *Cis,cis*-muconic acid is an intermediate characteristic of phenol catabolism via *ortho*-cleavage pathway [14] (Fig. 1). In contrast, the

examined samples did not show the presence of 2-hydroxymuconic semialdehyde, the product of *meta*-cleavage pathway (data not show). Therefore, this may support the enzymatic assay results, which displayed the lack of catechol 2,3-dioxygenase activity in all analyzed samples.

Moreover, for all studied yeast strains, independently of initial phenol concentration in the culture medium and the presence or absence of the starving step during the growth of yeast cultures, production of catechol was observed (Fig. 5a and 6a). These results were consistent with published reports [13-16], which indicated that under aerobic conditions, phenol degradation was initiated by hydroxylation of the aromatic ring and catechol formation. The formation of catechol is tantamount with the presence of phenol hydroxylase during phenol degradation in cells of the studied yeast strains belonging to *Candida* spp. and *Trichosporum* spp. [13].

According to our previous report [36], all examined yeast strains in which inoculums were prepared without the starving step, were able to degrade phenol at 500 mg l⁻¹ below detectable level after 24 h of cultivation. For all yeast strains, the highest concentrations of produced catechol were detected after 24 h of cultivation and were 0.369 mg l⁻¹, 0.553 mg l⁻¹ and 0.007 mg l⁻¹ for strains A01₁, B02₁ and L01₂, respectively (Fig. 5a). Furthermore, the highest *cis,cis*-muconic acid concentrations were detected after the first day of cultivation for strains A01₁ and L01₂. Hence, at initial phenol concentration equal to 500 mg l⁻¹, these yeast strains, were able to simultaneously produce both compounds. In comparison, strain B02₁ produced *cis,cis*-muconic acid only after 96 h of cultivation. This suggests that catechol was formed at earlier stages of phenol biodegradation (Fig. 5b). The result is consistent with those under aerobic conditions, in which the first step in the metabolic pathway of phenol is its conversion to catechol [13,16].

In the case of phenol at 750 mg l⁻¹ initial concentration in culture medium, selected yeast strains were able to utilize phenol after 24 h of cultivation for A01₁ and 48 h for B02₁ and L01₂ [36]. In terms of catechol production, A01₁ produced very low concentrations (0.002 mg l⁻¹) after the first day of cultivation, whereas B02₁ and L01₂ generated 0.441 mg l⁻¹ and 0.519 mg l⁻¹ catechol concentrations, respectively. After 48 h, besides strain L01₂, catechol was detected at low levels (Fig. 5a).

In the case of *cis,cis*-muconic acid, it was detected for yeast strains A01₁ and L01₂ after the first and second day of cultivation, but decreased and increased after prolonged cultivation time, respectively. For yeast strain B02₁, *cis,cis*-muconic acid was detected after 48 h and 96 h of cultivation and its concentration was almost the same, respectively.

For 1000 mg l⁻¹ phenol initial concentration in culture medium, phenol degradation was observed after 48 h for A01₁ and L01₂, however, strain B02₁ did not exhibit any phenol degradation at such high concentrations [36]. Production of catechol was detected after 24 and 48 h, for strain A01₁ and after 48 and 96 h of cultivation for strain L01₂. However, catechol concentration values in culture of strain L01₂ were at low levels. Production of *cis,cis*-muconic acid was detected only for strain A01₁ after 48 h and 96 h of cultivation and increased over prolonged cultivation time (Fig. 5a and 5b).

As was mentioned above, in the case of experiments that included yeast cultures with the starving step, independently from the initial phenol concentration, production of catechol and *cis,cis*-muconic acid were also detected for all analyzed yeast strains (Fig. 6a and 6b). However, when we compared, the data presented on Fig. 5a and Fig. 6a, and also Fig. 5b and Fig. 6b, respectively, it seems that the change in inoculum preparation method had noticeable impact on the both compounds production by examined yeast strains.



All studied yeast strains were able to utilize phenol at 500 mg l⁻¹ concentration after 48 h of cultivation. Catechol was detected after 24 h of cultivation for strains A01₁ and L01₂ and after 48 h for strain B02₁. *Cis,cis*-muconic acid was detected after 168 h of cultivation for strain A01₁ and B02₁ and after 48 and 168 h for L01₂ (Fig. 6a and 6b). Hence, catechol was produced at the earlier stages of phenol biodegradation and there was no simultaneous production of catechol and *cis,cis*-muconic acid.

In the case of phenol at 750 mg l⁻¹ initial concentration of growth medium, total phenol degradation was observed after 48 h of cultivation for strain L01₂ and after 72 h for A01₁ and B02₁. The highest catechol values were detected after 48 h for A01₁ and B02₁, whereas for L01₂ was after 24 h of cultivation (Fig. 6a).

Moreover, *cis,cis*-muconic acid was detected after 168, 48 h and 168 h of cultivation for strains A01₁ and L01₂, respectively. However, *cis,cis*-muconic acid formation was not detected for B02₁ even after 168 h of cultivation (Fig. 6b), which may indicate that rapid transformation of phenol occurs.

In the case of phenol at 1000 mg l⁻¹ initial concentration in culture medium, degradation was only observed for strains A01₁ and L01₂ after 168 h of cultivation. For both strains, production of *cis,cis*-muconic acid was observed after 48 h of cultivation, whereas catechol was detected after 24 and 48 h of cultivation, for A01₁ and after 24, 48 and 96 h for L01₂ (Fig. 6a and 6b).

To sum up, the production of catechol was observed for all tested yeast strains when their inoculums were prepared with or without starving step, independently of initial phenol concentration and changed during the their cultures incubation time. In the most of examined strains and different initial phenol concentrations, catechol was produced at the earlier stages of degradation and its production was no simultaneous with the production of *cis,cis*-muconic



acid. However, during the culture of the studied yeast strains with the starving step, measured catechol concentrations after 24 h of cultivation for A01₁ and B02₁ were lower than those without the starving step, but it was not observed for strain L01₂. In this case, the starving step seemed to induce the production of a remarkable higher level of catechol after 24 h of this yeast strain cultivation. Moreover, in the case of the experiments included the starving step, for all yeast strains, no production of catechol after the first and fourth day of cultivation was observed.

In general, the comparison of the concentration of *cis,cis*-muconic acid in all analyzed samples revealed that the tested strains may be able to more efficient production this compound (at higher concentrations) where they are cultivated with the use of inoculums prepared without the starving step (Fig. 5b). For experiments without the starving step, among tested yeast strains, the highest value of produced *cis,cis*-muconic acid level was observed for strain B02₁ (ipc 750) and was almost 10 mg l⁻¹ (Fig. 5b). Also, for this culture condition and for this yeast strain and the initial phenol concentration, we measured the highest specific activity of catechol 1,2-dioxygenase (Table 2, 2.17 U mg⁻¹), enzyme responsible for production of *cis,cis*-muconic acid via mechanism of *ortho*-cleavage ring of catechol. However, for experiments with the starving step, among tested yeast strains, the highest level of produced *cis,cis*-muconic acid were detected for strain L01₂ (ipc 500) and was almost 1.7 mg l⁻¹.

From the biotechnological point of view, the presence of catechol 1,2-dioxygenase activity and the presence of *cis,cis*-muconic acid in cultures of examined yeast strains provide a starting point for research focused on obtaining a new *cis,cis*-muconic acid producer through metabolic engineering of yeast. To date, to the best of our knowledge, the studies regarding microbial production of *cis,cis*-muconic acid employ two main strategies of the “construction” of *cis,cis*-muconic acid producers: *i*) genetic modification of microorganisms



which do not possess the natural ability to the production of *cis,cis*-muconic acid e.g. yeast *Saccharomyces cerevisiae* [44,45] and *E. coli* [43], *ii*) metabolic engineering bacterial strains naturally capable of utilizing phenol, catechol and other small aromatic compounds [41,42]. The second of the presented strategies led to obtaining recombinant strains of microorganisms capable of very efficient production of *cis,cis*-muconic acid. Becker et al. [41] reported that the metabolically engineered strain *Corynebacterium glutamicum* MA-2 was able to produce from catechol around 85 g l⁻¹ of *cis,cis*-muconic acid after the 60 hours of fed-batch cultivation and from small aromatics obtained after softwood lignin hydrolysis around 1.8 g l⁻¹ of this acid. Kohlstedt et al. [55] also reported the biotechnological production of *cis,cis*-muconic acid from catechol using a genetically engineered *Pseudomonas putida* strain MA-6 which was able to produce from catechol around 64 g l⁻¹ of *cis,cis*-muconic acid within 55 hours of cultivation. In the presented studies, the high rate of the production of *cis,cis*-muconic acid seemed to be connected with: *i*) deletion/inactivation of genes encoding an enzyme of muconate cycloisomerase enables the production of MA via the catechol branch of the β -ketoacid pathway from small aromatics and *ii*) overexpression of gene encoding catechol 1,2-dioxygenase in bacterial cells. Hence, the presented metabolic engineering strategies of bacterial strains naturally utilizing phenol, catechol or other small aromatics compounds seem to be also an attractive starting point for the developing of analogous strategies of metabolic engineering for one of our psychrotolerant peatland yeast strains utilizing phenol and catechol, selected for further study.

4. Conclusions

Although Margesin et al. [26] has identified the cold-adapted yeast strain belonging to *Rhodotorula* sp. isolated from Alpine glacier cryoconite which utilizes phenol via the *meta*-cleavage pathway, in this study, all tested cold-adapted yeast strains promoted phenol degradation via the *ortho*-cleavage pathway. This conclusion is based both on the results of the relevant enzyme tests for detection of C12O or C23O enzymatic activities (also preliminary tests), as well as on the results of the GC-MS tests. In this study, GC-MS analysis was performed to examine possible products of phenol metabolism obtained during yeast cultivations under different conditions. This approach was applied to the detection of products produced by *ortho*-cleavage or *meta*-cleavage, which led to the formation and detection of *cis,cis*-muconic acid or 2-hydroxymuconic semialdehyde, respectively. To the best of our knowledge, this is the first report of identification of *ortho*-cleavage pathway in cold-adapted yeast strains isolated from peatland. Previously, the identification of *ortho*-cleavage pathway was reported as the metabolic pathway of phenol utilization among alpine cold-adapted phenol-degrading yeasts isolated from Alpine glacier cryoconite and petroleum hydrocarbon contained alpine soils in Austria, respectively [26,37]. On the other hand, by analogy, this is the first report of the identification of phenol utilizing yeasts via the *ortho*-cleavage pathway belonging to the species: *Candida subhashii* (strain A01₁), *Candida oregonensis* (strain B02₁) and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* (strain L01₂). Interestingly, on the base of the results of our study and the literature study, it appears that, so far, the *ortho*-cleavage pathway seems to be the predominant metabolic pathway of phenol-degrading yeast [15,23-26,37].

It is worth noting that in all analyzed samples, regardless of whether yeast cultures were prepared with or without the starving step, only 1,2-dioxygenase enzyme activity was observed. On the other hand, all analyzed yeast strains reach higher OD values in a shorter



time of cultivation (biomass growth is more effective) in cultures prepared without starving step (Fig. 3–Fig. 4).

However, summing up the discussion of results presented in Section 3.2, we may also conclude that the individual character of examined yeast strain and also the conditions of conducting experiments (e.g. experiment conducted with or without the starving step), may have a noticeable impact on the results of C12O enzymatic activity assay. The inoculum preparation method, in the cases of two out of three tested yeast strains, seemed to influence on the obtained results of measuring the specific enzymatic activity of their C12O enzymes. For inoculum preparation method without starving step, the measured specific enzymatic C12O activity values for strain B02₁ are noticeable higher, and for strain L01₂ (ipc 500 and ipc 750) are lower than those measured for both yeast strains when their inoculums were prepared with the starving step.

Summarizing the results of the GC-MS analyzes, catechol and *cis,cis*-muconic acid production were observed for all studied yeast strains, independently of initial phenol concentration in culture medium and changed during the cultivation time. The majority of examined yeast strains and different initial concentration of phenol in the culture medium, catechol was detected at the earlier stages of degradation, whereas *cis,cis*-muconic acid was produced at later stages. For analyzed yeast strains and different initial phenol concentration in culture medium (Fig. 5a and 6a), during the cultivation time, catechol concentration levels decreased, with exception A01₁ (ipc 1000) (inoculum prepared without the starving step, Fig. 5a) and B02₁ (ipc 500 and ipc 750) (inoculum prepared with the starving step, Fig. 6a), respectively. Previously publicized reports have shown that *ortho*-cleavage is induced by *cis,cis*-muconate acid, the product of the catechol ring fission [56,57]. In case of cultivations where inoculum was prepared without the starving step, increasing the initial phenol concentration caused an increase in *cis,cis*-muconic acid concentrations (except strain L01₂ at



ipc 1000). Additionally, increasing *cis,cis*-muconic acid concentration was correlated with increasing specific activity of the obtained crude enzyme extracts (Table 2) within each specific strain. However, this correlation is not highly observed in the case of the experiments which included the starving step. It may be caused by the fact that during culture growth of analyzed yeast strains *cis,cis*-muconic acid was transformed to muconolactone, which was the next metabolite of the *ortho*-cleavage pathway and was not assayed during our study. Considering all factors, this suggests that the study of biodegradation pathways of phenol should focus not only on enzymatic assays or chromatographic techniques but combine both techniques. This point of view may be useful for a better understanding of the mechanism of biodegradation and for an unequivocal identification of biodegradation phenol pathways by microorganisms.

Because *cis,cis*-muconic acid is produced by microorganisms in only one of the known main metabolic pathways which they use to utilize such environmental aromatic pollutants like e.g. catechol, phenol, toluene and benzene as carbon sources [46] the research carried out in this work allowed us to answer an important question: “If the psychrotolerant phenol-degrading yeast strains isolated by us from the peatland may be interesting in terms of their further research on the development of a biotechnological method of obtaining *cis,cis*-muconic acid?” In this research, we found that all examined yeast strains utilize phenol via the *ortho*-cleavage pathway, where *cis,cis*-muconic acid is one of the intermediates. The highest value of *cis,cis*-muconic acid concentration in all analyzed yeast cultures was detected for *Candida oregonensis* strain B02₁ (initial phenol concentration 750 mg l⁻¹, inoculum preparation without the starving step) and was almost 10 mg l⁻¹. Hence, in our opinion, this yeast strain seems to be the most promising for achieving a metabolically engineered *Candida oregonensis* strain capable of efficient production of *cis,cis*-muconic acid by biotechnological



biotransformation of phenol, catechol and other small aromatic compounds resulting from lignin hydrolysis.

Author agreement statement

We the undersigned declare that this manuscript is original, has not been published before and is not currently being considered for publication elsewhere. We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. We understand that the Corresponding Author is the sole contact for the Editorial process. He/she is responsible for communicating with the other authors about progress, submissions of revisions and final approval of proofs. Due to the pandemic of COVID-19 there is no possibility to obtain each author's hand signature. Therefore, we are submitting email addresses. In case of a need, each author may confirm this statement via email.

Funding

This research did not receive any specific grants from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRediT authorship contribution statement

Natalia Filipowicz: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. Malwina Momotko: Methodology, Investigation, Writing - original draft. Grzegorz Boczka: Methodology, Resources, Writing - review & editing. Hubert Cieśliński: Resources, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

None.

References

- [1] J. Michalowicz, W. Duda, Phenols - sources and toxicity, *Pol. J. Environ. Stud.* 16 (2007) 347–362.
- [2] G. Boczkaj, A. Przyjazny, M. Kamiński, New procedures for control of industrial effluents treatment processes, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 1503–1514, <https://doi.org/10.1021/ie402126d>.
- [3] G. Boczkaj, P. Makoś, A. Przyjazny, Application of dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography with mass spectrometry for the determination of oxygenated volatile organic compounds in effluents from the production of petroleum bitumen, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 2604–2615, <https://doi.org/10.1002/jssc.201501355>.
- [4] G. Boczkaj, A. Fernandes, P. Makoś, Study of different advanced oxidation processes for wastewater treatment from petroleum bitumen production at basic pH, *Ind. Eng. Chem. Res.* 56 (2017) 8806–8814, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b01507>.
- [5] G. Boczkaj, A. Fernandes, Wastewater treatment by means of advanced oxidation processes at basic pH conditions: a review, *Chem. Eng. J.* 320 (2017) 608–633, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.03.084>.
- [6] A. Fernandes, P. Makoś, G. Boczkaj, Treatment of bitumen post oxidative effluents by sulfate radicals based advanced oxidation processes (S-AOPs) under alkaline pH conditions, *J. Clean. Prod.* 195 (2018) 374–384, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.207>
- [7] M. Gągol, A. Przyjazny, G. Boczkaj, Wastewater treatment by means of advanced oxidation processes based on cavitation – a review, *Chem. Eng. J.* 338 (2018) 599–627, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.049>.
- [8] Z. Aksu, D. Akpınar, E. Kabasakal, B. Köse, Simultaneous biosorption of phenol and nickel(II) from binary mixtures onto dried aerobic activated sludge, *Process Biochem.* 35 (1999) 301–308, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00072-2).
- [9] R. Yuan, M. Jiang, S. Gao, Z. Wang, H. Wang, G. Boczkaj, Z. Liu, J. Ma, Z. Li, 3D mesoporous A-Co(OH)₂ nanosheets electrodeposited on nickel foam: a new generation of macroscopic cobalt-based hybrid for peroxymonosulfate activation, *Chem. Eng. J.* 380 (2020) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122447>.

- [10] C.C. Wang, C.M. Lee, C.J. Lu, M.S. Chuang, C.Z. Huang, Biodegradation of 2,4,6- trichlorophenol in the presence of primary substrate by immobilized pure culture bacteria, *Chemosphere* 41 (2000) 1873–1879 (accessed December 20, 2016), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11061309>.
- [11] T. Al-Khalid, M.H. El-Naas, Aerobic biodegradation of phenols: a comprehensive review, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42 (2012) 1631–1690, <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.569872>.
- [12] P. Caposio, E. Pessione, G. Giuffrida, A. Conti, S. Landolfo, C. Giunta, G. Gribaudo, Cloning and characterization of two catechol 1,2-dioxygenase genes from *Acinetobacter radioresistens* S13, *Res. Microbiol.* 153 (2002) 69–74, [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01290-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01290-6).
- [13] A. Krastanov, Z. Alexieva, H. Yemendzhiev, Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives, *Eng. Life Sci.* 13 (2013) 76–87, <https://doi.org/10.1002/elsc.201100227>.
- [14] C.G. Whiteley, D.-J. Lee, Enzyme technology and biological remediation, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 291–316, <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2005.10.010>.
- [15] S.C. Tsai, L.D. Tsai, Y.K. Li, An isolated *Candida albicans* TL3 capable of degrading phenol at large concentration, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005) 2358–2367, <https://doi.org/10.1271/bbb.69.2358>.
- [16] M. Zeyauallah, R. Ahmad, A. Naseem, B. Islam, H.M.I. Hasan, A.S. Abdelkafe, F. A. Benkhayal, M.A. Rizvi, A. Ali, Catechol biodegradation by *Pseudomonas* strain : a critical analysis, *Int. J. Chem. Sci.* 7 (2009) 2211–2221 (accessed January 5, 2018), <http://www.tsijournals.com/articles/catechol-biodegradation-by-pse-udomonas-strain-a-critical-analysis.pdf>.
- [17] J.B. Broderick, T.V. O'Halloran, Overproduction, purification, and characterization of chlorocatechol dioxygenase, a non-heme iron dioxygenase with broad substrate tolerance, *Biochemistry* 30 (1991) 7349–7358 (accessed August 20, 2018), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1649626>.
- [18] M. Latus, H. Seitz, J. Eberspacher, F. Lingens, Purification and characterization of hydroxyquinol 1,2-Dioxygenase from *Azotobacter* sp. Strain GP1, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 2453–2460 (accessed August 20, 2018), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535063>.
- [19] V. Barbe, D. Vallenet, N. Fonknechten, A. Kreimeyer, S. Oztas, L. Labarre, S. Cruveiller, C. Robert, S. Duprat, P. Wincker, L.N. Ornston, J. Weissenbach, P. Marlière, G.N. Cohen, C. Médigue, Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally

transformation competent bacterium, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 5766–5779, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh910>.

[20] P.D. Strachan, A.A. Freer, C.A. Fewson, Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its *catA* gene, *Biochem. J.* 333 (1998) 741–747 (accessed August 20, 2018), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9677336>.

[21] P. Saxena, I.S. Thakur, Purification and Characterization of Catechol 1, 2-dioxygenase of *Pseudomonas fluorescens* for Degradation of 4-chlorobenzoic Acid, 2009 (accessed August 20, 2018), https://www.semanticscholar.org/paper/Purification-and-characterization-of-catechol-1-%2C-Saxena-Thakur/83ef735b3256a_da26df9ccf5e0afb36dda1e13f8.

[22] G. Giedraityte, L. Kalėdienė, Catechol, 1,2-dioxygenase from α -naphthol degrading thermophilic *Geobacillus* sp. strain: purification and properties, *Open Life Sci.* 4 (2009), <https://doi.org/10.2478/s11535-008-0049-y>.

[23] Y. Long, S. Yang, Z. Xie, L. Cheng, Cloning, expression, and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from a phenol-degrading *Candida tropicalis* JH8 strain, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 46 (2016) 673–678, <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1135449>.

[24] L. Vilímková, J. Páca, V. Kremláčková, J. Páca, M. Stiborová, M. Stiborová, Isolation of cytoplasmic NADPH-dependent phenol hydroxylase and catechol-1,2-dioxygenase from *Candida tropicalis* yeast, *Interdiscip. Toxicol.* 1 (2008) 225–230, <https://doi.org/10.2478/v10102-010-0046-7>.

[25] Z. Aleksieva, D. Ivanova, T. Godjevargova, B. Atanasov, Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57, *Process Biochem.* 37 (2002) 1215–1219, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00336-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00336-3).

[26] R. Margesin, S. Gander, G. Zacke, A.M. Gounot, F. Schinner, Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts, *Extremophiles.* 7 (2003) 451–458, <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0347-2>.

[27] R. Margesin, P.-A. Fonteyne, B. Redl, Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by *Rhodococcus* spp. And basidiomycetous yeasts, *Res. Microbiol.* 156 (2005) 68–75, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.08.002>.



- [28] A. Fialová, E. Boschke, T. Bley, Rapid monitoring of the biodegradation of phenol- like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements, *Int. Biodeterior. Biodegradation* 54 (2004) 69–76, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.02.004>.
- [29] Y. Jiang, X. Yang, B. Liu, H. Zhao, Q. Cheng, B. Cai, Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain ND6: gene sequence and enzyme characterization, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2004) 1798–1800, <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1798>.
- [30] I. Kasuga, F. Nakajima, H. Furumai, Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake, *FEMS Microbiol. Ecol.* 61 (2007) 449–458, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00347.x>.
- [31] W. Li, J. Shi, X. Wang, Y. Han, W. Tong, L. Ma, B. Liu, B. Cai, Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. Strain ND6, *Gene* 336 (2004) 231–240, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.03.027>.
- [32] C. Müller, L. Petruschka, H. Cuypers, G. Burchhardt, H. Herrmann, Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas putida* is mediated by the inhibition of the activator protein PhIR, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 2030–2036.
- [33] K. Sei, K. Asano, N. Tateishi, K. Mori, M. Ike, M. Fujita, Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways, *J. Biosci. Bioeng.* 88 (1999) 542–550.
- [34] A. Viggiani, L. Siani, E. Notomista, L. Birolo, P. Pucci, A. Di Donato, The role of the conserved residues His-246, His-199, and Tyr-255 in the catalysis of catechol 2,3- dioxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 48630–48639, <https://doi.org/10.1074/jbc.M406243200>.
- [35] J. Wei, Y. Zhou, T. Xu, B. Lu, Rational design of Catechol-2, 3-dioxygenase for improving the enzyme characteristics, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162 (2010) 116–126, <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8720-y>.
- [36] N. Filipowicz, M. Momotko, G. Boczka, T. Pawlikowski, M. Wanarska, H. Cieśliński, Isolation and characterization of phenol-degrading psychrotolerant yeasts, *Water Air Soil Pollut.* 228 (2017) 210, <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3391-8>.



[37] R. Margesin, P. Bergauer, S. Gander, Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: a comparison of cold-tolerant *Arthrobacter* sp. And mesophilic *Pseudomonas putida*, *Extremophiles*. 8 (2004) 201–207, <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0378-3>.

[38] Y. Jiang, N. Ren, X. Cai, D. Wu, L. Qiao, S. Lin, Biodegradation of phenol and 4- Chlorophenol by the mutant strain CTM 2, *Chinese J. Chem. Eng.* 16 (2008) 796–800, [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(08\)60158-5](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(08)60158-5).

[39] J. Yan, W. Jianping, L. Hongmei, Y. Suliang, H. Zongding, The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*, *Biochem. Eng. J.* 24 (2005) 243–247, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.02.016>.

[40] I. Khalil, G. Quintens, T. Junkers, M. Dusselier, Muconic acid isomers as platform chemicals and monomers in the biobased economy, *Green Chem.* 22 (2020) 1517–1541, <https://doi.org/10.1039/C9GC04161C>.

[41] J. Becker, M. Kuhl, M. Kohlstedt, S. Starck, C. Wittmann, Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of cis,cis-muconic acid from lignin, *Microb. Cell Fact.* 17 (2018), <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0963-2>.

[42] J.W. Chua, J.H. Hsieh, Oxidative bioconversion of toluene to 1,3-butadiene-1,4- dicarboxylic acid (cis,cis-muconic acid), *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6 (1990) 127–143, <https://doi.org/10.1007/BF01200932>.

[43] J.W. Frost, A. Miermont, D. Schweitzer, V. Bui, US Patent. (2013) US8426639B2.

[44] M.E. Pyne, L. Narcross, M. Melgar, K. Kevvai, S. Mookerjee, G.B. Leite, V.J. J. Martin, An engineered Aro1 protein degradation approach for increased cis,cis- Muconic acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *App. Environ. Microbiol.* 84 (2018), <https://doi.org/10.1128/AEM.01095-18>.

[45] G. Wang, S. Øzmerih, R. Guerreiro, A.C. Meireles, A. Carolas, N. Milne, M. K. Jensen, B.S. Ferreira, I. Borodina, Improvement of cis,cis-Muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* through biosensor-aided genome engineering, *ACS Synth. Biol.* 9 (2020) 634–646, <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00477>.

[46] N. Filipowicz, H. Cieśliński, A rapid and simple method for screening microorganisms with a potential for catechol biodegradation, *Int. J. Environ. Res.* 14 (2020) 87–92, <https://doi.org/10.1007/s41742-019-00239-z>.

[47] C.E. Paisio, A.L.W. Oller, S.G. Ibanez, M.A. Talano, P.S. Gonzalez, M.I. Medina, E. Agostini, in: J.B. Velazgues-Fernandes, S. Muniz-Hernandes (Eds.), *Bioremediation as a useful biotechnological strategy for the treatment of phenolics: advances, challenges and future prospects*, Nova Science Publishers, New York, 2014, pp. 57–79.

[48] E.L. Neidle, L.N. Ornston, Cloning and expression of *Acinetobacter calcoaceticus* catechol 1,2-dioxygenase structural gene *catA* in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 168 (1986) 815–820, <https://doi.org/10.1128/jb.168.2.815-820.1986>.

[49] A. Birger, G. Krauss, B. Kiesel, J. Dermietzel, W. Gläßer, Abbaupotential für aliphatische und aromatische kohlenwasserstoffe in bakteriellen und heterotrophen communities differenter grundwasser-biozönosen, in: G. Kreysa, J. Wiesner (Eds.), *Möglichkeiten Und Grenzen Der Reinigung Kontaminierter Gewässer*, Dechema, Frankfurt, 1997, pp. 571–581.

[50] J.A. Morgan, C. Winstanley, R.W. Pickup, J.G. Jones, J.R. Saunders, Direct phenotypic and genotypic detection of a recombinant *Pseudomonas* population released into lake water, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 2537–2544.

[51] T. Nakazawa, A. Nakazawa, Pyrocatechase (*Pseudomonas*), *Methods Enzymol.* 17 (1970) 518–522, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(71\)17234-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(71)17234-5).

[52] M. Nozaki, Metapyrocatechase (*Pseudomonas*), *Methods Enzymol.* 17 (1970) 522–525, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(71\)17235-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(71)17235-7).

[53] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254 (accessed August 20, 2018), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.

[54] H. Nie, M. Nie, Y. Yang, J. Zhao, X. Zhang, Y. Guo, Y. Wan, J. Zi, Characterization of phenol metabolism by *P. stutzeri* N2, *Polycycl. Aromat.* 36 (2016) 587–600, <https://doi.org/10.1080/10406638.2015.1033434>.

[55] M. Kohlstedt, S. Starck, N. Barton, J. Stolzenberger, M. Selzer, K. Mehlmann, R. Schneider, D. Pleissner, J. Rinkel, J.S. Dickschat, J. Venus, J.B.J.H. van Duuren, C. Wittmann, From lignin to nylon: cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*, *Metab. Eng.* 47 (2018) (2018) 279–293, <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.003>.

[56] B. Cao, A. Geng, K.-C. Loh, Induction of ortho- and meta-cleavage pathways in *Pseudomonas* in biodegradation of high benzoate concentration: MS identification of catabolic enzymes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (2008) 99–107, <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1728-3>.

[57] J. Song, J. Sung, Y.M. Kim, G.J. Zylstra, E. Kim, Roles of the meta- and ortho- cleavage pathways for the efficient utilization of aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas yanoikuyae* B1, *J. Microbiol.* 38 (2000) 245–249

Tables

Table 1 Total enzymatic C12O activity [U] of yeast strain cultures where inoculum was prepared without the starving step.

Yeast strain (initial phenol concentration [mg l ⁻¹])	Total enzymatic C12O activity [U]
A01 ₁ (500)	0.007 ± 0.0003
A01 ₁ (750)	0.014 ± 0.0007
A01 ₁ (1000)	0.007 ± 0.0004
B02 ₁ (500)	0.005 ± 0.0003
B02 ₁ (750)	0.001 ± 0.0001
L01 ₂ (500)	0.006 ± 0.0003
L01 ₂ (750)	0.001 ± 0.0001
L01 ₂ (1000)	0.0001 ± 0.000

Table 2 Total [U] and specific C12O activity [U mg⁻¹] of crude enzymatic extracts obtained from yeast cultures where inoculum was prepared without the starving step.

Yeast strain (initial phenol concentration [mg l ⁻¹])	Total enzymatic C12O activity [U]	Specific enzymatic C12O activity [U mg ⁻¹]
A01 ₁ (500)	0.071 ± 0.0036	0.084 ± 0.0042
A01 ₁ (750)	0.16 ± 0.0081	0.14 ± 0.0070
A01 ₁ (1000)	0.19 ± 0.0092	0.25 ± 0.012
B02 ₁ (500)	0.16 ± 0.0081	0.41 ± 0.021
B02 ₁ (750)	0.13 ± 0.0067	2.17 ± 0.11
L01 ₂ (500)	0.023 ± 0.0011	0.044 ± 0.0022
L01 ₂ (750)	0.13 ± 0.0067	0.16 ± 0.0082
L01 ₂ (1000)	0.0051 ± 0.00062	0.058 ± 0.0029

Table 3 Total enzymatic C12O activity [U] of yeast strains cultures where inoculum was prepared with the starving step.

Yeast strain (initial phenol concentration [mg l ⁻¹])	Total enzymatic C12O activity [U]
A01 ₁ (500)	0.001 ± 0.0001
A01 ₁ (750)	0.010 ± 0.0005
A01 ₁ (1000)	0.008 ± 0.0004
B02 ₁ (500)	0.002 ± 0.0001
B02 ₁ (750)	0.003 ± 0.0002
L01 ₂ (500)	0.002 ± 0.0001
L01 ₂ (750)	0.004 ± 0.0002
L01 ₂ (1000)	0.051 ± 0.0025



Table 4 Total [U] and specific C12O activity [U mg⁻¹] of crude enzymatic extracts obtained from yeast cultures where inoculum was prepared with the starving step.

Yeast strain (initial phenol concentration [mg l⁻¹])	Total enzymatic C12O activity [U]	Specific enzymatic C12O activity [U mg⁻¹]
A01 ₁ (500)	0.071 ± 0.0035	0.17 ± 0.0086
A01 ₁ (750)	0.0041 ± 0.00022	0.0064 ± 0.00032
A01 ₁ (1000)	0.27 ± 0.00092	0.57 ± 0.029
B02 ₁ (500)	0.0034 ± 0.00014	0.0047 ± 0.00023
B02 ₁ (750)	0.016 ± 0.00083	0.023 ± 0.0012
L01 ₂ (500)	0.0093 ± 0.00052	0.36 ± 0.018
L01 ₂ (750)	0.35 ± 0.0052	0.47 ± 0.023
L01 ₂ (1000)	0.0032 ± 0.00014	0.012 ± 0.00060

Figures

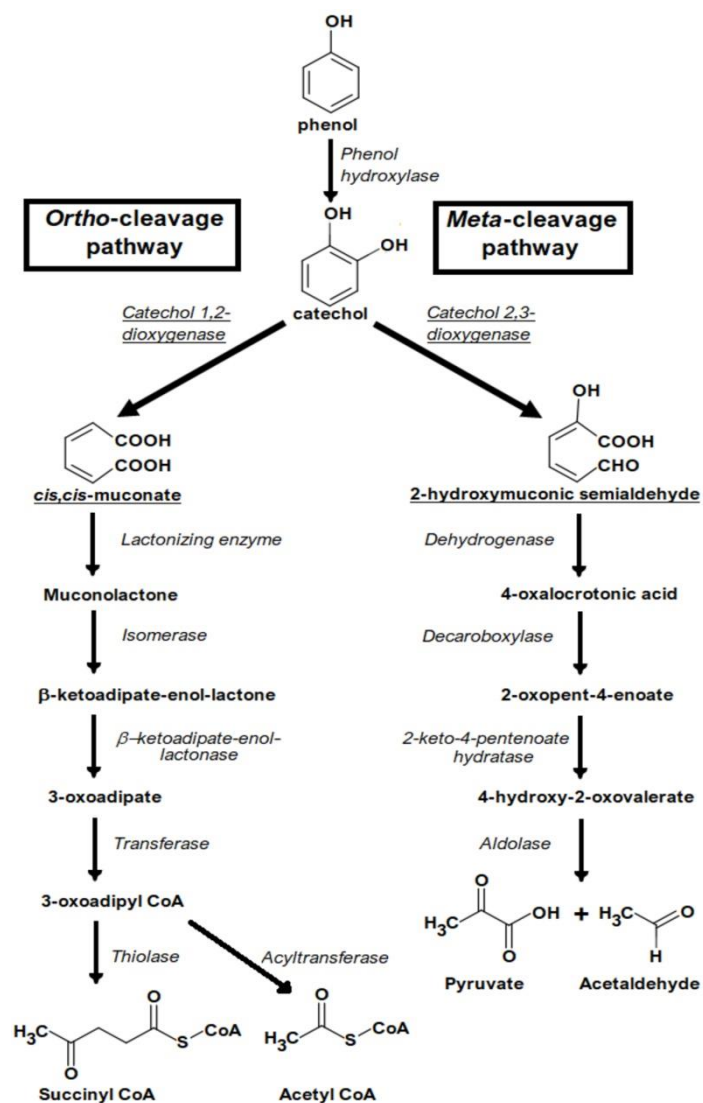


Fig. 1. Schemes of the *ortho*- and *meta*-pathways present in phenol and its derivatives-degrading microorganisms; based on Paisio et al. [47].

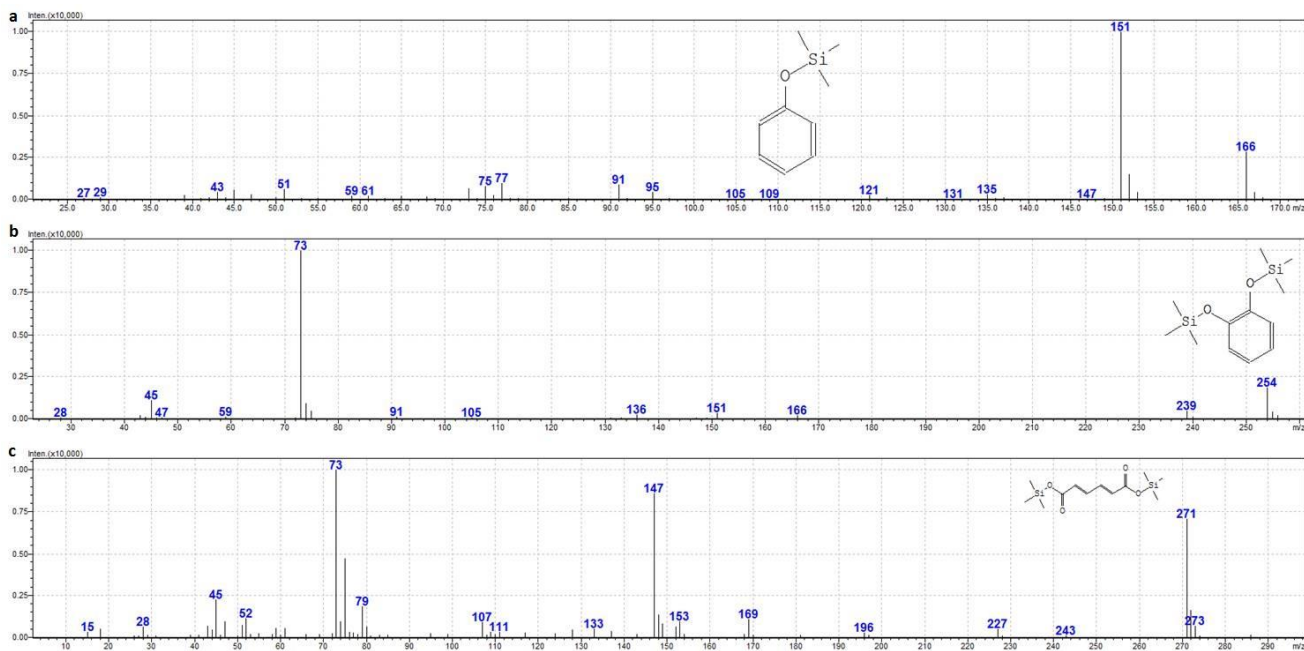
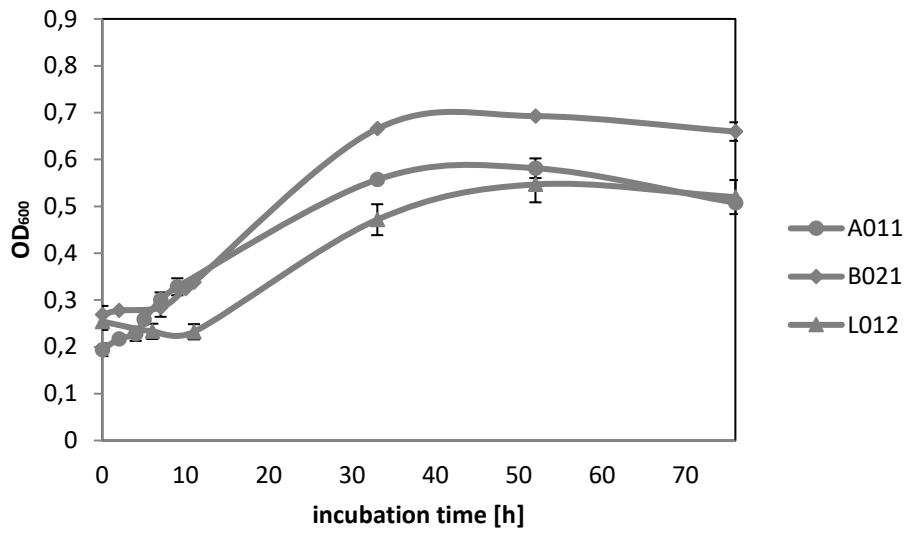
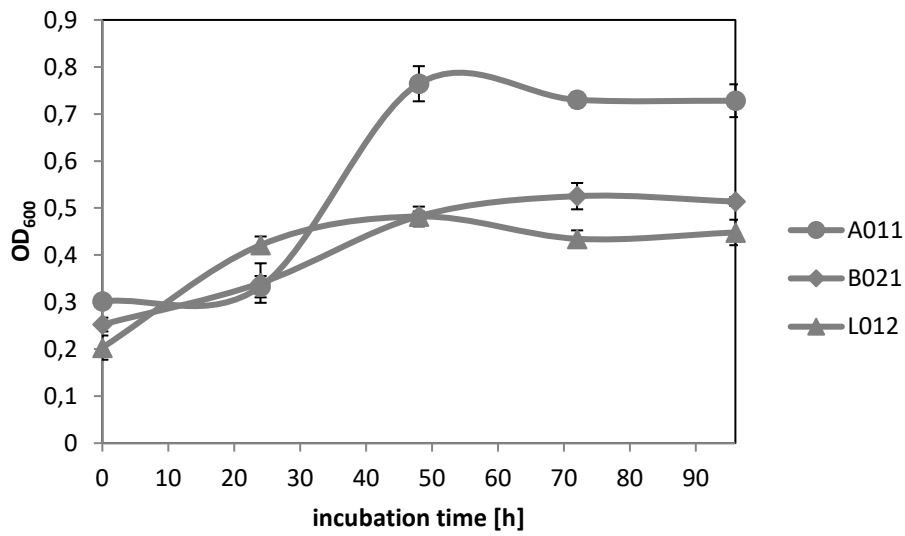


Fig. 2. GC-MS spectra (Electron impact ionization) of derivatized analytes – a) phenol TMS derivative; b) catechol TMS derivative; c) *cis,cis*-muconic acid TMS derivative.

a



b



c

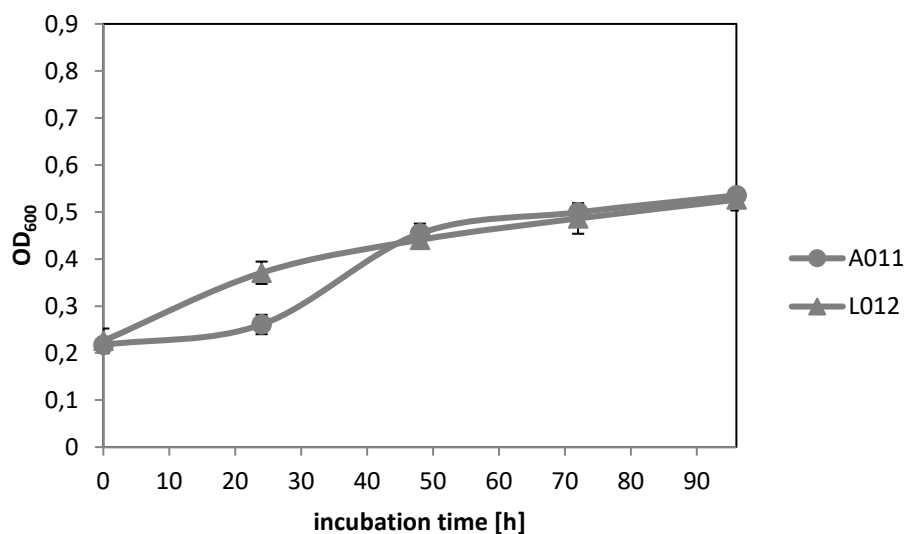
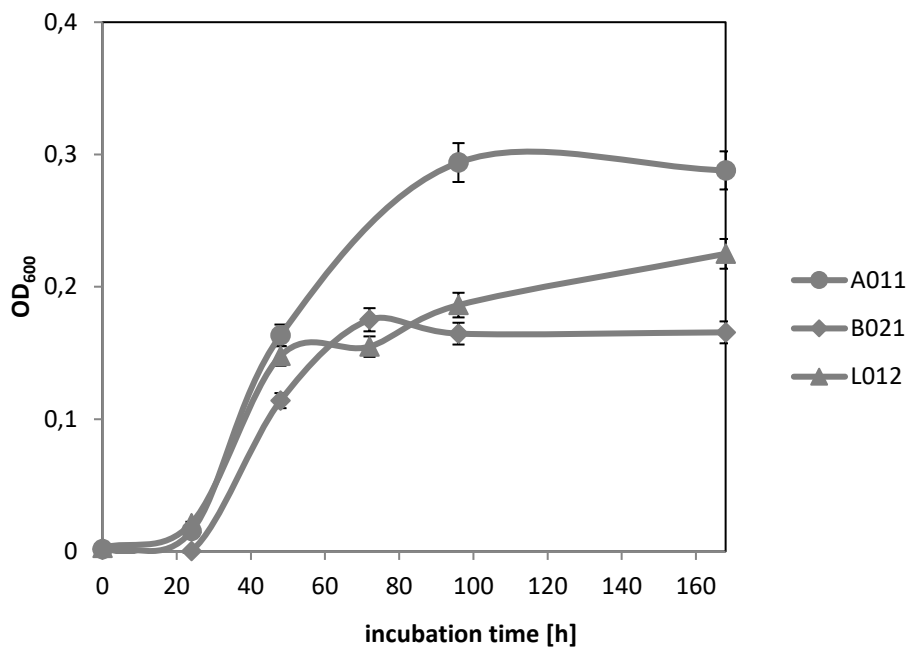
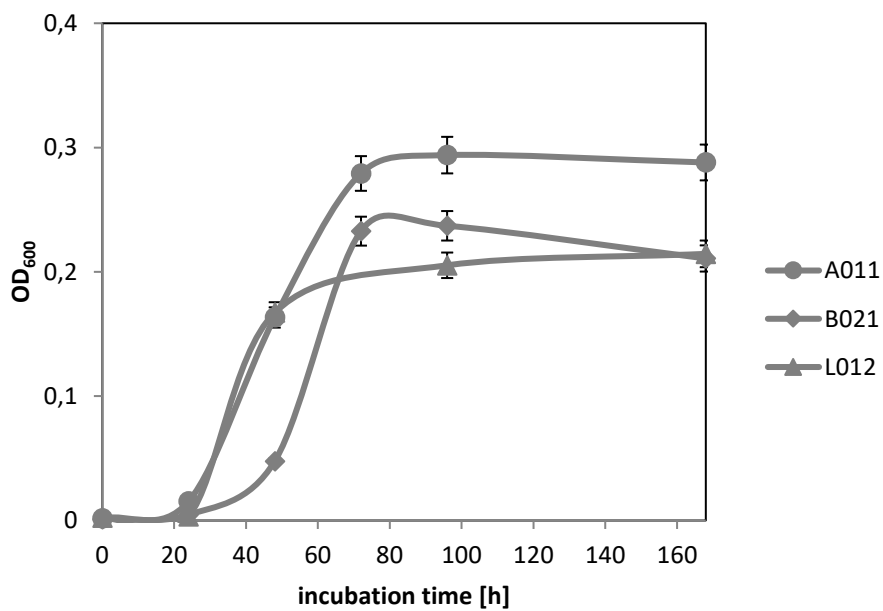


Fig. 3. **a** Growth curves for examined yeast strains in MSM medium without the starving step, supplemented with phenol at 500 mg l⁻¹. **b** Growth curves for examined yeast strains in MSM medium without the starving step, supplemented with phenol at 750 mg l⁻¹. **c** Growth curves for examined yeast strains in MSM medium without the starving step, supplemented with phenol at 1000 mg l⁻¹.

a



b



c

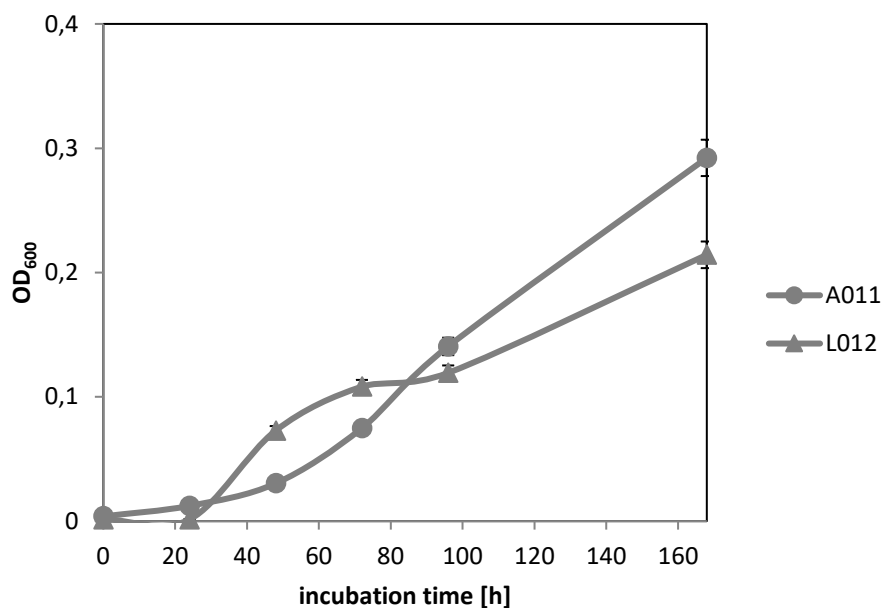
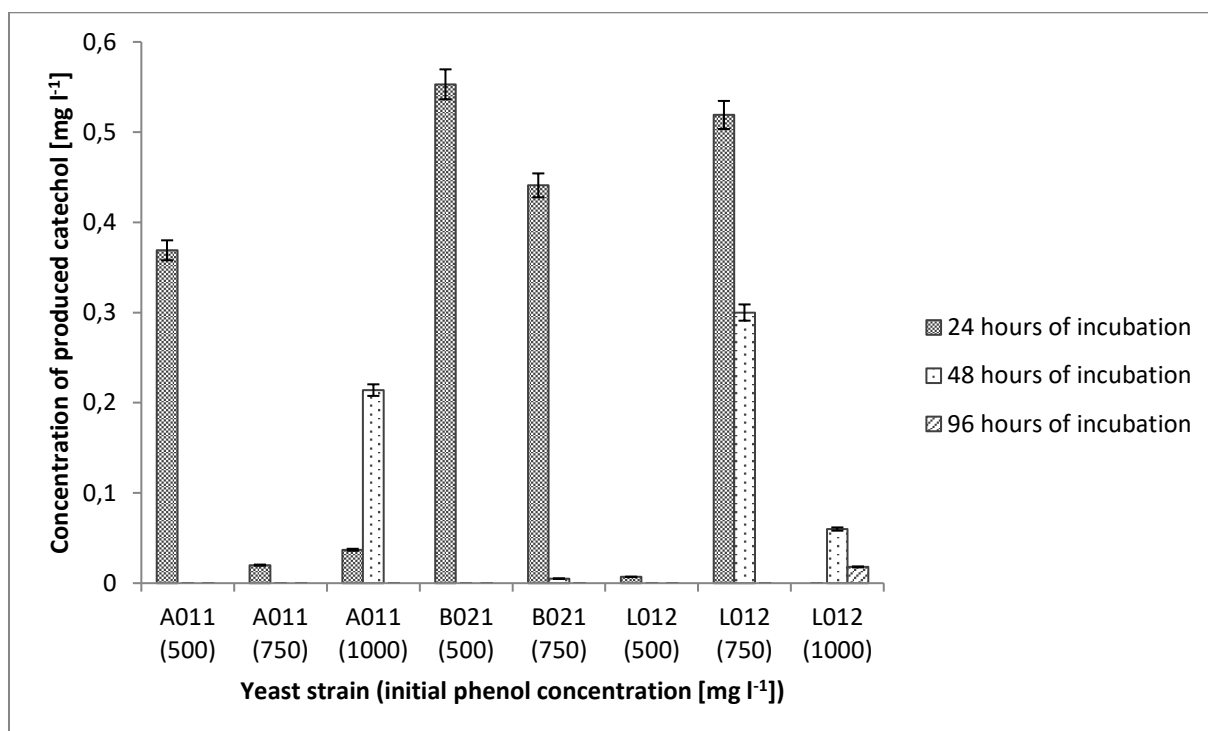


Fig. 4. a Growth curves for examined yeast strains in MSM medium with the starving step, supplemented with phenol at 500 mg l^{-1} . **b** Growth curves for examined yeast strains in MSM medium with the starving step, supplemented with phenol at 750 mg l^{-1} . **c** Growth curves for examined yeast strains in MSM medium with the starving step, supplemented with phenol at 1000 mg l^{-1} .

a



b

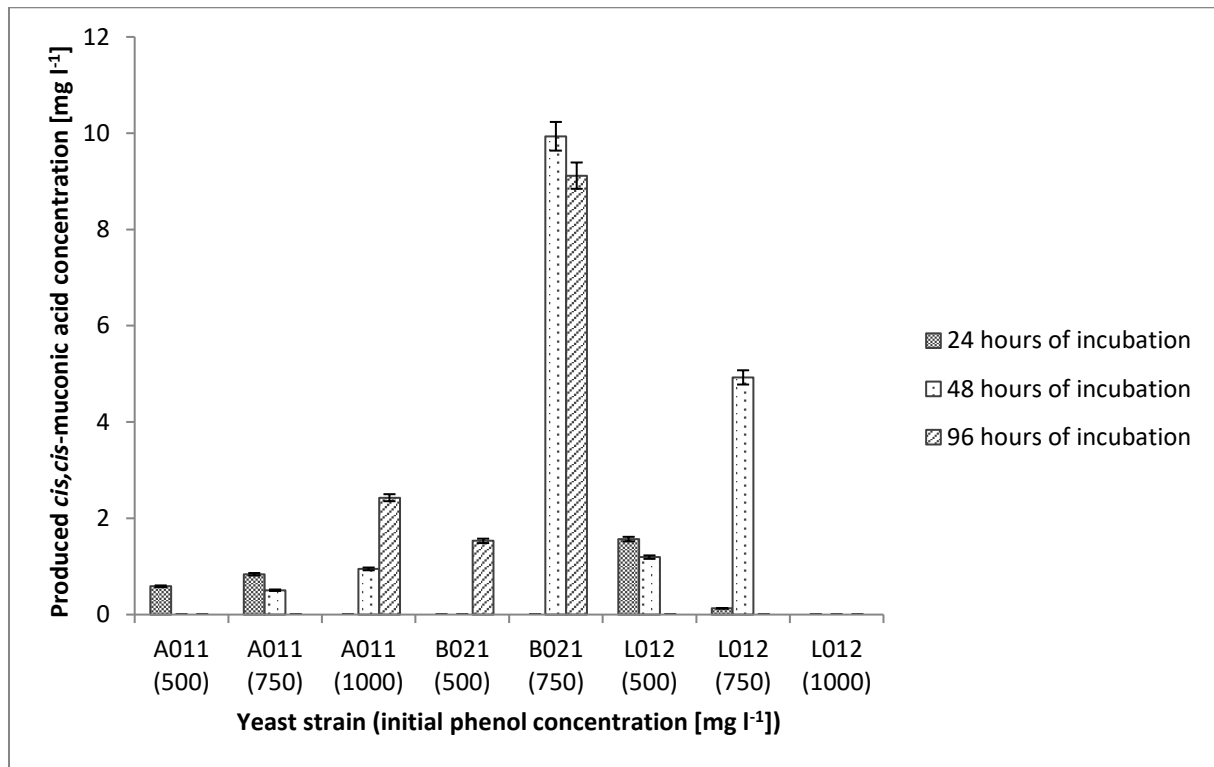
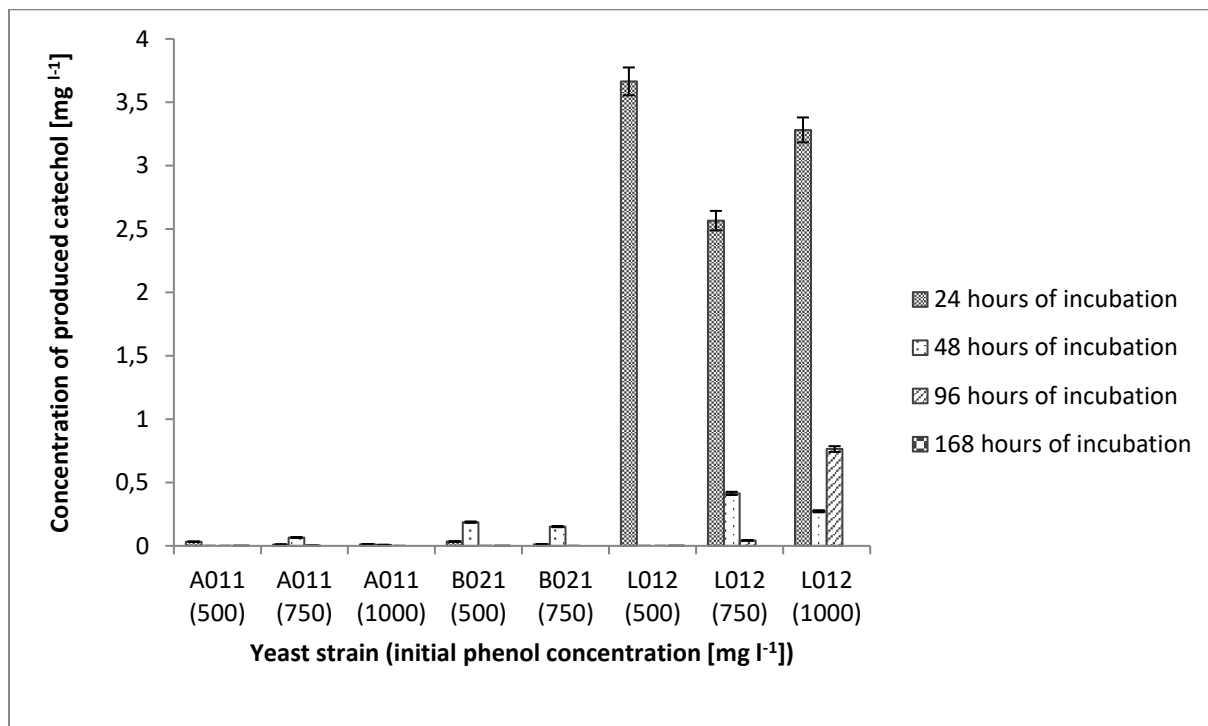


Fig. 5. a Catechol detected in examined yeast strains cultures - experiments conducted without the starving step (initial phenol concentration [mg l⁻¹]). **b** *Cis,cis*-muconic acid detected in examined yeast strains cultures - experiments conducted without the starving step (initial phenol concentration [mg l⁻¹]).

a



b

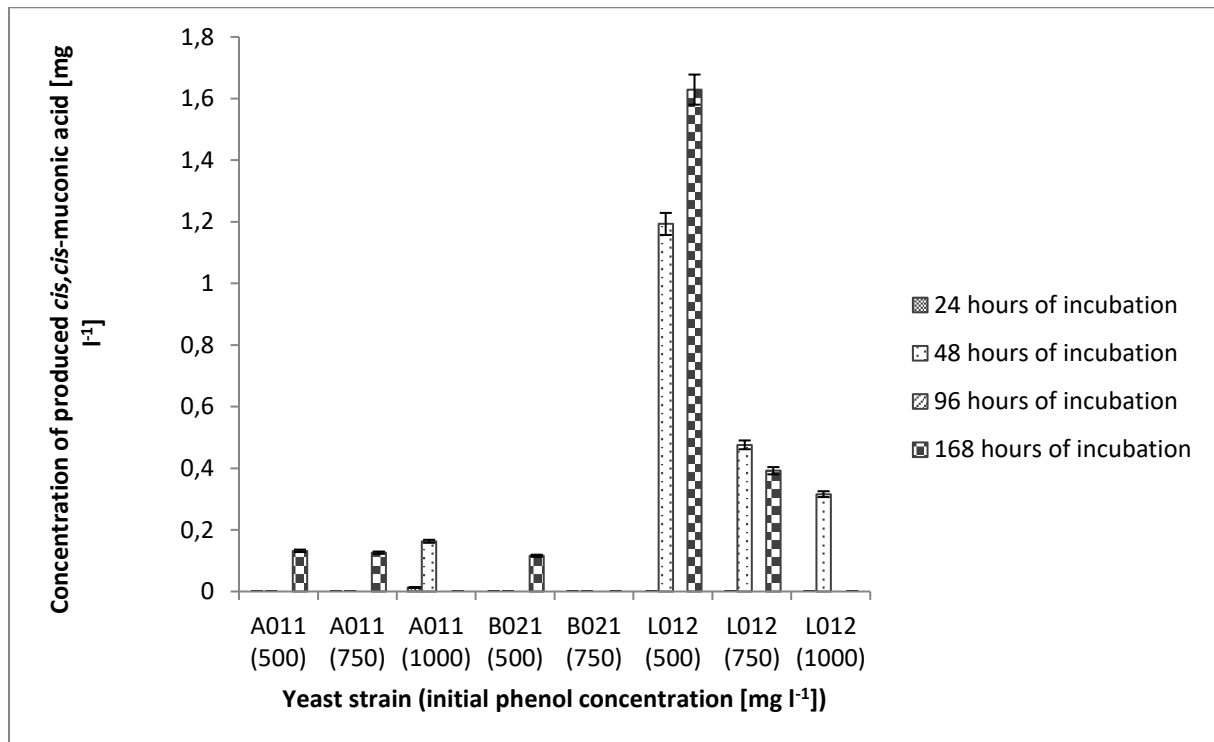


Fig. 6. a Catechol detected in examined yeast strains cultures - experiments conducted with the starving step (initial phenol concentration [mg l⁻¹]). **b** *Cis,cis*-muconic acid detected in examined yeast strains cultures – experiments conducted with the starving step (initial phenol concentration [mg l⁻¹]).