

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Klorosalitsülaatide lagundamine erinevates perekonna *Pseudomonas* liikides**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Anni Peegel

Juhendajad PhD Merike Jõesaar

PhD Signe Viggor

TARTU 2023

## INFOLEHT

### **Klorosalitsülaaside lagundamine erinevates perekonna *Pseudomonas* liikides**

Salitsülaad on naftaleeni lagundamisel tekkiv vaheühend. Käesolevas töös uuritakse perekonna *Pseudomonas* kolme tüve, *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4, võimet lagundada salitsülaati ja klorosalitsülaate. Tüvedel on erinev arv lagundamiseks vajalikke salitsülaadi 1-hüdroksülaase ja katehooli 1,2- ja/või 2,3- dioksügenaase. Teostatud katsete käigus määrati tüvede kasvuparameetrid, ensüümide aktiivsused ning neid kodeerivate geenide ekspressioon salitsülaati, 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati sisaldavas R2A söötmes kasvanud rakkudes. Analüüsi kolme tüve koosluse võimet kasvada salitsülaate sisaldaval söötmel. Töös sooritatud katsete põhjal mõjutab klororühma asetus salitsülaadi molekulis tüvede võimet neid aineid lagundada. Koosluses domineerib plasmiidset *sal* operoni omav kiirekasvuline *P. fluorescens* tüvi PC20.

Märksõnad: Salitsülaadi 1-hüdroksülaas, katehooli dioksügenaasid, redundantsus, klorosalitsülaad, *Pseudomonas*

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Degradation of chlorosalicylates in different species of the *Pseudomonas* family**

Salicylate is an intermediate in the degradation of naphthalene. This study focuses on the salicylate and chlorosalicylate degradation properties of three strains from the family *Pseudomonas*, *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 and *P. putida* NCIB 9816-4. These strains have a different number of salicylate 1-hydroxylases and catechol 1,2- and/or 2,3-dioxygenases, enzymes essential for the degradation of salicylate. The growth parameters, enzyme activities and gene expression of the key enzymes were determined on R2A medium supplemented with salicylate, 3-, 4- or 5-chlorosalicylate grown strains. In addition, the ability of the mixed culture of the three strains to grow on medium containing salicylates was analyzed. Based on the results of this work, the position of the chlorine group in the salicylate molecule affects the ability of pseudomonads to degrade these substances. The community is dominated by the fast-growing strain PC20, which *sal* operon locates in the pNAH20 plasmid.

Keywords: Salicylate 1-hydroxylase, catechol dioxygenases, redundancy, Na-salicylate, chlorosalicylate, *Pseudomonas*

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

## SISUKORD

INFOLEHT.....	1
KASUTATUD LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Aromaatsete ühendite aeroobne lagundamine bakterites .....	5
1.2 Naftaleeni aeroobne lagundamine salitsülaadiks.....	6
1.3 Salitsülaadi lagundamine .....	8
1.4 Dioksügenaasid.....	10
1.5. Klorokatehhoolide lagundamine.....	12
1.6 Naftaleeni ja salitsülaadi lagundamine perekonna <i>Pseudomonas</i> liikides .....	15
1.6.1 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> C70.....	16
1.6.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i> PC20.....	17
1.6.3 <i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4.....	17
1.7 Naftaleeni ja salitsülaadi lagundamine segakultuuris.....	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1. TÖÖ EESMÄRGID.....	20
2.2. MATERJAL JA METOODIKA.....	21
2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved .....	21
2.2.2. Bakteritüvede kasvatused kolbides.....	21
2.2.3. Bakteritüvede kasvuparameetrite määramine.....	21
2.2.4. Tüvede märgistamine GFP reportergeeniga.....	22
2.2.5. qRT-PCR .....	22
2.2.6. Geelelektroforees.....	23
2.2.7. Ensüümiaktiivsuste määramine .....	23
2.2.8. Koosluste kasvatused.....	24
3. TULEMUSED JA ARUTELU .....	25
3.1. Kasvatused salitsülaadil ja klorosalitsülaatidel .....	25
3.1.1 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> C70.....	25
3.1.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i> PC20.....	28
3.1.3 <i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4.....	31
3.2. Ensüümiaktiivsused.....	35
3.3. qRT-PCR .....	38
3.4. Segakultuuri kasv (kloro)salitsülaatidel .....	43
KOKKUVÕTE .....	48
Resümees/Summary .....	49
TÄNUSÕNAD .....	51
KASUTATUD KIRJANDUS.....	52
LISAD .....	58
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .....	59

## **KASUTATUD LÜHENDID**

3-KL - 3-klorosalitsülaad

4-KL - 4-klorosalitsülaad

5-KL - 5-klorosalitsülaad

C12O - katehhooli 1,2-dioksügenaas

C23O - katehhooli 2,3-dioksügenaas

HMS - hüdroksümukonosemialdehüüd

KHMS - 5-kloro-2-hüdroksümukonosemialdehüüd

PAH - polütsükliline aromaadne ühend

SH - salitsülaadi 1-hüdroksülaas

## SISSEJUHATUS

Aromaatsed ühendid, eelkõige stabiilsemad polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud (PAH-id), on inimtegevuse tagajärjel muutunud laiaulatuslikuks saasteallikaks kogu maailmas. Kuigi aromaatsed ühendid leidub ka looduses, on tihti katastroofiliste tagajärgedega just tööstuslikes jäätmetes või naftareostustes leiduvate ühendite keskkonda jõudmine. Ühenditel on kahjulik mõju floorale ja faunale, mistõttu reostused Läänemeres, Atlandi ookeanis jm veekogudes võivad kohalikes ökosüsteemides pöördumatut hävingut põhjustada.

Saaste likvideerimine on mehaaniliste meetodite puhul madala efektiivsusega, kulukas ja aeganõudev protsess. Lahenduseks on biotervendus – mikroorganismide lagundamisvõime kasutamine aromaatsete ühendite degradeerimiseks. Bakterid lagundavad aromaatsed ühendid ja nende vaheühendeid, kasutades neid süsiniku- ja energiaallikana. Aromaatsed ühendid on tihtipeale äärmiselt stabiilsed, mistõttu on vaja leida spetsiifilised bakteritüved, millel on olemas nii aromaatsete ühendite lagundamiseks vajalikud ensümaatilised rajad, kui ka võime kooslustes säilida. Efektiivseks biotervenduse vahendiks on mikroorganism, mis adapteerub kiirelt uue keskkonnaga ja lagundab saasteainet tõhusalt ja mõistliku aja piires (Seo *et al.*, 2009).

Antud töö eesmärgiks on analüüsida *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 Na-salitsülaadi ning klorosalitsülaatide lagundamisvõimet üksik- ja segakultuurides. Substraadiks valiti Na-salitsülaat, kuna tegemist on aromaatsete ühendite lagundamisel tekkiva tsentraalse vaheühendiga. Klorosalitsülaatide lagundamise hindamise eesmärgiks on selgitada klororühmade mõju klassikalisele aromaatsete ühendite lagundamisrajale.

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1 Aromaatsete ühendite aeroobne lagundamine bakterites

Aromaatsed ehk benseenituumaga ühendid on tänu ühtlustunud  $\pi$ -elektronipilvele keemiliselt ja bioloogiliselt suhteliselt stabiilsed. Neid toodavad oma elutegevuse käigus nii taimed kui ka mikroorganismid. Aromaatsed ühendid on näiteks kofeiin, aromaatsed aminohapped, salitsülaadid, ligniin jne. Keskkonnale tekitavad aga rohkem kahju inimtekkelised aromaatsed ühendid, mida tööstusprotsesside (keemia- ja farmaatsiatööstused, toornafta rikastustehased jne) või transpordi käigus võib loodusesse sattuda väga suurtes kogustes. (Ladino-Orjuela *et al.*, 2016) Iseloomuliku stabiilsuse tõttu on inimkäitumise tagajärjel keskkonda jõudnud aromaatsete ühendite puhul tihti tegemist ainetega, mille likvideerimine on keeruline (Seo *et al.*, 2009).

Aromaatsed ühendid jagunevad põhiliselt kolmeks suuremaks klassiks – polütsüklilised (PAH-id), heterotsüklilised ja asendusrühmadega aromaatsed ühendid. PAH-id koosnevad rohkem kui ühest benseenituumast ning neid satub loodusesse näiteks metsapõlengute ja vulkaanipursete, kuid ka inimtegevuse tagajärjel. (Seo *et al.*, 2009) PAH-idel on inimestele kartsinogeenne efekt, lisaks on neil toksiline mõju nii rakumembraanile, kui ka selle funktsioonidele, sealhulgas ensüümisüsteemidele (Menzie *et al.* 2002; Abdel-Shafy ja Mansour, 2016). Polütsükliliste aromaatsete ühendite lahustuvus vees ja keemiline reaktiivsus väheneb ühendi molekulmassi ja benseenituumade arvu tõusuga (Seo *et al.*, 2009).

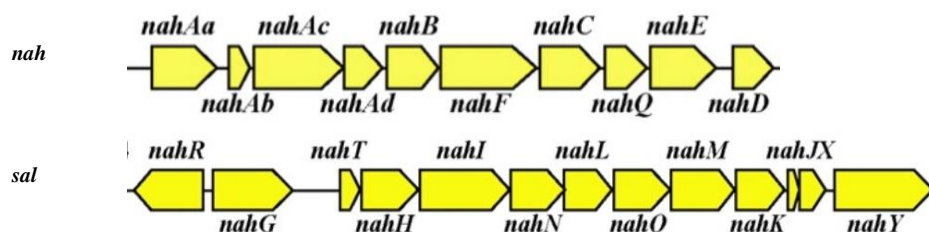
Aromaatseid ühendeid on võimalik keskkonnast likvideerida mikroorganismide abil biotervendusega. Teatud hulk mikroorganisme on võimelised kasutama aromaatseid ühendeid süsiniku- ja energiaallikana. Aeroobsed mikroorganismid hüdroksüleerivad esmalt oksügenaaside abil stabiilse benseenituumaga, mis seejärel lõhutakse dioksügenaaside poolt. Esimese reaktsiooni tulemusena tekivad mitmed olulised metaboolsed vaheühendid, nende seas katehoolid, protokatehhaadid ja gentisaadid. Olenemata ensümaatiliste radade eripäradest toetuvad aeroobsete ühendite lagundamistaktikad just nendele tsentraalsetele vaheühenditele. Edasiste lagundamisprotsesside tulemusena degradeeritakse ained tsitraaditsükli vaheühenditeks. (Perez-Pantoja *et al.*, 2019) Samas eelistavad bakterid tihti aromaatsetele ühenditele lihtsamaid substraate, näiteks süsivesikuid, mille lagundamine on organismile reeglina energeetiliselt kasulik (Seo *et al.*, 2009).

Aromaatsete ühendite lagundamisel tekkivad vaheühendid võivad omada tsütotoksilist mõju. Muñoz jt. (2007) väidavad, et benseenituumaga lõhkumisel tekkiva katehooli kõrgemad

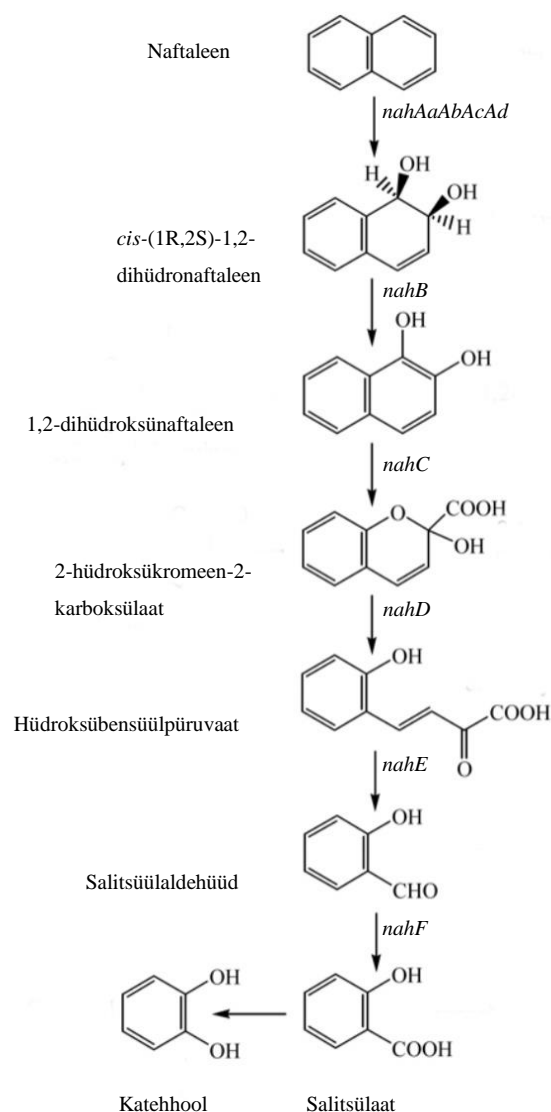
konsentratsioonid võivad inhibeerida nii selle tekkel kui ka lagundamisel osalevate ensüümide tööd. Redundantsus ehk sama geeni mitme koopia esinemine genoomis võib katehhooli mõju leevendada. *Pseudomonas putida* tüvi mt-2 suudab vaheühendite tsütotoksilisust vähendada, taludes kõrgemaid bensoaadi ning katehhooli kontsentratsioone tänu redundantsetele katehhooli 1,2- dioksügenaasidele, mis kontrollivad rakusisest katehhooli kontsentratsiooni (Jiménez *et al.*, 2014).

## 1.2 Naftaleeni aeroobne lagundamine salitsülaadiks

Polüaromaatsete ühendite mudelmolekul naftaleen on lihtsaima struktuuriga ühend antud klassis. Võrdluses teiste polütsükliiliste ühenditega on selle lahustuvus vees kõrgem, mistõttu on mikroobidel naftaleeni kergem lagundada. Põhiliselt tekib naftaleeni looduslikult mittetäielikel põlemisreaktsioonidel – vulkaanipursked, metsapõlengud (Menzie *et al.*, 2002), kuid ka looduslike lekete esinemisel nafta- ja söekaevandustes (Abdel-Shafy ja Mansour, 2016). Suuremas koguses satub naftaleeni keskkonda nafta kaevandamisel, töötlemisel ja transpordil, aga ka keemiatööstustest, kus toodetakse koitõrjevahendeid, värve, lõhkeaineid jne. Sarnaselt teistele PAH-idele, on ka naftaleenil potentsiaalselt inimestele kartsinogeenne efekt. (Preuss *et al.*, 2003)



Joonis 1. *Pseudomonas putida* NAH7 plasmidi *nah* ja *sal* operon, transkriptsiooni regulaator *nahR* (Sota *et al.*, 2006 põhjal).



Joonis 2. *Pseudomonas putida* tüve G7 naftaleeni lagundamisrada vastavate geenidega NAH7 plasmidi *nah* operonist (Seo *et al.*, 2009, põhjal).

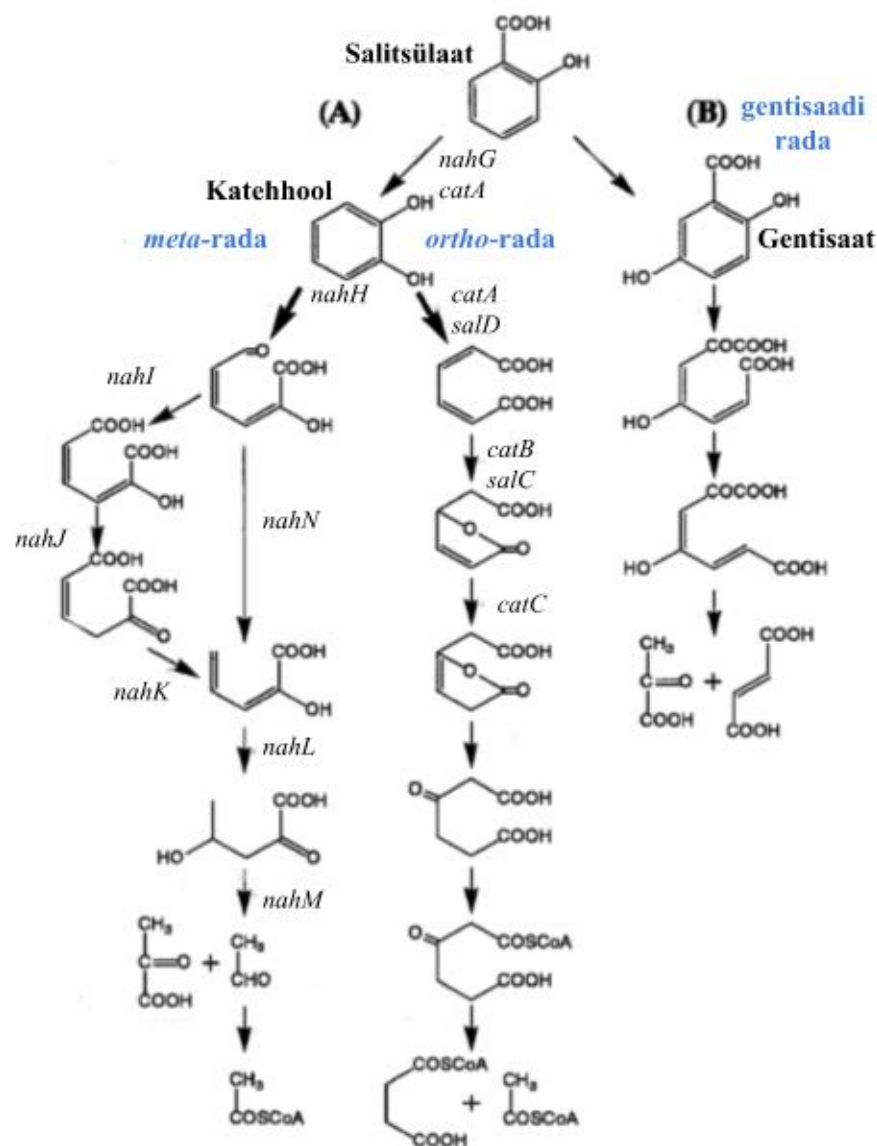
Naftaleeni ensümaatiline lagundamine bakterites toimub kahes etapis. Esimeste reaktsioonide tulemusena lõhutakse üks benseenituumadest ning tekib salitsülaad, mis seejärel lagundatakse üle katehooli või gentisaadi tsitraaditsükli vaheühenditeks (Serdar ja Gibson, 1989). Naftaleeni lagundamisrada on põhjalikult uuritud *Pseudomonas putida* tüves G7, kus naftaleeni lagundamisel salitsülaadiks osalevad kataboolsed ensüümid on kodeeritud plasmiidis NAH7 paiknevalt *nahABCDEF* operonilt (Joonis 1), edasiste reaktsioonide katalüüsimiseks kodeeritakse *sal* operoni geene (Seo *et al.*, 2009). Mõlema operoni geenide avaldumist reguleerib salitsülaadist positiivselt sõltuv *nahR* geen. Lagundamine, sarnaselt teistele aromaatsetele ühenditele, saab alguse aine hüdroksüleerimisega oksügenaaside abil (Joonis 2). Naftaleeni multikomponentne dioksügenaas (*nahAaAbAcAd*) ründab benseenituumat, mille

tagajärjel tekib hüdroksüleeritud *cis*-(1R,2S)-1,2-dihüdronaftaleen. Tekkinud dihüdrodioli dehüdrogeenimisel *cis*-dihüdrodioli dehüdrogenaasiga (*nahB*) on saaduseks 1,2-dihüdroksünaftaleen, mille benseenituuma lõikamisel dihüdroksünaftaleeni dioksügenaasiga (*nahC*) tekib 2-hüdroksükromeen-2-karboksülaad. Reaktsioon 2-hüdroksükromeen-2-karboksülaadi isomeraasiga (*nahD*) muudab 2-hüdroksükromeen-2-karboksülaadi hüdroksübensüülpüruvaadiks, millest 2-hüdroksübensüülpüruvaadi aldolaasi (*nahE*) poolt läbiviidud reaktsiooni tulemusena tekivad salitsüülaldehüüd ning püruvaat. Edasistes metaboolsetes reaktsioonides lagundatakse salitsüülaldehüüd salitsüülaldehüüdi dehüdrogenaasi (*nahF*) abil salitsülaadiks (Seo *et al.*, 2009, Travkin ja Solyanikova, 2021).

### 1.3 Salitsülaadi lagundamine

Salitsülaad on osaks metabolismist nii taimedel, loomadil kui ka mikroorganismidel. Taimehormoonina kaitseb salitsülaad taime läbi süsteemse omandatud resistentsuse ning osaleb teiste seas viljade valmimise ning seemnete idanemise protsessis (Koo *et al.*, 2020). Ühendit kasutatakse aspiriini, mittesteroidse põletikuvastase valuvaigisti, sünteesi lähteainena (Price *et al.*, 2000). Taimi, mis sisaldavad salitsülaati, on meditsiiniliselt kasutatud tuhandeid aastaid. Hippokrates - Vana-Kreeka arstiteaduse edasiarendaja - leidis, et pajukoore manustamine sünnitavatele emadele mõjub valu vaigistavalt, sama efekt esines ka papli ja mürdi puhul (Rainsford, 1984). On leitud, et salitsülaadil on ennetav efekt nii jämesoole- kui ka söögitoruvähile, ühend on võimeline indutseerima apoptoosi leukeemia rakkudes. Samuti võib salitsülaad indutseerida bakterites antibiootikumide resistentsust läbi muutuste membraanproteiinide sünteesis. Antibiootikumide kuhjumine rakus on seetõttu madalam. (Price *et al.*, 2000)

Salitsülaad on naftaleeni, aga ka teiste aromaatsete ühendite, näiteks fenantreeni lagundamisel keskseks vaheühendiks (Singleton *et al.*, 2005). Just salitsülaadi hüdroksülaaside abil on võimalik konverteerida salitsülaad katehooliks või gentisaadiks. Viimaste lagundamist viivad läbi dioksügenaasid, katalüüsides intra- või ekstradioolset benseenituuma lõhkumist. Alifaatne hape, mis reaktsioonide saaduseks on, degradeeritakse edasi bakterile olulisteks metaboliitideks (Pollmann, 2002).



Joonis 3. Salitsülaadi lagundamine katehhooli (A) *meta* ja *ortho* raja kaudu ning üle gentisaadi (B) (Habe ja Omori, 2003, modifitseeritud). Lagundamisel ekspresseeritavad geenid on välja toodud vastavalt *meta* rajal *Pseudomonas putida* G7 ning *ortho* rajal *Pseudomonas reinekei* MT1 näitel (Chakrabarty, 1972; Sota *et al.*, 2006 põhjal).

Mikroobidel on mitmeid variante salitsülaadi lagundamiseks. Pseudomonaadidel esinevad degradeerimisrajad üle katehhooli *meta* ja *ortho* raja (Joonis 3) (Kilpi *et al.*, 1982). Sel juhul lagundatakse salitsülaad flaviin-sõltuva monoooksügenaasi, salitsülaadi 1-hüdroksülaasi (SH), abil, mis katalüüsib salitsülaadi samaaegset dekarboksüleerimist ja hüdroksüleerimist katehhooliks kasutades molekulaarset hapnikku, NADH ja FAD (Costa *et al.*, 2019). *Pseudomonas putida* tüves G7 on nimetatud ensüüm kodeeritud plasmidi NAH7 *sal* operonis

asetseva *nahG* geeni poolt (Joonis 1). *Pseudomonas stutzeri* tüvel AN10 on kaks salitsülaadi 1-hüdroksülaasi kodeerivat geeni - *nahG* ja *nahW*, mis on mõlemad reguleeritud *nahR* poolt (Bosch *et al.*, 1999). Geen *nahG* asub kromosoomis paiknevas klassikalises *sal* operonis, olles osa naftaleeni lagundamise alumisest rajast. *nahW* asub kahe IS5-laadse insertioonialemendi vahel, *sal* operonist 3-kb kaugusel, aidates tüvel taluda kõrgemaid salitsülaadi kontsentratsioone (Lanfranconi *et al.*, 2009). Bosch jt. (1999) leidsid, et *Pseudomonas stutzeri* tüve AN10 *nahG* kuulub omaduste tõttu, nende seas paiknemine teiste naftaleeni lagundamises osalevate geenide suhtes, samasse salitsülaadi hüdroksülaaside gruppi kui *Pseudomonas putida* G7 *nahG*. Samas AN10 geenil *nahW* puudub erinevalt eelnevalt nimetatud geenidest N-terminaalse kofaktori seondumiskoht (GxGxxG), mistõttu rühmitub see teistest salitsülaadi 1-hüdroksülaasidest fülogeneesipuul eraldi. Samuti märgati kahe hüdroksülaasi puhul erinevat substraadispetsiifikat - NahG näib omavat sarnast efektiivsust nii salitsülaadi kui metüülsalitsülaadi lagundamisel, samas kui NahW eelistab substraadina metüülsalitsülaatide asemel klorosalitsülaate.

*Pseudomonas reinekei* tüvi MT1 lagundab salitsülaati ja kloro- või metüülsalitsülaate *sal* klastrilt kodeeritavate salitsülaadi 1-hüdroksülaasi (*salA*) ja katehhooli 1,2-dioksügenaasi (*salD*) abil (Joonis 3). Geeni *salA* reguleerivad *Pseudomonas putida* tüve G7 paikneva *nahR* geeniga homoloogsed *SalR1* ja *SalR2*, mis kuuluvad LysR perekonna regulaatorvalkude hulka. (Cámara *et al.*, 2007)

Lisaks katehhooli *meta* ja *ortho* rajale on avastatud ka alternatiivne salitsülaadi lagundamisrada üle gentisaadi (Joonis 3) (Habe ja Omori, 2003). *Ralstonia* sp. tüvi U2 on üks enim uuritud gentisaadi raja kasutajatest, mis lagundab salitsülaati monohüdroksüleerides ainet salitsülaadi 5-hüdroksülaasiga (Fang ja Zhou, 2013).

Gram-positiivsed bakterid ei ole üldjuhul võimelised naftaleenist salitsülaati moodustama, näiteks *Rhodococcus opacus* M213 lagundab naftaleeni *ortho*-ftalaadiks, mis seejärel lagundatakse protokatehhuuadi *ortho* rajal (Travkin ja Solyanikova, 2021).

#### 1.4 Dioksügenaasid

Dioksügenaasid on dihüdroksüaromaatsete ühendite, katehhooli, gentisaadi, protokatehhuuadi jt, benseenituuma lõhkumisel keskseteks ensüümideks. Vastavalt dioksügenaaside töömehhanismile ja omadustele jagunevad ensüümid ekstradioolseteks ehk *meta*-tüüpi ja intradioolseteks ehk *ortho*-tüüpi dioksügenaasideks (Harayama ja Rekik, 1989; Habe ja Omori, 2003).

Intradioolsed dioksügenaasid, näiteks katehhooli 1,2-dioksügenaas (C12O), protokatehhuadi 3,4-dioksügenaas (PC34O) ja klorokatehhooli 1,2-dioksügenaas (CC12O), kasutavad kofaktorina Fe<sup>3+</sup> ning on struktuurilt helikaalse tõmbelukuga ühendatud homodimeerid (Ladino-Orjuela *et al.* 2016; Vetting ja Ohlendorf, 2000). Benseenituum lõigatakse nende ensüümide poolt katki kahe hüdroksüülrühma omava süsiniku vahelt ehk hüdroksüülrühmade suhtes *ortho* asendis, C12O puhul tekib katehhoolist *cis*, *cis*-mukoonhape (Joonis 3), mis konverteeritakse suksinaadiks ja atsetüül-CoA-ks (Harayama ja Rekik, 1989; Williams ja Sayers, 1994).

*Pseudomonas* sp. MT1 lagundab salitsülaate üle katehhooli ning benseenituum lõhutakse katehhooli 1,2-dioksügenaaside (*catA*, *salD*) abil (Joonis 3). Mukoonhappe tsükloisomeraas (*catB*, *salC*) katalüüsib *cis,cis*-mukoonhappe laktoniseerimist tsükliiliseks mukonolaktooniks. Ühendi isomerisatsioonil mukonolaktooni isomeraasi (*catC*) abil tekib β-ketoadipaatenoollaktoon, mille hüdrolüüsil β-ketoadipaatenoollaktooni hüdrolaasiga on saaduseks 3-oksoadipaate (Cámara *et al.*, 2007; Nikodem *et al.*, 2003). Lõppsaadusteks on suksinüül-CoA ning atsetüül-CoA. (Mohapatra ja Phale, 2021) Lisaks kasutab MT1 5-klorosalitsülaadi lagundamisel klorokatehhooli 1,2-dioksügenaasi (*ccaA*) ja kloromukoonhappe tsükloisomeraasi (*ccaB*), mis samuti substraadi 3-oksoadipaadiks suunavad (Cámara *et al.*, 2009).

Sarnaselt varem mainitud *Pseudomonas putida* tüvega mt-2, mille redundantset dioksügenaasid aitavad rakkudel taluda kõrgemaid katehhooli kontsentratsioone, nägid Li jt. (2018) sarnast efekti ka mitut intradioolset dioksügenaasi omava *Pseudomonas putida* tüve ND6 uurimisel (Jiménez *et al.*, 2014). Neli redundantset C12O kodeerivat *catA* geeni tõstavad bakteri vastupidavust katehhooli sisaldavas keskkonnas. *catA* geeniekspressiooni tase ning katehhooli 1,2-dioksügenaasi ensüümiaktiivsus tüves viitavad kõrgematele ensüümitasemetele. Katehhooli dioksügenaase kodeerivate geenide redundanttsus võib seega bakterile tagada eelise tsütotoksiliste katehhooli kontsentratsioonidega keskkonnas. (Li *et al.* 2018)

Ekstradioolsed dioksügenaasid, näiteks katehhooli 2,3-dioksügenaas (C23O), kasutavad kofaktorina Fe<sup>2+</sup> ning erinevalt intradioolsetest dioksügenaasidest, lõikavad benseenituum katki süsinike vahelt, millest vaid üks omab hüdroksüülrühma ehk hüdroksüülrühma suhtes *meta* asendis (Ladino-Orjuela *et al.* 2016). C23O toimetel tekib katehhoolist kollast värvi 2-hüdroksümukonosemialdehüüd (HMS; neeldumisspektri piigi maksimum 375 nm) (Joonis 3), mis lagundatakse raja lõpuks püruvaadiks ja atsetüül-CoA-ks (Williams ja Sayers, 1994). Salitsülaadi lagundamine *Pseudomonas putida* tüves G7 toimub üle katehhooli ning benseenituumal lõhkumisel C23O-ga (*nahH*) tekib 2-hüdroksümukonosemialdehüüd (Joonis 3).

Aine hüdrolüüsil 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi hüdrolaasiga (*nahI*) tekib 2-hüdroksümukoonhape, mille isomerisatsiooni tagajärjel 4-oksalokrotanaadi isomeraasiga (*nahJ*) moodustub 4-oksalokrotanaat. Viimase dekarboksüleerimisel 4-oksalokrotanaadi dekarboksülaasiga (*nahK*) on produktiks 2-okso-4-pentenoaat. (Habe ja Omori, 2003) Alternatiivses rajas toimub 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi lagundamine 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi hüdrolaasiga (*nahN*) ning reaktsiooni tulemusena tekib kohe 2-okso-4-pentenoaat. Järgnevad etapid, kus 2-okso-4-pentenoaadi hüdrataasi (*nahL*) toimel saadakse 4-hüdroksü-2-oksopentanaat, mille 4-hüdroksü-2-oksopentanaadi aldolaas (*nahM*) lagundab püruvaadiks ja atsetaldehyüdiks, mis viiakse üle atsetüül-CoA-ks (Joonis 3) (Habe ja Omori, 2003; Mohapatra ja Phale, 2021).

Ekstradioolsed dioksügenaasid on laiema substraadispetsiifikaga kui intradioolsed dioksügenaasid, kuna viimased lõikavad vaid kahe hüdroksüülrühma omava süsiniku vahelist sidet. Seetõttu on ekstradioolsed dioksügenaasid lisaks katehoolile võimelised lagundama näiteks ka salitsülaati, gentisaati ja 2-aminofenooli (Vaillancourt *et al.*, 2006). Oluliseks ekstradioolseks dioksügenaasiks salitsülaatide lagundamisel on katehooli 2,3-dioksügenaas (C23O) (Ladino-Orjuela *et al.* 2016), mis on levinud ensüüm mitmetes bakterite perekondades, kaasa arvatud *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Gordonia* ja *Thauera* (Zeng *et al.*, 2020). Salitsülaadi lagundamisel katehooli 2,3-dioksügenaasi kasutavad tüved omavad tihti sarnaseid operone põhjalikult uuritud *Pseudomonas putida* G7 NAH7 plasmidi *sal* operoniga (*nahGTHINLOMKJXY*). Ühised jooned viitavad horisontaalsele geeniülekandele (Sota *et al.*, 2006).

### 1.5. Klorokatehoolide lagundamine

Antropogeense päritoluga kloroaromaatsed ühendid on keskkonda sattudes üldiselt püsivad ja otseselt elusloodusele kahjuliku mõjuga. Põhilisteks saasteallikateks on keemiatööstused, kus kloroühenditest sünteesitakse teiste seas värve, fungi- ja pestitsiide ning ravimeid. (Olaniran ja Igbiosa, 2011) Kloroaromaatsete ühendite lagundamist on näiteks näidatud bakterite perekondades *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Empedobacter* ja *Achromobacter* (Rojo *et al.*, 1987; Pieper *et al.*, 2010; Bobadilla Fazzini *et al.*, 2008).

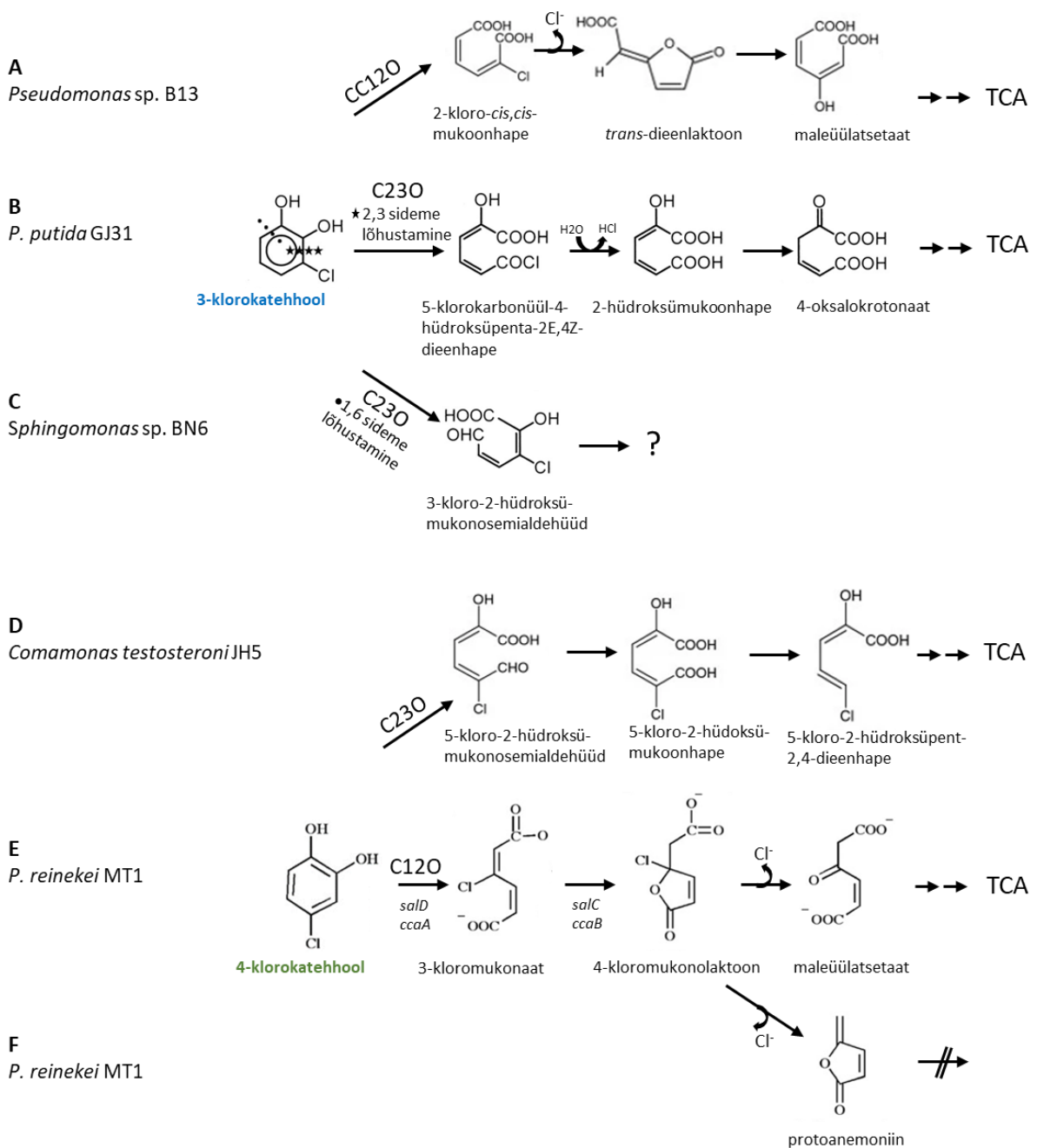
Kui metüülkatehoolid metaboliseeritakse enamasti katehooli *meta* rajas, siis klorokatehoolide puhul toimub lagundamine tavapäraselt katehooli *ortho* rajas (Pieper *et al.*, 2010). Lisaks leidub ka spetsiifilise klorokatehooli *ortho* rajaga tüvesid, kus klorokatehooli 1,2-dioksügenaasi toimel tekkinud *cis,cis*-kloromukoonhapet lagundavad edasi mukoonhape

tsükloisomeraasidega homoloogilised kloromukoonhappe tsüklo- isomeraasid. Viimased viivad läbi ka dehalogeenimise ja moodustub dieenlaktoon (Sander *et al.*, 1991).

Kuigi nii C23O kui ka C12O on suutelised lagundama vastavalt kloro- ja metüülkatehhoole, on lagundamine sel juhul tihti osaline ning tekivad järgnevatele ensüümidele sobimatud ja protsessi aeglustavad vaheühendid (Pieper *et al.*, 2010). Näiteks ei ole mukoonhappe tsükloisomeraasid võimelised erinevalt kloromukoonhappe tsükloisomeraasidest 2-kloro-*cis,cis*-mukoonhapet dehalogeenima üle 5-kloromukoonlaktooni *trans*- dieenlaktooniks, vaid konverteerivad aine 2-kloromukoonlaktooni ja 5-kloromukoonlaktooni seguks. See aga takistab edasist dehalogeenimis- ning degradeerimisprotsessi (Vollmer *et al.*, 1994). Mukoonhappe tsükloisomeraaside evolutsiooniline areng kloromukoonhappe tsükloisomeraasideks on olnud keerukas protsess. On tõstatatud hüpotees, et antud ensüümid on aine dehalogeenimise eesmärgil omandanud eraldiseisva katalüütilise võimekuse substraadi laktoongrupi ümberpaigutamiseks. (Vollmer *et al.*, 1998)

Järgnevalt toome näiteid erineva kloriidrüüma asetusega klorokatehhoolid lagundamisradadest. 3-klorokatehhooli lagundamist on näidatud teiste seas *Pseudomonas putida* GJ31, *Pseudomonas* sp. MG61, *Pseudomonas fluorescens* SK1 ning *Pseudomonas veronii* 16-6A puhul, kus C23O abil 3-klorokatehhooli benseenituumale lahti lõikamisega samaaegselt viiakse läbi ka deklorimine (Joonis 4B). Reaktsiooni saaduseks on 2-hüdroksü-*cis,cis*-mukoonhappe, mida on rakud võimelised täielikult lagundama. (Kaschabek *et al.*, 1998; Arora ja Bae, 2014). Kaschabek jt. (1998) kirjeldavad *Pseudomonas putida* GJ31 ekspresseeruvat klorokatehhooli 2,3-dioksügenaasi, mis erinevalt teistest katehhooli 2,3-dioksügenaasidest lagundab 3-klorokatehhooli suurtes kogustes ilma märgatavate tsütotoksiliste efektideta. Siiski on 3-klorokatehhooli lagundamine *meta* rajas sageli võimatu kuna 3-klorokatehhoole ja selle benseenituumale lõikamisel tekkiva reaktiivse atsüülkloriidi (5-klorokarbonüül-4-hüdroksü-penta-2E,4Z-dieenhape) tsükleerimisel tekkiv produkt inaktiveerivad C23O ja peatavad raja tegevuse. Lisaks on bakteris kuhjuval 3-klorokatehhoolil ja selle auto-oksüdatsioonil tekkivatel ühenditel rakule tsütotoksiline efekt. (Kaschabek *et al.*, 1998)

*Sphingomonas* sp. BN6 lagundab 3-klorokatehhoole C23O-ga, kuid erinevalt *Pseudomonas putida* tüvest GJ31 lõikab benseenituumale katki 1 ja 6 süsiniku vahelt ning tekib 3-kloro-2-hüdroksümukonosemialdehüüd (Joonis 4C). Aine on kromofoorsete omaduste (neeldumisspektri piigi maksimum 378 nm) poolest sarnane katehhoole lagundamisel tekkiva 2-hüdroksümukonosemialdehüüdiga (HMS). Kuigi tüve BN6 C23O lagundab 3- klorokateh-



Joonis 4. 3- ja 4-klorokatehooli lagundamisrajad *Pseudomonas* sp. B13 (A), *Pseudomonas putida* GJ31 (B), *Sphingomonas* sp. BN6 (C), *Comamonas testosteroni* JH5 (D) ja *Pseudomonas reinekei* MT1 (E ja F) näitel (Heiss *et al.*, 1995; Blasco *et al.*, 1997; Kaschabek *et al.*, 1998 põhjal).

hooli on ensüümi aktiivsus võrreldes katehooliga kümme korda madalam. (Heiss *et al.*, 1995)

3-klorokatehooli lagundamisel *ortho* rajas C120-ga või korokatehooli 1,2-dioksügenaasiga (CC120) on saaduseks 2-kloro-*cis,cis*-mukoonhape, mille isomerisatsioonil kloromukoonhappe tsükloisomeraasiga dehalogeenitakse aine üle 5-kloromukoonlaktooni *trans*-dieenlaktooniks. *trans*-dieenlaktooni hüdrolaasi abil tekib sellest maleüülatsetaat, mis siseneb 3-oksoadipaadi lagundamise ratta (Joonis 4A). (Pieper *et al.*, 2010)

Cámara jt. (2007) näitavad oma uurimustöös, et *Pseudomonas* sp. MT1 lagundab nii 4- kui ka 5-klorosalitsülaati üle 4-klorokatehhooli, mis seejärel C12O (*salD*) abil 3-kloromukoonhappeks lagundatakse (Joonis 4E). Järgmises etapis tekib 4-kloromukonolaktoon, mis võib spontaanselt minna üle protoanemoniiniks (Joonis 4F), millel on tsütotoksiline efekt bakterirakkudele (Nikodem *et al.*, 2003). Kui *trans*-dieenlaktooni hüdrolaas suudab aga 4-kloromukonolaktooni viia maleüülatsetaadiks, jätkub lagundamine samamoodi kui klassikalises *ortho* rajas. Lisaks esinevad tüvel MT1 5-klorosalitsülaadi lagundamiseks eraldi klorokatehhooli 1,2-dioksügenaas (*ccaA*) ning kloromukoonhappe tsükloisomeraas (*ccaB*). (Cámara *et al.* 2009)

4-klorokatehhoolist C23O toimetel tekkiv 5-kloro-2-hüdroksümukonosemialdehüüd (KHMS) on kirjanduse andmetel enamasti tupikühend, mida rakud lagundada ei suuda (Joonis 4C) (McLaughlin *et al.*, 2006). Siiski on kirjeldatud mõningaid tüvesid, näiteks *Comamonas testosteroni* JH5 (Hollender *et al.*, 1997), mis on võimelised KHMS lagundama. KHMS ladestumine söötmes muudab lahuse laimikollaseks (neeldumisspektri piigi maksimum 380 nm), seega on värvimuutuse põhjal lihtne tuvastada C23O olemasolu ja aktiivsust. McLaughlin *et al.*, (2006) näitasid, et *Pseudomonas putida* tüve A kasvatamisel 4-klorofenooli sisaldaval söötmel koguneb samal ajal substraadi kasutamise ajal keskkonda KHMS. Värvilise vaheühendi kontsentratsioon saavutas maksimumi kui kogu substraat oli söötmest kasutatud ning selle kontsentratsioon hakkas vähenema kui kloriidioonide kontsentratsioon oli saavutanud maksimaalse väärtuse.

Lisaks värviliste vaheühendite tekkele katehhooli *meta* rajas võib söötme värv muutuda ka vaid katehhooli *ortho* rada omavate tüvede korral. Sageli toimub just lahuste tumenemine ning seda põhjustavad söötmesse kuhjunud katehhooli autooksüdatsiooni tulemusel tekkinud polümeersed ühendid. Reaktsiooni tulemusel küll katehhooli kontsentratsioon lahuses väheneb, kuid tegemist on abiootilise protsessiga. (McLaughlin *et al.*, 2006; Farrell ja Quilty, 1999)

#### 1.6 Naftaleeni ja salitsülaadi lagundamine perekonna *Pseudomonas* liikides

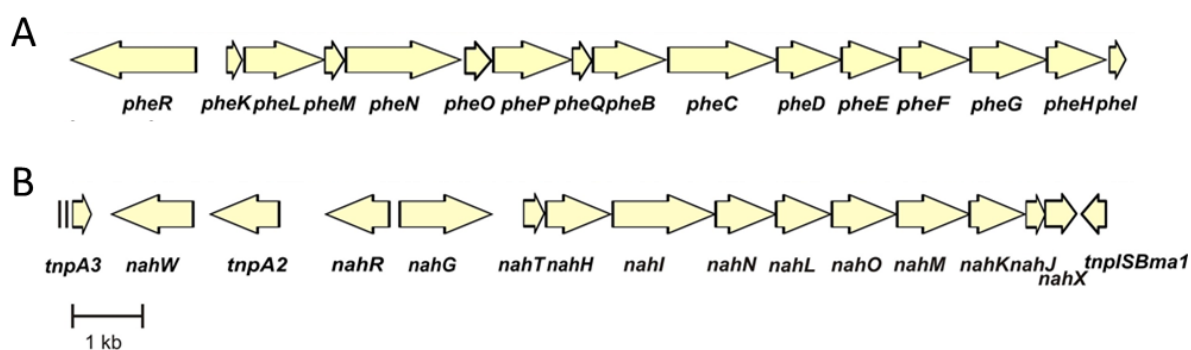
*Pseudomonas*'e perekond on üks mitmekesisemaid bakteriperekondi, pseudomonaadide levik on laialdane ja metabolism varieerub vastavalt keskkonnale (Spiers *et al.*, 2000). Paljudel sellesse perekonda kuuluvatel tüvedel on leitud *Pseudomonas putida* G7 naftaleeni lagundamise ülemise raja ehk *nah* operoni geenide homolooge, mis esinevad tavaliselt klasterdunult (Mohapatra ja Phale, 2021).

### 1.6.1 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70

*Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüvi C70 eraldati Eeva Heinaru poolt 2008. aastal, Läänemere Narva lahe pindmisest veekihist. Tüvi kasutab süsiniku- ja energiaallikana fenooli, naftaleeni ja salitsülaati. *P. pseudoalcaligenes* tüvel C70 on kaks kromosomaalset katehhooli *meta* rada, mis on indutseeritavad vastavalt salitsülaadi ja fenooli poolt. Lisaks on tüvel kaks salitsülaadi 1-hüdroksülaasi kodeerivat geeni, *nahG* ja *nahW*, mis paiknevad naftaleeni lagundamise raja alumises *sal* (*nahGTHINLOMKJX*) operonis (Joonis 5B). Tervel operonil on mitmeid sarnasusi *Pseudomonas stutzeri* tüves AN10 kirjeldatud kromosomaalse operoniga. Näiteks on mõlema tüve kahe salitsülaadi 1-hüdroksülaasi aminohappelised järjestused identsed. Lisaks paiknevad nii *sal* operon kui ka *nahW* insertioonelementide vahel, mis viitab horisontaalsele geeniülekandele. (Jõesaar *et al.*, 2017)

Tüvel C70 on ka kaks redundantset katehhooli 2,3-dioksügenaasi. Esimene neist, NahH, on kodeeritud *sal* operonis asuvalt *nahH* geenilt ja teine, PheB, *phe* operonis paikneva *pheB* geeni poolt. Fenooli lagundamist katalüüsivaid ensüüme kodeerivatest geenidest koosnev *pheRKLMNOPQBCDEFGHI* operon (Joonis 5A) on sarnane *Pseudomonas* sp. tüves CF600 paikneva *dmp* operoniga ning omab XylR perekonna regulaatorgeeni *pheR*. (Jõesaar *et al.*, 2017)

Redundantsus nii salitsülaadi 1-hüdroksülaaside kui ka katehhooli 2,3-dioksügenaaside suhtes annab tüvele lagundamisel eelise, sealjuures nii fenooli, naftaleeni kui ka kahe aine segu sisaldavas keskkonnas. Kuna naftaleeni ja fenooli segul kasvaval tüvel C70 on indutseeritud nii *sal* kui ka *phe* operon, ekspresseeritakse mõlema raja C230-d. Kultuur on seega võimeline lagundama substraatide kõrgemaid kontsentratsioone, mistõttu ei ladestu tsütotoksiline katehhool keskkonda. (Jõesaar *et al.*, 2017)

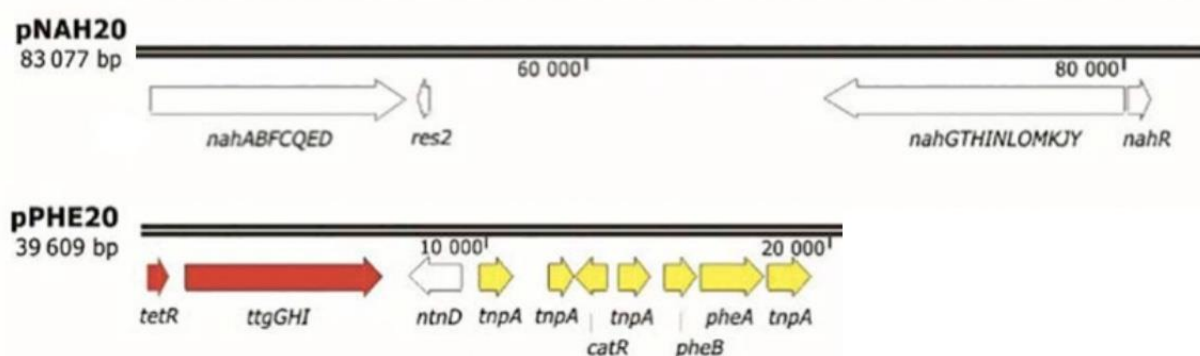


Joonis 5. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve C70 fenooli lagundamise *phe* (A) ja naftaleeni lagundamise alumise ehk *sal* (B) operoni struktuur. (Jõesaar *et al.*, 2017)

### 1.6.2 *Pseudomonas fluorescens* PC20

*Pseudomonas fluorescens* tüvi PC20 eraldati põlevkivitööstuse piirkonda läbiva reostunud Kohtla jõe veest, Ida-Virumaalt 1994. aastal Eeva Heinaru poolt. Tüvi omab kolme mobiilset plasmidi. pNAH20 asetsevad vastavalt naftaleeni ning salitsülaadi ja pPHE20 fenooli lagundamiseks vajalikke ensüüme kodeerivad geenid (Joonis 6) (Elken *et al.*, 2020).

pNAH20 on 83 042 aluspaari pikk IncP-9 tüüpi plasmiid, millel on nii suuruse kui järjestuse poolest märgatavaid sarnasusi *P. putida* tüve G7 NAH7 plasmiidiga. Plasmiidil pNAH20 paiknevad geenid *nahG* ja *nahH*, mis kodeerivad vastavalt salitsülaadi 1-hüdroksülaasi ja katehhooli 2,3-dioksügenaasi. Teine plasmiid, 39 609 aluspaari pikk pPHE20, omab vajalikke gene fenooli lagundamiseks. Geenid *pheA* ja *pheB* kodeerivad vastavalt fenooli monooksügenaasi ja katehhooli 1,2-dioksügenaasi. (Heinaru *et al.*, 2009; Elken *et al.*, 2020) Lisaks plasmiidset päritolu C23O-le (*nahH*) ja C12O-le (*pheB*) omab *P. fluorescens* PC20 ka kromosomaalset katehhooli 1,2-dioksügenaasi (*catA*) *catRBCA* operonis, mistõttu on tüvi C12O-de suhtes redundantne (Elken *et al.*, 2020).

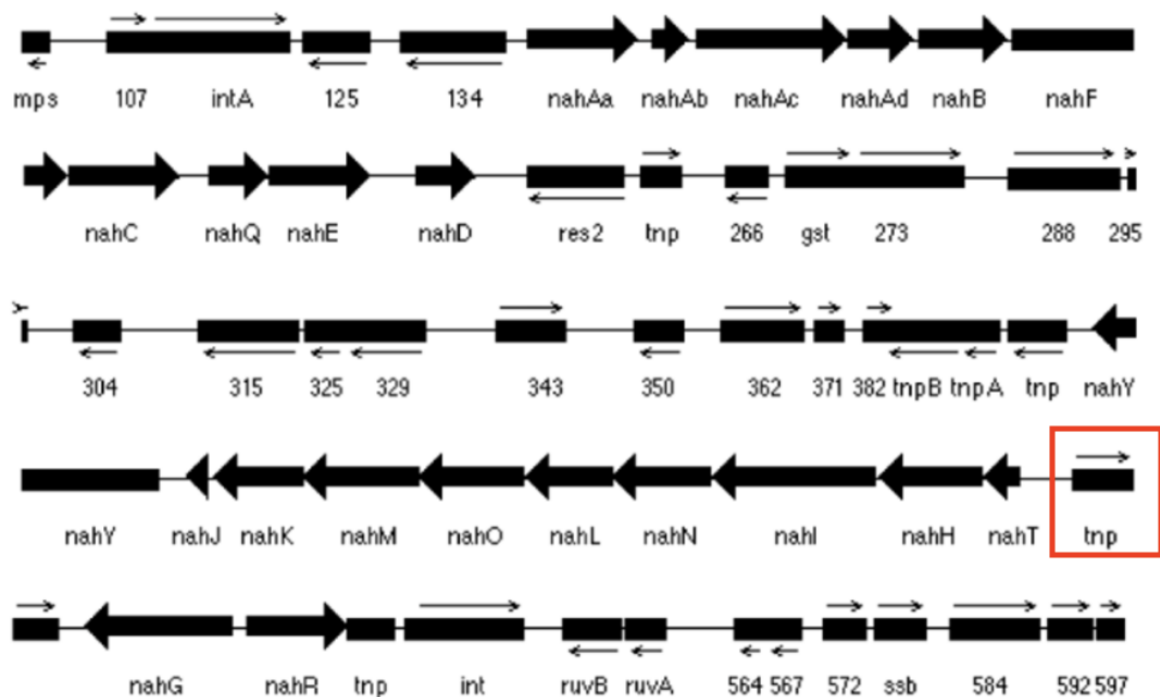


Joonis 6. *Pseudomonas fluorescens* tüves PC20 naftaleeni ja fenooli lagundamist katalüüsivaid ensüüme kodeerivate geenide paiknemine vastavalt pNAH20 ja pPHE20 plasmiidil (Elken *et al.*, 2020).

### 1.6.3 *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4

*Pseudomonas putida* tüvi NCIB 9816-4 eraldati aiamaalast 1964. aastal (Davies ja Evans, 1964). Hilisemal analüüsil selgus, et laborites on tekkinud NCIB 9816 alatüved, mis erinesid naftaleeni katabolismi ja plasmiidide arvu poolest. Serdari ja Gibsoni (1989) kirjeldatud *Pseudomonas putida* tüvi NCIB 9816-4 lagundab nii naftaleeni kui ka salitsülaati ning sisaldab plasmidi pDTG1 (83 042 aluspaari pikk), mis sarnaneb *Pseudomonas fluorescens* PC20 plasmidi pNAH20-ga. Erinevused pNAH20 ja pDTG1 vahel tulenevad viimase eripäradest: *sal* operoni geenide *nahT* ja *nahG* vahele on sisenenud insertioonelement, mis naftaleeni

lagundamise alumise raja mittefunktsionaalseks muudab (Joonis 7). Seetõttu rakendatakse tüves naftaleeni lagundamisel kromosomaalse *ortho* raja ensüüme. *meta* raja ensüümid, sealhulgas ka C23O, ekspresseeritakse seevastu pidevalt, kuid vähesel hulgal. (Dennis ja Zylstra, 2004)



Joonis 7. *Pseudomonas putida* tüve *nah* ja *sal* operonide paiknemine plasmiidis pDTG1, insertioonelement (tähistatud punase kastiga) *nahT* ja *nahG* vahel muudab *sal* operoni inaktiivseks (Dennis ja Zylstra, 2004).

### 1.7 Naftaleeni ja salitsülaadi lagundamine segakultuuris

Looduskatastroofi korral keskkonda sattunud inimtekkelistel ühenditel on mõju tervele ümbritsevale elusloodusele. Saasteaine(te) lagundamisel osaleb ühel või teisel moel iga bakterikoosluse liige. Kui nende seas leidub vastavaid kataboolseid radu omavaid tüvesid, siis nende arvukus kasvab ning tüved hakkavad koosluses domineerima. Lagundamise käigus kuhjuvaid vaheühendeid võivad edasi lagundada teised mikroobid ning nii on tagatud kiirem ja efektiivsem saasteainete kontsentratsioonide vähenemine. Suuremõõtmelisemate reostuste puhul ei saa sageli aga looduslikud kooslused lagundamisega hakkama ning seepärast kasutatakse protsessi kiirendamiseks bioaugmentatsiooni, kus kohalikule mikrofloorale lisatakse bakterikultuuri, mille võimekus lagundada saasteainet on kõrge. Siiski on sobiva koosluse komplekteerimine keeruline, sest lagundamisel toimuvad pidevalt muutused koosluse liigilises koosseisus ning mitmekesisuses. (Pawelczyk, *et al.*, 2008)

Pelz jt. (1999) uurisid pideva reostuskoormusega piirkonnast võetud sedimendiproovi koosluse võimet lagundada 4-klorosalitsülaati läbivoolukultuuri tingimustes. Kui kooslus oli stabiliseerunud koosnes see 16S rRNA geeni järjestuste analüüsi põhjal neljast tüvest: *Pseudomonas* sp. MT1 (84%) ja MT4 (1%), *Alcaligenes* sp. MT3 (8%) ning *Empedobacter* sp. MT2 (1%). Selgus, et ainsana suutis lagundada substraati vaid *Pseudomonas* sp. MT1 (katehhooli *ortho* rada) ning tekkinud vaheühendit, 4-klorokatehhooli, kasutas klorokatehhooli *ortho* rajas ära hoopiski *Alcaligenes* sp. tüvi MT3. Lisaks näitasid nad, et tüvi MT4 lagundas MT1 poolt toodetud toksilise protoanemoniini, kuid tüvi MT2 ei ole ilmselt seotud 4-klorosalitsülaadi lagundamisrajaga. Need katsed näitasid, et koosluse moodustavad tüved mõjutavad üksteise metabolismi ja pakuvad kasvueeliseid, mistõttu võib aromaatsete ühendite lagundamine koosluste abil olla vägagi efektiivne lahendus.

Teiseks näiteks segakultuuride kasutamisest klorosalitsülaatide lagundamisel ning selle käigus toimuvatest muutustest bakterite genoomis on Rubio jt. (1989) artikkel. Nimelt näitasid nad, et *Pseudomonas* sp. tüvede B13 (katehhooli 1,2-dioksügenaas; kasvab 3-klorobensoaadil) ja WR401 (katehhooli 2,3-dioksügenaas; kasvab metüülsalitsülaatidel) kasvatamisel 3-klorobensoaadil saadi hübriidtüvi WR4011, kus katehhooli *meta* rada oli inaktiveeritud ning 3-klorokatehhooli lagundamine toimus *ortho* rajas. 4- ja 5-klorosalitsülaatide korral tekib aga 4-klorokatehhool, mis ei ole C23O-le toksiline, ning tüve WR4011 rakkudes toimub selle lagundamine *meta* rajas. Tüve WR4011 adaptatsioonil 5-klorosalitsülaadil saadi mutantne tüvi WR4016, mis lagundas 4- ja 5-klorosalitsülaate *ortho* rajas ning C23O aktiivsus puudus. Tüvedel oli ka erinev salitsülaadi hüdroksülaaside substraadispetsiifilisus, tüvel WR401 oli kõrgem efektiivsus metüülsalitsülaatidega ning klorosalitsülaadil selekteeritud tüvel WR4016 klorosalitsülaatidega indutseerimisel. (Rubio *et al.* 1986)

Aromaatsete ühendite lagundamiseks vajalikke kataboolseid radu omavad tüved võivad seega kooslustes lagundamisel kuhjuvate vaheühendite kasutamisel saavutada kasvueeliseid. Koosluste koostamine on aga keerukas protsess. Liike tuleb valida nõnda, et tüvedevahelised interaktsioonid ning lagundamisprotsessis kuhjuvad vaheühendid mõjuksid kooslusele ja lagundamisradadele positiivselt.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. TÖÖ EESMÄRGID

*Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 on kirjanduse põhjal võimelised naftaleeni ja salitsülaati lagundama. Tüvel C70 on kaks redundantset salitsülaadi 1-hüdroksülaasi (SH) ning kaks redundantset katehhooli 2,3-dioksügenaasi (C23O), tüvel PC20 kaks redundantset katehhooli 1,2-dioksügenaasi (C12O) ning tüve NCIB 9816-4 salitsülaadi lagundamise *meta* raja töö on häiritud. Erinevused lagundamisradades kujundavad tüvede C70, PC20 ja NCIB 9816-4 salitsülaadi lagundamisvõimekuse. Antud töö eesmärgiks on analüüsida erinevate ensümaatiliste omadustega tüvede võimekust lagundada salitsülaati ning klororühmadega salitsülaate üksik- ja segakultuurina.

Selleks et täita töö eesmäärke:

- määrati uuritavate tüvede kasvuparameetrid erinevatel salitsülaatide kontsentratsioonidel;
- võrreldi tüvede kasvu klorosalitsülaate sisaldavatel söötmetel;
- määrati SH, C23O ning C120 kodeerivate geenide ekspressioon salitsülaati või klorosalitsülaate sisaldavatel söötmetel kasvanud rakkudes;
- määrati SH, C23O ning C120 ensüümiaktiivsused salitsülaati või klorosalitsülaate sisaldavatel söötmetel kasvanud rakkudes;
- analüüsiti vaheühendite (KHMS ja HMS) kogunemist üksik- ja segakultuurides.

## 2.2. MATERJAL JA METOODIKA

### 2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved

Antud töös kasutati tüvesid, mis pärinevad Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis asuvast looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioonist (CELMS - Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains). CELMS-i andmebaas asub aadressil <http://eemb.ut.ee>. Andmebaasis on kasutatud tüved märgistatud kui EEUT C70 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70), EEUT PC20 (*Pseudomonas fluorescens* PC20) ja EEUT NCIB 9816-4 (*Pseudomonas putida* NCIB 9816-4). Tüvesid kasvatati 30 °C juures ning säilitati söötmeplaatidel 4 °C juures.

### 2.2.2. Bakteritüvede kasvatused kolbides

Tüvesid kasvatati üleöö 25 ml R2A söötmes (pärmiekstrakt, peptoon, CAA, glükoos, tärklis, Na-püruvaat, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>), millele oli lisatud 2,5 mM salitsülaati. Inokulumi jaoks tsentrifuugiti rakud (8000 rpm, 4 °C) ning eemaldati supernatant. Seejärel suspendeeriti rakud 6 ml füsioloogilises lahuses (0,9 % NaCl) ja mõõdeti optiline tihedus 580 nm juures Ultrospec 7500 (Biochrom) spektrofotomeetriga. Sissekülvid 250 ml kolbidesse, kuhu oli kantud 50 ml R2A söödet koos salitsülaadi, 3-, 4- või 5-klorosalitsülaadiga (3 mM), tehti arvestusega, et söötme neelduvus oleks  $A_{580\text{ nm}} \sim 0,1$ . Bakterikultuure kasvatati loksutil (30 °C; 150 rpm). Iga tunni järel mõõdeti bakterite kasvu ( $A_{580\text{ nm}}$ ) ning rakuvabade proovide neeldumisspektreid (300 kuni 600 nm) vaheühendite kogunemise jälgimiseks Ultrospec 7500 (Biochrom) spektrofotomeetriga. Katset viidi läbi vähemalt kaks korda. Joonistel on toodud esindusjoonised ühest kasvatusest.

### 2.2.3. Bakteritüvede kasvuparameetrite määramine

Tüvede kasvuparameetrite määramiseks tehti kasvatused 96 kannuga mikrotiiterplaatidel (Greiner Bio-One Cellstar, 655185). Põhi ehk baassöötmetena kasutati R2A söödet, millele lisati 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati (Sigma-Aldrich, puhtuseaste 93-98%) lõpp-kontsentratsiooniga 1, 2 ja 3 mM. Iga substraadiga tehti kõikidel kontsentratsioonidel paralleelselt 8 kannu 150 µl söötmega, millest üks jäeti abiootiliseks kontrolliks. Seitsmesse kannu tehti sissekülv üleöö kultuurist arvestusega, et lahuse neelduvus lainepikkusel 580 nm oleks 0,03. Kasvukõverate mõõtmisel kasutati termostateeritud (30 °C) POLARstar Omega mikrotiiterplaadi lugejat (BMG Labtech), mis registreeris iga 7 minuti järel proovide neelduvused 580 nm juures. Katset viidi läbi kaks korda. Kasvukiirused arvutati

poollogaritmilise teljestikuga graafikutelt eksponentsiaalsest kasvufaasist ning on esitatud joonistel koos standardhällbega.

#### 2.2.4. Tüvede märgistamine GFP reportergeeniga

Märgistamiseks tüvesid GFP (*Green Fluorescence Protein*) markeriga, kasutati gentamütsiini (Gm) resistentsusgeeni sisaldavat plasmidi pBK-miniTn7-*gfp* (Koch *et al.*, 2001; Lambertsen *et al.*, 2004). Plasmid viidi *Escherichia coli* CC118λpir (Herrero *et al.*, 1990) tüvest *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 tüvedesse konjugatsiooni meetodil. Protsessis kasutati lisaks konjugatiivset abiplasmidi pRK2013 (Figurski ja Helinski, 1979) sisaldavat *E. coli* HB101 (Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969) ja mini-Tn7 transponeerumiseks vajalikku abiplasmidi pUXBF13 sisaldava *E. coli* AKN68 rakke (Bao *et al.*, 1991).

Retsipient tüvesid kasvatati üleöö (30 °C, 150 rpm) 1,5 ml LB söötmel. *E. coli* tüvede CC118λpir, HB101 ja AKN68 kasvatamisel (üleöö, 37 °C, 150 rpm) lisati 1,5 ml-le LB söötmele vastavalt gentamütsiini (Gm 10 µg ml<sup>-1</sup>), kanamütsiini (Km 50 µg ml<sup>-1</sup>) või ampitsilliini (Amp 150 µg ml<sup>-1</sup>). Üleöö kasvanud kultuuridest (retsipient ja kolm *E. coli* tüve) pipeteeriti 100 µl Eppendorfi tuubi, misjärel kanti segust tilkkülvina 400 µl LB tardsöötmele ning asetati söötmeplaat kasvama 30 °C juurde. Järgmisel päeval suspendeeriti biomass 1 ml füsioloogilises lahuses, rakud tsentrifuugiti (8000 rpm; 3 min) tuubi põhja, eemaldati supernatant ning rakud suspendeeriti uuesti 1 ml füsioloogilises lahuses. Transkonjugantide eraldamiseks külvati saadud lahusest 100 µl suspensiooni tüvede PC20 ja C70 korral fenooli (1,3 mM) ning tüve NCIB 9816-4 korral glükoosi (0,2%) minimaalsöötme plaatidele, kuhu oli lisatud ka Gm (10 µg ml<sup>-1</sup>). Transkonjugantide kolooniaid vaadeldi järgmisel päeval esmalt UV valguslual Syngene™ LED Blue Light Transilluminator (Thermo Fisher Scientific). Seejärel tehti väljavalitud UV-valguses helendavatest kolooniatest preparaadid ning vaadati rakke fluorestsentsmikroskoobis (Olympus BX41 ergastuse ja emissiooni lainepikkused olid vastavalt 480 ja 500 nm), et veenduda veelkord, et pBK-miniTn7-*gfp* konjugatsioon on toimunud.

#### 2.2.5. qRT-PCR

C120, C230 ja SH geenide ekspressiooni taseme võrdlemiseks kasvatati *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 rakke 50 ml R2A või 50 ml R2A ja 3mM salitsülaadi, 3-, 4- või 5-klorosalitsülaadi söötmel.

Vastavad rakud kasvatati üles 250 ml Erlenmeyeri kolvides. Varajase statsionaarse kasvufaasi rakkudest eraldati RNA Nucleospin RNA II kitiga (Macherey-Nagel) vastavalt tootja etteantud protokollile. Tüvedest eraldatud RNA-d töödeldi kaks korda DNAas I-ga (Thermo Fisher Scientific), eesmärgiga proovidest eemaldada kogu genoomne DNA. Eraldatud RNA puhtust kontrolliti agarosgeelelektroforeesiga ning kontsentratsioon määrati NanoDrop ND-2000c (Thermo Fisher Scientific) spektrofotomeetriga.

Rotor-Gene Q termotsükleri (Qiagen) ja SOLIScript 1-step SolisGreen qPCR kitiga (Solis Biodyne) viidi läbi qRT-PCR. Reaktsioonisegu mahuks oli 10 µl, segu sisaldas 10 ng RNA-d. Referentsgeeniks valiti geen *polA*, mis kodeerib DNA polümeraas I-te. Proove amplifitseeriti kasutades järgnevat qRT-PCR programmi:

1. 50 °C 15 min
2. 95 °C 10 min
3. 95 °C 15 s; 58 / 61 °C (vastavalt kasutatud praimeritele, vt. Lisa 1). Tsükli korrati 40 korda.
4. 40 °C 1 min
5. Sulamisköver 72 – 95 °C, tõus 1 kraadi haaval, 4 s paus enne iga uut etappi.

qRT-PCR andmete analüüsiks kasutati Rotorgene 2.02 (Qiagen) ja LinRegPCR 2021.2 programme. Joonistel on toodud kolme bioloogilise korduse (igal 3 tehnilist kordust) keskmised koos standardhälbega.

#### 2.2.6. Geelelektroforees

Eraldatud RNA puhtust kontrolliti agarosgeelelektroforeesil, milleks valmistati 0,8% agarosgeel TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2). RNA visualiseerimiseks lisati geelile etiidumbromiidi ( $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), 5 µl proovi kanti geelile koos 1 µl foresivärviga (0,04% broomfenool lahustatud 50% glütseroolis). RNA fragmentide pikkuse määramiseks kanti geelile ka 3,5 µl DNA molekulmassi markerit GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). Forees viidi läbi 100 V juures 1x TAE puhvril ning geel ilmutati ultraviolettlampidega varustatud valguslaual.

#### 2.2.7. Ensüümiaktiivsuste määramine

Ensüümiaktiivsuste määramiseks kasvatati *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 tüvesid R2A söötmetel (30 °C; 100 rpm), kuhu oli lisatud 3 mM salitsülaati, 3-, 4-, või 5-klorosalitsülaati. Proovid võeti samadest ajapunktidest nagu qRT-PCR (p.2.2.5), seejärel eraldati rakud tsentrifuugimise teel

(5000 rpm, 20 min). Peale söötme eemaldamist lisati rakkudele 1 ml 50 mM fosfaatpuhvit ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5), fuugiti 6000 rpm juures 10 min, misjärel eemaldati supernatant. Pesemist viidi läbi kaks korda. Rakke säilitati 600  $\mu\text{l}$  100 mM fosfaatpuhveris  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  juures. Rakke sonikeeriti (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co) viis sekundit kolm korda, misjärel rakuvaba ekstrakti (RV) saamiseks proov tsentrifuugiti (13 000 rpm;  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ; 25 min). SH, C23O ja C12O ensüümiaktiivsuste määramiseks kasutati Ultrospec 7500 (Biochrom) spektrofotomeetrit, neeldumist mõõdeti vastavalt 340, 375 ja 260 nm juures. Mõõtmise jaoks tehti lahused järgnevate lõppkontsentratsioonidega: 1) SH: NADH 141  $\mu\text{M}$ , EDTA 1 mM, fosfaatpuhver 100 mM, salitsülaad 150  $\mu\text{M}$ , 100-150  $\mu\text{l}$  RV; 2) C23O ja C12O: katehool 0,3 mM, fosfaatpuhver 100 mM, 100-150  $\mu\text{l}$  RV. C12O aktiivsust mõõdeti kvartsküvetis ning eelnevalt inaktiveeriti RV lahuses leiduv C23O  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga (3 mM). Joonistel on toodud kahe bioloogilise korduse (igal 3 tehnilist kordust) keskmised koos standardhälbega.

#### 2.2.8. Koosluste kasvatused

*Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 kasvatati 25 ml R2A koos 2,5 mM salitsülaadiga  $30\text{ }^\circ\text{C}$  juures loksutil üleöö. Inokulumi saamiseks fuugiti rakud 5000 rpm juures 15 min, eemaldati supernatant ja suspendeeriti rakud 6 ml füsioloogilises lahuses. Rakkude sissekülv 50 ml-sse R2A ning R2A ja salitsülaati, 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati (3 mM) sisaldavasse vedelsöötmesse tehti arvestusega, et iga tüve puhul oleks  $A_{580\text{ nm}} \sim 0,05$ .

Kasvatustest ( $30\text{ }^\circ\text{C}$ ; 150 rpm) tehti väljakülvid R2A tardsöötmele katse algusest (0 h), eksponentsiaalsest (4h) ja statsionaarsest kasvufaasist (8 h) võetud proovidest. R2A tardsöötmetel loendati kolooniad ning külvati ümber KingB (peptoon, glütserool,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , agar) tardsöötmele, et eristada fluorestseeruvaid tüvesid (*P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4) mittefluorestseeruvast tüvest (*P. pseudoalcaligenes* C70). KingB tardsöötmetel tehti ümberkülv fenooli sisaldavale tardsöötmele (2,5 mM), et eristada tugeva kasvuga tüvesid (*P. fluorescens* PC20 ja *P. pseudoalcaligenes* C70) fenoolil mitte kasvavast tüvest (*P. putida* NCIB 9816-4).

Iga tunni järel mõõdeti bakterite kasvu ( $A_{580\text{ nm}}$ ) ning rakuvabade proovide neeldumisspektreid (300 kuni 600 nm) vaheühendite kogunemise jälgimiseks Ultrospec 7500 (Biochrom) spektrofotomeetriga.

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1. Kasvatused salitsülaadil ja klorosalitsülaatidel

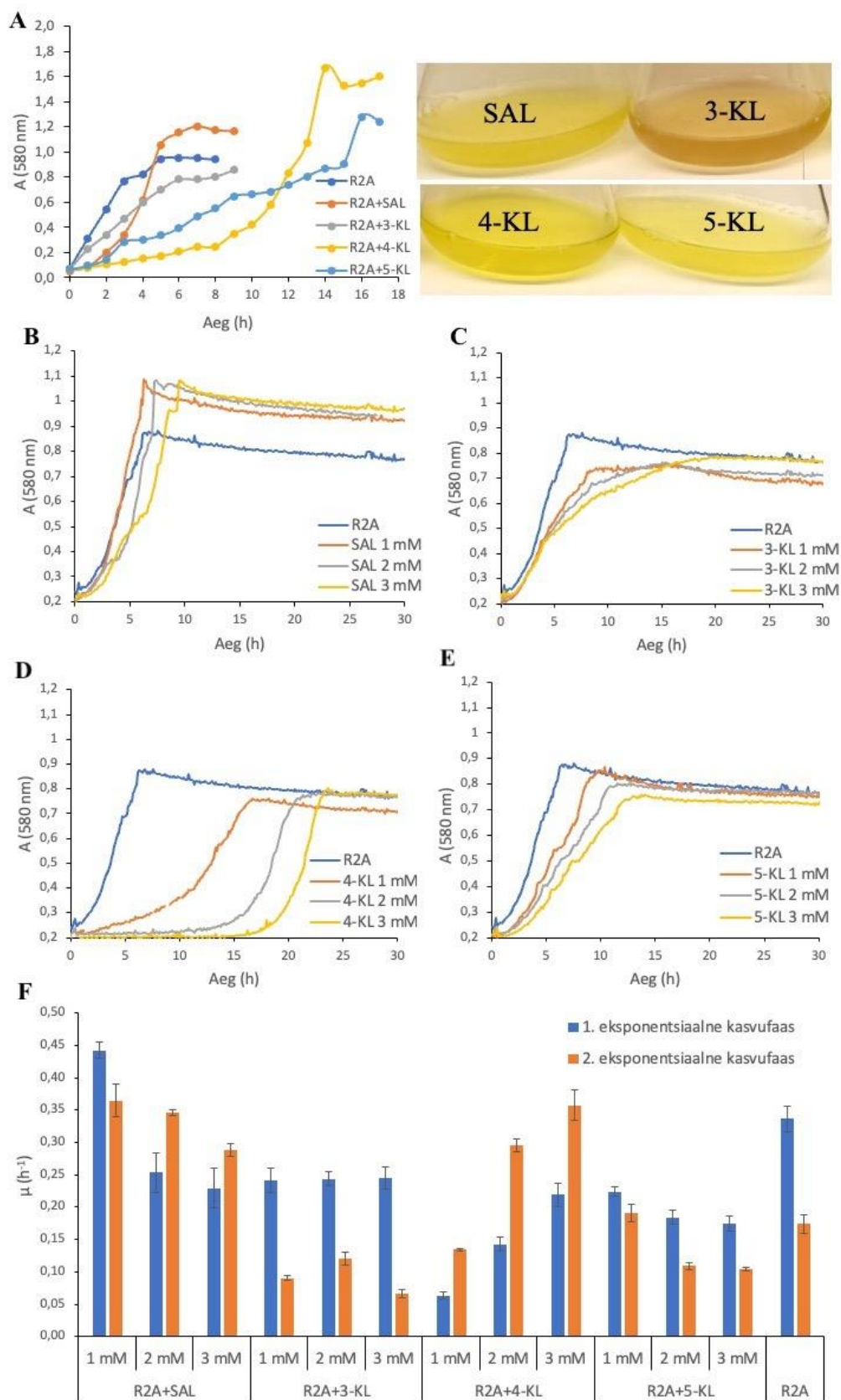
Hindamaks *P. pseudoalcaligenes* tüve C70, *P. fluorescens* tüve PC20 ja *P. putida* tüve NCIB 9816-4 võimekust kasvada salitsülaati, 3-klorosalitsülaati (3-KL), 4-klorosalitsülaati (4-KL) ning 5-klorosalitsülaati (5-KL) sisaldaval R2A söötmel, viidi läbi kasvatused kolbides ning mikrotiiterplaatidel.

##### 3.1.1 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70

*Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 kasvukõverad salitsülaate (3 mM) sisaldavates R2A söötmetes on toodud Joonisel 8A koos kolbides toimunud värvimuutustega. Salitsülaadil kasvanud kultuur saavutas statsionaarse kasvufaasi kuue tunniga ning biomassi saagis antud söötmel oli võrreldes R2A söötmega kõrgem. 4-KL-i sisaldava söötmega kohanemine võttis enim aega, lag-faas lõppes alles kaheksandal katsetunnil, samas kui R2A-l, salitsülaadil ning 3-KL olid rakud selleks ajahetkeks jõudnud statsionaarsesse kasvufaasi. Ka 5-KL-il kasvas C70 märgatavalt aeglasemalt, kuid nii 4- kui ka 5-KL-il oli biomassi saagis kõrgem nii R2A-l kui ka salitsülaadil kasvanud kultuurist. 3-KL-il oli võrreldes teiste söötmetega madalaim biomassi saagis ning erinevalt teistest salitsülaate sisaldavatest söötmetest värvus 3-KL puhul sööde pruuniks (Joonis 8A).

Mikrotiiterplaadil kasvatamisel oli tüve C70 kasvukõveratel enamasti eristatavad kaks eksponentsiaalset kasvufaasi (Joonis 8B-E). Võib oletada, et rakud tarbivad esmalt ära R2A söötme kergesti omastatavad komponendid ning alles peale biomassi suurenemist ja katabolismiradade indutseerimist hakkab kultuur salitsülaate metaboliseerima. Samas on ka R2A söötmel näha kasvu pidurdumist umbes neljandal tunnil (Joonis 8B-E). Nende kasvatuste puhul on oluline rõhutada ka seda, et hapniku kontsentratsioon söötmetes võib olla oluliselt madalam kui kolbides kasvatamisel ning tulemused võivad seetõttu erineda kolbides tehtud kasvutulemustest.

Salitsülaadi lisamisel söötmele tüve C70 lag-faasi pikkus ei muutu oluliselt ja saagis on kõrgem kui ainult R2A söötmel kasvanud rakkudel, kuid see ei suurene proportsionaalselt salitsülaadi kontsentratsiooni tõsuga (Joonis 8B-E). See võib olla põhjustatud substraadi kõrgematest kontsentratsioonidest või sellest tekkivate vaheühendite toksilisest mõjust



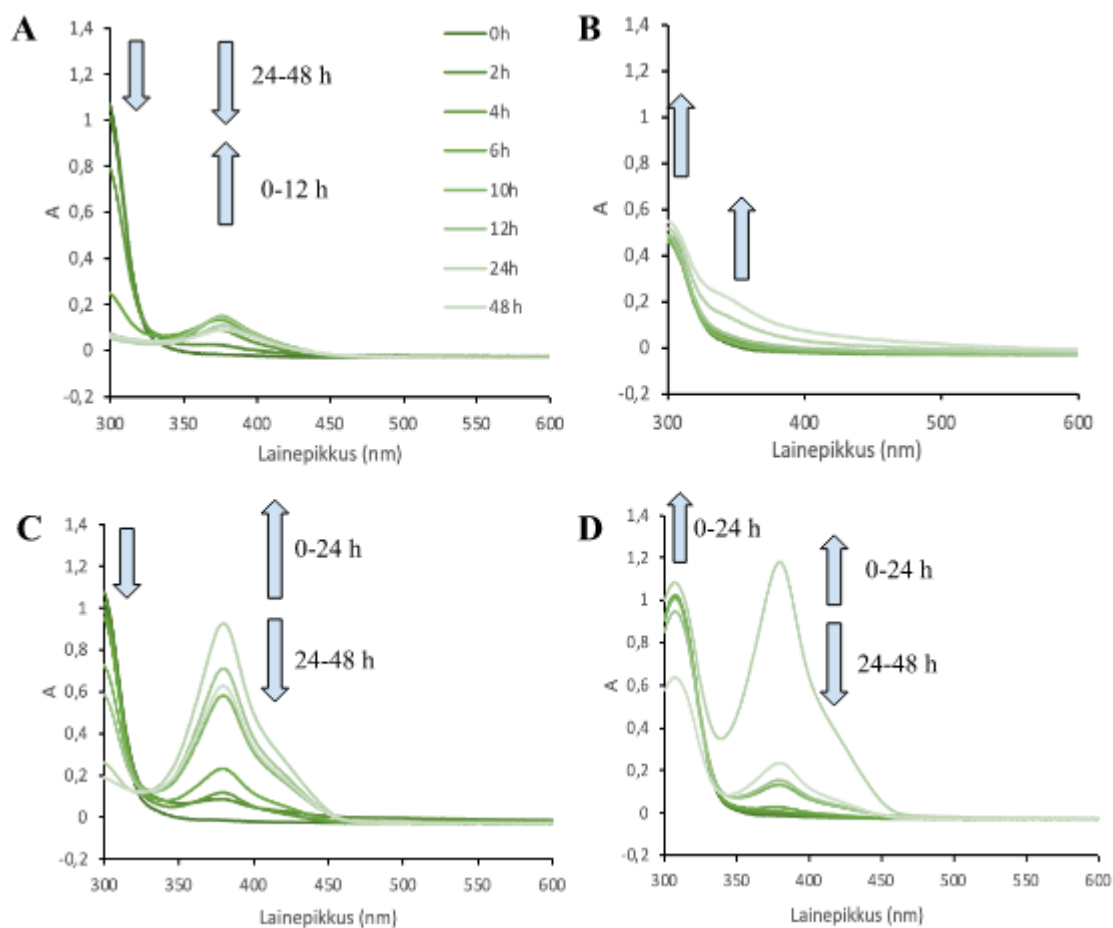
Joonis 8. Kolbides (A) ja mikrotiiterplaatidel (B-E) R2A söötmel ja R2A söötmel, millele on lisatud salitsülaati (SAL), 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati (KL) kasvanud *P. pseudoalcaligenes* C70 kasvukõverad. Salitsülaatide kontsentratsioon oli kolbides 3 mM ja mikrotiiterplaatidel 1-3 mM. Mikrotiiterplaadi kasvutuste andmetest arvatud kasvukiirused koos standardhällbega on esitatud paneelil F. Paneeli A paremal küljel oleval fotol on näha 12 h möödumisel kolbides toimunud söötmete värvuse muutus.

rakkudele. Tüve C70 kasvukiirus teises eksponentsiaalses kasvufaasis on salitsülaati sisaldavas söötmes võrreldes ainult R2A söötmel kasvanud rakkudega kõrgem (Joonis 8F). Samas kasvukiirused esimeses eksponentsiaalses kasvufaasis vähenevad, kuid mitte märkimisväärselt.

Mikroitiiterplaatidel tüve C70 kasvatamisel klorosalitsülaate sisaldavatel söötmetel ei esinenud erinevalt kasvatustest kolbides saagise suurenemist võrreldes R2A söötmel kasvanud rakkudega (Joonis 8B-E). Kuigi 3- ja 5-KL puhul esimeses faasis kasvukiirused oluliselt ei erine R2A-l saadud tulemustest, siis teises faasis on kasvukiirused oluliselt madalamad, eriti 3-KL puhul (Joonis 8F). 3- ja 5-KL kontsentratsiooni tõstmine söötmes põhjustas lag-faasi pikenemise, kuid sel oli märgatavalt väiksem mõju kui 4-KL kontsentratsiooni tõstmisel (Joonis 8C-E). Nii oli tüve C70 lag-faas 3mM 4-KL lisamisel ligikaudu 15 h (Joonis 8D). Samas, kui rakud olid 4-KL kohanenud, oli kasv mõlemas eksponentsiaalses kasvufaasis väga kiire (Joonis 8F).

Katsetest järeldub, et tüvi C70 on efektiivne salitsülaadi lagundaja ning on võimeline substraati keskkonnas lühikese kohanemisfaasiga kasutusele võtma süsiniku- ja energiaallikana. Seda kinnitavad ka kasvukeskkonna neeldumisspektrite mõõtmised lainepikkuste vahemikus 300-600 nm, kus katehooli *meta* rajale iseloomuliku kollast värvi vaheühendi HMS neeldumine 375 nm juures suureneb kuni 12 tunnini ning hakkab seejärel vähenema (Joonis 9A). Ka 4- ja 5-KL sisaldavad söötmed värvusid kollaseks (Joonis 8A), mis viitab 5-kloro-2-hüdroksümukonosemialdehüüdi (KHMS) tekkele 4-klorokatehoolist nagu on oma töödes näidanud ka Wieser jt. (1994) ja Hollender jt. (1997). Mõlema substraadi kasvatustest võetud proovides oli neeldumisspektritel piik 380 nm juures, mis 4-KL korral hakkas vähenema alates 48 tunnist, samas kui sama ajapunkti 5-KL sisaldavas proovis neeldumine jätkuvalt tõusis (Joonis 9C-D).

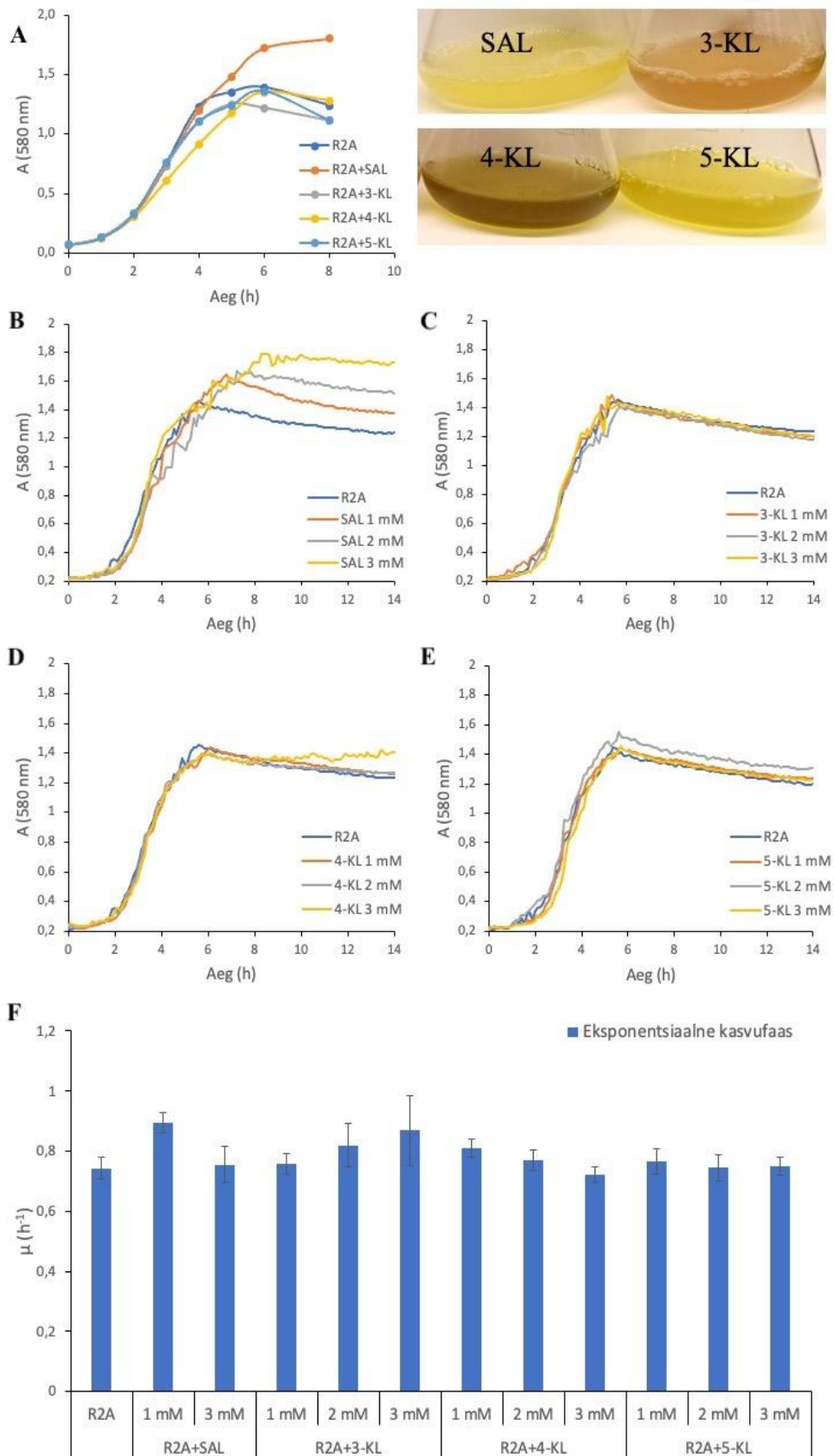
Madalamad biomassi saagised ning söötme värvumine pruuniks kui tüvi C70 kasvab 3-klorosalitsülaati sisaldaval R2A söötmel (Joonis 8A) viitab samuti vaheühendite kuhjumisele. Kuna C70 omab vaid katehooli *meta* raja ensüüme ning kollast HMS analoogi keskkonda (benseenituuma lõigatakse lahti 1. ja 6. süsiniku vahelt) ei kogune (Joonis 9B) võib tegemist olla hoopiski 3-klorokatehooli kogunemise ja polümerisatsiooniga (Farrel ja Quilty, 1999). Samas on Kaschabek *et al.*, (1998) näidanud, et C23O võib benseenituuma lõigata ka 2. ja 3. süsiniku vahelt, kuid siis tekib enamuses seni uuritud tüvedes toksiline atsüülkloriid, mis inaktiveerib C23O-i.



Joonis 9. Neeldumisspektrid (300-600 nm) *P. pseudoalcaligenes* tüve C70 kasvatustest R2A söötmetelt, millele oli lisatud 3 mM salitsülaati (A), 3-klorosalitsülaati (B), 4-klorosalitsülaati (C) või 5-klorosalitsülaati (D), võetud rakuvabadest proovidest.

### 3.1.2 *Pseudomonas fluorescens* PC20

*Pseudomonas fluorescens* PC20 kolbi kasvatuste kasvukõverad salitsülaate (3 mM) sisaldavates R2A söötmetes on välja toodud Joonisel 10A ning selle kõrval on foto kolbidest, kus on näha 12 tunni jooksul toimunud söötme värvuse muutus. Erinevalt tüvest C70, kasvab tüvi PC20 kõigil söötmetel väga sarnaselt ning lag-faasi pikkus ei sõltu lisatud salitsülaadist. Võrreldes R2A söötmega saadi kõrgem biomassi saagis vaid 3 mM salitsülaadi lisamisel, kõige madalam oli saagis 3-KL sisaldava söötme korral (Joonis 10A). Kasv eksponentsiaalses kasvufaasis oli kõikidel söötmetel sarnane välja arvatud 4-KL-i sisaldaval söötmel, kus PC20 kasvukiirus oli väiksem. Nii 3-KL kui ka 4-KL korral muutus kasvatus käigus söötmete värv tumedamaks, vastavalt pruuniks ja tumeroheliseks.

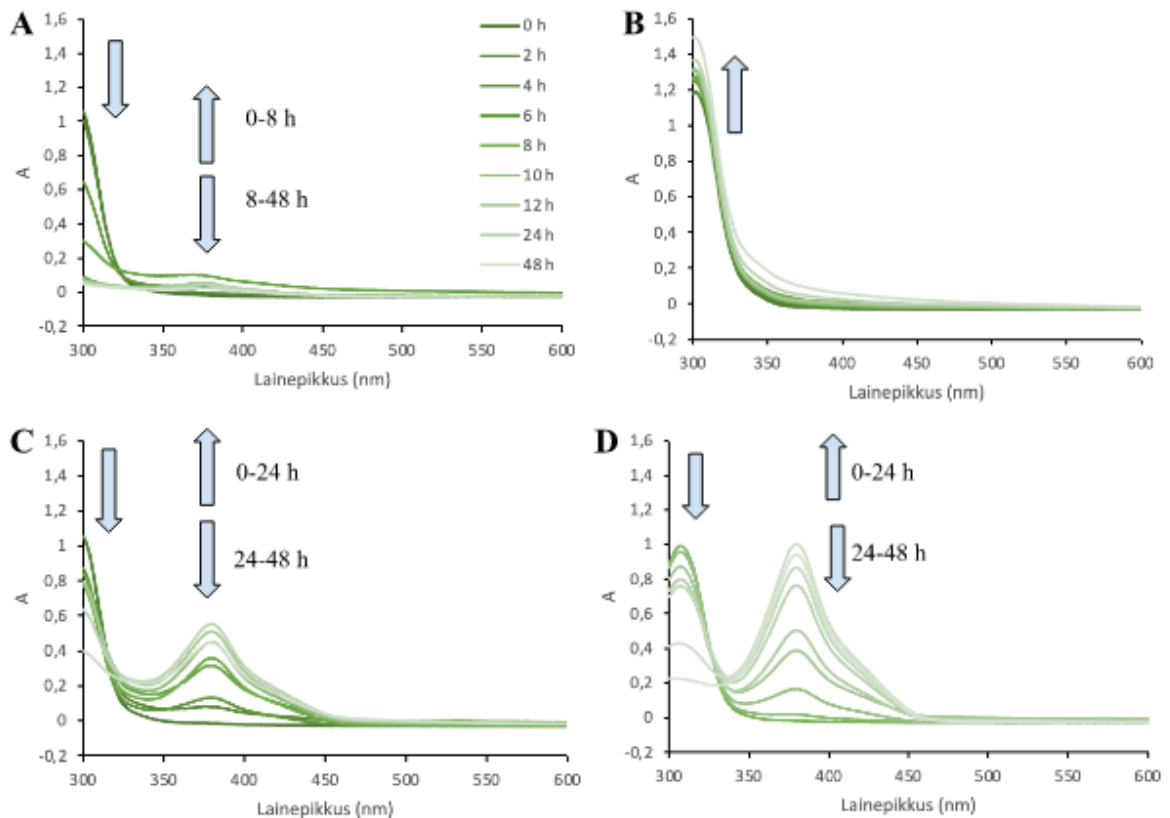


Joonis 10. Kolbides (A) ja mikrotiiterplaatidel (B-E) R2A söötmel ja R2A söötmel, millele on lisatud salitsülaati (SAL), 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati (KL) kasvanud *P. fluorescens* PC20 kasvukõverad. Salitsülaatide kontsentratsioon oli kolbides 3 mM ja mikrotiiterplaatidel 1-3 mM. Mikrotiiterplaadi kasvatuste andmetest arvatud kasvukiirused koos standardhälbega on esitatud paneelil F. Paneeli A paremal küljel oleval fotol on näha 12 h möödumisel kolbides toimunud söötmete värvuse muutus.

Mikroitiiterplaadil oli tüve PC20 kasv 1-3 mM salitsülaatide lisamisel (Joonis 10B-E) sarnane kolbides tehtud kasvatustega. Erinevalt tüvest C70 on PC20 kasvukõveratel üks eksponentsiaalne kasvufaas ning lag-faasi pikkused ja kasvukiirused ei sõltu oluliselt lisatud (kloro)salitsülaadist ega selle kontsentratsioonist (Joonis 10B-E). Tüve PC20 kasvukiirused (Joonis 10F) on ligikaudu kaks korda kõrgemad kui tüvel C70 (Joonis 8F). Ka tüve PC20 korral olid biomassi saagised kõrgemad R2A-l kasvanud rakkude omast vaid salitsülaati sisaldavatel söötmetel (Joonis 10B-E), kuid erinevalt tüvest C70 suurenes saagis salitsülaadi kontsentratsiooni tõstmisel söötmes (Joonis 10B).

Erinevate salitsülaatide lisamine R2A söötmetele ei mõjuta *P. fluorescens* tüve PC20 kasvukiirust oluliselt (Joonis 10F). Võrreldes tüvega C70 koguneb salitsülaadi lagundamisel vähem HMS (piik 375 nm) ning selle hulk lahuses hakkab vähenema juba alates 8. tunnist (Joonis 11A). 4-KL lagundamisel koguneb KHMS (piik 380 nm) vähem (Joonis 11C) kui tüve C70 puhul (Joonis 9C). 5-KL lagundamisel koguneb KHMS (Joonis 11D) isegi rohkem kui tüvel C70, kuid PC20 kasvukiirust ning lag-faasi pikkust see ei mõjuta. Nende andmete põhjal võib oletada, et tüvi PC20 ei ole tundlik söötmesse koguneva (kloro)katehhooli ja/või (K)HMS suhtes nagu C70. Samas näitab vaheühendite kuhjumine ja sellega kaasnev söötme värvi muutumine ning biomassi saagise püsimine samal tasemel R2A söötmetel kasvanud rakkudega, et salitsülaate lagundatakse siiski vaid osaliselt. Farrel ja Quilty (1999) analüüsisid segakultuuri võimet lagundada 4-klorofenooli ning tuvastasid, et selle lagundamisel tekkivad 4-klorokatehhool ja KHMS. Nende andmetel KHMS küll kuhjub keskkonda, kuid hiljem lagundatakse ning 4-klorofenool lagundatakse efektiivselt katehhooli *meta* rajas.

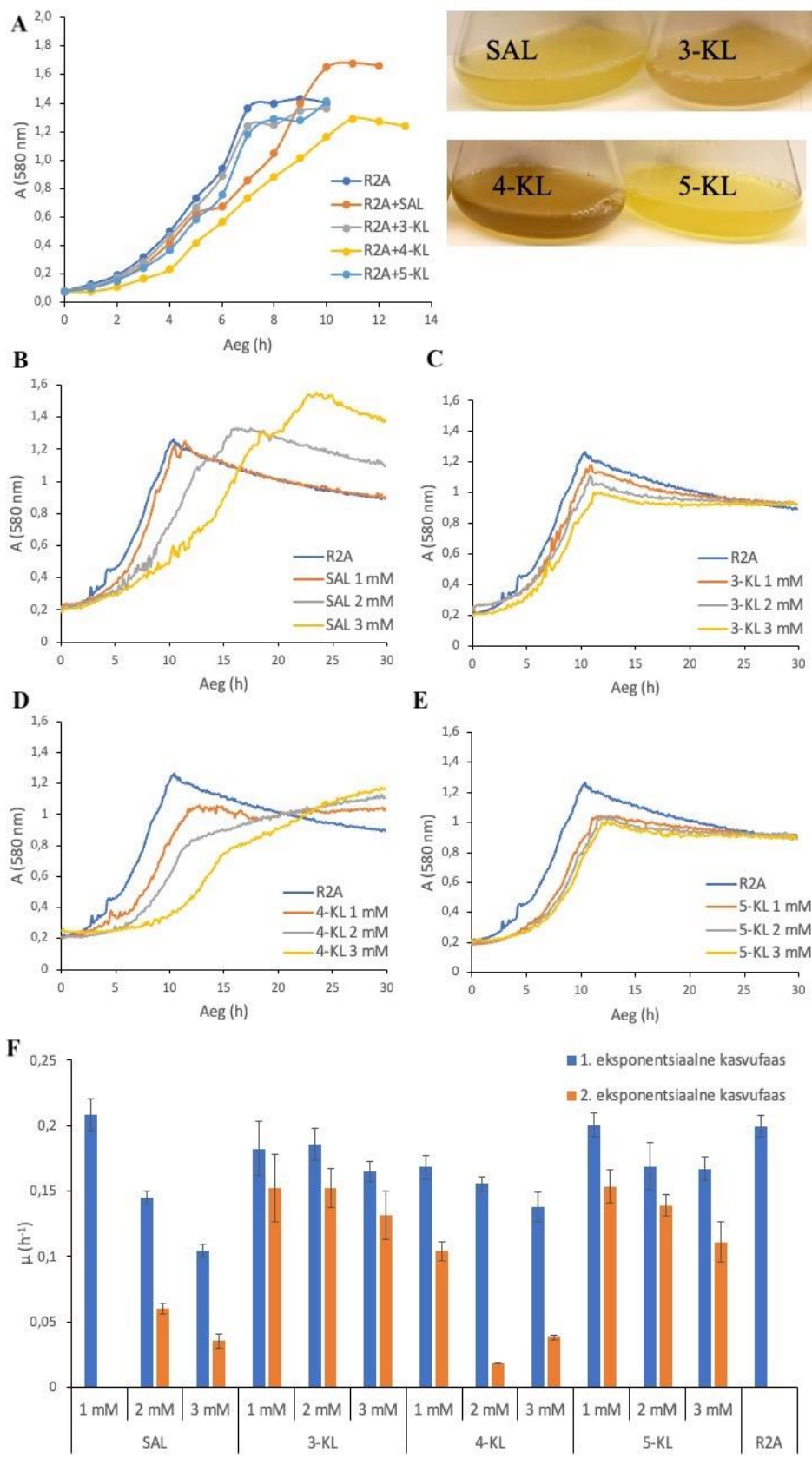
Varasemast on teada, et tüves PC20 indutseerib fenool nii C12O kui C23O (kõrge tase ka induktorita) ja salitsülaat vaid C23O (Liivak, 2007). Käesolevas töös tuvastatud vaheühendite kogunemine kinnitab seda ning võib väita, et salitsülaate lagundab tüvi PC20 katehhooli *meta* rajas. Tüve PC20 kõrge kasvukiirus salitsülaate sisaldavatel söötmetel võrreldes tüvega C70 võib olla põhjustatud *sal* operoni plasmiidsest päritolust. Ka Barrow (2022) sai metüülsalitsülaatidel kasvatades tüvel PC20 kõrged kasvukiiruste väärtused.



Joonis 11. *P. fluorescens* tüve PC20 neeldumisspekter (300-600 nm) kasvades 3 mM salitsülaadil (SAL) (A), 3-klorosalitsülaadil (3-KL) (B), 4-klorosalitsülaadil (4-KL) (C) ja 5-klorosalitsülaadil (5-KL) (D).

### 3.1.3 *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4

Salitsülaatide lisamine R2A söötmele mõjutab *Pseudomonas putida* tüve NCIB 9816-4 kasvu kolbides (Joonis 12A). Nii nagu tüve PC20 korral ei suurene võrreldes R2A söötmele kasvanud rakkudega ka tüve NCIB 9816-4 biomassi saagis klorosalitsülaatide lisamisel. Ainult 3 mM salitsülaadi lisamisel saadi kõrgem biomassi saagis, mis näitab, et bakter suudab kasutada ühendit süsiniku- ja energiaallikana. Erinevates söötmetes on NCIB 9816-4 lag-faasi pikkus erinev, kõige pikem kohanemisfaas on 4-KL korral ning sel substraadil on tüvel ka kõige väiksem kasvukiirus esimeses eksponentsiaalses kasvufaasis (Joonis 12A, F). Kui kasvatustel kolbides on kahte eksponentsiaalset kasvufaasi võimalik eristada ainult salitsülaati sisaldaval söötmele, siis mikrotiiterplaatidel kasvatamisel on kõikidel söötmetel neid kaks (Joonis 12B-E). 3- ja 5-KL lisamisel R2A söötmele esimese eksponentsiaalse kasvufaasi kasvukiirus oluliselt ei muutu aromaatses ühendi kontsentratsiooni tõstmisel, kuid teise faasi kasvukiirused vähenevad (Joonis 12F).

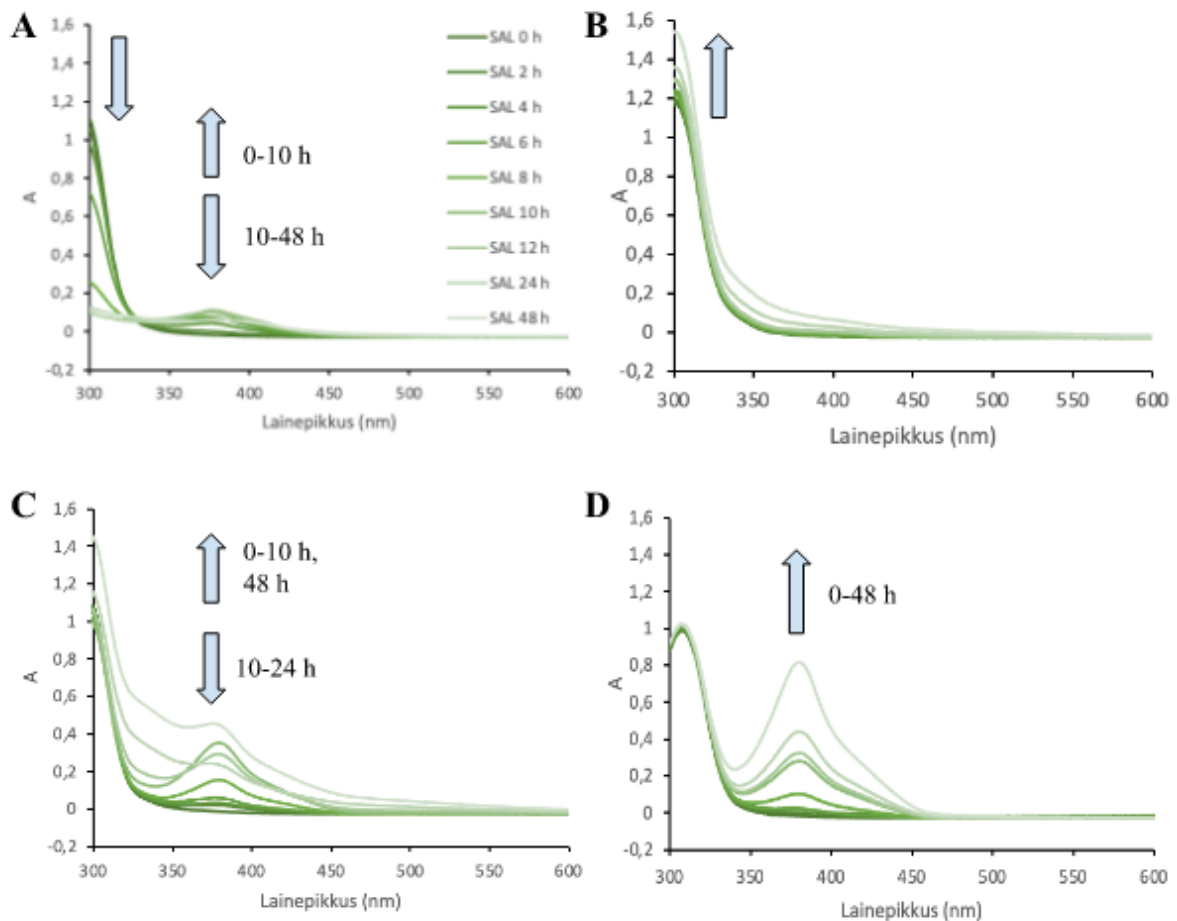


Joonis 12. Kolbides (A) ja mikrotiiterplaatidel (B-E) R2A söötmel ja R2A söötmel, millele on lisatud salitsülaati (SAL), 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati (KL) kasvanud *P. putida* NCIB 9816-4 kasvukõverad. Salitsülaatide kontsentratsioon oli kolbides 3 mM ja mikrotiiterplaatidel 1-3 mM. Mikrotiiterplaadi kasvatuste andmetest arvatud kasvukiirused koos standardhälbega on esitatud paneelil F. Paneeli A paremal küljel oleval fotol on näha 12 h möödumisel kolbides toimunud söötmete värvuse muutus.

5-KL kontsentratsiooni tõstmisel kulub NCIB 9816-4 rakkudel kauem aega kohanemiseks kui samadel tingimustel 3-KL sisaldaval söötmel (Joonis 12 C, E). Nii salitsülaadi kui ka 4-KL puhul pikeneb lag-faas oluliselt substraadi kontsentratsiooni tõstmisel, kuid salitsülaadi puhul on mõju väiksem (Joonis 12 B, D). 4-KL kõrgemal kontsentratsioonil (3 mM) vähenevad kasvukiirused mõlemas eksponentsiaalses kasvufaasis oluliselt (umbes kolm korda) võrreldes R2A söötmel kasvanud rakkudega (Joonis 12F). Võrreldes teiste töös uuritud tüvedega on salitsülaate sisaldavatel söötmetel kasvanud tüve NCIB 9816-4 kasvukiirused madalamad.

Sarnaselt tüvedega C70 ja PC20 toimub ka NCIB 9816-4 kasvatamisel kolbides salitsülaati sisaldavatel söötmetel värvi muutumine (Joonis 12A) - kollaseks (salitsülaat), rohekaskollaseks (5-KL), pruuniks (3-KL) või tumepruuniks (4-KL). Nagu ka teiste uuritud tüvede korral koguneb salitsülaadi lagundamisel söötmesse HMS (piik 375 nm), mille maksimaalne sisaldus mõõdeti 10 tunnil võetud proovis (Joonis 13A). 3-KL-il kasvades ei teki söötmesse KHMS-i (puudub piik 380 nm juures), kuid samal ajal suureneb neelduvus 300 nm juures, mis võib viidata katehhooli ja selle polümeeride kogunemisele (Joonis 13B). 4-KL-i lagundamisel tõuseb neeldumine 380 nm juures kuni 10. tunnini ning väheneb seejärel ajavahemikus 12-24 tundi, kuid 48. tunni proovis on neeldumine uuesti suurenenud. Erinevalt teistest tüvedest suureneb 4-KL sisaldaval söötmel tüve NCIB 9816-4 korral alates 24. tunni proovist neelduvus ka lainepikkustel 300-380 nm (Joonis 13C). Kuna ka söötme värv on selle tüve puhul tumedam (ajapunktid 24 ja 48 h) võib oletada, et lisaks KHMS-le kuhjub kasvukeskkonda ka 4-klorokatehhooli (piik 310 nm). Sarnaselt tüvele PC20 koguneb 5-KL-i lagundamisel KHMS keskkonda rohkem kui 4-KL korral, kuid katse vältel ei vähene tüve NCIB 9816-4 kasvukeskkonnas klorokatehhooli lainepikkusel 310 nm oleva piigi neelduvus (Joonis 13D).

Salitsülaatide lagundamisel koguneb tüve NCIB 9816-4 kasvukeskkonda vaheühendeid, mis salitsülaadi ja 4-KL puhul mõjutavad ka tüve kasvuparameetreid. Vaheühendite kuhjumine ja R2A-l kasvanud rakkudega võrreldes võrdse või madalama biomassi saagise väärtused viitavad, et NCIB 9816-4 ei kasuta klorosalitsülaate süsiniku- ja energiaallikana. Liivak (2007) on näidanud, et salitsülaat indutseerib tüves NCIB 9816-4 olulisel määral C12O aktiivsuse ning C23O aktiivsus on väga madal. Käesoleva töö katsed näitasid, et salitsülaadi, 4-KL ja 5-KL lagundamisel kuhjuvad keskkonda katehhooli *meta* raja vaheühendid. Samas jäi klorosalitsülaatide puhul piigi 300-310 nm intensiivsus samaks (5-KL) või tõusis (3-KL ja 4-KL), mis võib olla seotud samal ajal toimiva katehhooli *ortho* raja vaheühendite kogunemisega.



Joonis 13. *P. putida* tüve NCIB 9816-4 neeldumisspekter (300-600 nm) kasvades 3 mM salitsülaadil (SAL) (A), 3-klorosalitsülaadil (3-KL) (B), 4-klorosalitsülaadil (4-KL) (C) ja 5-klorosalitsülaadil (5-KL) (D).

Kolbides ja mikrotiiterplaatidel tehtud kasvatuste põhjal võib kokkuvõtlikult öelda, et testitud substraatidest kasutavad kõik tüved süsiniku- ja energiaallikana ainult salitsülaati. Salitsülaadi 1-hüdroksülaasi toimel tekkinud katehool lagundatakse C23O-ga, sest kasvukeskkonda koguneb kollast värvi vaheühend HMS, mille hulk katse lõpus kõikide tüvede puhul väheneb. 3-KL lagundamisel tekivad 3-klorokatehool on C23O omavatele tüvedele toksiline ning see kuhjub söötmesse ning sööde tumeneb. 4-KL ja 5-KL lagundamisel koguneb kõikide tüvede puhul söötmesse KHMS, mille hulk väheneb tüvede C70 ja PC20 kasvatustes. Ka tüvede tundlikkus salitsülaatide ning lagundamisel tekkivate vaheühendite suhtes on erinev - PC20 kasv on alati kiire, samal ajal kui C70 ja NCIB 9816-4 kasvu puhul on osadel substraatidel lagufaasid väga pikad ning kasvukiirused madalad. Varasemalt on näidatud, et neljandas positsioonis olev asendusrühm mõjutab C23O aktiivsust (Hupert-Kocurek *et al.*, 2014). Seepärast määrati järgmistes katsetes ensüümide SH, C23O ja C12O aktiivsused salitsülaate sisaldavatel söötmetel kasvanud C70, PC20 ja NCIB 9816-4 rakkudes.

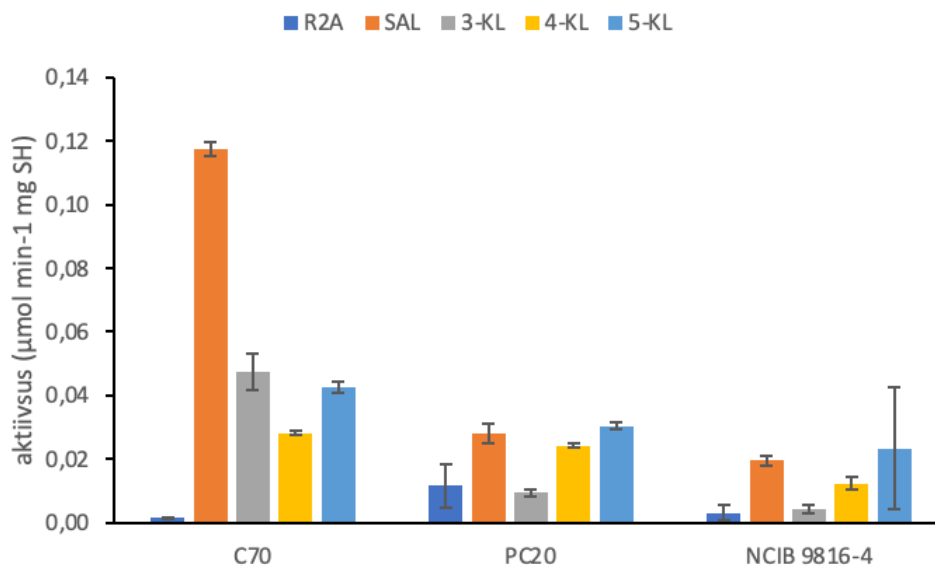
### 3.2. Ensüümiaktiivsused

Salitsülaatide lagundamisel viib esimest reaktsiooni läbi salitsülaadi 1-hüdroksülaas (SH), mille toimel tekib salitsülaadist katehool (Costa *et al.*, 2019). SH aktiivsus sõltub asendusrühmade olemasolust ning asetusest salitsülaadi molekulis, aga ka SH struktuurist (Bosch *et al.*, 1999). Katehooli lagundavad dioksügenaasid, C23O ja C12O, ning ka nende aktiivsus sõltub asendusrühmast (nt kloro-, metüül-, etüülrühmadest) ja selle paiknemisest benseenituumas, sest substraadi ja ensüümi aktiivtsentri interaktsioon võib olla takistatud (Hupert-Kocurek *et al.*, 2014). Kasvatuskatsetest oli näha, et kolm tüve kasvavad salitsülaate sisaldavatel söötmetel erinevalt. Töö järgmises etapis määrati salitsülaatide lagundamisel osalevate võtmeensüümide (SH, C23O, C12O) aktiivsused spektrofotomeetriliselt varajase statsionaarse kasvufaasi proovidest eraldatud rakuvabades ekstraktides.

*Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüvel C70 on *sal* operonis kaks SH-d kodeerivat geeni, *nahW* ja *nahG* (Jõesaar *et al.*, 2017), mida SH aktiivsuste määramisel teineteisest eristada ei ole võimalik. Summaarne SH aktiivsus on tüves C70 kõige kõrgem salitsülaati sisaldaval R2A söötmel kasvanud rakkudes, klorosalitsülaatide lisamisel on aktiivsused kolm kuni neli korda madalamad (Joonis 14). *Pseudomonas stutzeri* tüvel AN10 on sarnane *sal* operon kui tüvel C70 ning Bosch jt. (1999) näitasid oma uurimustöös samuti, et summaarne SH aktiivsus on klorosalitsülaatidega indutseerides kaks kuni kümme korda madalam kui salitsülaadi korral.

*Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 plasmiidsetes *sal* operonides on vaid üks geen, *nahG*, millelt kodeeritakse SH (Elken *et al.*, 2020; Dennis ja Zylstra, 2004). R2A söötmes, millele ei ole lisatud salitsülaate on tüve PC20 rakkudes SH konstitutiivselt indutseeritud, salitsülaadi, 4-KL või 5-KL lisamisel aktiivsus suureneb kaks korda (Joonis 14). 3-KL juuresolekul kasvanud PC20 rakkudes oli SH aktiivsus samal tasemel kui induktorita kasvanud rakkudes. Kuna SH aktiivsus on kõrge nii salitsülaadil kui ka 4-KL ja 5-KL kasvanud rakkudes selgitab see tüve PC20 kiiret kasvu neil substraatidel (Joonis 10A).

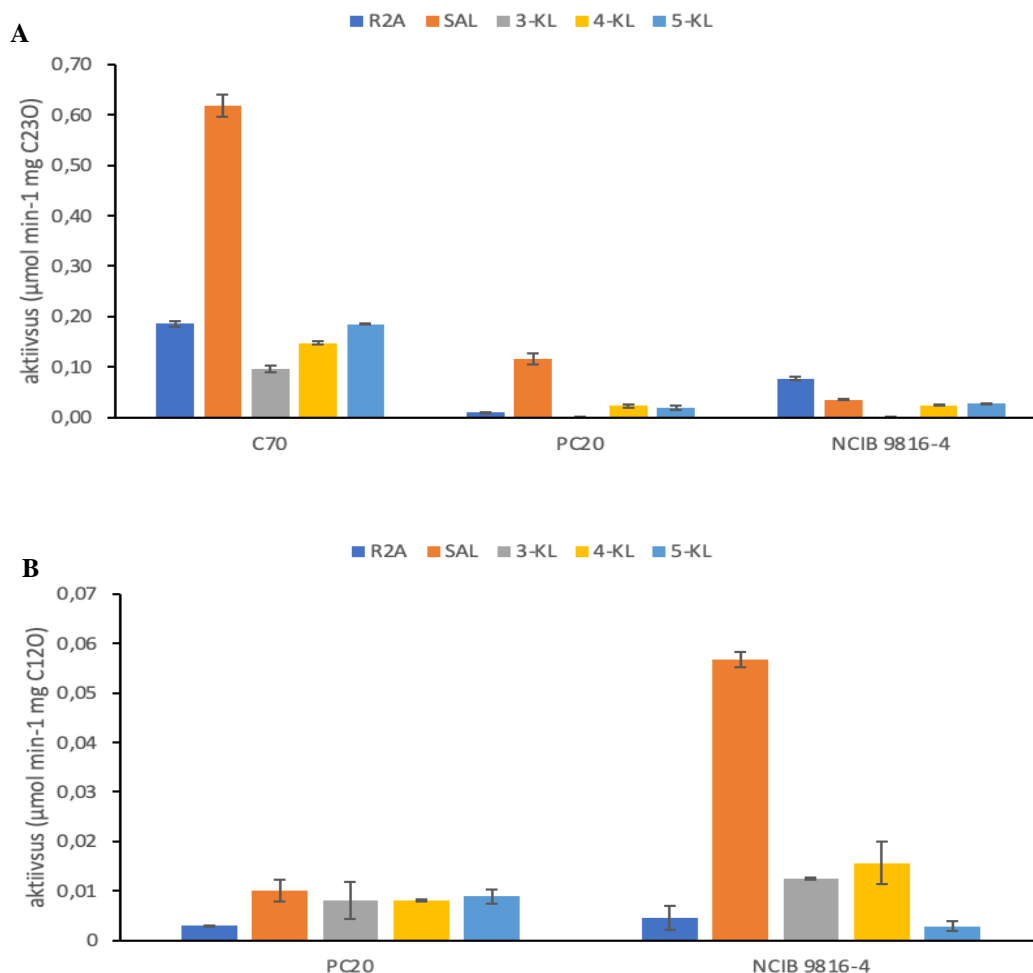
Kõige madalamad SH aktiivsused saadi tüve NCIB 9816-4 rakkudes, salitsülaadi ja 4-KL lisamisel söötmele tõusis aktiivsus vastavalt viis ja kolm korda (Joonis 14). 3- ja 5-KL-l kasvanud rakkudes oli SH aktiivsus sarnane R2A söötmel kasvanud rakkudega. Madal aktiivsus viitab, et neid substraate SH aktiivselt ei lagunda.



Joonis 14. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 salitsülaadi 1-hüdroksülaasi aktiivsused R2A söötmel (R2A) ja R2A söötmel, millele on lisatud 3 mM salitsülaati (SAL), 3-klorosalitsülaati (3-KL), 4-klorosalitsülaati (4-KL) ja 5-klorosalitsülaati (5-KL) kasvanud rakkudes.

Töös uuritud kolmel tüvel on erinev arv katehhooli 1,2- ja/või 2,3-dioksügenaase. Tüvel C70 on kaks C23O-d, üks paikneb *sal* operonis (*nahH*) ning teine *phe* operonis (*pheB<sup>C23O</sup>*), kuid varasemates töödes on näidatud, et ainult *nahH* on salitsülaadiga indutseeritav (Jõesaar *et al.*, 2017). Seetõttu ei anna kahe C23O omamine ainult salitsülaati sisaldaval söötmel kasvavale tüvele C70 eelist katehhooli lagundamisel. C23O aktiivsuste mõõtmisel saadi kõige kõrgemad väärtused salitsülaati sisaldaval söötmel kasvanud C70 rakkudes, kloroühendite lisamisel söötmele olid aktiivsused kolm kuni kuus korda madalamad (Joonis 15A). 3-KL sisaldavas söötmes oli C70 rakkudes C23O aktiivsus kõige madalam.

Tüvel PC20 on kokku kolm katehhooli dioksügenaasi: pNAH20 *sal* operonis paiknev C23O (*nahH*), pPHE20 *pheBA* operonis paiknev C12O (*pheB<sup>C12O</sup>*) ning kromosomaalne *catRBCA* operonis paiknev C12O (*catA*) (Heinaru *et al.*, 2009; Elken *et al.*, 2020). Salitsülaatidega indutseerimisel oli kõige kõrgem C23O aktiivsus salitsülaadil, 4- ja 5-KL olid aktiivsused kuus korda madalamad (Joonis 15A). Kõige madalam C23O aktiivsus saadi PC20 rakkudega, mis eraldati 3-KL sisaldavalt R2A söötmelt. C12O summaarne aktiivsus oli indutseerimata PC20 rakkudes madal ning ei suurenenud oluliselt salitsülaatide lisamisel (Joonis 15B). C12O madalad aktiivsused on kooskõlas Liivak (2007) ja Heinaru jt. (2009) avaldatud andmetega, kus näidati, et C12O (*pheB<sup>C12O</sup>*) indutseerib fenooli.



Joonis 15. (C70) *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, (PC20) *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja (NCIB) *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 C230 (A) ja C120 (B) ensüümiaktiivsused kasvades R2A söötmel (R2A), millele on lisatud 3 mM salitsülaati (SAL), 3-klorosalitsülaati (3-KL), 4-klorosalitsülaati (4-KL) ja 5-klorosalitsülaati (5-KL).

Tüvel NCIB 9816-4 on kromosomaalne C120 (*catA*) ja pDTG1 *sal* operonis C230 (*nahH*), kuid operoni inserteerunud IS elemendi tõttu arvatakse, et katehhooli lagundamise eest vastutab C120 (Dennis ja Zylstra, 2004). Käesolevas töös teostatud katsed näitasid, et C230 on konstitutiivselt indutseeritud ning salitsülaadi, 4- ja 5-KL juuresolekul rakkudes aktiivsus oluliselt ei muutunud (Joonis 15A). Sarnaselt tüvedele C70 ja PC20 oli kõige madalam C230 aktiivsus 3-KL-ga indutseerimisel. Kuid erinevalt tüvest PC20 indutseeris salitsülaat NCIB 9816-4 rakkudes C120 ning basaalsest kõrgemad väärtused saadi ka 3- ja 4-KL sisaldaval söötmel kasvanud rakkudes (Joonis 15B). Salitsülaadil kasvanud rakkudes määratud katehhooli dioksügenaasi aktiivsused langevad kokku Liivak (2007) ja Heinaru jt. (2009) saadud andmetega.

Kolme tüve SH aktiivsuste määramise tulemused näitasid, et tüvede C70 ja NCIB 9816-4 korral sõltus aktiivsus oluliselt klororühma olemasolust ja asendist, mistõttu võib järeldada, et tüvede SH interaktsioon substraadiga on klororühmadega salitsülaatide puhul häiritud nagu on näidanud ka Bosch jt. (1999) tüvega AN10. Tüve PC20 kõrge SH aktiivsus nii salitsülaadil kui ka 4- ja 5-klorosalitsülaadil näitab aga, et klororühmad antud positsioonides ei sega ensümaatilist reaktsiooni. Tüvedel C70 ja PC20 on C23O aktiivsus kõige kõrgem salitsülaati sisaldaval söötmel kasvanud rakkudes, mis viitab efektiivsele katehhooli lagundamisele *meta* rajal ja vaheühendite (katehhooli ja HMS) inhibeeriva mõju puudumisele. Lisaks vähenes ka HMS kontsentratsioon söötmes. Kõigi kolme tüve korral on C23O aktiivsus kõige madalam 3-KL korral, mis on kooskõlas kirjanduse andmetega ning on seotud ilmselt 3-klorokatehhooli toksilise mõjuga, sest ühelgi juhul järgmise vaheühendi, (K)HMS, kogunemist ei tuvastatud (Kaschabek *et al.*, 1998; Farrell ja Quilty, 1999; Bartels *et al.*, 1984). 4- ja 5-KL korral värvusid kõikide tüvede korral söötmed kasvatuste alguses (laimi)kollaseks, mis viitab KHMS kogunemisele, kuid PC20 ja NCIB 9816-4 toimus 4-KL korral värvi tumenemine. Tulemustest võib järeldada, et teatud KHMS-i kontsentratsioonist alates toimub C23O inhibeerimine ning söötmesse hakkab kuhjuma klorokatehhool. Asendusrühmadega katehhoolidena saadud madalamaid C23O aktiivsusi on põhjendatud substraadi takistatud seondumisega ensüümi aktiivtsentrisse (Hupert-Kocurek *et al.*, 2014), aga ka (kloro)katehhoolidena oksüdatsioonil ja polümerisatsioonil tekkivate ühendite toksilisusest (Park *et al.*, 2004; Jõesaar *et al.*, 2017).

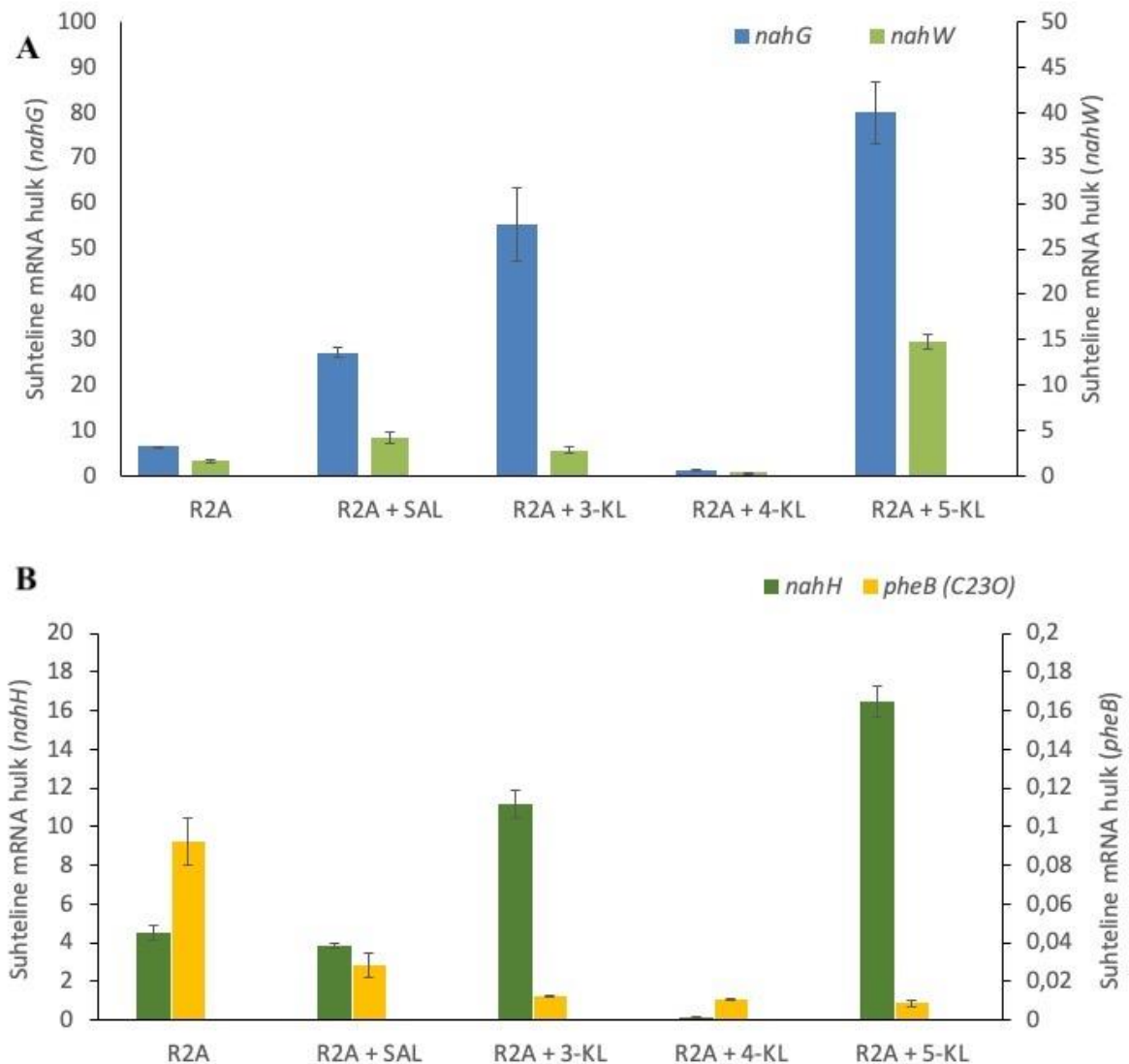
Kuigi nii *P. fluorescens* PC20 kui ka *P. putida* NCIB 9816-4 omavad C12O, toimub selle abil katehhooli lagundamine vaid salitsülaati sisaldaval söötmel kasvanud NCIB 9816-4 rakkudes. Seega ei toimu klorosalitsülaatide lagundamine katehhooli *ortho* rada omavates tüvedes C12O abil, kuigi enamus kirjandusallikaid seda väidab (Pieper *et al.*, 2010). Üheks põhjuseks võib olla, et uuritud tüvede puhul toimub *ortho* raja ensüüme kodeerivate geenide indutseerimine teiste ühendite, näiteks tüves PC20 fenooli poolt.

### 3.3. qRT-PCR

Salitsülaati või klorosalitsülaati sisaldavatel söötmetel kasvanud *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 rakuekstraktidest määrati võtmeensüümide aktiivsused spektrofotomeetriliselt. Kuid sel meetodil ei ole võimalik eristada redundantsetelt geenidelt kodeeritud ensüümide aktiivsusi. Seepärast kasutati järgnevas katsetes qRT-PCR meetodit ensüüme kodeerivate geenide suhtelise mRNA hulga määramiseks varajasest statsionaarsest kasvufaasist eraldatud rakkudes.

*P. pseudoalcaligenes* tüvel C70 on kaks salitsülaadi 1-hüdroksülaasi kodeerivat geeni - *nahG*, mis asub klassikalises naftaleeni lagundamise alumises raja geeniklastris *nahGTHINLOMKJX*, ja *nahW*, mis paikneb insertsoonielementide vahel klastri vahetus läheduses (Jõesaar *et al.*, 2017). Mõlema geeni mRNA hulk tõuseb salitsülaadi lisamisel söötmele, kuid *nahG* ekspressioon on kõrgem kui geenil *nahW* (Jõesaar *et al.*, 2017). Käesolevas töös saadi kõikidel substraatidel, välja arvatud 4-KL, kõrgemad *nahG* ja *nahW* suhtelised mRNA hulgad kui R2A söötmel kasvanud tüve C70 rakkudes (Joonis 16A). Samas oli geeni *nahG* ekspressioon kõrgem kui geenil *nahW*. Sarnase tulemuse sai oma töös ka Barrow (2022) kui kasvas tüve C70 metüülsalitsülaate sisaldavatel R2A söötmetel. Geenide *nahG* ja *nahW* mRNA hulk suurenes salitsülaadi, 3-KL ja 5-KL lisamisel R2A söötmele vastavalt 4, 9 ja 12 ning 3, 2 ja 9 korda. Kuid miks on 3-KL ja 5-KL korral *nahG* ja *nahW* ekspressioon kõrgem kui salitsülaadil (Joonis 16A) aga SH aktiivsused (Joonis 14) on hoopiski madalamad? Ilmselt need salitsülaadid indutseerivad mRNA sünteesi, kuid substraadi seondumine vastavale valgule on takistatud või tekib reaktsiooni käigus vaheühend, mis inhibeerib ensüümi tööd. *P. stutzeri* AN10, mille salitsülaadi 1-hüdroksülaasid on >99 % identsed C70 järjestustega, summaarne SH aktiivsus oli klorosalitsülaatidega oluliselt madalam kui metüülsalitsülaatidega indutseerides ning kõrgemad väärtused saadi 4-kloro- ja 4-metüülsalitsülaatidega (Bosch *et al.*, 1999). *nahG* ja *nahW* mRNA äärmiselt madal hulk 4-klorosalitsülaadil kasvanud C70 rakkudes (Joonis 16A) võib olla seotud pika lag-faasiga antud substraadil (Joonis 8A), ka SH aktiivsus on madalam kui teiste salitsülaatidega (Joonis 14). Metüülsalitsülaatidega R2A söötmetes *nahG* ekspressioon ei sõltunud oluliselt asendusrühma asendist, kuid need olid kõrgemad kui salitsülaadil kasvanud rakkudel (Barrow, 2022).

Kuna C70 rakke ei kasvatatud salitsülaadi ja fenooli segul, ekspresseeritakse salitsülaate sisaldavatel söötmetel ainult *nahH* geen ja *pheB*<sup>C230</sup> mRNA hulk on väga madal ning ei sõltu salitsülaatide olemasolust (Joonis 16B), nii nagu on varem näidanud ka Jõesaar jt. (2017) ja Barrow (2022). 3-KL ja 5-KL lisamisel suurenes *nahH* mRNA ekspressioon vastavalt 3 ja 4 korda ning 4-KL korral oli ekspressioon samasugune kui R2A söötmel kasvanud rakkudel. Madalad ekspressioonid 4-KL söötmes kasvanud rakkudes võivad olla põhjustatud substraadi enda toksilisest mõjust tüvele. Mehike (2016) näitas oma töös, et tüvede AN10 ja C70 NahH järjestuste identsus on 99,7% ning erinevus on ainult ühes aminohappes - tüvel C70 on positsioonis 218 histidiini asemel türosiin. Kirjanduse andmetel mõjutab selles positsioonis paiknev türosiin C230 katalüütilisi omadusi, nii on perekonna *Pseudomonas* türosiiniga tüvedel saadud kõrgem afiinsus katehhooli suhtes kui histidiiniga tüvedel (Junca *et al.*, 2004,

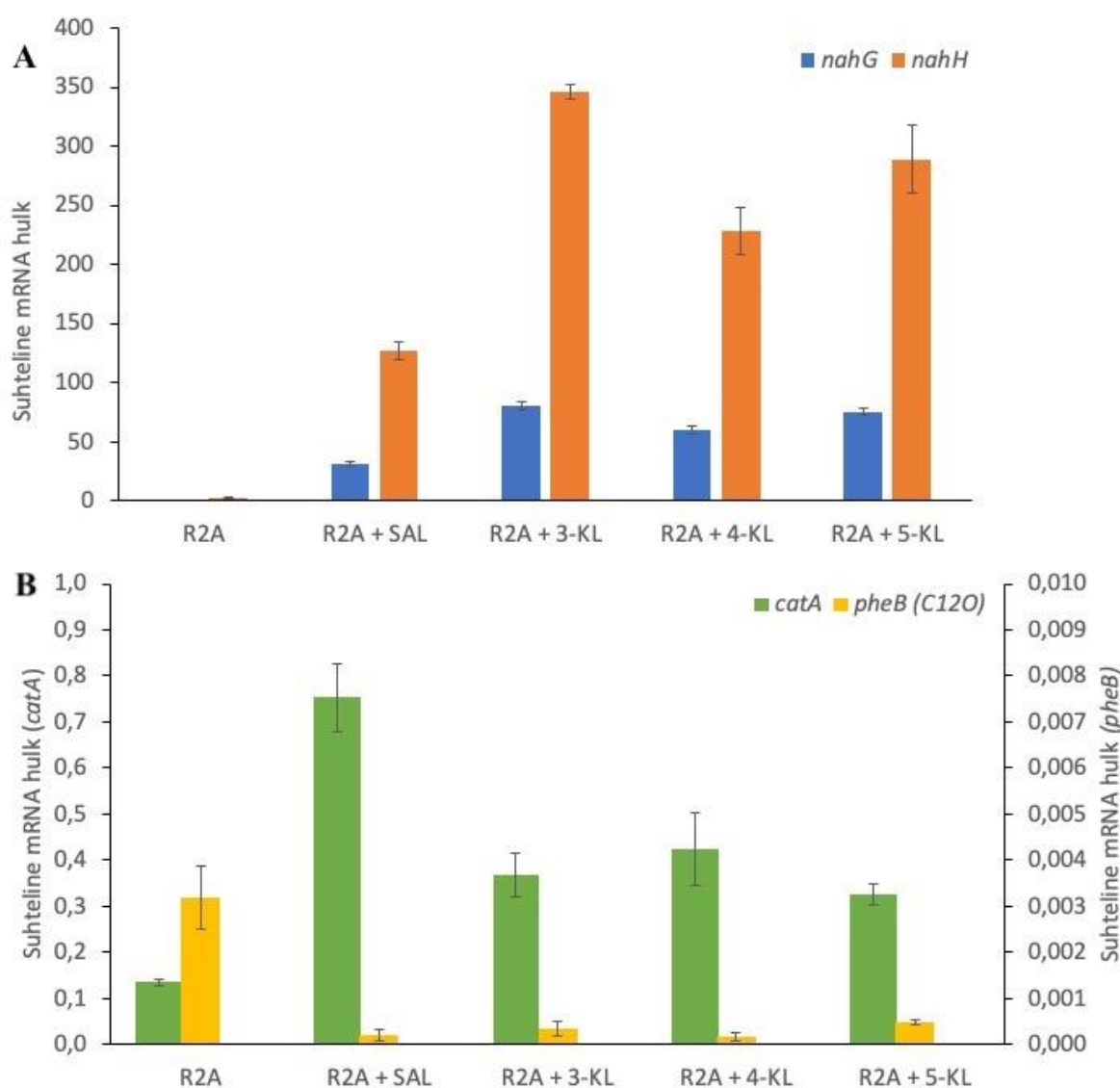


Joonis 16. *P. pseudoalcaligenes* C70 salitsülaadi 1-hüdrosülaase (A), NahG ja NahW, ning katehhooli 2,3-dioksügenaase (B), NahH ja PheB<sup>C230</sup>, kodeerivate geenide suhtelised mRNA hulgid. RNA eraldati logaritmilisest kasvufaasist lõpust võetud rakkudest, mida kasvatati R2A söötmel või R2A söötmel, millele oli lisatud salitsülaati (SAL), 3-, 4- või 5-klorolsalitsülaati (KL) lõppkontsentratsiooniga 3 mM.

Suenaga *et al.*, 2009). See võib olla ka põhjuseks, miks C70 kasvatustel söötmed ei tumenenud (katehhoolid lagundati kiiresti).

*Pseudomonas fluorescens* tüvel PC20 on üks SH kodeeriv geen, mis asub pNAH20 plasmidi *sal* operonis (Elken *et al.*, 2020). Väga madalast *nahG* geeni mRNA hulgast R2A söötmel kasvanud PC20 rakkudes järeldub, et SH ekspressioon on indutseeritud substraadi poolt (Joonis 17A). Klorosalitsülaadid indutseerivad *nahG* ekspressiooni võrreldes salitsülaadiga rohkem. Samas on 3-KL-il kasvanud rakkudes SH aktiivsus salitsülaadiga võrreldes madalam (Joonis 14), mistõttu võib järeldada, et substraadil ei ole geeni *nahG* ekspressioonile inhibeerivat mõju, vaid on häiritud ensüümi ja 3-KL-i interaktsioon. Tüvel PC20 on üks C23O kodeeriv geen,

*nahH*, mis asub pNAH20 plasmidi *sal* operonis (Elken *et al.*, 2020). Klororühmadega salitsülaatidel kasvades esineb rakkudel võrdluses salitsülaadiga kõrgem *nahH* mRNA hulk (Joonis 17A), kuid madalam C23O ensümaatilise aktiivsus (Joonis 15A). 3-KL-il kasvanud rakkude puhul on see erinevus kõige suurem ning võib oletada, et C23O on inhibeeritud, sest kasvukeskkonda ei kogunenud kollast KHMS (Joonis 11A) ning sööde värvus pruuniks kuhjuva katehhooli polümeriseerumise tõttu (Joonis 10A). Salitsülaatidest tekkivat (kloro)katehhooli ei lagundata tüves PC20 ka redundantsete C12O-dega, sest nii *pheB*<sup>C12O</sup> kui ka *catA* ekspressioon on madal (Joonis 17B) nagu ka summaarne C12O aktiivsus (Joonis 15B).

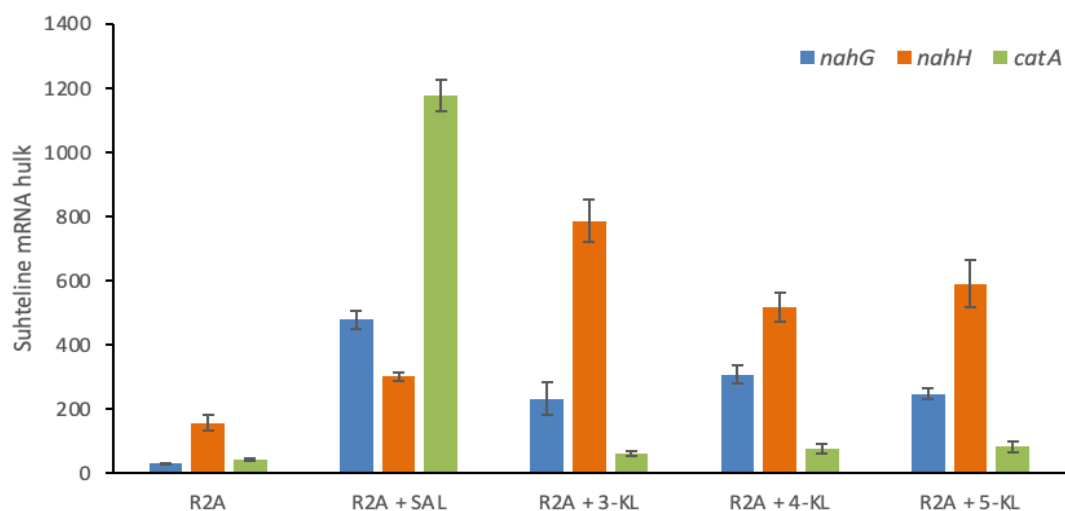


Joonis 17. *P. fluorescens* PC20 salitsülaadi 1-hüdroksülaasi (A), NahG, ning katehhooli 2,3-dioksügenaasi, NahH, ja katehhooli 1,2-dioksügenaasi, PheB<sup>C12O</sup>, (B) kodeerivate geenide suhtelised mRNA hulgad. RNA eraldati logaritmilisest kasvufaasi lõpust võetud rakkudest, mida kasvatati R2A söötmel või R2A söötmel, millele oli lisatud salitsülaati (SAL), 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati (KL) lõppkontsentratsiooniga 3 mM.

Kirjandusest on teada, et tüves PC20 indutseeritakse PheB<sup>C12O</sup> ainult fenooli poolt (Elken *et al.*, 2020), kuid salitsülaatidel kasvanud rakkudes mõõdetud kromosomaalse *catA* ekspressioon ilmselt oluliselt lagundamisprotsessi ei mõjuta. Seda oletust kinnitab ka 4-KL ja 5-KL sisaldavate söötmete värvumine kollaseks, mis on põhjustatud C23O toimel 4-klorokatehhoolist tekkiva KHMS kogunemisest söötmesse (Joonis 10A).

*Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 *sal* operon paikneb plasmiidil pDTG1. Erinevalt tüvest PC20 asetseb C23O kodeeriva *nahH* läheduses insertioonelement ning varasemates töödes on näidatud, et kuigi madal C23O aktiivsus on konstitutiivselt tuvastatav lagundatakse salitsülaadist tekkiv katehhoole kromosomaalse C12O-ga (Dennis ja Zylstra, 2004). Käesolevas töös oli *P. putida* NCIB 9816-4 R2A söötmel kasvanud rakkudes SH kodeeriva *nahG* mRNA hulk kuni 15 korda madalam, kui salitsülaati (3-, 4- ja 5-KL korral vastavalt 7, 10 ja 8 korda) sisaldavas söötmes (Joonis 18). Seega on SH ekspressioon indutseeritud salitsülaatide poolt. C23O kodeeriva *nahH* mRNA hulga määramised kinnitasid kirjanduse andmeid, ka R2A söötmel kasvanud rakkudes on *nahH* ekspresseeritud ning salitsülaatide lisamisel suureneb ekspressioon kaks (salitsülaat) kuni viis (3-KL) korda (Joonis 18). Kui kromosomaalset C12O kodeeriva *catA* ekspressioon oli salitsülaadil kasvanud NCIB 9816-4 rakkudes 27 korda kõrgem, siis klorosalitsülaate sisaldavatel söötmetel oli ekspressioon sarnane R2A-l kasvanud rakkudega (Joonis 18). Park *et al.* (2004) on näidanud, et *P. putida* NCIB 9816-4 kasvul salitsülaadil esineb katehhoole ladestumine tsütotoksilisel tasemel, mis viitab C23O ja C12O madalale aktiivsusele. Käesolevas töös tehtud katsete tulemused viitavad, et ka klorokatehhoole lagundamine ei toimu efektiivselt: 3-KL sisaldav sööde värvub pruuniks ning C23O ja C12O aktiivsused on madalad, 4-KL ja 5-KL korral tekib vaatamata C23O suhteliselt madalale aktiivsusele söötmesse KHMS (Joonis 12, Joonis 15).

Kuigi kogunevate vaheühendite hulk katse lõpuks ei vähene söötmes (Joonis 13B-D), ei mõjuta see väga oluliselt NCIB 9816-4 kasvukiirust ega lag-faasi pikkust (Joonis 12A). Biomassi saagise tõusu puudumine klorosalitsülaatide lisamisel näitab, et rakud ei suuda substraate süsiniku-ja energiaallikana kasutada. Võrreldes tüvede C70 ja PC20 on NCIB 9816-4 *nahG* ekspressioon kõige kõrgem ning võib oletada, et seetõttu tuleb tüvi paremini toime tsütotoksilise (kloro)salitsülaadi lagundamisega. Kuid kuna klorokatehhoole lagundamisprotsess oli katsete põhjal aeglane ja/või ebaefektiivne, mõjuvad ka salitsülaatide lagundamisel tekkivad vaheühendid NCIB 9816-4-le toksiliselt.



Joonis 18. *P. putida* NCIB 9816-4 salitsülaadi 1-hüdrosülaasi, NahG, ning katehhooli 2,3-dioksügenaasi, NahH ja katehhooli 1,2-dioksügenaasi, *catA*, kodeerivate geenide suhtelised mRNA hulgid. RNA eraldati logaritmilisest kasvufaasist lõpust võetud rakkudest, mida kasvatati R2A söötmel või R2A söötmel, millele oli lisatud salitsülaati (SAL), 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati (KL) lõppkontsentratsiooniga 3 mM.

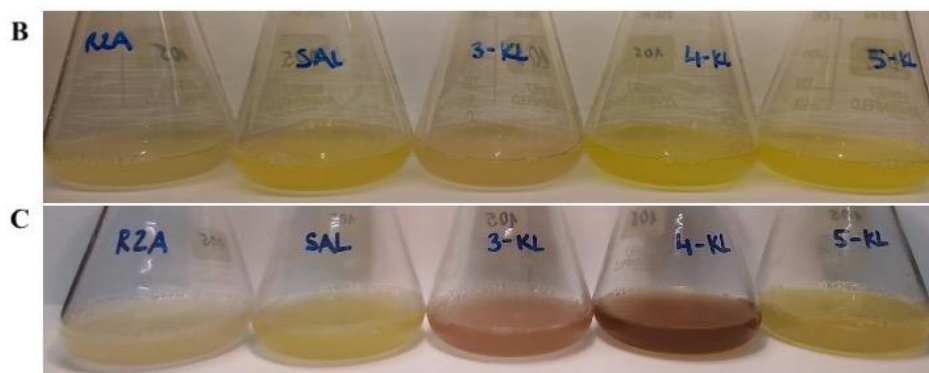
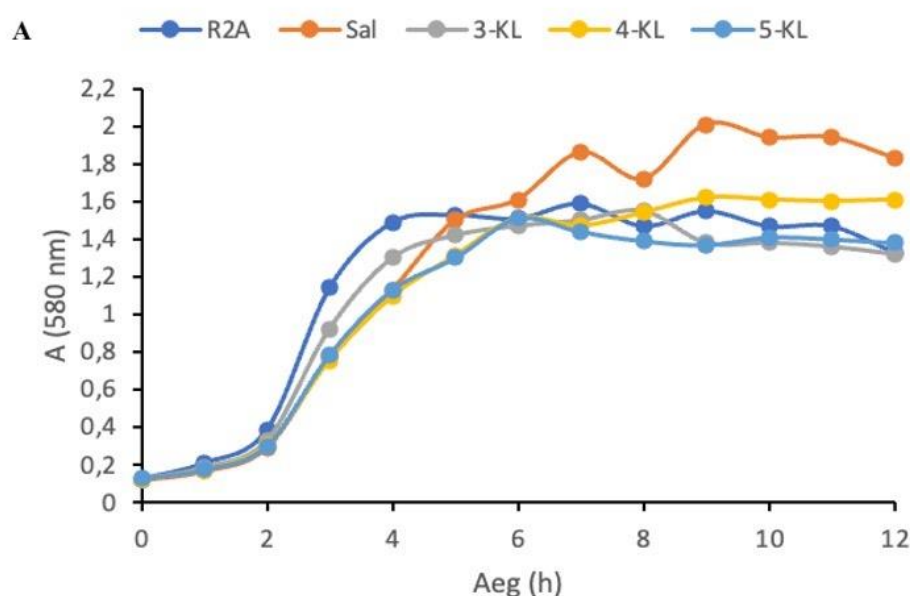
Kolmest tüvest olid kõrgeimad SH kodeeriva geeni mRNA hulgid salitsülaadil kasvanud *P. putida* tüvel NCIB 9816-4. *P. pseudoalcaligenes* tüve C70 kahe SH kodeeriva geeni mRNA hulk oli kõrgeim 3- ja 5-klorosalitsülaadil, kuid madalaim 4-klorosalitsülaadil kasvanud rakkudes. Klorosalitsülaate sisaldaval söötmel kasvanud *P. fluorescens* tüve PC20 rakkudes olid kõrged SH ja C230, kuid madalad C120 kodeerivate geenide ekspressioonid.

### 3.4. Segakultuuri kasv (kloro)salitsülaatidel

Saasteainete lagundamine segakultuuris võib pakkuda kasvueeliseid vastavaid kataboolseid radu omavatele mikroobidele, mille tulemusel on lagundamisprotsess kiirem ja efektiivsem (Pelz, *et al.*, 1999; Pawelczyk, *et al.*, 2008). Seepärast otsustati ka antud töös uurida, kuidas toimub salitsülaatide lagundamine tüvede C70, PC20 ja NCIB 9816-4 koosluses. Kasvatused kolme tüve seguga tehti kolbides R2A söötmel ning R2A söötmel, millele oli lisatud 3mM salitsülaati, 3-klorosalitsülaati, 4-klorosalitsülaati või 5-klorosalitsülaati (Joonis 19). Segakultuuri kasvukõveratel oli ühte moodi lühike lag-faas, kasvukiirus oli kõige suurem R2A söötmel, kuid ka salitsülaate sisaldavatel söötmel ei olnud see oluliselt madalam. Võrreldes R2A söötmega oli biomassi saagis kõrgem, kui söötmesse oli lisatud salitsülaati või 4-KL

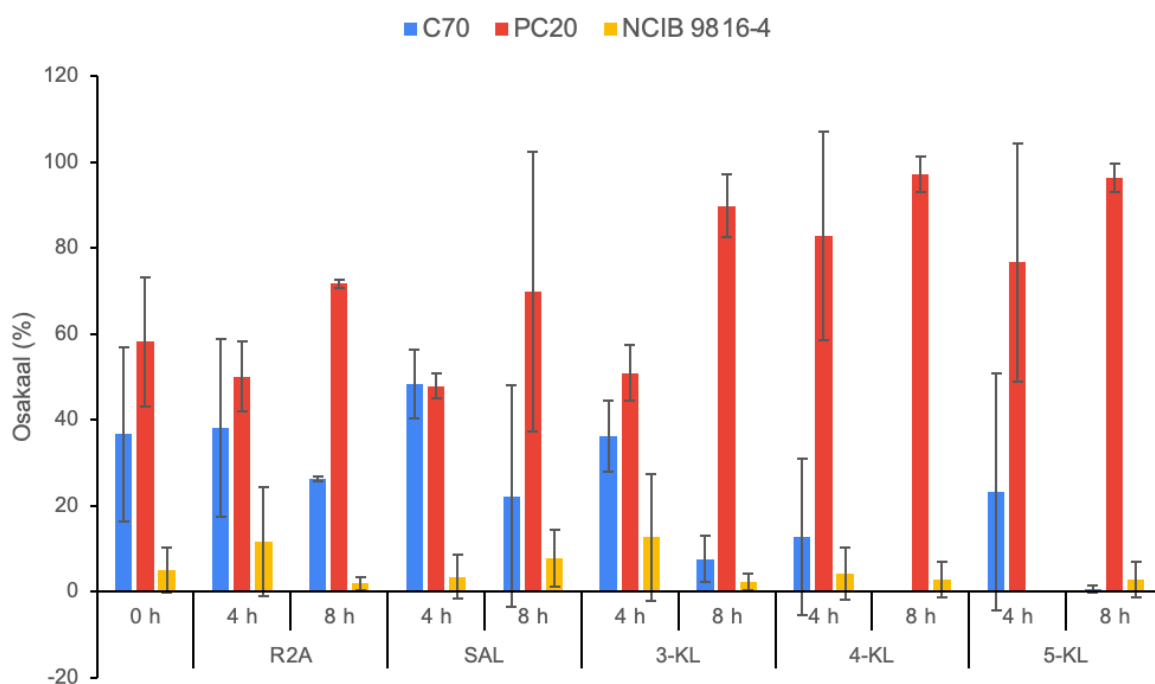
(Joonis 19A). Kõrvutades segakultuuri kasvukõveraid üksikkultuuride omadega (Joonised 8A, 10A ja 12A) võiks esmapilgul järeldada, et koosluses domineeris *P. fluorescens* PC20.

Kooslusest üksiktüvede detekteerimiseks otsustati alguses viia tüvedesse sisse GFP-märgised. Kuid katsed reportergeeniga kandva tüve NCIB 9816-4 näitasid, et muutunud oli tüve võime kasvada kõrgematel salitsülaadi kontsentratsioonidel. Seepärast otsustati tüvede eristamiseks kasutada erinevaid söötmeid. R2A tardsöötmetele külvatud proovidest kasvanud kolooniad külvati kõigepealt KingB söötmele, mille abil oli võimalik eristada fluorestseeruvaid tüvesid PC20 ja NCIB 9816-4 mittefluorestseeruvast tüvest C70. Seejärel külvati kolooniad fenooli sisaldavale minimaalsöötmele, et eristada fenoolil kasvavaid tüvesid C70 ja PC20 fenoolil mitte kasvavast tüvest NCIB 9816-4. Saadud arvukuste põhjal arutati tüvede suhtelised osakaalud 0, 4 ja 8 tunnil võetud proovides (Joonis 20). Kuna katset jõuti teha vaid kaks korda ning tulemused hälbisid üsna palju, on standardhälbed suured.



Joonis 19. *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4 segakultuuri kasvukõverad (A) R2A söötmel ja R2A söötmel, millele on lisatud salitsülaati (SAL), 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati (KL). Fotod kolbidest 6 (B) ja 12 tunnil (C) peale katse algust.

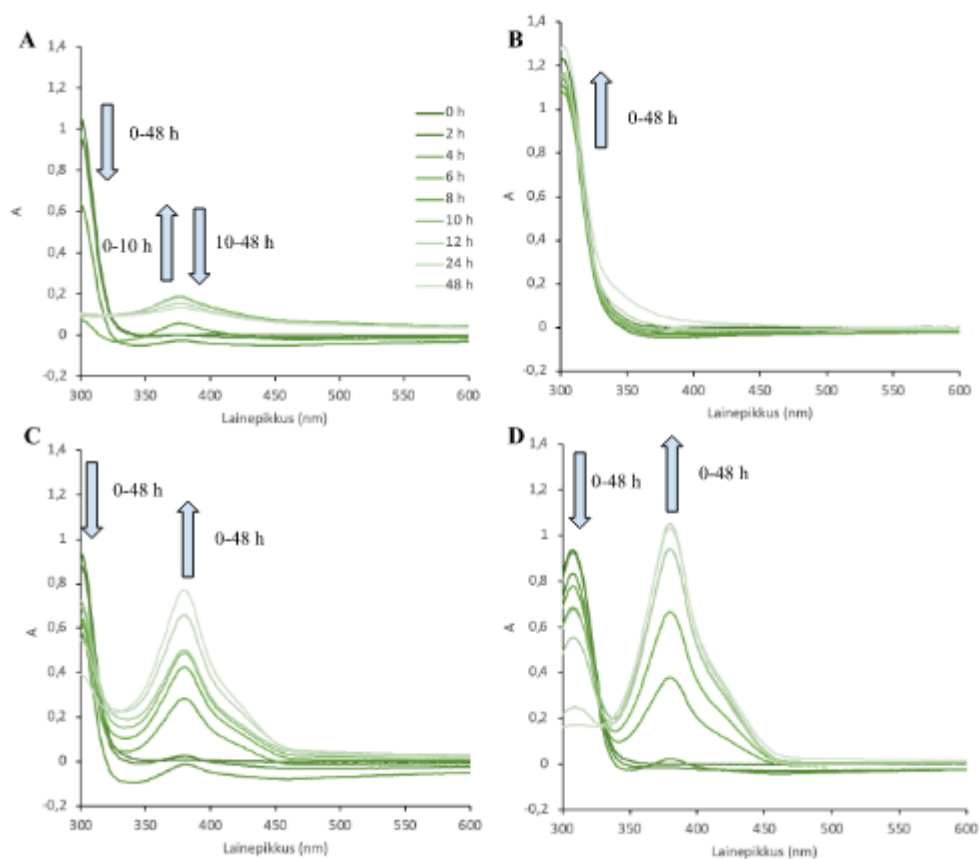
Kuigi katse alguses võeti segusse iga tüve ettekasvatust arvestusega, et selle osakaal segus oleks  $\frac{1}{3}$  siis 0 tunni proovist tehtud väljakülvide põhjal oli tüve NCIB 9861-4 osakaal kõige madalam ning tüvesid C70 ja PC20 oli enam vähem võrdselt (Joonis 20). Kõikide kasvatuste 4 ja 8 tunni väljakülvides domineerib (50-98%) tüvi PC20. C70 osakaal püsib erinevatel söötmetel 4 h proovis kas samal tasemel (R2A, salitsülaad, 3-KL) või väheneb (4-KL, 5-KL), kuid väheneb oluliselt kõikides 8 h proovides (v.a. R2A söötmetel). Tüve NCIB 9816-4 osakaal erinevatel söötmetel jääb samuti samale tasemele või väheneb, ainult 4 h salitsülaadi ja 3-KL proovides oli osakaal võrreldes 0 h prooviga kõrgem (Joonis 20). Kindlasti tuleks segakultuuride kasvatusi korrata ning ühtlustada sissekülvis kolme tüve osakaalud.



Joonis 20. *P. pseudocaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ning *P. putida* NCIB 9816-4 osakaal (%) kasvades R2A-l ja R2A-l, millele lisati 3 mM salitsülaati, 3-, 4-, ja 5-klorosalitsülaati. Väljakülvid söötmetest sooritati katse alguses (0 h) R2A söötmetest ning 4 tunni ja 8 tunni möödudes kõikidest söötmetest.

*P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ning *P. putida* NCIB 9816-4 segakultuuride kasvukeskkondades toimus katse jooksul drastiline söötmete värvimuutus (Joonis 19B, C). Fotolt, mis tehti 6 tunnil on näha, et salitsülaadi, 4- ja 5-klorosalitsülaadi sisaldavad söötmed olid muutunud erkkollaseks (Joonis 19B), kuid 12 tunnil oli 4-klorosalitsülaadi sisaldav sööde muutunud tumepruuniks (Joonis 19C). Värvimuutus neil söötmetel viitab vähemalt osalisele katehhooli *meta* raja aktiivsusele ning seda kinnitavad ka neeldumisspektritel tuvastatud *meta* rajale iseloomulike vaheühendite piigid lainepikkustel 375 ja 380 nm (Joonis 21). 3-klorosalitsülaadi sisaldava söötme värvus oli 6 tunnil helepruun ning värv tumenes aja

möödudes (Joonis 19 B, C), mis viitab katehhooli *meta* või *ortho* raja madalale või puuduvale aktiivsusele ning akumulereuva 3-klorokatehhooli polümeriseerumisele (piik 310 nm; Joonis 21).



Joonis 21. Neeldumisspektrid (300 kuni 600 nm) *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4 segakultuuri kasvatustest R2A vedelsöötmetel, millele oli lisatud salitsülaati (A), 3-klorosalitsülaati (B), 4-klorosalitsülaati (C) või 5-klorosalitsülaati (D).

Sarnaselt üksiktüvede kasvatustega toimus koosluses kõige efektiivselt kasv salitsülaadil - biomassi saagis tõusis võrreldes R2A söötmega, katehhooli *meta* raja vaheühendit kogunes vähem ning pöörduvalt (Joonis 19, 21A). Kuid klorosalitsülaadidel kasvanud segakultuuris kogunesid samuti vaheühendid ning biomass suurenemist ei toimunud. 3-KL sisaldas söötmes olid 4 h proovis kõik tüved olemas ning NCIB 9816-4 osakaal isegi tõusnud (Joonis 20B), kuid siiski ei suutnud tüved 3-klorokatehhooli lagundada ja polümeriseerumisel tekkinud ühendid värvisid söötme tumedaks (Joonis 19A). Seega ei suuda uuritud tüved sõltumata sellest, kas neil on katehhooli lagundamiseks C12O või C23O 3-KL lagundada. 3-klorokatehhooli kuhjumist on näidatud ka perekonna *Actinomycetes* tüvede kooslustes 2- ja 3-klorofenooli lagundamisel (Farell ja Quilty, 1999).

Koosluses domineeris *P. fluorescens* PC20, mille kõrge kasvukiirus ning ensüümide madalam tundlikkus klororühmadega substraatide suhtes andsid tüvele teiste tüvede ees kasvueelise. Kuigi üksiktüvena *P. pseudoalcaligenes* C70 kasvul 4- ja 5-KL sisaldaval söötmel kogunes KHMS pöördvalt oli bakteri kasv ja võtmeensüüme kodeerivate geenide ekspressioon (Joonis 8 ja 16) siiski nii palju häiritud, et ka koosluses ei suuda tüvi kiire kasvuga PC20 konkureerida (Joonis 20). Mõlemal söötmel toimub sarnane värvimuutus kui PC20 üksikkultuuris. Kuigi *P. putida* NCIB 9816-4 osakaalud on kõigil söötmetel võrreldes teistega madalaimad, siis 5-KL on see kõige madalam. See on kooskõlas tüve madalate ensüümiaktiivsuse ning geeniekspressiooniga 5-klorosalitsülaadil kasvades (Joonis 14, 15 18). *P. fluorescens* PC20 kiirel kasvul tekkivad vaheühendid ei paku märgatavat eelist teistele tüvedele.

Käesolevas töös teostatud katsed näitavad, et üksiksubstraatidel kasvavatele tüvedele ei anna redundantseid salitsülaadi 1-hüdroksülaasid ja/või katehooli dioksügenaasid salitsülaatide lagundamisel eelist. Tüvede C70 ja PC20 puhul tasuks edaspidi uurida nende võimekust lagundada (kloro)salitsülaadi ja fenooli segu, sest sel juhul on indutseeritud mõlemad katehooli rajad. Jõesaar jt. (2017) näitasid, et salitsülaadi ja fenooli segus kasvades kogunes tüve C70 kasvukeskkonda vähem katehooli ning mõlemad C23O kodeerivad geenid olid ekspresseeritud. Varem ei ole salitsülaadi ja fenooli segus tüve PC20 kasvu uuritud, kuid teada on, et fenool indutseerib plasmiidse C12O (Heinaru *et al.*, 2009), mis võib samuti mõjutada kasvu segasubstraatidel. Segakultuuride uurimisel tuleks optimeerida üksiktüvede osakaalud sissekülvis ning analüüsida seejärel vaheühendite kogunemist ning ensüümiaktiivsuseid.

## KOKKUVÕTE

Bioremediatsiooni kasutamine on paljulubav lähenemine reostuste likvideerimiseks, kuid tehnoloogia pädev kasutamine nõuab protsessis kasutatavate mikroorganismide omaduste ning lagundamispotentsiaali põhjalikku tundmist. Antud töös võrreldi *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4 võimekust lagundada salitsülaati, 3-, 4- ja 5-klorosalitsülaati.

Töö tulemused ja järeldused võib kokku võtta järgnevalt:

1. Kasutatud salitsülaadi ja klorosalitsülaadi kontsentratsioonidel ning tingimustes esines *P. fluorescens* tüvel PC20 kõrgeim kasvukiirus, järgnes *P. pseudoalcaligenes* C70 ning madalaima kasvukiirusega oli *P. putida* tüvi NCIB 9816-4;
2. süsiniku- ja energiaallikana kasutasid tüved ainult salitsülaati;
3. klorosalitsülaatide lagundamisel kuhjuvad vaheühendid, mis inhibeerivad võtmeensüüme;
4. salitsülaatide lagundamisel oli tüves NCIB 9816-4 vaatamata *sal* operoni sisenenud insertioonielemendile olemas C23O aktiivsus, kuid siiski ei suuda tüvi klorosalitsülaate täielikult lagundada;
5. salitsülaatide lagundamisel ei anna redundantset SH ja C23O tüvele C70 kasvueelist;
6. segakultuuris domineerib tüvi PC20, tüve kasvukiirus ja lag-faasi pikkus ei sõltu klororühma olemasolust ega asetusest salitsülaadi molekulis.

Kokkuvõttes võib väita, et uuritud tüved ei ole võimelised klorosalitsülaate efektiivselt lagundamisradades lõpuni lagundama ei üksik- ega segakultuurina.

## Degradation of chlorosalicylates in different species of the *Pseudomonas* family

Anni Peegel

### Resümee/Summary

Aromatic compounds, particularly the more stable polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), have become a large-scale source of pollution worldwide. The compounds have a harmful effect on flora and fauna, which is why pollution in the Baltic Sea, Atlantic Ocean, or other water bodies can cause irreversible destruction in local ecosystems.

Elimination of pollution using mechanical methods is an expensive and time-consuming process, usually yielding mediocre results. The solution is bioremediation - using microorganisms to degrade aromatic compounds into metabolites. Aromatic compounds are often highly stable, so it is necessary to find specific bacterial strains that have both the enzymatic pathways necessary to break down aromatic compounds and the ability to survive in bacterial communities and do it within a reasonable time.

The aim of this work was to analyze the ability of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, *Pseudomonas fluorescens* PC20 and *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 to degrade chlorosalicylates in comparison of Na-salicylate in single and mixed cultures via classical naphthalene degradation pathway. Na-salicylate was chosen as it is a central intermediate formed during the decomposition of PAHs.

The results and conclusions of the study are summarized as follows:

1. Under tested conditions and concentrations of salicylate and chlorosalicylates *P. fluorescens* strain PC20 exhibited the highest levels of growth rates, followed by *P. pseudoalcaligenes* C70 and with the lowest growth rates belonging to *P. putida* NCIB 9816-4;
2. all the strains used only salicylate as a carbon and energy source;
3. during the degradation of chlorosalicylates, intermediates, which inhibit the key enzymes, accumulated in the media;
4. *P. putida* NCIB 9816-4 exhibited catechol *meta* pathway activity when grown on salicylates (even though an insertion element is present in the *sal* operon), although the strain was still unable to degrade chlorosalicylates;

5. the redundant salicylate 1-hydroxylases and catechol 2,3-dioxygenases do not give *P. pseudoalcaligenes* C70 a growth advantage during the degradation process of chlorosalicylates;
6. *P. fluorescens* PC20 was the dominating strain in mixed culture cultivations; in single culture the growth rate and the lag-phase length of PC20 were not influenced by chlorine group or the subsequent placement of the group in the salicylate molecule.

In conclusion, the strains used in this study cannot efficiently use chlorosalicylates as a carbon and energy source, either in a single or mixed culture.

## **TÄNUSÕNAD**

Soovin südamest tänada juhendajaid, Merike Jõesaart ning Signe Viggorit, kes olid nõu ja jõuga abiks ning hoidsid mind motiveerituna terve bakalaureusetöö kirjutamise vältel. Lisaks tänan ka enda armsaid kursusekaaslaseid, jagatud mure on alati pool muret.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Arora, P., & Bae, H. (2014). Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-31>
- Bae, H. S., Lee, J. M., Kim, Y. B., & Lee, S.-T. (1997). Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation*, 7(6), 463–469. <https://doi.org/10.1007/BF00115293>
- Bai, X., Nie, M., Diwu, Z., Wang, L., Nie, H., Wang, Y., Yin, Q., & Zhang, B. (2021). Extraction and purification of 2-hydroxymuconic semialdehyde accumulated in phenol degradation by *Pseudomonas stutzeri* N2. *Chemical Engineering Journal*, 419, 129444. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129444>
- Bao, Y., Lies, D. P., Fu, H., & Roberts, G. P. (1991). An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene*, 109(1), 167–168. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90604-A](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90604-A)
- Barrow, R.R. Salitsülaadi ning metüülsalitsülaatide lagundamine erinevates perekonna *Pseudomonas* liikides [Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool]. <https://dspace.ut.ee/handle/10062/86011>
- Bartels, I., Knackmuss, H.-J., & Reineke, W. (1984). Suicide Inactivation of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-Halocatechols. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(3), 500–505. <https://doi.org/10.1128/aem.47.3.500-505.1984>
- Blasco, R., Mallavarapu, M., Wittich, R., Timmis, K. N., & Pieper, D. H. (1997). Evidence that Formation of Protoanemonin from Metabolites of 4-Chlorobiphenyl Degradation Negatively Affects the Survival of 4-Chlorobiphenyl-Cometabolizing Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 427–434. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.427-434.1997>
- Bobadilla Fazzini, R. A., Bielecka, A., Poucas Quintas, A. K., Golyshin, P. N., Preto, M. J., Timmis, K. N., & Martins Dos Santos, V. A. P. (2009). Bacterial consortium proteomics under 4-chlorosalicylate carbon-limiting conditions. *PROTEOMICS*, 9(8), 2273–2285. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800489>
- Bosch, R., Moore, E. R. B., García-Valdés, E., & Pieper, D. H. (1999). NahW, a Novel, Inducible Salicylate Hydroxylase Involved in Mineralization of Naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2315–2322. <https://doi.org/10.1128/JB.181.8.2315-2322.1999>
- Boyer, H. W., & Roulland-dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 41(3), 459–472. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90288-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90288-5)
- Cámara, B., Bielecki, P., Kaminski, F., Dos Santos, V. M., Plumeier, I., Nikodem, P., & Pieper, D. H. (2007). A Gene Cluster Involved in Degradation of Substituted Salicylates via ortho Cleavage in *Pseudomonas* sp. Strain MT1 Encodes Enzymes Specifically Adapted for Transformation of 4-Methylcatechol and 3-Methylmuconate. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1664–1674. <https://doi.org/10.1128/JB.01192-06>
- Cámara, B., Nikodem, P., Bielecki, P., Bobadilla, R., Junca, H., & Pieper, D. H. (2009). Characterization of a Gene Cluster Involved in 4-Chlorocatechol Degradation by *Pseudomonas reinekei* MT1. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4905–4915. <https://doi.org/10.1128/JB.00331-09>

- Chakrabarty, A. M. (1972). Genetic Basis of the Biodegradation of Salicylate in *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, 112(2), 815–823. <https://doi.org/10.1128/jb.112.2.815-823.1972>
- Chen, S.-H., & Aitken, M. D. (1999). Salicylate Stimulates the Degradation of High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environmental Science & Technology*, 33(3), 435–439. <https://doi.org/10.1021/es9805730>
- Costa, D. M. A., Gómez, S. V., De Araújo, S. S., Pereira, M. S., Alves, R. B., Favaro, D. C., Hengge, A. C., Nagem, R. A. P., & Brandão, T. A. S. (2019). Catalytic mechanism for the conversion of salicylate into catechol by the flavin-dependent monooxygenase salicylate hydroxylase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.135>
- Davies, J., & Evans, W. (1964). Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. *Biochemical Journal*, 91(2), 251–261. <https://doi.org/10.1042/bj0910251>
- Dennis, J. J., & Zylstra, G. J. (2004). Complete Sequence and Genetic Organization of pDTG1, the 83 Kilobase Naphthalene Degradation Plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *Journal of Molecular Biology*, 341(3), 753–768. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.034>
- Elken, E., Heinaru, E., Jõesaar, M., & Heinaru, A. (2020). Formation of new PHE plasmids in pseudomonads in a phenol-polluted environment. *Plasmid*, 110, 102504. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2020.102504>
- Fang, T., & Zhou, N.-Y. (2014). Purification and characterization of salicylate 5-hydroxylase, a three-component monooxygenase from *Ralstonia* sp. Strain U2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 671–679. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4914-x>
- Farrell, A., & Quilty, B. (1999). Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a meta- cleavage pathway. *Biodegradation*, 10(5), 353–362. <https://doi.org/10.1023/A:1008323811433>
- Figurski, D. H., & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1648–1652. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>
- Habe, H., & Omori, T. (2003). Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(2), 225–243. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.225>
- Harayama, S., & Rekik, M. (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *Journal of Biological Chemistry*, 264(26), 15328–15333. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84830-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84830-5)
- Heinaru, E., Vedler, E., Jutkina, J., Aava, M., & Heinaru, A. (2009). Conjugal transfer and mobilization capacity of the completely sequenced naphthalene plasmid pNAH20 from multiplasmid strain *Pseudomonas fluorescens* PC20. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(3), 563–574. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00763.x>
- Heiss, G., Stolz, A., Kuhm, A. E., Müller, C., Klein, J., Altenbuchner, J., & Knackmuss, H. J. (1995). Characterization of a 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from the naphthalenesulfonate-degrading bacterium strain BN6. *Journal of Bacteriology*, 177(20), 5865–5871. <https://doi.org/10.1128/jb.177.20.5865-5871.1995>
- Herrero, M., De Lorenzo, V., & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(11), 6557–6567. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6557-6567.1990>

- Hollender, J., Hopp, J., & Dott, W. (1997). Degradation of 4-Chlorophenol via the meta Cleavage Pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4567–4572. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4567-4572.1997>
- Hupert-Kocurek, K., Wojcieszynska, D., & Guzik, U. (2014). Activity of a Carboxyl-Terminal Truncated Form of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Planococcus* sp. S5. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/598518>
- Jiménez, J. I., Pérez-Pantoja, D., Chavarría, M., Díaz, E., & de Lorenzo, V. (2014). A second chromosomal copy of the *catA* gene endows *Pseudomonas putida* mt-2 with an enzymatic safety valve for excess of catechol. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1767–1778. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12361>
- Jõesaar, M., Viggor, S., Heinaru, E., Naanuri, E., Mehike, M., Leito, I., & Heinaru, A. (2017). Strategy of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 for effective degradation of phenol and salicylate. *PLOS ONE*, 12(3), e0173180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173180>
- Junca, H. (2004). Difference in kinetic behaviour of catechol 2,3-dioxygenase variants from a polluted environment. *Microbiology*, 150(12), 4181–4187. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27451-0>
- Kaschabek, S. R., Kasberg, T., Müller, D., Mars, A. E., Janssen, D. B., & Reineke, W. (1998). Degradation of Chloroaromatics: Purification and Characterization of a Novel Type of Chlorocatechol 2,3-Dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. *Journal of Bacteriology*, 180(2), 296–302. <https://doi.org/10.1128/JB.180.2.296-302.1998>
- Kilpi, S., Backstrom, V., & Korhola, M. (1983). Degradation of catechol, methylcatechols and chlorocatechols by *Pseudomonas* sp. HV3. *FEMS Microbiology Letters*, 18(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00438.x>
- Koch, B., Jensen, L. E., & Nybroe, O. (2001). A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *Journal of Microbiological Methods*, 45(3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00246-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00246-9)
- Koo, Y. M., Heo, A. Y., & Choi, H. W. (2020). Salicylic Acid as a Safe Plant Protector and Growth Regulator. *The Plant Pathology Journal*, 36(1), 1–10. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.12.2019.0295>
- Ladino-Orjuela, G., Gomes, E., da Silva, R., Salt, C., & Parsons, J. R. (2016). Metabolic Pathways for Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. In W. P. de Voogt (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237* (pp. 105–121). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_5)
- Lambertsen, L., Sternberg, C., & Molin, S. (2004). Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environmental Microbiology*, 6(7), 726–732. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00605.x>
- Lanfranconi, M. P., Christie-Oleza, J. A., Martin-Cardona, C., Suárez-Suárez, L. Y., Lalucat, J., Nogales, B., & Bosch, R. (2009). Physiological role of NahW, the additional salicylate hydroxylase found in *Pseudomonas stutzeri* AN10. *FEMS Microbiology Letters*, 300(2), 265–272. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01787.x>
- Li, S., Qin, K., Li, H., Guo, J., Li, D., Liu, F., Tan, Z., Yan, W., Qu, S., & Zhao, H. (2018). Cloning and characterisation of four *catA* genes located on the chromosome and large plasmid of *Pseudomonas putida* ND6. *Electronic Journal of Biotechnology*, 34, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.06.001>
- Liivak, M. (2007). Multiplasmiidne süsteem naftaleeni ja fenooli lagundamiseks *Pseudomonas fluorescens* tüves PC20 [Magistritöö, Tartu Ülikool].
- McLaughlin, H., Farrell, A., & Quilty, B. (2006). Bioaugmentation of Activated Sludge with Two *Pseudomonas putida* Strains for the Degradation of 4-Chlorophenol. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 41(5), 763–777. <https://doi.org/10.1080/10934520600614348>

- Mehike, M. (2016). Redundantsed katehhooli 2,3-dioksügenaasid *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüves C70 [Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool]. <https://dspace.ut.ee/handle/10062/52102>
- Menzie, C. A., Potocki, B. B., & Santodonato, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science & Technology*, 26(7), 1278–1284. <https://doi.org/10.1021/es00031a002>
- Mohapatra, B., & Phale, P. S. (2021). Microbial Degradation of Naphthalene and Substituted Naphthalenes: Metabolic Diversity and Genomic Insight for Bioremediation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 602445. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.602445>
- Muñoz, R., Díaz, L. F., Bordel, S., & Villaverde, S. (2007). Inhibitory effects of catechol accumulation on benzene biodegradation in *Pseudomonas putida* F1 cultures. *Chemosphere*, 68(2), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.01.016>
- Nikodem, P., Hecht, V., Schlömann, M., & Pieper, D. H. (2003). New Bacterial Pathway for 4- and 5-Chlorosalicylate Degradation via 4-Chlorocatechol and Maleylacetate in *Pseudomonas* sp. Strain MT1. *Journal of Bacteriology*, 185(23), 6790–6800. <https://doi.org/10.1128/JB.185.23.6790-6800.2003>
- Olaniran, A. O., & Igbinsa, E. O. (2011). Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes. *Chemosphere*, 83(10), 1297–1306. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.009>
- Park, W., Jeon, C. O., Cadillo, H., DeRito, C., & Madsen, E. L. (2004). Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 in naphthalene-amended soils: Toxicity of naphthalene and its metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(3), 429–435. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1420-6>
- Pawelczyk, S., Abraham, W.-R., Harms, H., & Müller, S. (2008). Community-based degradation of 4-chlorosalicylate tracked on the single cell level. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.018>
- Pelz, O., Tesar, M., Wittich, R.-M., Moore, E. R. B., Timmis, K. N., & Abraham, W.-R. (1999). Towards elucidation of microbial community metabolic pathways: Unravelling the network of carbon sharing in a pollutant-degrading bacterial consortium by immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry. *Environmental Microbiology*, 1(2), 167–174. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00023.x>
- Pérez-Pantoja, D., González, B., & Pieper, D. H. (2010). Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 799–837). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_60](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_60)
- Pieper, D. H., González, B., Cámara, B., Pérez-Pantoja, D., & Reineke, W. (2010). Aerobic Degradation of Chloroaromatics. In K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 839–864). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_61](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_61)
- Pollmann, K. (2002). Abbau von Chlorbenzolen und Chlortoluolen durch natürliche und konstruierte Mikroorganismen. Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften, Dissertation, [https://www.hzdr.de/FWR/DOCS/Publications/Dissertation\\_Katrin\\_Pollmann.pdf](https://www.hzdr.de/FWR/DOCS/Publications/Dissertation_Katrin_Pollmann.pdf).
- Pozdnyakova-Filatova, I., Petrikov, K., Vetrova, A., Frolova, A., Streletskii, R., & Zakharova, M. (2020). The Naphthalene Catabolic Genes of *Pseudomonas putida* BS3701: Additional Regulatory Control. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1217. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01217>

- Preuss, R., Angerer, J., & Drexler, H. (2003). Naphthalene: an environmental and occupational toxicant. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 76(8), 556–576. <https://doi.org/10.1007/s00420-003-0458-1>
- Price, C. T. D., Lee, I. R., & Gustafson, J. E. (2000). The effects of salicylate on bacteria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(10), 1029–1043. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(00\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(00)00042-X)
- Rainsford, K. D. (1984). *Aspirin and the Salicylates*. Butterworth & Co.
- Riegert, U., Bürger, S., & Stolz, A. (2001). Altering Catalytic Properties of 3-Chlorocatechol-Oxidizing Extradiol Dioxygenase from *Sphingomonas xenophaga* BN6 by Random Mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 183(7), 2322–2330. <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2322-2330.2001>
- Rojó, F., Pieper, D. H., Engesser, K.-H., Knackmuss, H.-J., & Timmis, K. N. (1987). Assemblage of Ortho Cleavage Route for Simultaneous Degradation of Chloro- and Methylaromatics. *Science*, 238(4832), 1395–1398. <https://doi.org/10.1126/science.3479842>
- Rubio, M. A., Engesser, K.-H., & Knackmuss, H.-J. (1986). Microbial metabolism of chlorosalicylates: Accelerated evolution by natural genetic exchange. *Archives of Microbiology*, 145(2), 116–122. <https://doi.org/10.1007/BF00446767>
- Sahinkaya, E., & Dilek, F. B. (2006). Effect of biogenic substrate concentration on chlorophenol degradation kinetics. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(9), 1530–1539. <https://doi.org/10.1002/jctb.1557>
- Sander, P., Wittich, R.-M., Fortnagel, P., Wilkes, H., & Francke, W. (1991). Degradation of 1,2,4-Trichloro- and 1,2,4,5-Tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1430–1440. <https://doi.org/10.1128/aem.57.5.1430-1440.1991>
- Sazonova, O. I., Izmalkova, T. Yu., Kosheleva, I. A., & Boronin, A. M. (2008). Salicylate degradation by *Pseudomonas putida* strains not involving the “Classical” nah2 operon. *Microbiology*, 77(6), 710–716. <https://doi.org/10.1134/S002626170806009X>
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>
- Serdar, C. M., & Gibson, D. T. (1989). Studies of nucleotide sequence homology between naphthalene-utilizing strains of bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164(2), 772–779. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91526-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91526-X)
- Sidorenko, J., Jatsenko, T., Saumaa, S., Teras, R., Tark-Dame, M., Hōrak, R., & Kivisaar, M. (2011). Involvement of specialized DNA polymerases Pol II, Pol IV and DnaE2 in DNA replication in the absence of Pol I in *Pseudomonas putida*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 714(1–2), 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.06.013>
- Singleton, D. R., Powell, S. N., Sangaiah, R., Gold, A., Ball, L. M., & Aitken, M. D. (2005). Stable-Isotope Probing of Bacteria Capable of Degrading Salicylate, Naphthalene, or Phenanthrene in a Bioreactor Treating Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1202–1209. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1202-1209.2005>
- Sota, M., Yano, H., Ono, A., Miyazaki, R., Ishii, H., Genka, H., Top, E. M., & Tsuda, M. (2006). Genomic and Functional Analysis of the IncP-9 Naphthalene-Catabolic Plasmid NAH7 and Its Transposon Tn4655 Suggests Catabolic Gene Spread by a Tyrosine Recombinase. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4057–4067. <https://doi.org/10.1128/JB.00185-06>
- Spiers, A. J., Buckling, A., & Rainey, P. B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146, 2345–2350.
- Sturges, S., & Brown, M. (1975). Polypsychopharmacy. *Bulletin of the Menninger Clinic*, 39(3), 274–279.

- Suenaga, H., Koyama, Y., Miyakoshi, M., Miyazaki, R., Yano, H., Sota, M., Ohtsubo, Y., Tsuda, M., & Miyazaki, K. (2009). Novel organization of aromatic degradation pathway genes in a microbial community as revealed by metagenomic analysis. *The ISME Journal*, 3(12), 1335–1348. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.76>
- Travkin, V. M., & Solyanikova, I. P. (2021). Salicylate or Phthalate: The Main Intermediates in the Bacterial Degradation of Naphthalene. *Processes*, 9(11), 1862. <https://doi.org/10.3390/pr9111862>
- Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T., & Eltis, L. D. (2006). The Ins and Outs of Ring-Cleaving Dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4), 241–267. <https://doi.org/10.1080/10409230600817422>
- 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(4), 429–440. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00122-2)
- Vollmer, M. D., Fischer, P., Knackmuss, H. J., & Schlömann, M. (1994). Inability of muconate cycloisomerases to cause dehalogenation during conversion of 2-chloro-cis,cis-muconate. *Journal of Bacteriology*, 176(14), 4366–4375. <https://doi.org/10.1128/jb.176.14.4366-4375.1994>
- Vollmer, M. D., Hoier, H., Hecht, H.-J., Schell, U., Gröning, J., Goldman, A., & Schlömann, M. (1998). Substrate Specificity of and Product Formation by Muconate Cycloisomerases: An Analysis of Wild-Type Enzymes and Engineered Variants. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3290–3299. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3290-3299.1998>
- Wieser, M., Eberspacher, J., Vogler, B., & Lingens, F. (1994). Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1: Structure of the meta cleavage product of 4-chlorocatechol. *FEMS Microbiology Letters*, 116(1), 73–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06678.x>
- Williams, P. A., & Sayers, J. R. (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation*, 5(3), 195–217. <https://doi.org/10.1007/BF00696460>
- Zeng, X.-H., Du, H., Zhao, H.-M., Xiang, L., Feng, N.-X., Li, H., Li, Y.-W., Cai, Q.-Y., Mo, C.-H., Wong, M.-H., & He, Z.-L. (2020). Insights into the binding interaction of substrate with catechol 2,3-dioxygenase from biophysics point of view. *Journal of Hazardous Materials*, 391, 122211. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122211>

## LISAD

**Lisa 1.** Töös kasutatud praimerid (nukleotiidne järjestus, seondumistemperatuur, amplifitseeritava geeni ja vastava ensüümi nimetus)

Ensüüm/Geen/Tüvi	Praimeri nimi	Nukleotiidne järjestus (5' → 3')	Seondumistemperatuur	Viide
C230 / <i>nahI</i> / C70 ja NCIB 9816-4	C70aF C70aR	TGGAGCGGGATCTGACGGCA CGGGATTGACCTCATTACA	58 °C	Mehike, 2016
C230 / <i>pheB</i> / C70	C70bF C70bR	TCACCGAGGACCTGCTCAAC CCGGGTTGACCTCGGCCAAG	58 °C	
SH / <i>nahG</i> / C70	nahGF7 nahGR3u	CTGCAACTGCGCGAAGCCTT GCTTCCCGTACCCAGGGAG	61 °C	
SH / <i>nahG</i> / PC20 ja NCIB 9816-4	nahGF3 nahGR2	GGGCTTGAGGACGCCTATTTTC GTTGCACACGACAGGCA TGAG	61 °C	
SH / <i>nahW</i> / C70	nahWF nahWR	CGATGACACTGGCGAACAGC CGTACGGTGGAAACGCATCC	61 °C	
C120 / <i>catA</i> / PC20	catAF_1 catAR_1	CGTACTTCGACTCGACCCAG GCAAAGTCGTCCCACAGGTA	61 °C	Barrow, R., 2022
C120 / <i>catA</i> / NCIB 9816-4	catA4F catA4R	TCGGAATTCAACCTGCGTTCG GGTGGTCAGGTGACGATGG	58 °C	
C120 / <i>pheB</i> / PC20	pheB20_F pheB20_R	CACCCGGCCTAGGTTTTGAT CACCCGGCCTAGGTTTTGAT	61 °C	
C230 / <i>nahH</i> / PC20	nahHRT694f nahHRT822r	ATCAGCATGACCGACACCTC ATAGTTGTAGTTCGCGCCGC	61 °C	Pozdnyakova-Filatova <i>et al.</i> , 2020
DNA Pol I* / <i>polA</i> / C70, PC20 ja NCIB 9816-4	polAXhoylev polAXhoall	GGGGCAGAACGCCAAGTACG TCTGCGCCAGGCTGTCCAT	61/58 °C	Sidorenko <i>et al.</i> , 2011

\*DNA pol I - DNA polümeraas I

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Anni Peegel,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Klorosalitsülaatide lagundamine erinevates perekonna *Pseudomonas* liikides,

mille juhendajateks on Merike Jõesaar ja Signe Viggor,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Anni Peegel*

**29.05.2023**