

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Anastassia Lenskaja

**Alkaani hüdroksülaasi (AlkB) mitmekesisus Läänemere bakterites**

Bakalaureusetöö

Juhendaja teadur Signe Viggor PhD

TARTU 2014

## Sisukord

Sisukord .....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
Sissejuhatus .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Läänemeri.....	6
1.1.1 Läänemere bakterikooslus .....	6
1.2 Alkaanid .....	10
1.2.1 n-alkaanide aeroobne lagundamine.....	10
1.3 Alkaani hüdroksülaasid.....	11
1.3.1 Metaani monooksügenaas ja sellega sarnased alkaani hüdroksülaasid .....	13
1.3.2 AlkB perekonna alkaani hüdroksülaasid.....	13
1.3.3 Tsütokroom P450 perekonna alkaani hüdroksülaasid .....	15
1.3.4 Ensüümid pikkade alkaanide lagundamiseks .....	15
1.4 Alkaane lagundavad bakterid .....	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	18
2.1 Töö eesmärgid .....	18
2.2 Materjal ja meetodika .....	18
2.2.1 Veeproovide võtmine Läänemerest, filtreerimine ja DNA eraldamine.....	18
2.2.2 Rikastuskultuurid (mikrokosmid) ja bakteritüvede isoleerimine .....	19
2.2.3 Geenifragmentide amplifitseerimine .....	19
2.2.4 Geelelektroforees.....	20
2.2.5 <i>alkB</i> klooniraamatukogu koostamine.....	21
2.2.6 Denatureeriva gradiendiga geelelektroforees (DGGE).....	21
2.2.7 DGGE geelipiltide „sõrmejälj” mustrite analüüs .....	22
2.2.8 Sekveneerimine .....	23
2.2.9 Sekveneeritud järjestuste analüüs .....	23
2.3 Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1 Mikroobikoosluste 16S rRNA geenifragmentide DGGE profiilide analüüs.....	24
2.3.2 Tüvede isoleerimine ja identifitseerimine.....	28
2.3.2.1 Tüvede 16S rRNA geenifragmendi järjestuste analüüs.....	29
2.3.3 Tüvede <i>alkB</i> geeni järjestuste detekteerimine.....	32
2.3.3.1 Tüvede <i>AlkB</i> mitmekesisuse iseloomustamine fülogeneetilise puu analüüsi põhjal.....	34

2.3.3.1.1 Ühe <i>alkB</i> geeniga tüved .....	34
2.3.3.1.2 Mitme <i>alkB</i> geeniga tüved.....	36
2.3.4 Tüvede AlkB järjestuste võrdlemine klooniraamatukogust saadud kloonide AlkB-dega.....	38
KOKKUVÕTE .....	41
SUMMARY .....	43
Kasutatud kirjandus.....	45
Kasutatud veebiaadressid.....	56
LISA 1 .....	57
LISA 2 .....	58
LISA 3 .....	61
LIHTLITSENTS .....	62

## KASUTATUD LÜHENDID

aa – aminohape

AlkB – membraniseoseline alkaani hüdroksülaas

APS – ammooniumperoksüsulfaat

BMO – butaani monooksügenaas

bp – nukleinhape

d – diiselkütus

DGGE – denatureeriva gradiendiga geelelektroforees

EtBr – etiidumbromiid

ExoI – eksonukleas I

F – algproov

Hd – heksadekaan

HELCOM – Läänemere merekeskkonna kaitse komisjon ehk Helsingi komisjon

Hp – heptaan

LB – Luria Bertani tardsööde

pMMO – membraaniseoseline metaani monooksügenaas

PMO – propaani monooksügenaas

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

SAP – kreveti aluseline fostaafaas

sMMO – tsütoplasmaatiline metaani monooksügenaas

TEMED – tetrametüületüülenediamiin

TN – toornafta

## Sissejuhatus

Naftareostuse risk Läänemerel on aasta aastalt suurenenud tänu tihenenud mereliiklusele ja suurenenud naftatranspordile. Keskkonnaohtlike ainete sattumine vesikeskkonda mõjutab kogu selle kooslust - bakterist imetajani. Operatiivne reageerimine reostusel võimaldab oluliselt vähendada tundlike rannaalade saastumist, seetõttu on Läänemere riigid omavahel kooskõlastanud naftareostusega võitlemise ja reostuse kõrvaldamise meetmed.

Toornafta põhikomponentideks on lineaarsed, hargnenud või tsüklilised alkaanid, aromaatsed ühendid, kõrgmolekulaarsed ühendid – asfalteenid, jne. Nimetatud ühendid on keemiliselt ja biokeemiliselt stabiilsed, kuid vaatamata sellele on paljud mikroorganismid evolutsiooni käigus omandanud võime aktiveerida ja kasutada süsivesinikke ainukese süsiniku- ja energiaallikana. Alkaani hüdroksülaasid on ensüümid, mis katalüüsivad alkaanide lagundamise esimest etappi. Vedelate alkaanide (pentaanist heksadekaanini) lagundamisel osaleva membraaniseoselise alkaani hüdroksülaasi geene, *alkB*, kasutatakse markerina erinevate keskkondade alkaanide lagundamise võime ennustamiseks.

Tartu Ülikooli geneetika õppetoolis on iseloomustatud Läänemere bakterikoosluse võimet lagundada toornafta koostises olevaid alkaane Vilsandi saare lähedase (Viggor *et al.*, 2013) ning Tallinna, Soome, Narva ja Liivi lahe veeproovide AlkB klooniraamatukogude põhjal (Kiiker, 2010; Pärnpuu, 2013). Uurimustööde tulemused näitasid, et Läänemere bakterikoosluse ennustatavad AlkB järjestused on mitmekesised ning alkaanide lagundamise potentsiaal hea. Molekulaarsete meetodite kasutamisel saadakse palju olulist infot mikroobikoosluse struktuuri kohta, kuid biotehnoloogilisest seisukohast on väga oluline uurida puhaskultuuride feno- ja genotüüpe. Sellest tulenevalt on käesoleva töö põhieesmärgiks iseloomustada Läänemere veest isoleeritud alkaane-lagundavate bakteritüvede fenotüübilisi ja geneetilisi tunnuseid ning võrrelda leitud AlkB mitmekesisust klooniraamatukogude analüüsil saadud andmetega.

Tänan Signe Viggor'it juhendamise ja koostöö eest ning laborikaaslast abi ja nõuannete eest.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Läänemeri

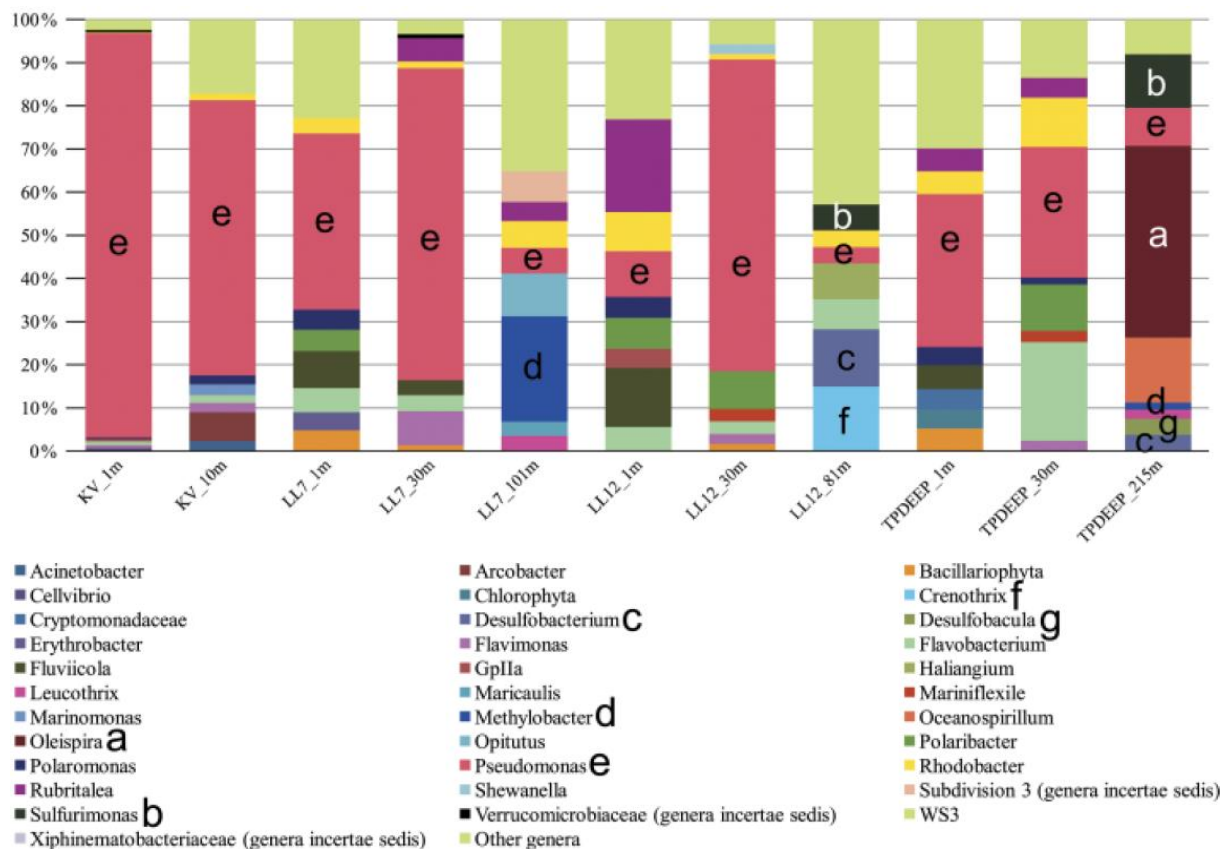
Läänemeri on suuruselt teine riimveekogu maailmas (Koskinen *et al.*, 2011). Madala soolsuse (6–8‰) põhjuseks on piiratud soolase vee sissevool (aastas keskmiselt 475 km<sup>3</sup>), sest Läänemeri on ühenduses Põhjamerega kitsaste Taani väinade kaudu. Samaaegselt toimub pidev riimvee väljavool (ca 940 km<sup>3</sup> aastas) ja magevee juurdevool maismaalt (ca 660 km<sup>3</sup> aastas). Soolase ja riimvee tiheduste erinevusest tekib põhja- (soolane) ja pinnavee (magedam) kihistumine. Nende kihtide vahel paiknev õhuke veekiht, soolsushüppekiht ehk halokliin, moodustab barjääri, mis takistab hapnikurikka pinnavee segunemist soolase põhjaveega. Seetõttu tekib madalamates kihtides hapnikuvaba tsoon ehk „surnud tsoon” (Ruskule *et al.*, 2009). Nende tingimuste tõttu on Läänemeri ainulaadne, kõikide keskkonna muutuste ja saasteainete suhtes väga tundlik ökosüsteem. Reostus on Läänemere peamiseks ohuks, mida võivad põhjustada paljud merega seotud aktiivsed tegevused nagu kalandus, põllumajandus, tööstus, sadamate arendus, laevandus (Ruskule *et al.*, 2009). Laevadega transporditakse nii inimesi ja tooteid, kui ka ohtlikke aineid nagu toornafta või õli. Igal ajahetkel on merel umbes 2000 laeva ning ligikaudu 20% nendest on naftatankerid, lastiks hinnanguliselt umbes 166 miljonit tonni õli. 2020 aastaks ulatub see arv 180 miljoni tonnini (HELCOM, 2010). Seepärast on Läänemere riigid muretsenud õlireostuse tõrjeks vajaliku varustuse. HELCOM (Läänemere merekeskkonna kaitse komisjon ehk Helsingi komisjon) on asutatud 40 aastat tagasi, et kaitsta Läänemere merekeskkonda kõikide reostusallikate eest (<http://helcom.fi/about-us>). Suure ulatusega õlireostuste likvideerimine meres on väga keeruline protsess, samas kui väikese reostuse lagundamisega saavad hakkama paljud merevees elavad mikroorganismid.

### 1.1.1 Läänemere bakterikooslus

Läänemeri on unikaalne keskkond, kus elavad koos mere-, mage- ning riimvee bakterite liigid (Hölldfors *et al.*, 1981). Riemann koos kaastöötajatega (2008) analüüsisid Kesk-Läänemere bakterikoosluste DNAlt amplifitseeritud 16S rRNA geenifragmendi klooniraamatukogusid. Proove võeti ühest kohast (Landsort Deep station) ühe kuni kolme nädala järel aasta jooksul.

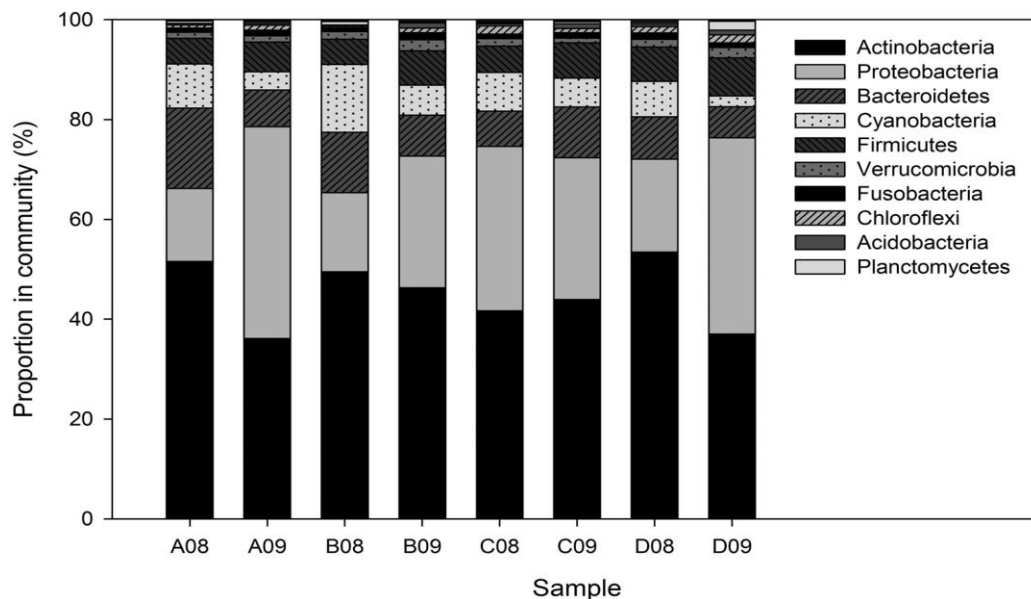
Analüüsid näitasid, et bakterikoosluse mitmekesisus muutub aastaegade vaheldudes ning tõenäoliselt on kõige olulisemad tegurid vee temperatuur, fütoplanktoni biomassi kontsentratsioon ning toitainete kättesaadavus. Samas näidati, et uuritud Läänemere bakterikooslustes domineerivad hõimkonda *Bacteroidetes* kuuluvad bakterid ning suur osakaal on tüüpilistel magevee bakteritel klassidest *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* ja *Betaproteobacteria* (Riemann *et al.*, 2008).

Koskinen ja kaastöötajad uurisid oma teadustöös (2011) Läänemere bakterite mitmekesisust ja bakterikoosluse struktuuri, kasutades proovide 16S rRNA geeni V3 segmendi järjestuste sekveneerimiseks 454 pürosekveneerimist. Proove võeti avamerelt (Soome laht, 3 proovipunkti kolmest erinevast sügavusest: 1 m, 30 m ja 1 m põhjast) ja rannikulähedasest punktist (kahest sügavusest: 1 m ja 10 m) (Koskinen *et al.*, 2011). Tulemused näitasid, et samast sügavusest võetud avamere bakterikooslused on omavahel sarnasemad (füüsikalised ja hüdrokeemilised tingimused on lähedased) kui ühe proovipunkti erinevatest sügavustest



**Joonis 1.** Läänemere rannikulähedase (KV) ja avamere (LL7, LL12 ja TPDEEP) proovipunktide kaheksa kõige suurema osakaaluga bakteriperekonna suhtelised arvukused. Paremaks jälgitavuseks on suurema osakaaluga perekonnad tähistatud joonisel tähtedega a-g (Koskinen *et al.*, 2011; modifitseeritud joonis).

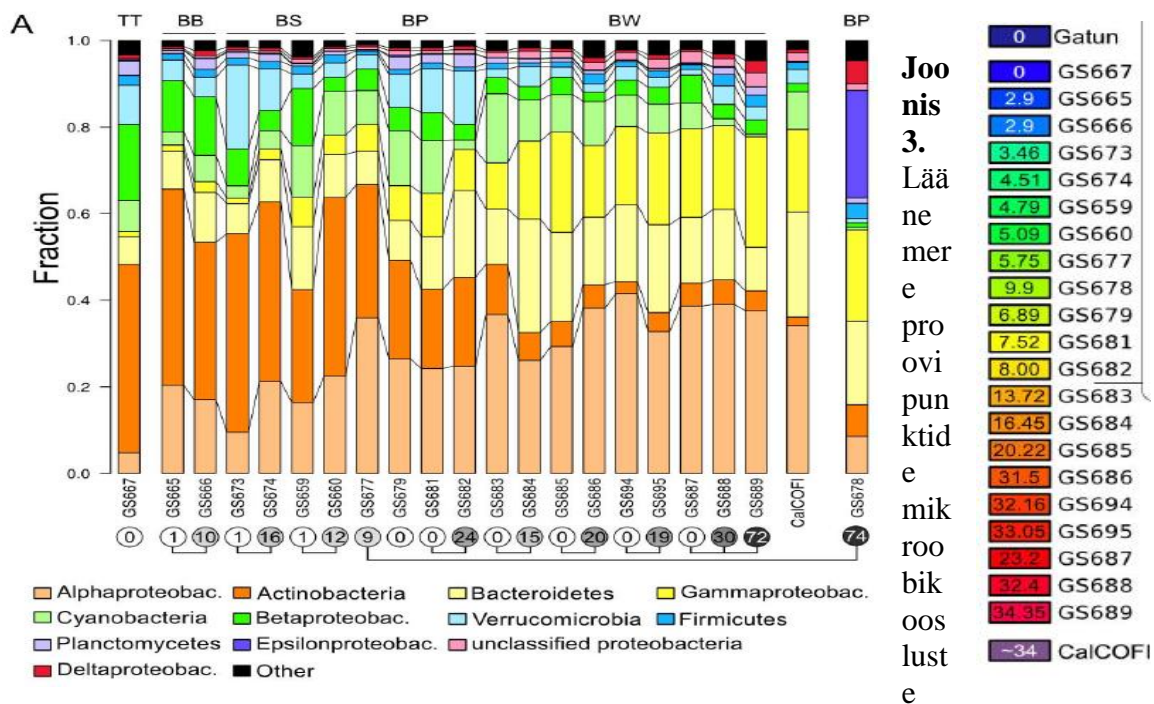
võetud proovide kooslused. Jõe suudmeala lähistelt võetud rannikulähedase proovipunkti kooslused (erinevate järjestuste arv OTU (*Operational taxonomic unit*) oli kõige suurem just selle proovipunkti 10 m sügavuselt võetud proovis) erinesid oluliselt avamere proovide kooslustest. Koosluste järjestuste fülogeneetiline analüüs näitas, et 53% järjestustest olid sarnased klassi *Gammaproteobacteria* kuuluvate bakterite järjestustega, järgnesid klassid *Flavobacteria* (13%), *Betaproteobacteria* (7%), *Alphaproteobacteria* (6%) ja *Actinobacteria* (4%) (Joonis 1). Perekonna tasemel identifitseeriti kokku 169 erinevat bakteriperekonda, millest kõige levinum perekond kõikide proovipunktide andmestikus oli *Pseudomonas* (45% kõikidest järjestustest). Pseudomonaadide järjestusi leiti kõikidest uuritud kooslustest, samas 99% perekonna *Oleispira* järjestustest (9% kõikidest järjestustest) leiti ühest proovipunkti kooslusest. Kooslustes esinesid suuremal hulgal veel merebakterite perekonnad *Flavobacterium* (3%), *Rhodobacter* (3%), *Oceanospirillum* (3%), *Rubritalea* (3%), *Sulfurimonas* (3%) kui ka mageveele iseloomulik bakteri perekond *Fluviicola* (3%) (Koskinen *et al.*, 2011). Kokkuvõttes tõdeti, et Läänemere bakterikooslus ei ole nii mitmekesine, kui seda on ookeanide oma.



**Joonis 2.** Läänemere bakterikoosluse koostis hõimkondade tasemel 2008. ja 2009. aastal. Lühendid: A – Tallinna laht; B – Soome laht; C – Narva laht; D – Liivi laht; 08 – 2008. aasta; 09 – 2009. aasta (Tiirik *et al.*, 2013; modifitseeritud joonis).

Tallinna, Narva, Soome ja Liivi lahe 2008. ja 2009. aasta veeproovide bakterikoosluste 16S rRNA geeni V6 segmendi sekveneerimisel Illumina platvormil saadud järjestuste analüüsimisel leiti, et koosluste struktuurides on kõige suuremad erinevused aastate lõikes (Tiirik *et al.*, 2013). Samal ajal on Läänemere proovide kooslused erinevad ka proovipunktide lõikes (Joonis 2). Koosluste fülogeneetiline analüüs näitas, et ka nende nelja lahe pinnavees domineerivad bakterid hõimkondadest *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ja *Bacteroidetes* nagu on näidatud varasemates artiklites (Riemann *et al.*, 2008; Koskinen *et al.*, 2011).

J. C. Venter'i töörühm võttis 2009. aasta suvel toimunud Läänemere ekspeditsioonil veeproove teekonnal Taani väinadest mööda Rootsi rannikut Botnia lahe põhjatippu, et uurida vee soolsuse mõju mikroobikoosluse koosseisule (Dupont *et al.*, 2014). Uurimustöö tulemusena selgus, et Läänemere bakterikooslused erinevates geograafilistes punktides erinevad tunduvalt rohkem kui ookeani sama kaugete proovipunktide kooslused, ja seda nii domineerivate hõimkondade/klasside, kui ka osakaalude poolest (Joonis 3).



kaheteistkümne kõige suurema osakaaluga bakteriperekonna suhtelised arvukused (A) ja soolsused (B). Proovi võtmise sügavus on toodud proovi nime all olevas ringis; omavahel ühendatud ringid tähistavad proove samast asukohast. Lühendid: TT – Torne Träsk, magevee proov Põhja-Rootsist, BB – Botnia lahe põhjatipp; BS – Botnia meri; BP – Läänemere keskosa, ava-Läänemeri; BW –Läänemere idaosa, Kattegat väin; CalCOFI – kõikide Läänemere idaosa proovipunktide metagenoomide liidetud rühm (Dupont *et al.*, 2004; modifitseeritud joonis).

Madala soolsusega proovides moodustasid suurema osakaalu klasside *Actinobacteria* ja *Betaproteobacteria* ning kõrgema soolsusega proovides *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* ning *Bacteroidetes* järjestused.

16S rRNA geeni põhised analüüsid näitavad, et Läänemere bakterikooslus ei ole nii mitmekesine kui ookeani oma (Koskinen *et al.*, 2011; Dupont *et al.*, 2014), aga samas elavad siin koos nii mere- kui ka magevee bakterid nagu näiteks gramnegatiivsed bakterid klassidest *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* ja *Bacteroidetes* ning grampositiivsed bakterid klassist *Actinobacteria* (Riemann *et al.*, 2008; Koskinen *et al.*, 2011; Tiirik *et al.*, 2013; Viggor *et al.*, 2013; Dupont *et al.*, 2014).

## 1.2 Alkaanid

Alkaanid on küllastunud süsivesinikud, mille molekulides ühekordse sidemega seotud süsinikuaatomid moodustavad kas lineaarseid (*n*-alkaanid) või hargnenud (*iso*-alkaanid) ahelaid või tsükleid (*cyclo*-alkaanid). Alkaanid on toornafta põhikomponentideks. Nad moodustavad umbes 30% toornafta koostisest koos *cyclo*-alkaanide (49%), aromaatsete ühendite (15%) ja asfalteenidega (6%) (Hyne, 2012). Mitmed organismid nagu taimed, rohevetikad, loomad ja bakterid toodavad oma elutegevuse käigus alkaane. Seepärast leidub alkaane madalas kontsentratsioonis kõikides veekogudes. Alkaanide metabolism on väga eriline protsess. Ühest küljest on alkaani molekulid hüdrofoobsed ja seega lahustuvad vees väga halvasti. Teiselt poolt on need molekulid keemiliselt väga inertsed ning enne lagundamist tuleb nad esmalt aktiveerida (Labinger ja Bercaw, 2002). Mikroorganismid on võimelised lagundama alkaane nii anaeroobselt kui ka aeroobselt (Rojo, 2010). Anaeroobsetes tingimustes alkaane lagundatavad bakterid kasutavad elektronaktseptorina nitraati ja sulfaati. Aeroobsetes tingimustes on elektronaktseptoriks hapnik (Widdel ja Rabus, 2001).

### 1.2.1 *n*-alkaanide aeroobne lagundamine

Alkaani hüdroksülaasid (EC 1.14.15.3, süstemaatiline nimi alkaan, redutseeritud-rubredoksiin:hapnik 1-oksüdoreduktaas, kuid kasutatakse ka järgnevaid sünonüüme: alkaani 1-monooksügenaas, alkaani 1-hüdroksülaas, oomega-hüdroksülaas, rasvhape oomega-

hüdroksülaas, alkaani monooksügenaas, 1-hüdroksülaas) on mitmekülgsed biokatalüsaatorid, mis viivad läbi erinevaid oksüdatsiooniprotsesse, mille hulgas on ka aeroobne alkaanide lagundamine ([http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?ec:1.14.15.3](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.14.15.3)).

Mikroorganismides on kirjeldatud nelja *n*-alkaanide aeroobse lagundamise rada (Joonis 4 (Ji *et al.*, 2013)). Terminaalse metüülrühma oksüdatsiooni tulemusena tekib alkaanist primaarne alkohol, mis omakorda oksüdeeritakse aldehüüdiks. Järgnevate reaktsioonide toimel moodustunud rasvhapped sisenevad  $\beta$ -oksüdatsiooni ratta, kus moodustub rasvhappeatsetüül-CoA (Watkinson ja Morgan, 1990). Alkaani biterminaalset oksüdatsioonil oksüdeeritakse astmeliselt mõlemad alkaani molekuli terminaalsed metüülrühmad ning tekib dikarboksüülhape, mis siseneb samuti  $\beta$ -oksüdatsiooni ratta (Watkinson ja Morgan, 1990). Subterminaalse oksüdatsiooni puhul tekib esmalt sekundaarne alkohol, mis muudetakse järgnevas etapis ketooniks. Ketoon oksüdeeritakse omakorda Baeyer-Villiger monooksügenaasiga estriks, millest moodustub alkohol ja rasvhape (Ashraf *et al.*, 1994). Finnerty rajas oksüdeeritakse diooksügenaaside abil moodustunud *n*-alküülhüdroperoksiidid alküülaldehüüdideks, peroksühapeteks ja rasvhapeteks (Ji *et al.*, 2013). Mõnes organismis võivad koos eksisteerida nii terminaalne kui ka subterminaalne alkaanide lagundamise rada (Rojo, 2010).

### 1.3 Alkaani hüdroksülaasid

Alkaanide aeroobse lagundamise esimest etappi vahendab alkaani hüdroksülaas. Lagundatava alkaani pikkus määrab, millist spetsiifilist alkaani hüdroksülaasi süsteemis kasutatakse ning vastavalt sellele eristatakse kolme ensüümide rühma:

1. ensüümid (metaani monooksügenaas ning temaga sarnased alkaani hüdroksülaasid), mis lagundavad gaasilisi alkaane (metaanist kuni butaanini);
2. ensüümid (membraaniseoselised alkaani hüdroksülaasid, tsütokroom P450 perekonna ensüümid), mis lagundavad vedelaid alkaane (pentaanist kuni heksadekaanini);
3. ensüümid (AlmA, LadA), mis lagundavad tahkeid alkaane (heksadekaanist pikemad ahelad) (van Beilen ja Funhoff, 2007).



### 1.3.1 Metaani monooksügenaas ja sellega sarnased alkaani hüdroksülaasid

Metaani monooksügenaasi kompleksid on mikroorganismides membraaniseoselised (pMMO) või tsütoplasmaatilised (sMMO). Tsütoplasmaatiline metaani monooksügenaas oksüdeerib 1 kuni 7 süsinikuaatomi pikkuseid alkaane, alkeene, eetreid, halogeniseeritud metaani, tsüklilisi ja aromaatsed ühendeid (Green ja Dalton, 1989; Sullivan *et al.*, 1998). Membraaniseoseline metaani monooksügenaas võib oksüdeerida erinevaid alkaane, alkeene, eetreid ning alitsüklilisi, aromaatsed ja heterotsüklilisi ühendeid (Colby *et al.*, 1977). pMMO ekspresseeritakse ainult juhul, kui vase ioonid on kättesaadavad ning arvatatakse, et vask kuulub pMMO aktiivsaiiti (Hakemian ja Rosenzweig, 2007). Samas sMMO ekspresseeritakse madalatel vase ioonide kontsentratsioonidel ning ensüümi aktiivsusele omavad inhibeerivat toimet ka nikli ja tsingi ioonid (Jahng ja Wood, 1996). Metaani monooksügenaasi sisaldavad liigid kuuluvad perekondadesse *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera*, *Methylosinus* ja *Methylocystis* (Murell *et al.*, 2000).

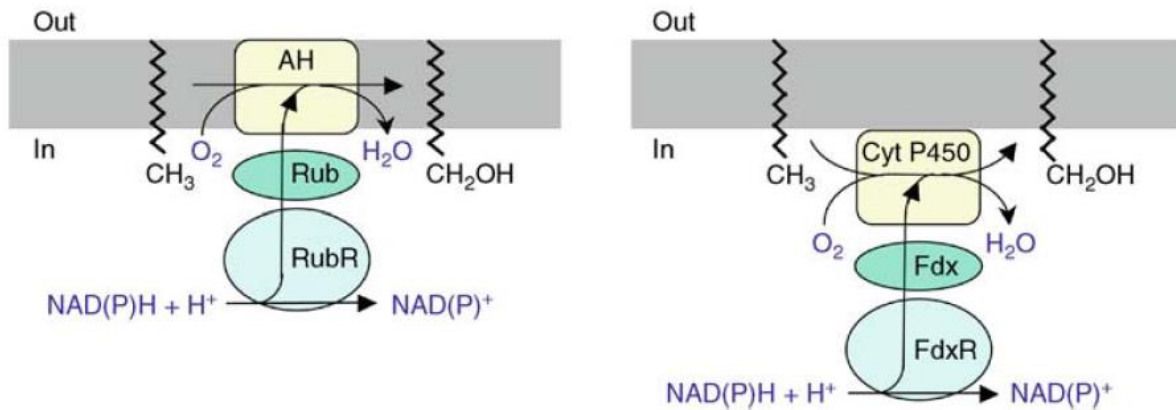
*Thauera butanivorans* tüve ATCC43655 butaani monooksügenaas (BMO), mis oksüdeerib 2 kuni 9 süsinikuaatomi pikkuseid alkaane, koosneb kolmest alaühikust: dinuklearsest rauda sisaldavast monooksügenaasist (BMOH), NADH-oksüdüreduktaasist (BMOR) ja väikesest reguleerivast valgust (BMOB) (Halsey *et al.*, 2006; Dubbels *et al.*, 2007).

Kitsa subatradispetsiifkaga propaani monooksügenaase on kirjeldatud perekonna *Gordonia* tüvedes, kes on võimelised kasvama ainult propaani juuresolekul. Propaani monooksügenaasi (PMO) valgujärjestus on sarnane sMMO järjestusega (Kotani *et al.*, 2003). PMO on leitud ka teistest bakteritest, näiteks *Pseudonocardia* sp. TY-7 ja *Mycobacterium* sp. TY-6, mis on võimelised lagundama alkaane pikkusega 2 kuni 4 süsinikuaatomit (Kotani *et al.*, 2006).

### 1.3.2 AlkB perekonna alkaani hüdroksülaasid

Membraaniseoselise alkaani hüdroksülaasi (AlkB) süsteemid on looduses laialt levinud – 45 bakteriliigis on kirjeldatud enam kui 250 homoloogi (van Beilen ja Funhoff, 2007). Neid süsteeme on leitud nii grampositiivsetes (*Prauserella*, *Mycobacterium*) kui ka gramnegatiivsetes (*Pseudomonas*, *Alcanivorax*) mikroorganismides (Smits *et al.*, 2002).

Põhjalikud biokeemilised ja geneetilised uuringud on tehtud *Pseudomonas putida* GPo1 OCT plasmiidis paikneva alkaani hüdroksülaasi süsteemiga, mis koosneb kolmest komponendist: alkaani hüdroksülaasist (AlkB), rubredoksiinist (AlkG) ja rubredoksiin reduktaasist (AlkT) (Smits *et al.*, 2002). Lagundamisraja esimene ensüüm on membraaniseoseline alkaani hüdroksülaas AlkB, mis oksüdeerib 5 kuni 12 süsinikuaatomi pikkuseid alkaane terminaalselt.



**Joonis 5.** Membraaniseoselise alkaani hüdroksülaasi (AlkB) (vasakul) ja tsütokroom P450 perekonna (paremal) alkaani hüdroksülaasi paiknemine bakterirakus. AH - alkaani hüdroksülaas, Rub - rubredoksiin, RubR - rubredoksiin reduktaas, Cyt P450 - tsütokroom p450, Fdx - ferredoksiin, FdxR - ferredoksiin reduktaas. Halli värviga on tähistatud tsütoplasmamembraan (Rojo, 2010; modifitseeritud joonis).

Rubredoksiin kannab elektrone NAD(P)H molekulilt rubredoksiin reduktaasile, mis omakorda kannab elektrone alkaani hüdroksülaasile (Joonis 5, vasakul) (Smits *et al.*, 2002). AlkB on integraalne valk, mis koosneb 6 transmembraansest segmendist ja tsütoplasmapoolsest katalüütilisest saidist (van Beilen *et al.*, 1992; Shanklin *et al.*, 1994). Viimane sisaldab 4 histidiini motiivi ja 2 raua aatomit. Transmembraansed segmendid moodustavad hüdrofoobse tasku, kuhu siseneb alkaani molekul nii, et tema terminaalne metüülrühm paikneks histidiini motiiviga lähestikku. Üks hapniku aatom seostub alkaani metüülrühmaga, teine aga redutseeritakse veeks (van Beilen *et al.*, 1992).

*Pseudomonas putida* GPo1 AlkB süsteem on võimeline katalüüsima mitmeid erinevaid reaktsioone, näiteks lineaarsete ja hargnenud ahelaga alifaatsete-, tsükliliste- ja alküülaromaatsete ühendite hüdroksülatsiooni, terminaalsete alkoholide oksüdatsiooni, hargnenud ahelaga metüüleetrite demetülatsiooni ja terminaalsete alkaanide epoksüdatsiooni

(van Beilen *et al.*, 2005b). Membraaniseoseline alkaani hüdroksülaas võib oksüdeerida ka gaasilisi alkaane nagu propaan ja *n*-butaan (Johnson ja Hyman, 2006).

### 1.3.3 Tsütokroom P450 perekonna alkaani hüdroksülaasid

Tsütokroom P450 ensüümid on terminaalised monooksügenaasid, mida on kirjeldatud kõikides elu domäänides (Ji *et al.*, 2013). Nimetatud ensüümi kompleks koosneb kolmest subühikust: tsütokroomist, ferredoksiinist ja ferredoksiin reduktaasist, mis kannab elektrone NAD(P)H molekulilt tsütokroomile (Joonis 5, paremal) (van Beilen, 2005). Tsütokroom P450 liidab ühe hapniku aatomi alkaani molekulile tavaliselt kõrge regio- ja stereospetsiifilisusega. Teine hapniku aatom redutseeritakse vee molekuliks (Farinas *et al.*, 2001). P450 perekonna ensüümid võivad lagundada erineva pikkusega alkaane, näiteks ensüüm CYP153A6, mis on pärit bakterist *Mycobacterium* sp. HXN-1500, lagundab 6 kuni 11 süsinikuaatomi pikkuseid alkaane (Funhoff *et al.*, 2006); ensüüm CYP153C1 bakterist *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 oksüdeerib heptaani, oktaani ja nonaani (Zhou *et al.*, 2011). Tsütokroom P450 perekonna alkaani hüdroksülaasid suudavad funktsioonilt asendada *P. putida* GPo1 kirjeldatud AlkB-ga sarnaseid ensüüme (van Beilen *et al.*, 2006).

### 1.3.4 Ensüümid pikkade alkaanide lagundamiseks

Pikki alkaane (16 ja enam süsinikuaatomit) on võimelised lagundama nii grampositiivsed (*Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Geobacillus*) kui ka gramnegatiivsed (*Acinetobacter*, *Alcanivorax*) bakterid (Asharf *et al.*, 1994; Throne-Holst *et al.*, 2006). LadA, mida kirjeldati esimest korda termofiilsel bakteril *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, on kahe komponendiline ekstratsellulaarne termofiilne flaviinisõltuv oksügenaas (Li *et al.*, 2008). See valk kuulub bakteriaalse lutsiferaasi valkude perekonda ja oksüdeerib 10 kuni 30 süsinikuaatomi pikkuseid alkaane (Li *et al.*, 2008). *Acinetobacter* tüvedel M-1 (Tani *et al.*, 2001) ja DSM17874 (Throne-Holst *et al.*, 2007) ning bakteritel *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Hara *et al.*, 2004) ja *Alcanivorax dieselolei* B-5 (Liu *et al.*, 2011) on leitud ensüüm Alma. See on tsütoplasmaatiline flaviiniseoseline Baeyer-Villiger tüüpi monooksügenaas, mis oksüdeerib 20 kuni 36 süsinikuaatomi pikkuseid alkaane (Throne-Holst *et al.*, 2006).

## 1.4 Alkaane lagundavad bakterid

Alkaanide lagundamine on looduses laialt levinud nähtus. Paljud mikroorganismid, prokarüoodid ja eukarüoodid, suudavad kasutada alkaane süsiniku- ja energiaallikana (Wentzel *et al.*, 2007). Enamasti eelistavad bakterid süsinikuallikana suhkruid, rasvhappeid või aminohappeid ning alkaane hakatakse kasutama alles siis kui eelpool nimetatud ühendid on otsa saanud või ei ole kättesaadavad (van Beilen *et al.*, 2003). Suur enamik süsivesinikke lagundavaid baktereid kuuluvad nelja hõimkonda: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ning *Proteobacteria* (Prince *et al.*, 2010).

Samas eksisteerivad bakterid, kes kasvavad ainult alkaanide lagundamise arvel - süsivesinikklastilised bakterid (Golyshin *et al.*, 2003). Sellised bakterid kuuluvad näiteks klassi *Gammaproteobacteria* perekondadesse *Alcanivorax* (Yakimov *et al.*, 1998), *Cycloclasticus* (Dyksterhouse *et al.*, 1995), *Marinobacter* (Gauthier *et al.*, 1992), *Neptunomonas* (Hedlund *et al.*, 1999), *Oleiphilus* (Golyshin *et al.*, 2002), *Oleispira* (Yakimov *et al.*, 2003) ja *Thalassolituus* (Yakimov *et al.*, 2004). Tavaliselt on süsivesinikklastiliste bakterite arvukused keskkonnas väga madalad (Yakimov *et al.*, 2007), kuid saastunud keskkonnas võib näiteks perekonna *Alcanivorax* arvukus moodustada 80-90% kogu koosluse arvukusest (Röling *et al.*, 2002; Yakimov *et al.*, 2005). Ka mikrokosmikatsed õlireostusega piirkonnast toodud mereveeproovidega näitasid, et toitainete (fosfori- ja lämmastikuühendid) lisamisel suurenes nende bakterite arvukus märkimisväärselt (Head *et al.*, 2006).

Konkurentsikatsed bakteritega *Alcanivorax borkumensis* ST-T1 ja *Acinetobacter venetianus* T4 näitasid, et kui katse alguses on domineerivaks *Acinetobacter* siis hiljem suureneb oluliselt *Alcanivorax* arvukus (Hara *et al.*, 2003). Võime lagundada lisaks *n*-alkaanidele ka nii hargnenud ahelaga alkaane kui ka alküülsükloheksaane ja alküülbenseene (Dutta ja Harayama, 2001) on ilmselt põhjuseks, miks *Alcanivorax* perekonna liigid domineerivad toornaftaga reostatud merekeskkondades.

Süsivesinike biodegradatsioonil ja naftareostuse kõrvaldamisel mereökosüsteemides olulist rolli mängivatel *Alcanivorax* perekonna tüvedel leidub genoomis sageli mitu süsivesinikke lagundamisega seotud geeni. Näiteks tüüptüve *Alcanivorax borkumensis* SK2 genoomis on alkaanide lagundamiseks kaks AlkB (AlkB1 ja AlkB2 lagundavad alkaane pikkusega vastavalt C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub> ja C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub>; van Beilen *et al.*, 2004), kolm tsütokroom P450 valguperekonna (vastutavad areenide ja tsükloalkaanide lagundamise eest; Sabirova *et al.*, 2006; Schneiker *et*

*al.*, 2006) ja kaks AlmA (lagundavad alkaane pikkusega kuni C<sub>32</sub>; Sabirova *et al.*, 2006; Schneiker *et al.*, 2006) kodeerivat järjestust.

Redundantseid alkaani hüdroksülaase on kirjeldatud ka *Pseudomonas* (Marin *et al.*, 2003), *Acinetobacter* (Tani *et al.*, 2001; Throne-Holst *et al.*, 2007), *Rhodococcus* (Whyte *et al.*, 2002b; van Beilen *et al.*, 2006), *Nocardioides* (Hamamura *et al.*, 2001) jt. perekondadesse kuuluvatel bakteritel. Erinevate alkaani hüdroksülaaside olemasolu ühes organismis tagab enamasti laiema substraatide lagundamise võime (*A. borkumensis* SK2 alkaani hüdroksülaasid), kuid erinevatel ensüümidel võivad ka lagundatavate substraatide vahemikud kattuda. Näiteks, *Pseudomonas aeruginosa* tüvi RR1 omab kahte alkaani hüdroksülaasi (oksüdeerivad alkaane pikkusega C<sub>10</sub>-C<sub>22/24</sub>), kuid nad ekspresseeritakse erinevates kasvufaasides. Sel juhul on tagatud efektiivne alkaanide lagundamine nii kõrgetel kui ka madalatel hapniku kontsentratsioonidel (Marin *et al.*, 2003).

Kirjanduse andmetel asetsevad alkaani hüdroksülaasi geenid enamasti transposoonide vahel (van Beilen *et al.*, 2001) ja paiknevad kas kromosoomis (*Alcanivorax borkumensis* SK2; Schneiker *et al.*, 2006) või plasmiidis (*Pseudomonas putida* GPo1 OCT plasmiid; van Beilen *et al.*, 1994). *Alcanivorax borkumensis* tüvede SK2 ja AP1 genoomide analüüsi tulemusena leiti, et nimetatud tüvede mõlemad *alkB* geenid pärinevad ilmselt perekonda *Yersinia* kuuluvast bakterist (Reva *et al.*, 2008). Alkaani hüdroksülaaside levikut horisontaalse ülekande teel tõestab ka fakt, et *Pseudomonas putida* erinevate tüvede *alkB* geenide järjestused kui ka geenide organisatsioon on väga sarnased *Alcanivorax* perekonna vastavate geeniklastritega (Reva *et al.*, 2008).

Mikroorganismidel on alkaanide lagundamisel kanda oluline roll. Uute tüvede isoleerimine ja iseloomustamine aitab meil paremini mõista mikroobikooslustes toimuvaid muutusi ning biodegradatiivsete radade ja ensüümide uurimine võimaldab parandada bioremediatsiooni strateegiaid nii, et saavutada efektiivne alkaanide lagundamine saastunud piirkondades.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Antud lõputöö eesmärkideks on:

- a) analüüsida 2008. ja 2009. aastal Läänemere neljast lahest võetud veeproovide ja nende rikastuskultuuride (substraatidena kasutati: heptaani, heksadekaani, diiselkütust ning toornaftat) bakterikoosluste mitmekesisust kasutades denatureeriva gradiendiga geelelektroforeesi (DGGE) 16S rRNA geenifragmentide lahutamiseks;
- b) iseloomustada Läänemere veeproovidest eraldatud alkaane-lagundavate bakteritüvede substraadispetsiifikat, määrata tüvede fülogeneetiline kuuluvus 16S rRNA geenifragmenti järjestuste põhjal ning kirjeldada tüvede alkaani hüdroksülaasi (AlkB) mitmekesisust;
- c) võrrelda Läänemerest eraldatud bakteritüvede AlkB mitmekesisust varasemates töödes saadud AlkB klooniraamatukogude mitmekesisusega.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Veeproovide võtmine Läänemerest, filtreerimine ja DNA eraldamine

Veeproovid võeti neljast Läänemere piirkonnast (**LISA 1**) pindmisest kuni 1-meetrise kihist 2008. aastal augustist septembrini ja 2009. aastal septembrist novembrini. Proovid transporditi laborisse steriilsetes 12-liitrilistes kanistrites.

Koosluse DNA eraldamiseks filtreeriti proovid läbi 0,2 µm poori suurusega 47 mm diameetriga steriilsete filtrite (Sartorius AG, Saksamaa) ühe- ja kahe liitri kaupa. Filtrid paigutati steriilsetesse koekultuuritopsidesse ja säilitati -80°C juures. Koosluse DNA eraldati filtritelt MO BIO PowerSoil™ DNA Kit'i abil (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad), järgides tootjapoolset protokollit (töö sooritasid Riinu Kiiker ja Kertu Tiirik).

## 2.2.2 Rikastuskultuurid (mikrokosmid) ja bakteritüvede isoleerimine

Rikastuskultuuride kasvatused tehti 250 ml Erlenmeyer'i kolbides, millesse lisati 50 ml merevett ja 1% (mahuprotsent) lõppkontsentratsiooniga substraati (toornafta (TN), diiselkütus (D), heptaan (Hp), heksadekaan (Hd)). Kolbe inkubeeriti ringloksutil (100 rpm) 15°C juures 3 nädalat (töö teostasid Eeva Heinaru, Merike Jõesaar ja Signe Viggor).

Koosluse DNA eraldamiseks võeti 3 nädala möödumisel kolbidest 15 ml proovi, millest tsentrifuugimisel (13,000 x g, 3 min) eraldati bakterirakud. Saadud bakterimassist eraldati koosluse DNA vastavalt punktis 2.2.1 kirjeldatule (töö teostasid Mihkel Mäesaar ja Signe Viggor).

Süsivesinikke lagundavaid baktereid isoleeriti nii merevee otsekülvidest kui ka rikastuskultuuridest (töö teostas Signe Viggor). Väljakülvid proovide erinevatest lahjendustest tehti minimaalsöötme plaatidele (sisaldab 1x mineraalainete segu M9 (Adams, 1959), 1x mikroelementide segu (Bauchop ja Elsdén, 1960) ja 1,5% agarit), mille kaanele asetatud filterpaberi tükile lisati 200 µl substraati (heptaan, heksadekaan, diiselkütus, toornafta). Külve inkubeeriti 2 nädalat 15°C juures. Puhaskultuuride saamiseks tehti morfoloogiliselt erinevatest kolooniatest lahjenduskülvid R2A agarile või selektiivsöötmele (sisaldas mikrokosmis kasutatud süsinikuallikat). Övede kõrvaldamiseks analüüsiti puhaskultuuride genoomseid sõrmejälgi BOX-PCR meetodikaga (Louws *et al.*, 1994). Puhaskultuure säilitatakse 30%-lises glütseroolis (-80°C). Bakteritüvede kasvu testiti erineva ahela pikkusega alkaanidel (oktaanil (C<sub>8</sub>), heksadekaanil (C<sub>16</sub>), oktadekaanil (C<sub>18</sub>) ja osade tüvede puhul (17 tüve) ka dokosaanil (C<sub>22</sub>)). Alkaanid (C<sub>8</sub>; C<sub>16</sub>; C<sub>18</sub>) lisati minimaalsöötmega tassi kaanele asetatud filterpaberile ning dokosaan (C<sub>22</sub>) lisati enne tasside valamist minimaalsöötmele. Testi tulemused on toodud tabelis (**LISA2**).

## 2.2.3 Geenifragmentide amplifitseerimine

Geenifragmentide amplifitseerimiseks kasutati PCR reaktsioonisegu lõppmahuga 25 µl. Segu sisaldas 1x lõppkontsentratsiooniga PCR puhvrit [75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20], 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM igat nukleotiidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,8 µM praimereid (Tabel 1), 0,5 U Taq DNA *Polymerase* ja 1 µl DNA-d (filtritelt või mikrokosmidest eraldatud) või 1µl raku lüsaati (puhaskultuuride korral). Lüüsimiseks

kuumutati rakke 96°C juures 10 minutit, jahutati jääl ning raku kestad eraldati tsentrifuugimisel (13000 x g, 1 min).

Amplifikatsiooniprogramm koosnes initsiatsioonietapist 95°C juures 5 minutit, millele järgnes 30 tsüklit. Iga tsüklit koosnes kolmest etapist: DNA ahelate denatureerimine 95°C juures 1 minut, praimerite seundumine vatava seundumistemperatuuri (Tabel 1) juures 1 minut, DNA süntees 72°C juures 1 kuni 8 minutit (Tabel 1) ning pärast 30 tsüklit toimus lõppekstensioon 72°C juures 10 minutit.

**Tabel 1.** Töös kasutatud praimerid

Primeri sihtmärk	Primeri nimetus	5'→3' järjestus	Seundumis-temperatuur (°C)	Sünteesiaeg (min)	Produkti-suurus (bp)	Viide
16S rRNA geen	PCRI	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	55	2	~1500	Weisburg <i>et al.</i> , (1991)
	PCRII	TACGGTTACCTTGTTACGACTT				
	Seq1	GTATTACCGCGGCTGCTGG	57C	1	~480	Vedler <i>et al.</i> , (2000)
	PRA338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	53	1	~180	Lane (1991)
	PRUN518R	ATTACCGCGGCTGCTGG				Muyzer <i>et al.</i> , (1993)
<i>alkB</i> geen	alkBF <sup>1</sup>	TACGGNCACTTYTACVYCGA	50	1	344	Viggor <i>et al.</i> , (2013)
	alkBR <sup>1</sup>	CCRTARTGYTCGAGRTAGTT				
	HydroAlkBF <sup>2</sup>	CCTACGGCCATTTCTTCATTGA	50	1	344	Käesolev töö
	HydroAlkBR <sup>2</sup>	GGCTGTAATGCTCGAGATATT				Käesolev töö
Kordus-järjestus	BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGAC G	53→ 68	1→ 8	variee- rub	Louws <i>et al.</i> , (1994)
	GC-klamber <sup>3</sup>	CGCCCGCCGCGCGCGGG CGGGGCGGGGACCGGGGGG				Muyzer <i>et al.</i> , (1993)

<sup>1</sup>- nukleotiidide tähistused: **N:** A, T, G või C; **Y:** C või T; **R:** A või G; **V:** A, C või G;

<sup>2</sup>- primer on disainitud *Hydrocarboniphaga effusa* AP103 *alkB* geeni järjestuse (NZAKGD01000003) järgi;

<sup>3</sup>- GC-klamber on lisatud PRA338F primeri 5' otsa.

## 2.2.4 Geelektroforees

PCR edukuse kontrollimiseks kasutati 1,5% agarosgeeli 1x TAE puhvrts, millele lisati 0,5 µg ml<sup>-1</sup> kontsentratsiooniga etiidumbromiidi (EtBr). Geeli hambasse kanti 5 µl proovi segatuna

1 µl laadimispuhvriga (6x MassRuler™ Loading Dye Solution; 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03 % broomfenoolsinine; 60% glütserool; 60 mM EDTA; Fermentas, Leedu). Produkti suuruse hindamiseks kasutati 1 kb DNA suurusmarkerit (GeneRuler™; Fermentas; Leedu). Geelelektroforees viidi läbi 1x TAE puhvris 100 V juures. Geeli pildistati UV transilluminaatoris.

### 2.2.5 *alkB* klooniraamatukogu koostamine

Amplifitseeritud *alkB* geeni produktid puhastati geelist kasutades QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) ja ligeeriti vektorisse pTZ57R/T kasutades InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas; Leedu) järgides tootjapoolset protokollit.

Transformatsioon viidi läbi kasutades kompetentseid *E.coli* DH5α rakke (Inoue *et al.*, 1990) ja ligeerimissegut. Segut plaaditi Luria Bertani (LB) tardsöötmele, mis sisaldas 150 µg ml<sup>-1</sup> ampitsiliini, 48 µg ml<sup>-1</sup> isopropüül-β-D-tiogalaktopüraanosiidi ja 80 µg ml<sup>-1</sup> 5-bromo-4-kloro-3-indolüül-β-D-galaktopüraanosiidi. Transformante kasvatati 37°C juures üleöö ja klonerimise õnnestumist kontrolliti sini-valge testi abil. Edasises töös kasutati valgeid kolooniaid. Väljavahitud kolooniatest tehti külvid steriilse tikuga LB-tardsöötmele tassile, kuhu oli lisatud ampitsiliini (150µg ml<sup>-1</sup>) ning kasvatati 37° juures üleöö. *alkB* geeni sisaldava plasmidi olemasolu kontrolliti *alkBF* ja *alkBR* praimeritega läbi viidud PCR analüüsiga (2.2.3). LB-ampitsiliini-tardsöötmele kasvanud rakke lisati PCR segusse steriilselt pipetiotsikuga. PCR edukust kontrolliti geelektroforeesiga (2.2.4).

### 2.2.6 Denatureeriva gradiendiga geelektroforees (DGGE)

Geenifragmentide DGGE analüüs (Muyzer *et al.*, 1993) viidi läbi INGENYphorU-2 x 2 elektroforeesisüsteemiga (Ingeny International, Holland), järgides tootjapoolset protokollit. 16S rRNA geenifragmentide (~220 bp) analüüsimiseks kasutati 35-60% denatureeriva gradiendiga (100% denatureeriv gradient sisaldab 7 M ureat ja 40% formamiidi) 10% polüakrüülamiidgeeli (akrüülamiid-bisakrüülamiid 37,5:1). Geel oli valmistatud 1xTAE puhvris. Polümerisatsiooni katalüsaatoriteks olid ammooniumperoksüsulfaat (APS; 0,4 µl

ml<sup>-1</sup>) ja tetrametüületüülenediamiin (TEMED; 0,53 µl ml<sup>-1</sup>). Geelihammaste jaoks kasutati denaturantideta akrüülamiidide lahust. Ühte geelihambasse kanti ~500 ng koosluse DNA-lt amplifitseeritud 16S rRNA geenifragmendi produkti (PCR produkt sadestati 25 min -20°C juures 1/10 mahu 5M NaCl ja 2 mahu 96% etanooliga; tsentrifuugiti 13000 x g, 15 min; sade pesti 200 µl 70% etanooliga; tsentrifuugiti 13000 x g, 4 min; sade lahustati 25 µl vees; DNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA) ja 6 µl laadimispuhvri (6x MassRuler™ Loading Dye Solution; Fermentas, Leedu) segu. Elektroforees viidi läbi 1x TAE puhvris konstantsel temperatuuril 60°C, 13 tundi, 100 V pinge juures. Geeli värviti 20 minutit MilliQ vees, kuhu lisati etiidiumbromiidi (EtBr; 0,5 µg l<sup>-1</sup>) ning pärast pesti geeli 20 minutit MilliQ vees. Geeli pildistamiseks kasutati Molecular Imager® Gel Doc™ XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) UV transilluminaatorit ja arvutiprogrammi Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

### 2.2.7 DGGE geelipiltide „sõrmejalg” mustrite analüüs

DGGE geelipildi analüüsimiseks kasutati arvutitarkvara GelCompar II (Applied Maths BVBA, Belgia). Esmalt määrati käsitsi proovide rajad (*stripes*), et korrigeerida elektrivoolust tekkinud profiilide kõverusi, mis mõjutavad edasise analüüsi usaldusväärsust. Seejärel teostati spektraalanalüüs, et eemaldada optimaalselt (kadudeta) geelipiltide taust ning kõrvaldada soovimatu „müra” ja esiletõsta korrektsete bändide densitomeetrilised kõverad (*densitometric curves*). Järgnevalt kasutati automaatset bändide tuvastamist (*auto search bands*) rakendades optimaalseid seadeid – 5% miinimum profiil (*minimum profile*); 0% hall tsoon (*gray zone*); 4 õlatundlikkus (*shoulder sensitivity*). DGGE geelipildi töötamise järel koostati dendrogrammid ning sarnasus-maatriksid. Dendrogrammide genereerimiseks kasutati densitomeetriliste kõverate põhjal Pearson'i produkt-moment korrelatsiooni (*Pearson's product-moment correlation*) sarnasuse koefitsienti, 3,9% optimisatsiooniga (*optimization*). Sarnasus-maatriksite arvutamiseks rakendati aritmeetilisi keskmisi kasutatavat kaalumata paaride meetodit (UPGMA).

### 2.2.8 Sekveneerimine

Geenifragmentide sekveneerimiseks töödeldi PCR segu praimerite katkilõikamiseks ja nukleotiidide inaktiveerimiseks ensüümidega eksonukleas I (ExoI; Fermentas, Leedu; lõppkontsentratsiooniga  $0,36 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ ) ja krevetil aluseline fosfataas (SAP; Fermentas, Leedu; lõppkontsentratsiooniga  $0,14 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ )  $37^\circ\text{C}$  juures 15 minutit. Seejärel ensüümid inaktiveeriti  $80^\circ\text{C}$  juures (15 minutit). Sekveneerimiseks kasutati BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'i (Applied Biosystems Inc., USA) vastavalt protokollile. Reaktsioon viidi läbi kasutades PCR programmi, mis koosnes 30 tsüklit. Iga tsüklil sisaldas kolme etappi: ahelate denaturatsioon  $95^\circ\text{C}$  juures 15 sekundit, praimerite seondumine Tabelis 1 toodud temperatuuri juures 10 sekundit ja DNA süntees  $60^\circ\text{C}$  juures 45 sekundit. Geenifragmendid sekveneeriti Applied Biosystems täisautomaatse kapillaarsekvenaatoriga 3730xl DNA Analyzer.

### 2.2.9 Sekveneeritud järjestuste analüüs

Sekveneeritud järjestuste analüüsimiseks kasutati programmi BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). 16S rRNA geenifragmendi ning *alkB* geeni transleeritud ennustatavaid aminohappe järjestusi võrreldi BLAST (The Basic Local Tool Alignment Search Tool) otsingumootori abil järjestustega GeneBank andmebaasis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Järjestuste joondamiseks kasutati programmi ClustalX2 (Ashok, 1999). ClustalX2 joondab järjestusi, kasutades Feng'i ja Doolittle'i progressiivset mitme järjestuse meetodit. Joondatud järjestustest koostati programmi Mega5.2 abil lähimnaabri meetodit (N-J, Neighbor-Joining) kasutades fülogeneesipuu. N-J meetodit rakendatakse, et koostada fülogeneetiline puu evolutsioonilistest kaugustest lähtudes. Selle meetodi põhimõtteks on otsida operatiivsete taksonoomiliste ühikute paare, et vähendada üldist haru pikkust igal klasterdamise etapil, alustades tähekujulisest puust (Saitou ja Nei, 1987).

Ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste rühmitamiseks kasutati internetipõhist programmi FastGroupII ([http://fastgroup.sdsu.edu/fg\\_tools.html](http://fastgroup.sdsu.edu/fg_tools.html)), mis rühmitab analüüsitavad järjestused kasutaja poolt etteantud parameetrite järgi. Tulemiks on info järjestuste rühmade kohta ja statistilised hinnangud uuritava koosluse mitmekesisusele (Yu *et al.*, 2006).

## 2.3 Tulemused ja arutelu

Läänemere bakterikoosluste liigilist mitmekesisust ja dünaamikat on käsitletud mitmetes teadusartiklites (Hagström *et al.*, 2000; Riemann *et al.*, 2008; Koskinen *et al.*, 2011; Tiirik *et al.*, 2013; Viggor *et al.*, 2013). Samas peetakse antud ökosüsteemi peamiseks ohuks toornafta reostust, mistõttu on tähtis uurida ka toornafta koostises olevate ühendite lagundamises osalevate bakterikoosluste ning võtmeensüümide mitmekesisust. Alkaanide, toornafta põhikomponentide, biodegradatsiooni esimest etappi viivad läbi alkaani hüdroksülaasid, mille seast on kõige rohkem uuritud membraaniseoselist alkaani hüdroksülaasi, AlkB. Antud geeni mitmekesisust on uuritud nii mulla ja põhjavee (Whyte *et al.*, 2002a; van Beilen *et al.*, 2003) kui ka Atlandi ookeni pinnavee (Wang *et al.*, 2010), Alaska (Sotsky *et al.*, 1994) ja Antarktika (Kuhn *et al.*, 2009) setete proovides. Läänemere mikroobide alkaanide lagundamise biodegradatiivset potentsiaali on seni käsitletud vaid ühes meie töörühma artiklis, kus kultiveerimispõhiseid- ja molekulaarseid meetodeid kasutades analüüsiti Vilsandi saare lähedalt pärinevat veeproovi (Viggor *et al.*, 2013). Riinu Kiiker ja Liis Pärnpuu uurisid oma bakalaureusetöodes vastavalt 2008. ja 2009. aasta neljast Läänemere proovivõtupunktist (A – Tallinna laht, B – Soome laht, C – Narva laht, D – Liivi laht) võetud veeproovidest eraldatud koosluse DNAlt amplifitseeritud *alkB* geeni klooniraamatukogudest saadud ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste mitmekesisust (Kiiker, 2009; Pärnpuu, 2013). Viimati nimetatud tööde loogilise jätkuna analüüsiti käesolevas bakalaureusetöös Läänemere proovidest ning rikastuskultuuridest isoleeritud bakteritüvede alkaanide lagundamise potentsiaali kirjeldades nende ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste mitmekesisust. Lisaks analüüsiti denatureeriva gradiendiga geelelektroforeesi meetodit kasutades koosluste DNAlt amplifitseeritud 16S rRNA geenifragmentide profiile.

### 2.3.1 Mikroobikoosluste 16S rRNA geenifragmentide DGGE profiilide analüüs

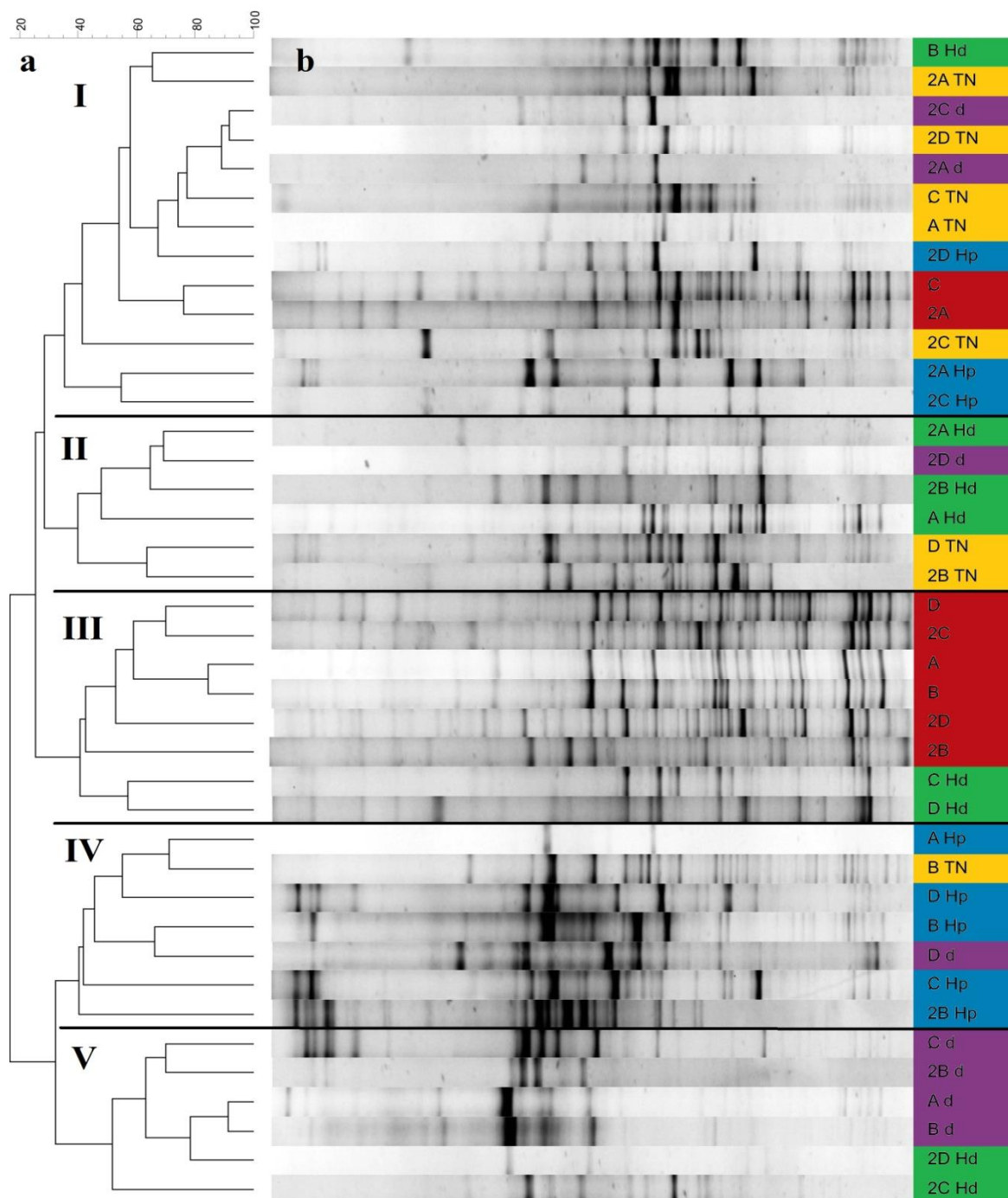
Läänemere mikrobikoosluse mitmekesisuse uurimiseks kasutati 16S rRNA geeni denatureeriva gradiendiga geelektroforeesi (DGGE) analüüsi. Kokku analüüsiti 40 proovi - 2008. ja 2009. aasta Tallinna, Soome, Narva ja Liivi lahest võetud veeproovid ning 4 rikastuskatset (heptaan, heksadekaan, toornafta ja diiselkütus) igast proovipunktist võetud veeprooviga. Originaal (**LISA 3**) ning korrigeeritud andmete ja tuvastatud bändidega (Joonis

6) DGGE geelipiltidelt on näha, et algse mereveeproovi koosluste „sõrmejälj” muustrid erinevad rikastuskultuuride koosluste „sõrmejälj” muustritest nii bändide asetuse, intensiivsuse kui ka arvu poolest. Saadud tulemused langevad kokku kirjanduses toodud andmetega, kus on näidatud, et bakterikoosluste mitmekesisust mõjutab erinevate substraatide manulus (Ogino *et al.*, 2001; Røling *et al.*, 2002; Viggor *et al.*, 2013) ning bakterikoosluste struktuuri mõjutavad proovipunktide asukoht ning proovivõtu aeg (Riemann *et al.*, 2008; Tiirik *et al.*, 2013). DGGE geelipiltidelt automaatselt tuvastatud bändide arvude alusel koostatud tulpdiaagrammidelt hinnati koosluste mitmekesisuse muutumist erinevate kasvusubstraatide lisamisel rikastuskultuuridele (Joonis 7), sest iga DGGE profiilis esinev bänd loetakse tavaliselt erinevaks liigiks (Long *et al.*, 2009). Korrastatud DGGE geelipildilt kalkuleeritud dendrogrammil on viis klastrit ning klasterdumine on üldiselt rikastuskultuuris kasutatud substraadi põhine (Joonis 6).

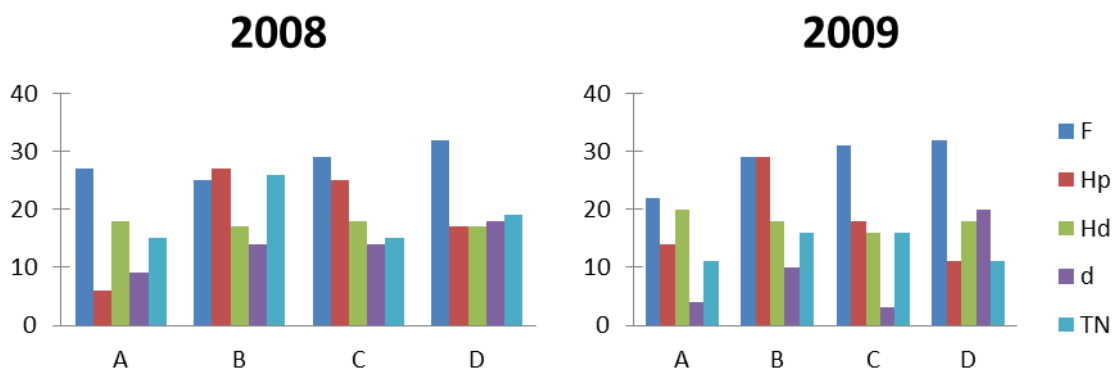
Peaaegu kõikide veeproovide (2008. aasta Tallinna, Soome ja Liivi laht; 2009. aasta Soome, Narva ja Liivi laht) algsete koosluste 16S rRNA geenifragmentide DGGE profiilid grupeerusid densiomeetriliste kõverate põhjal ühte klastrisse (III, Joonis 6). Eranditeks olid 2009. aasta Tallinna ja 2008. aasta Narva lahest võetud algsed veeproovid, mis klasterdusid klastrisse I (Joonis 6) koos toornafta rikastuskultuuridega. Koosluste mitmekesisus Läänemere erinevatest lahtedest võetud veeproovides oli sarnane (22-32 detekteeritud bändi; Joonis 7).

Heptaani lisamisel Tallinna, Narva ja Liivi lahe proovidele vähenes bakterikoosluse mitmekesisus, samal ajal kui Soome lahe veeproovide rikastustes bändide arv oluliselt ei muutunud (Joonis 7). Korrastatud DGGE geelipildilt kalkuleeritud dendrogrammil grupeerusid klastrisse IV (Joonis 6) kõik 2008. aasta ning 2009. aasta Soome lahe proovide heptaaniga rikastused. 2009. aastal Tallinna, Narva ja Liivi lahest võetud veeproovide heptaaniga rikastuste DGGE profiilid klasterdusid eraldi klastrisse (I, Joonis 6) koos toornafta rikastustega.

Heksadekaani lisamisel Tallinna, Soome, Narva ja Liivi lahe veeproovidele vähenes bändide arv, samas 2009. aasta Tallinna lahe proovi rikastuses bakterikoosluse mitmekesisus eriti ei muutunud (Joonis 7). Korrastatud DGGE geelipildilt kalkuleeritud dendrogrammil väga selget klasterdumist ei olnud, kuid 2008. aasta Tallinna ja 2009. aasta Tallinna ja Soome lahtede heksadekaani rikastused grupeerusid ühte klastrisse (II, Joonis 6).



**Joonis 6.** Läänemere veeproovide koosluste 16S rRNA geenifragmentide denatureeriva gradiendiga geelelektroforeesi analüüsi alusel koostatud dendrogramm (a) ja korrastatud DGGE andmestik (b). 2008. aasta algsed merevee kooslused on tähistatud järgnevalt: A – Tallinna laht, B – Soome laht, C – Narva laht, D – Liivi laht; 2009. aasta koosluste tähistamisel on legendi ette kirjutatud number 2 (kõik punasel taustal). Rikastuskultuuride kooslused on tähistatud proovipunkti legendiga, millele järgneb kasutatud substraadi lühend: Hp – heptaan (sinine taust), Hd – heksadekaan (roheline taust), d – diiselkütus (lilla taust) ja TN – toornafta (kollane taust).



**Joonis 7.** Läänemere 2008. ja 2009. aasta bakterikoosluste algsete ning rikastuskultuuride 16S rRNA geeni DGGE geeli korrastatud andmete analüüsil leitud bändide arvud. Proovipunktide tähistused: A – Tallinna laht, B – Soome laht, C – Narva laht ja D – Liivi laht. Rikastuskultuurides kasutatud substraatide tähistused: Hp – heptaan, Hd – heksadekaan, d – diiselmütus, TN – toornafta ja F – algne kooslus.

Samas 2008. aastal Narva ja Liivi lahest võetud proovide heksadekaani rikastuste DGGE profiilid klasterdusid klastrisse III (Joonis 6) koos algsete veeproovidega. 2009. aastal Narva ja Liivi lahest võetud veeproovide heksadekaani rikastused moodustasid ühe klastrisse koos diiselmütuse rikastustega (V, Joonis 6). Koosluste mitmekesisus Läänemere erinevatest lahtedest võetud veeproovide heksadekaani rikastustes oli sarnane (16-20 detekteeritud bändi; Joonis 7).

Diiselmütuse lisamisel vähenes bakterikoosluse mitmekesisus kõikide veeproovide rikastustes, kõige suurem muutus oli 2009. aasta Narva ja Tallinna lahest võetud proovide diiselmütuse rikastustes (3-4 detekteeritud bändi, Joonis 7). Korrastatud DGGE geelipildilt kalkuleeritud dendrogrammil grupeerusid viimati nimetatud rikastused klastrisse I (Joonis 6) koos toornafta rikastustega. Ühtse klatri moodustasid peaaegu kõik 2008. aasta (Tallinna, Soome ja Narva laht) ning 2009. aasta Soome lahe proovide diiselmütusega rikastused (V, Joonis 6).

Toornafta lisamisel Tallinna, Soome ja Liivi lahe proovidele vähenes bakterite mitmekesisus rikastuskultuurides, samal ajal kui 2008. aasta Soome lahe rikastuses detekteeritud bändide arvu alusel mitmekesisus suurenes (Joonis 7). Korrastatud DGGE geelipildilt kalkuleeritud dendrogrammil grupeerusid klastrisse I (Joonis 6) Tallinna ja Narva lahtedest ning 2009. aastal Liivi lahest võetud veeproovide toornafta rikastuste DGGE profiilid. 2008. aastal Soome lahest ja 2008. aastal Liivi lahest võetud proovide rikastused klasterdusid klastrisse II (Joonis 6) koos heksadekaani rikastustega.

Erinevate substraatide lisamisel bakterikoosluste mitmekesisus võrreldes algsete veeproovide bakterite mitmekesisusega langes, välja arvatud Soome lahest võetud proovide rikastused (2008. aasta heptaani ja toornafta rikastuste puhul bändide arv suurenes; 2009. aasta heptaani rikastuse puhul bändide arv on sarnane algse veeprooviga). Mitmekesisuse vähenemist selektiivse surve olemasolul ning spetsiifilise bakterikoosluse moodustumist on näidatud ka varasemates töödes, kus on uuritud õlireostuse mõju mere bakterikooslustele või seda imiteerivaid rikastuskatseid (Röling *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2008; Viggor *et al.*, 2013). Enamasti on DGGE profiilide analüüsil näha, et substraadi lisamisel tekivad uued dominantsed bändid (Hilyard *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2009), kuid samal ajal mõned bändid säilivad nii algsetes proovides kui ka rikastustes (Viggor *et al.*, 2013).

Kõige suuremad muutused Läänemere bakterikoosluse mitmekesisuses ja struktuuris toimusid diiselmootori ja toornafta lisamisel algsetele veeproovidele (Joonis 6; Joonis 7). Ilmselt on see tingitud sellest, et diiselmootori ja toornafta koostised on keerulised, mistõttu mõjutab nende lisamine/olemasolu oluliselt alkaane-lagundava bakterikoosluse kujunemist eksperimendi käigus (Röling *et al.*, 2002; McKew *et al.*, 2007). Diiselmootor sisaldab nii lühikese kui ka pika ahelaga *n*-alkaane (C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>) (40%), *iso*- ja *cyclo*-alkaane (40%), aromaatsed süsivesinikke (20%) ja väiksemas kontsentratsioonis isoprenoide ning väävlit, lämmastikku ja/või hapnikku sisaldavaid ühendeid (Lee *et al.*, 1992). Toornafta koostises on aga 30% *n*-alkaane (C<sub>5</sub>-C<sub>40</sub>), 49% *cyclo*-alkaane, 15% aromaatsed ühendeid ja 6% asfalteene (Hyne *et al.*, 2012). On näidatud, et süsivesinike lagundamine algab *n*- ja *iso*-alkaanide lagundamist. Kõige viimasena lagundatakse aromaatsed ühendid ja asfalteenid (Leahy ja Colwell, 1990; Sugiura *et al.*, 1997).

### 2.3.2 Tüvede isoleerimine ja identifitseerimine

Veeproovidest, mis olid võetud neljast Läänemere piirkonnast 2008. ja 2009. aastal ning nende rikastuskatsetest heptaani, heksadekaani, diiselmootori ja toornaftaga, oli varem eraldatud 66 alkaane-lagundavat bakteritüve (**LISA 2**). Õved olid kõrvaldatud BOX-PCR analüüsiga, kus võrreldi isolaatide genoomseid „sõrmejälgi“ mustreid. Käesoleva töö käigus testiti bakteritüvede kasvu oktaanil (C<sub>8</sub>), heksadekaanil (C<sub>16</sub>) ja oktadekaanil (C<sub>18</sub>), mis lisati minimaalsöötmele tassi kaanele asetatud filterpaberile ja osade tüvede puhul ka dokosaanil (C<sub>22</sub>), mis lisati enne tasside valamist minimaalsöötmele. Paljud tüved andsid tugeva kasvu

heksadekaanil ja oktadekaanil. Oktaanil oli reeglina kasvujälg nõrgem. Väga intensiivse ja kiire kasvuga pikematel alkaanidel olid tüved 2A27, C1RHp1, D1RHp1, 2A2, 2D43, 2D82, 2D19, 2C1 ja 2A59. Kõige tugevam kasv oktaanil saadi tüvega C2RTN5 (**LISA 2**).

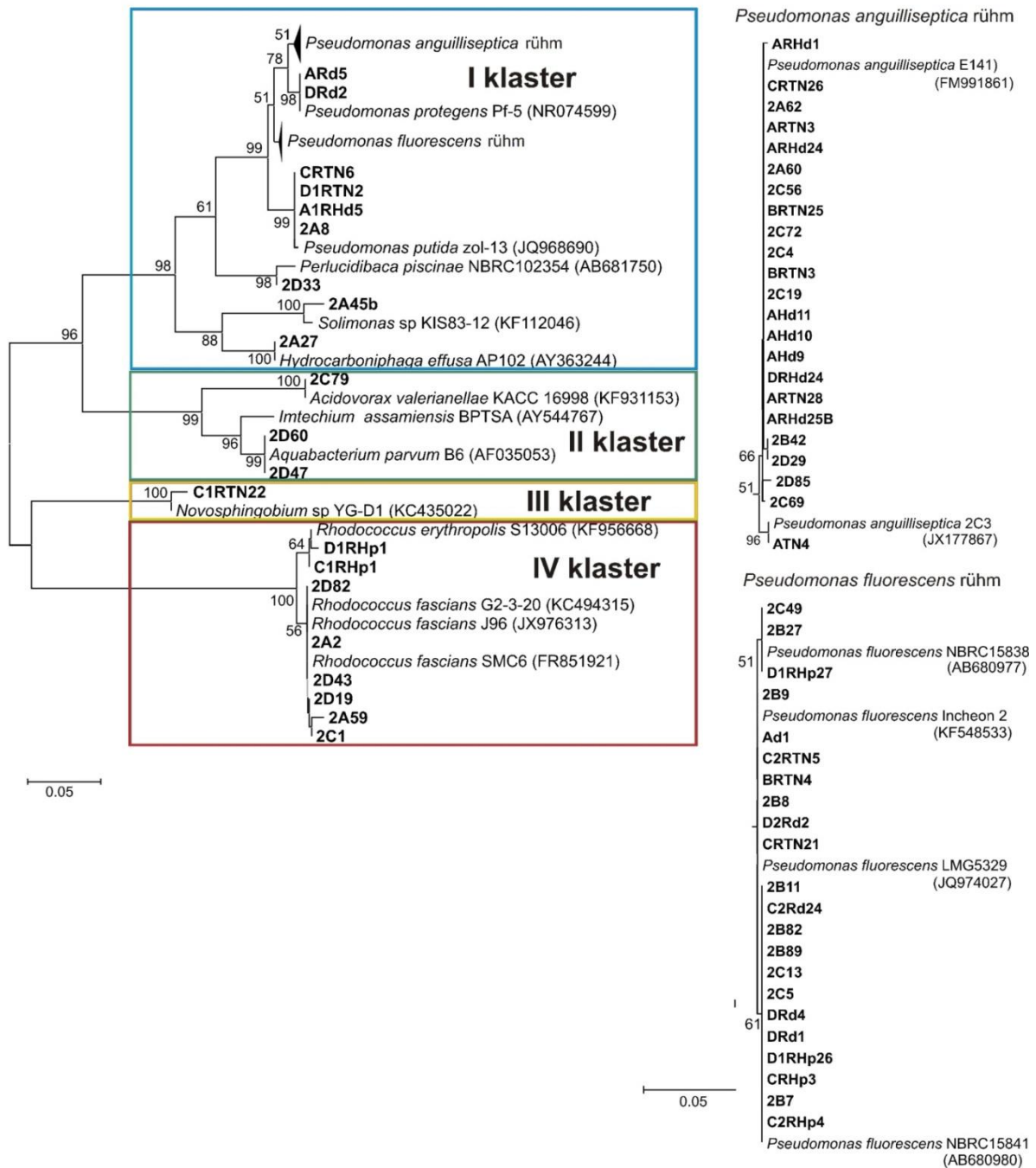
### 2.3.2.1 Tüvede 16S rRNA geenifragmendi järjestuste analüüs

Töös uuritud bakteritüvede 16S rRNA geenifragmentidest (407-418 bp) ja GenBank andmebaasist leitud referentsjärjestustest koostati fülogeneetiline puu kasutades programmi Mega 5.2 (Joonis 8). 66 bakteritüve järjestused klasterdusid nelja klastrisse, millest gramnegatiivsed bakterid moodustasid kolm (I, II, III) ja grampositiivsed bakterid ühe klastri (IV). Klassi *Gammaproteobacteria* esindajad moodustavad klastri I, *Betaproteobacteria* - klastri II, ainukene klassi *Alphaproteobacteria* esindaja paikneb III klastris ning IV klastris on klassi *Actinobacteria* esindajad.

Varasemates töodes on näidatud, et hõimkondade *Proteobacteria* ja *Actinobacteria* esindajad on iseloomulikud Läänemere bakterikooslustele (Riemann *et al.*, 2008; Koskinen *et al.*, 2011; Tiirik *et al.*, 2013; Viggor *et al.*, 2013). Käesolevas töös uuritud 54 isoleeritud tüve 16S rRNA geeni järjestust on 96-100% identsed *Gammaproteobacteria* ja 8 tüve 98-100% identsed *Actinobacteria* klassi kuuluvate bakterite vastavate järjestustega (**LISA 2**).

Klassi *Gammaproteobacteria* perekonna *Pseudomonas* esindajate järjestustega kõige lähedasemaid järjestusi omavad 51 tüve moodustasid kõige suurema rühma uuritud 16S rRNA geenifragmentide järjestustest (Joonis 8; **LISA 2**). BLAST otsingumootoriga GenBank andmebaasist saadi lähimad vasted järgmiste pseudomonaadide järjestustega: *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas protegens* ja *Pseudomonas putida*, mis fülogeneetilisel puul on paigutunud eri harudesse (Joonis 8, klaster I). Kõige tugevama kasvuga erinevatel alkaanidel olid tüved, kes kuuluvad liikidesse *P. anguilliseptica* ja *P. putida* (**LISA 2**). Pseudomonaadid on tuntud alkaanide lagundajad ning neid leidub nii pinnases, kui ka mage- ja merevees (van Beilen *et al.*, 1992; Louws *et al.*, 1994; Lönnström *et al.*, 1994; Halsey *et al.*, 2006; Johnson ja Hyman, 2006; Dubbels *et al.*, 2007).

*Gammaproteobacteria* klassi kuuluva *Hydrocarboniphaga effusa* tüve AP102 16S rRNA geeni järjestusega 99% ulatuses identset järjestust omav tüvi 2A27 kasvas kõigil testitud substraatidel, tugevamad kasvujäljed olid heksadekaanil ja oktadekaanil (Joonis 8; **LISA 2**).



**Joonis 8.** 16S rRNA geeni (407-418 bp) põhjal koostatud fülogeneetiline puu. Sinise värviga on tähistatud *Gammaproteobacteria* klass (I); roheline värviga on tähistatud *Betaproteobacteria* klass (II); kollase värviga on tähistatud *Alphaproteobacteria* klass (III); punase värviga on tähistatud *Actinobacteria* klass (IV). GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on toodud bakteri nimi ning sulgudes vastav GenBank ID number. Klaster I kolmnurgaga tähistatud *Pseudomonas anguilliseptica* ja *Pseudomonas fluorescens* rühmad on toodud eraldi välja joonise paremal poolel. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,05 aminohappe asendusele ühe aminohappe kohta.

Palleroni ja töökaaslased leidsid, et *Hydrocarboniphaga* tüved kasvavad *n*-alkaanidel pikkusega 6 kuni 19 süsinikuaatomit, mis langeb kokku antud töös kirjeldatud bakteritüve tulemustega (Palleroni *et al.*, 2004).

Esimeses klastris paikneb ka sugukonda *Solimonadaceae* kuuluva *Solimonas soli* tüve DCY 15 16S rRNA geenifragmendi järjestusega 96% identne tüve 2A45b järjestus (Joonis 8). Tüvi 2A45b kasvab heksa- ja oktodekaanil (**LISA 2**). Atlandi ookeani pinnaveeprooviga tehtud diiselkütuse rikastuskultuurides näidati esmakordselt bakteriperekonna *Solimonas* osalemist alkaanide lagundamisel (Wang *et al.*, 2010).

Tüve 2D33, mille 16S rRNA geeni järjestus on 99% identne klassi *Gammaproteobacteria* sugukonna *Moraxellaceae* bakteri *Perlucidibaca piscinae* tüve NBRC 102354 vastava järjestusega, andis testitud substraatidest kõige tugevama kasvujälje heksadekaanil (Joonis 8; **LISA 2**). Antud perekond on alles hiljuti kirjeldatud (Song *et al.*, 2008) ning seepärast puuduvad andmed nende bakterite alkaanide lagundamise võime kohta.

Klastris II (Joonis 8) paiknevate tüvede 2D60, 2D47 ja tüve 2C79 järjestused on vastavalt 99% ja 100% identsed klassi *Betaproteobacteria* sugukonda *Comamonadaceae* kuuluvate bakterite *Aquabacterium parvum* ja *Acidovorax valerianellae* 16S rRNA geenifragmendi järjestustega (**LISA 2**). Kasvu intensiivsuse järgi lagundavad need bakterid hästi heksadekaani. Bell ja töökaaslased näitasid oma uurimistöös, et kui diiselkütusega saastunud Arktika muldadele lisada ammoonium fosfaati, siis bakterikooslustes hakkavad domineerima perekonda *Betaproteobacteria* kuuluvad bakterid (Bell *et al.*, 2013).

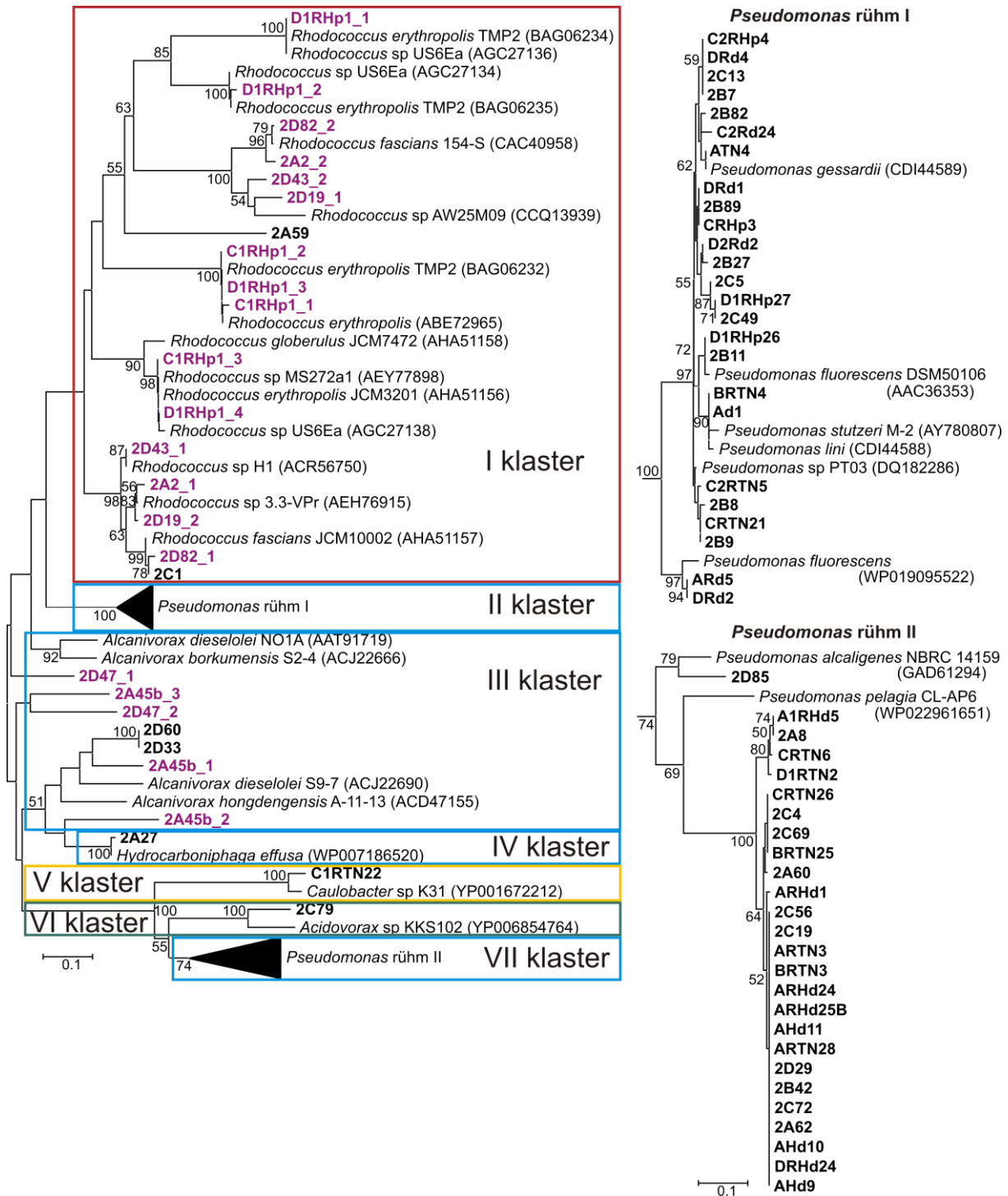
Kaheksa isolaadi 16S rRNA geenifragmentide järjestused olid 98-100% ulatuses identsed grampositiivsete bakterite klassi *Actinobacteria* perekonda *Rhodococcus* kuuluvate bakterite vastavate järjestustega ning fülogeneetilisel puul moodustasid nad klatri IV (Joonis 8, **LISA 2**). Liigiliselt saadi lähimad vasted järgmiste rodokokkidega: *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus qingshengii*, *Rhodococcus fascians* ja *Rhodococcus cercidiphylli*. Kõik perekonda *Rhodococcus* kuuluvad tüved (C1RHp1, D1RHp1, 2A2, 2D43, 2D82, 2D19, 2A59 ja 2C1) kasvasid alkaanidel ahela pikkusega C<sub>8</sub> – C<sub>22</sub>, kõige parem kasv oli heksadekaanil ning erinevalt teistest testitud tüvedest kasvasid nad väga hästi ka oktadekaanil. Kirjanduses on näidatud, et tüved perekonnast *Rhodococcus* on väga laia substraadispetsiifikaga ning lagundavad efektiivselt alkaane (van Beilen *et al.*, 2002; Whyte *et al.*, 2002b; Peng *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008; Ferrera-Rodriguez *et al.*, 2013).

### 2.3.3 Tüvede *alkB* geeni järjestuste detekteerimine

Bakteritüvede (66) *alkB* geeni järjestused amplifitseeriti ja sekveneriti. Alkaani hüdroksülaasi geeni järjestuste amplifitseerimiseks kasutati Viggor'i ja töökaaslaste poolt disainitud universaalseid praimereid, *alkBF* ja *alkBR* (Viggor *et al.*, 2013). Kaheksa tüve *alkB* järjestuse sekvenerimisel saadi järjestused, millel olid topelt piikidega kromatogrammid, mis viitas mitme *alkB* geeni olemasolule ühes tüves. Redundantsete geenide järjestuste määramiseks puhastati *alkB* geenifragment geelist, kioneeriti ning sekveneriti kioneeritud järjestused. Nii tuvastati viiel tüvel kaks, kahel tüvel kolm ning ühel tüvel neli erinevat alkaani hüdroksülaasi geeni (**LISA 2**). *Hydrocarboniphaga effusa* tüve 2A27 puhul universaalsete *alkB* geeni praimeritega PCR produkti ei saadud, uued praimerid disainiti GenBank andmebaasist leitud *Hydrocarboniphaga effusa* AP103 *alkB* geeni nukleotiidses järjestuses (NZAKGD01000003) järgi.

Korrastatud *alkB* geeni nukleotiidsed järjestused (78) transleeriti ennustatavateks aminohappelisteks järjestusteks (100-102 aa). Kõik saadud sekveneritud järjestused sisaldavad histidiini klastrit, mis on iseloomulik alkaani hüdroksülaasi aktiivtsentrile (Shanklin *et al.*, 1994; Smits *et al.*, 2002).

78 ennustatud AlkB aminohappelist järjestustust võrreldi BLAST otsingumootoriga GenBank andmebaasis leiduvate aminohappeliste järjestustega. Isoleeritud bakteritüvede ja referentstüvede AlkB valgujärjestustest koostati Mega 5.2 programmi kasutades fülogeneetiline puu, millel on seitse klastrit (Joonis 9). Gramnegatiivsete bakterite ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestustega identsed järjestused on puul paigutatud nelja *Gammaproteobacteria* (II, III, IV, VII), ühte *Alphaproteobacteria* (V) ja ühte *Betaproteobacteria* (VI) klastrisse. Grampositiivsete bakterite ennustatavad AlkB aminohappelised järjestused asetsevad klastris I (Joonis 9).



**Joonis 9.** Tüvede ennustatavate AlkB valgujärjestuste (100-102 aa) põhjal koostatud fülogeneetiline puu. Punase värviga on tähistatud *Actinobacteria* klass; sinise värviga – *Gammaproteobacteria* klass; roheline värviga – *Betaproteobacteria* klass; kollase värviga – *Alphaproteobacteria* klass. GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on toodud bakteri nimi ning sulgudes vastav GenBank ID number. Klastrites II ja VII kolmnurgaga tähistatud *Pseudomonas* rühmad I ja II on toodud eraldi välja joonise paremal poolel. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,1 aminohappe asendusele ühe aminohappe kohta.

### 2.3.3.1 Tüvede AlkB mitmekesisuse iseloomustamine fülogeneetilise puu analüüsi põhjal

#### 2.3.3.1.1 Ühe *alkB* geeniga tüved

Klastrid II ja VII sisaldavad järjestusi, mis on kõige sarnasemad perekonda *Pseudomonas* kuuluvate bakterite AlkB järjestustega (Joonis 9). Klastris II paiknevad 24 uuritud tüve ennustatavad AlkB aminohappelised järjestused, mis on 95-100% identsed *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. lini* ja *P. gessardii* tüvede AlkB järjestustega. Samal ajal 16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi põhjal on nende tüvede järjestused 100% identsed *P. fluorescens* järjestustega (LISA 2). Alkaanidel annavad need 24 tüve reeglina nõrga kasvujälje, tüvi C2RTN5 annab tugevaima kasvujälje oktaanil. Barathi ja Vasudevan näitasid oma uurimustöös, et *P. fluorescens* moodustab biopindaktiivseid ühendeid alkaanide ja aromaatsete ühendite paremaks omastamiseks keskkonnast ning ta on võimeline lagundama alkaane ahela pikkusega 6 kuni 16 süsinikuaatomit (Barathi ja Vasudevan, 2001). Smits ja töökaaslased leidsid *Pseudomonas fluorescens* tüvest CHA0 AlkB järjestuse, mis on homoloogne *Pseudomonas putida* GPo1 OCT plasmiidis paikneva alkaani hüdroksülaasiga ning lagundas alkaane ahela pikkusega C<sub>18</sub>-C<sub>28</sub> (Smits *et al.*, 2002).

Klastrid VII moodustavad 26 tüve AlkB järjestused, mis on 73-74% identsed *Pseudomonas pelagia* AlkB järjestusega. 16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi järgi on nende tüvede järjestused aga suurema protsendiga (99-100%) identsed *P. anguilliseptica* E141 järjestusega. Kõik sellesse klastrisse kuuluvad tüved annavad tugevad kasvujäljed hekso- ja oktadekaanil. GenBank andmebaasis puuduvad andmed *Pseudomonas anguilliseptica* AlkB järjestuste kohta. Samas näidati, et 2004. aastal Galicia mererannast isoleeriti *Pseudomonas anguilliseptica* tüved on võimelised lagundama erinevaid süsivesinikke kaasa arvatud heksadekaani (Mulet *et al.*, 2010).

Eraldi haru moodustab klastris VII tüve 2D85 AlkB järjestus, mille lähim vaste GenBank andmebaasis on *P. alcaligenes* NBRC14159 alkaani hüdroksülaas (identsusprotsent 86%). Kaczorek ja töökaaslased näitasid, et pindaktiivsete omadustega looduslike ainete saponiinide kasutamisel biodegradatsiooni katsetes lagundas *Pseudomonas alcaligenes* S22 21 päeva jooksul 92% lisatud diiselkütusest (Kaczorek *et al.*, 2011). Pindaktiivsete ühendite tootmine muudab pseudomonaadide rakupinna omadusi nii, et paraneb hüdrofoobsete alkaanide omastamine ja seeläbi ka nende lagundamine.

16S rRNA geeni järjestuse analüüsi tulemusel *Hydrocarboniphaga effusa* järjestusega 99% identse tüve 2A27 AlkB järjestus on fülogeneetilisel puul paigutunud klastrisse III ning 99% identne *Hydrocarboniphaga effusa* AP103 vastava järjestusega. *H. effusa* AP103 genoomi sekveneerimisel leiti kaks AlkB ning viis CYP-ensüümidega sarnast järjestust, kuid nende süsteemide tööprintsipi ei ole seni täpsemalt veel uuritud (Chang *et al.*, 2012). Soolajärvest isoleeritud *Hydrocarboniphaga daqingensis* tüvi 2B-9<sup>T</sup> on võimeline lagundama alkaane pikkusega 6 kuni 19 süsinikuaatomit (Liu *et al.*, 2011).

Tüvede 2D60 ja 2D33 AlkB järjestused on mõlemad 79% identsed klassi *Gammaproteobacteria* perekonda *Alcanivorax* kuuluvate tüvede vastavate järjestustega ning fülogeneetilisel puul paigutuvad nad IV klastrisse. Samas kuulub tüvi 2D33 16S rRNA geeni järjestuse alusel hoopis klassi *Gammaproteobacteria* perekonda *Perlucidibaca* ning tüvi 2D60 klassi *Betaproteobacteria* perekonda *Aquabacterium*. AlkB horisontaalse geeniülekanne kohta perekonnast *Alcanivorax* klassi *Gammaproteobacteria* teiste perekondade esindajatele kirjutasid näiteks van Beilen ja töökaaslased (van Beilen *et al.*, 2001; 2004). Perekonda *Alcanivorax* kuuluvad tüved on tuntud kui väga head alkaanide lagundajad (Golyshin *et al.*, 2003; Schneiker *et al.*, 2006). Yakimov ja töökaaslased näitasid, et alkaanide paremaks omastamiseks keskkonnast toodavad *Alcanivorax* esindajad unikaalseid biopindaktiivseid ühendeid. Samas ei ole kirjanduses ja andmebaasides andmeid perekondade *Perlucidibaca* ja *Aquabacterium* alkaanide kasutamise võime ega ka selles osalevate ensüümide kohta, kuid on leitud, et perekonda *Aquabacterium* kuuluvate bakterite arvukus kasvab heptaani ja toornaftaga mikrokosmides (Jurelevicius *et al.*, 2013b). Madala identsusprotsendi seletuseks võib olla vähene info perekonna *Aquabacterium* tüvede *alkB* geenide järjestuste kohta või *alkB* geenide horisontaalne geeniülekanne perekonda *Alcanivorax* kuuluvatest bakteritest, kuna on näidatud, et *Alcanivorax* esindajatel paiknevad *alkB* geenid plasmiidis (van Beilen *et al.*, 2001; 2004).

V klastris paikneb *Novosphingobium* sp. tüve C1RTN22 AlkB järjestus, mis annab 99% identsust *Sphingobium* Ant17 alkaani hüdroksülaasi järjestusega, kuid see järjestus on lühem kui meie tüve oma. Seetõttu kasutati referentsjärjestuseks 93% ulatuses identsusega klassi *Alphaproteobacteria* perekonna *Caulobacter* sp. K31 AlkB järjestust. Nimetatud bakter andis testitud alkaanidega minimaalsöötmele nõrga kasvujälje (**LISA 2**). Deepwater Horizon õlireostuse mõju ümbritseva keskkonna mikroobikooslustele uurinud töörühm näitas 16S rRNA geeni järjestuste analüüsi põhjal, et 17 alkaane lagundava perekonna seas on ka perekondade *Novosphingobium* ja *Caulobacter* järjestused (Looper *et al.*, 2013). Tüvest

*Novospingobium aromaticivorans* leiti ka P450 ensüümi, mille abil ta on võimeline lagundama aromaatseid alkaane (Bell ja Wong, 2007).

Eraldi klasteri (VI) moodustab fülogeneetilisel puul 16S rRNA geeni järjestuse alusel perekonda *Acidovorax* kuuluva bakteri 2C79 alkaani hüdroksülaasi järjestus, mis on 83% ulatuses identne *Acidovorax valerianellae* KACC 16998 AlkB järjestusega. *Acidovorax* olemasolu Läänemeres on kirjeldatud näiteks Opelt ja Berg'i poolt (Opelt ja Berg, 2004). Uurides saastamata King-George saare mullaproovidest koostatud *alkB* geeni klooniraamatukogu, leidsid Jurelevicius ja töökaaslased bakteritüvesid, mille *alkB* geen oli 73% identne *Acidovorax* sp. KKS102 alkaani hüdroksülaasi geeni järjestusega ning sellised järjestused moodustasid 9,5% kloonidest (Jurelevicius *et al.*, 2013a).

Grampositiivsetel tüvedel, 2C1 ja 2A59, tuvastati AlkB järjestused, mis olid identsed vastavalt *Rhodococcus fascians* (99%) ja *Rhodococcus globerulus* (69%) AlkB järjestustega (klaster II, Joonis 9; **LISA 2**). 16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi põhjal on tüvi 2A59 suurema identsusprotsendiga (98%) sarnane *Rhodococcus fascians* tüvega. Mõlemad tüved kasvasid kõikidel testitud substraatidel, kuid 2C1 kasvujäljed olid tugevamad (**LISA 2**). Ferrera-Rodriguez ja töökaaslased uurisid Arktika taimede risosfäärade bakterikooslusi ja leidsid, et perekonda *Rhodococcus* kuuluvad bakterid suudavad lagundada heksadekaani isegi miinuskraadide juures (Ferrera-Rodriguez *et al.*, 2012). *Rhodococcus* sp. tüvedes 1.3-VEs ja 3.3-VPr asub *alkB* geen plasmiidis (Ferrera-Rodriguez *et al.*, 2012). *alkB* geeni plasmiidne päritolu viitab horisontaalse geeniülekanne toimumise võimalusele ning sellega võib seletada tüve *Rhodococcus globerulus* JCM 7472 *alkB* geeniga sarnase geeni olemasolu tüves 2A59, mille 16S rRNA geeni järjestus sarnaneb rohkem tüve *Rhodococcus fascians* J96 järjestusega.

#### 2.3.3.1.2 Mitme *alkB* geeniga tüved

*alkB* geenid võivad asetseda plasmiidis ja kanduda bakterite vahel horisontaalse geeniülekanne teel, mistõttu eksisteerivad tüved, kus on korraka mitu *alkB* geeni. Näiteks osa meie poolt uuritud perekonda *Rhodococcus* liigitatud tüvedest sisaldavad mitut alkaani hüdroksülaasi. Kõik need bakterid kasvavad kiiresti alkaanidel ning annavad ka tugeva kasvujälje (**LISA 2**).

Ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste fülogeneetilise puu klaster II sisaldab alkaani hüdroksülaasi järjestusi, mis on kõige sarnasemad hõimkond *Actinobacteria* perekonda *Rhodococcus* kuuluvate bakterite AlkB järjestustega (identsusprotsent 82-100%; Joonis 9; **LISA 2**). Tüvede C1RHp1 (3 *alkB* geeni) ja D1RHp1 (4 *alkB* geeni) AlkB järjestused on sarnased *Rhodococcus erythropolis* AlkB järjestustega. 16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi alusel *Rhodococcus fascians* tüvedega kõige suuremat sugulust omavates tüvedes 2A2, 2D43, 2D82 ja 2D19 tuvastati kõigis kaks *alkB* geeni, mis olid 82-99% ulatuses identsed *Rhodococcus fascians* tüvede alkaani hüdroksülaasi aminohappeliste järjestustega (**LISA 2**). Sama tüve erinevad AlkB järjestused on omavahel identsed 55-66% ulatuses, kõige suurem identsusprotsent saadi tüve C1RHp1 (59-66%) ja kõige väiksem tüve 2D82 AlkB järjestuste puhul (55%). Kirjanduses põhjendatakse nende bakterite laia alkaani lagundamisevõime spektrit erinevate, osaliselt kattuva substraadispektriga alkaani hüdroksülaaside olemasoluga (van Beilen *et al.*, 2002; Whyte *et al.*, 2002b; Takei *et al.*, 2008). Takei ja töörühm näitasid, et tüvi *Rhodococcus* sp. TMP2 sisaldab korraga 5 *alkB* geeni, millest geenid *alkB3-5* ekspresseeritakse raku kogu elutsükli käigus konstitutiivselt, samal ajal geenid *alkB1* ja *alkB2* indutseeritakse ainult teatud kasvutingimuste korral. Arvatakse, et geenide *alkB1* ja *alkB2* ekspressiooni tase sõltub alkaanide lisamisest (Takei *et al.*, 2008). Selline funktsionaalne erinevus võib seletada suurt erinevust sama tüve erinevate alkaani hüdroksülaaside järjestuste vahel.

Kaks *alkB* geeni tuvastati ka tüves 2D47, mille 16S rRNA geen sarnaneb perekonda *Aquabacterium* kuuluva tüve järjestusega (klaster II; Joonis 9; **LISA 2**). AlkB fülogeneetilise analüüsi põhjal on järjestused vastavalt 68 ja 76% identsed perekonda *Alcanivorax* kuuluvate bakterite AlkB järjestustega. Perekonda *Aquabacterium* kuuluvate bakterite AlkB järjestusi ei ole andmebaasis palju, kuid on näidatud, et tüved võivad sisaldada ühte või enam *alkB* geeni (Masuda, 2009). Masuda eraldas New Jersey saastunud mullast neli perekonda *Aquabacterium* kuuluvat bakteritüve, kes kasvasid hästi vedelatel ja tahketel alkaanidel (C<sub>8</sub>-C<sub>26</sub>). Kaks isolaati sisaldas kahte (redundantsete geenide järjestused olid omavahel 72% identsed) ja kaks ühte *alkB* geeni, mille järjestuste identsusprotsent GenBank andmebaasist leitud lähimate vastetega oli 68% (Masuda, 2009). Homoloogsus tüve 2D47 kahe AlkB järjestuse vahel ulatub 71%, mistõttu võiks antud tüve edasises töös uurida põhjalikumalt.

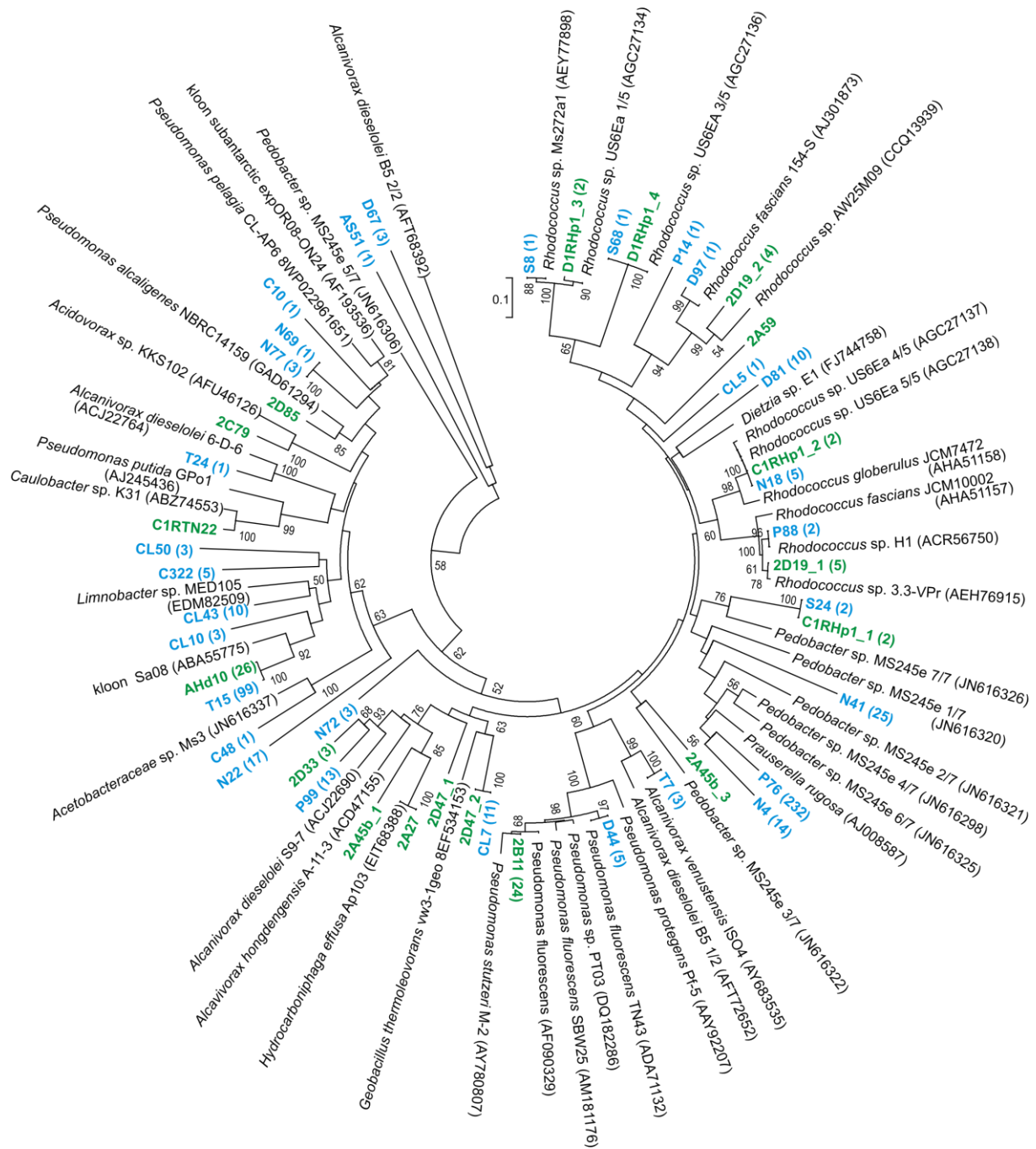
16S rRNA geeni fülogeneetilise analüüsi järgi *Solimonas* sp. järjestusega 96% identne tüvi 2A45b sisaldab kolme AlkB järjestust, mis on 70-76% identsed perekonda *Alcanivorax* kuuluvate bakterite alkaani hüdroksülaaside järjestustega. Alkaani järjestuste omavaheline

identsus varieerub vahemikus 65-76%. Wang ja töökaaslased tuvastasid, et perekonda *Solimonas* kuuluvad bakterid omavad lisaks AlkB järjestusele ka kahte P450 valguperekonda kuuluva CYP153 ensüümi järjestust (Wang *et al.*, 2010). Samas töös näidati, et Atlandi ookeani pinnaveeproovist eraldatud perekonda *Solimonas* kuuluvad bakterid osalevad alkaanide lagundamisel õli-rikastuskatses. (Wang *et al.*, 2010).

#### 2.3.4 Tüvede AlkB järjestuste võrdlemine klooniraamatukogust saadud kloonide AlkB-dega.

Läänemere mikroobikoosluse ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste mitmekesisuse hindamiseks analüüsiti programmiga FastGroupII 66 isolaadi 78 AlkB järjestust ja 30 AlkB klooniraamatukogude (klooniraamatukogud koostasid ja analüüsisid Riinu Kiiker ja Liis Pärnpuu) esindusklooni järjestust. Rühmitamisel kasutati *cutoff*-väärtusena 82%, mis valiti lähtudes kirjanduses varasemalt AlkB järjestuste analüüsimiseks kasutatud väärtusest ning see näitab, kui suur peab olema ühte gruppi rühmitatud erinevate järjestuste vaheline identsus (Kuhn *et al.*, 2009; Wasmund *et al.*, 2009; Guibert *et al.*, 2012). Kokku leiti rühmitamisel 38 gruppi, mille igast grupist valiti üks tüve ja üks klooni esindusjärjestus. AlkB esindusjärjestustest ja GenBank andmebaasist leitud referentsjärjestustest koostati programmi Mega 5.2 abil fülogeneetiline puu (Joonis 10).

Molekulaarsel ja kultiveerimispõhisel meetodil saadud AlkB järjestuste analüüsil selgus, et 38 grupist kaheksas leidub nii tüvede kui ka kloonide järjestusi, üheksas ainult tüvede ning kahekümne ühes ainult klooniraamatukogust leitud AlkB järjestusi. Rühm, mille esindajaks on *P. angulliseptica* tüvi AHd10, sisaldab 26 tüve ja selle järjestus on identne üsna suure kloonide rühmaga (99 klooni), mille esindajaks on kloon T15 (Joonis 10). *P. fluorescens* tüvi 2B11 on esindaja rühmast, milles on 24 tüve ning fülogeneetilise analüüsi alusel grupeerus ta samasse klastrisse klooni D44 rühmaga, mis sisaldab 5 klooni (Joonis 10). Perekonda *Pseudomonas* kuuluvate bakterite osalemist alkaanide lagundamises on palju uuritud (Smita *et al.*, 2001; van Beilen *et al.*, 2001; Rojo *et al.*, 2010), samas on teada, et see perekond on üks dominantsetest perekondadest Läänemere bakterikoosluses (Koskinen *et al.*, 2011; Viggor *et al.*, 2013).



**Joonis 10.** Esindustüvede ja -kloonide ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste (100-102 aa) põhjal koostatud fülogeneetiline puu. Rohelise ja sinise värviga on tähistatud vastavalt tüvede ja kloonide nimed, mille taha on märgitud sulgudes rühma kuuluvate järjestuste arv. GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on toodud bakteri nimi ning sulgudes vastav GenBank ID number. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,1 aminohappe asendusele ühe aminohappe kohta.

Suure kloonide rühma, kuhu kuuluvad kolm suurt gruppi esindajatega N4, P76 ja N41 (sisaldavad vastavalt 14, 232 ja 25 kloonid) AlkB järjestused on GenBank andmebaasi otsingu alusel ~70% identsed perekondade *Pedobacter* ja *Prauserella* kuuluvate bakterite alkaani hüdroksülaasidega (Pärnpuu, 2013). Käesolevas töös ja ka Vilsandi saare lähedastest veeproovist (Viggor *et al.*, 2013) eraldatud kultiveeritavatest bakteritest ei tuvastatud ühtegi AlkB järjestust, mis oleks lähim antud järjestustele (Joonis 10).

Peaaegu iga esindaja, kelle alkaani hüdroksülaasi järjestus on sarnane perekonda *Rhodococcus* kuuluvate tüvede AlkB järjestustega, sai endale paarilise kloonide hulga, erandiks on grupp, mis sisaldas ainult tüve 2A59 AlkB järjestust (Joonis 10). Läänemere bakterikoosluses on perekonna *Rhodococcus* esindajad levinud ning nende alkaanide lagundamise süsteeme on tänaseks juba ka põhjalikumalt uuritud (Peng *et al.*, 2007; Riemann *et al.*, 2008; Dupont *et al.*, 2014). *Aquabacterium* sp. 2D47 AlkB homoloog 2, mille järjestus sarnaneb perekonda *Alcanivorax* kuuluva bakteri AlkB järjestusega, on identne esindusklooni CL7 (11 kloonid) järjestusega. Perekonda *Alcanivorax* kuuluvad bakterid on tuntud alkaanide lagundajad, kelle keerulisi alkaani hüdroksülaaside süsteeme on uuritud mitmetes teaduslaborites (Dutta ja Harayama, 2001; Golyshin *et al.*, 2003; Hara *et al.*, 2003; Yakimov *et al.*, 2003; Schneiker *et al.*, 2006). Esindustüve *Perlucidibaca* sp. 2D33 gruppi kuuluvad ka *Aquabacterium* sp. 2D60 ning *Solimonas* sp. 2A45b (alkB1) AlkB järjestused, mis on 83% identsed esindusklooni P99 järjestusega (13 kloonid) (Joonis 10).

Grupid, kuhu kuuluvad AlkB järjestused tüvedest *Hydrocarboniphaga* sp. 2A27, *Novosphingobium* sp. C1RTN22, *Solimonas* sp. 2A45b (alkB1 ja alkB3), *Pseudomonas* sp. 2D85 *Acidovorax* sp. 2C79 ja *Aquabacterium* sp. 2D47 ei leitud vasteid kloonide hulga (Joonis 10).

Kuigi AlkB klooniraamatukogudest leiti suurem osa erinevatest järjestustest, täiendavalt tüvedest leitud järjestused oluliselt (ligikaudu ¼ gruppidest) Läänemere AlkB mitmekesisuse kohta teadaolevaid andmeid.

## KOKKUVÕTE

Läänemeri on suuruselt teine riimveekogu maailmas, kus elavad koos mere-, mage- ja riimvee organismid. Aktiivse inimtegevuse tagajärjel on üha sagedamini päevakorral õlireostuse oht merel. On teada, et paljud organismid suudavad lagundada õlitoodete koostises olevaid alkaane kasutades selleks erinevaid ensüüme. Membraaniseoselised alkaani hüdroksülaasid, mida kodeerib *alkB* geen, katalüüsivad alkaanide lagundamise esimest etappi. Selle võtmeensüümi mitmekesisuse uurimine Läänemere bakterites annab meile infot bakterikoosluse alkaanide lagundamise potentsiaali kohta.

Selle bakalaureusetöö põhieesmärgiks oli iseloomustada Läänemere veest isoleeritud alkaane-lagundavate bakteritüvede fenotüübilisi ja genotüübilisi tunnuseid. Samuti oli eesmärgiks võrrelda tüvedest tuvastatud *alkB* geenide mitmekesisust varasemates töödes toodud Läänemere *alkB* geeni klooniraamatukogude andmetega. Lisaks analüüsiti denatureeriva gradiendiga geelelektroforeesi meetodit kasutades Läänemere bakterikoosluse 16S rRNA geenifragmentide profiile. Käesolevas bakalaureusetöös saadud andmete analüüsimisel tehti järgmised järeldused:

- heptaani, heksadekaani, diiselkütuse ja toornafta lisamisel vähenes bakterikoosluste mitmekesisus võrreldes algsete veeproovide mitmekesisusega;
- korrigeeritud DGGE geelipildilt koostatud dendrogrammil on klasterdumine üldiselt rikastuskultuuris kasutatud substraadi põhine;
- tüvede 16S rRNA geeni ja ennustatavate AlkB aminohappeliste järjestuste fülogeneetilise analüüsi põhjal on dominantsed hõimkonna *Proteobacteria* perekond *Pseudomonas* ja hõimkonna *Actinobacteria* perekond *Rhodococcus*;
- perekonda *Rhodococcus* kuuluvatel tüvedel on 2-4 redundantset *alkB* geeni;
- *Pseudomonas anguilliseptica*, *Hydrocarboniphaga effusa* ning perekonna *Rhodococcus* erinevatesse liikidesse kuuluvad isolaadid kasvavad hästi alkaanidel ahela pikusega 16 kuni 22 süsinikuaatomit;
- tüvede AlkB järjestused täiendavad klooniraamatukogude analüüsil saadud Läänemere alkaani hüdroksülaaside mitmekesisuse andmeid.

Selle bakalaureusetöö tulemused näitavad, et Läänemerest isoleeritud bakterite AlkB järjestused on mitmekesised ja bakterid suudavad lagundada erineva ahela pikkusega alkaane. Seega võib uskuda, et Läänemere bakterikooslusel on hea alkaanide lagundamise biodegratiivne potentsiaal. Põhjalikumaks kirjeldamiseks võiks edaspidi analüüsida tüvedel teisi alkaani hüdroksülaaside süsteeme (P450 perekonna ensüümid, AlmA jt).

## The diversity of alkane hydroxylase (AlkB) in the Baltic Sea bacterial community

Anastassia Lenskaja

### SUMMARY

The Baltic Sea is the second largest brackish water basin in the world with a unique ecosystem, where marine, fresh and brackish water organisms reside together. As a result of an active marine traffic and transport of fuels, oil spills are considered to be a major threat to the Baltic Sea. Crude oil consists of different types of hydrocarbons, including alkanes, which could be degraded by some organisms that use alkanes as the source of energy and carbon. Because of chemical inertness of alkane molecule it must be activated before it can be metabolized. Aerobic degradation of alkanes starts by the oxidation which is carried out by different enzymes. One of these enzymes is a membrane-bound alkane hydroxylase, encoded by the *alkB* gene.

The aim of this study was to characterize phenotypic and genetic properties of strains isolated from four different sampling points of the Baltic Sea and compare the found diversity of AlkB proteins with the results from *alkB* clone libraries. Denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene and AlkB protein sequences were performed. The following conclusions were made based on the obtained results:

- analysis of the DGGE profiles of the 16S rRNA gene showed that the diversity of bacterial community decreased after an addition of different oil compounds;
- cluster analysis of DGGE fingerprints of the 16S rRNA gene sequences showed that microcosms with different compounds formed separate clusters in the dendrogram;
- the results of the phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene and AlkB protein sequences showed that the phyla *Proteobacteria* and *Actinobacteria*, especially the genera *Pseudomonas* and *Rhodococcus* were dominant;
- almost all species of the genus *Rhodococcus* have multiple *alkB* genes;

- *Pseudomonas anguilliseptica*, *Hydrocarboniphaga effusa* and different species of the genus *Rhodococcus* grew on C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> alkanes;
- Diversity of the AlkB sequences of the strains complement the results received from the analysis of the clone libraries.

The results of this bachelor's thesis show that the AlkB protein sequences are diverse in their degradational substrate range. This allows us to believe that the biodegradative potential of the Baltic Sea bacterial community is high. To find out more about it some additional researches to assess the involvement of other alkane hydroxylase enzymes or the diversity of alkane hydroxylase genes in bacteria at different sampling sites should be provided.

## Kasutatud kirjandus

- Adams, M. H.** (1959). Bacteriophages, Interscience, New York.
- Andersson, A. F., Riemann, L., Bertilsson, S.** (2010). Pyrosequencing reveals contrasting seasonal dynamics of taxa within Baltic Sea bacterioplankton communities. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **4**: 171-181.
- Ashok, A.** (1999). The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment. *Meth. Molec. Biol.* **132**: 221-241.
- Ashraf, W., Mihdhir, A., Murrell, J. C.** (1994). Bacterial oxidation of propane. *FEMS. Microbiol. Lett.* **122**: 1-6.
- Barathi, S., Vasudevan, N.** (2001). Utilization of petroleum hydrocarbones by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environ. Intern.* **26**: 413-416.
- Bauchop, T., Eldsen, S. R.** (1960). The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* **23**: 457-469.
- Bell, S. G., Wong, L. L.** (2007). P450 enzymes from the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. *Biochem. Biophys. Resear. Comm.* **360**: 666-672.
- Bell, T. H., Yergeau, E., Maynard, C., Juck, D., Whyte, L. G., Greer, C. W.** (2013). Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **7**: 1200-1210.
- Chang, H. K., Zylstra, G. J., Chae, J. C.** (2012). Genome sequence of *n*-alkane-degrading *Hydrocarboniphaga effusa* strain AP103 (ATCC BAA-332). *J. Bacteriol.* **194**: 5120.
- Colby, J., Stirling, D. I., Dalton, H.** (1977). The soluble methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) its ability to oxygenase *n*-alkanes, *n*-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds. *J. Biochem.* **165**: 395-402.
- Dubbels, B. L., Sayavedra-Soto, L. A., Arp, D. J.** (2007). Butane monooxygenase of '*Pseudomonas butanovora*': purification and biochemical characterization of a terminal-alkane hydroxylating diiron monooxygenase. *Microbiology.* **153**: 1808–1816.
- Dupont, C. L., Larsson, J., Yooseph, S., Ininbergs, K., Goll, J., Asplund-Samuelsson, J., McCrow, J. P., Celepli, N., Allen, L. Z., Ekman, M., Lucas, A. J., Hagström, Å., Thiagarajan, M., Brindefalk, B., Richter, A. R., Andersson, A. F., Tenney, A., Lundin, D., Tovchigrechko, A., Nylander, J. A. A., Brami, D., Badger, J. H., Allen, A. E., Rusch, D. B., Hoffman, J., Norrby, E., Friedman, R., Pinhassi, J., Venter, J. C., Bergman, B.**

(2014). Functional tradeoffs underpin salinity-driven divergence in microbial community composition. *Adapt. Salin. Aquat. Microb.* **9**: 1-9.

**Dutta, T. K., Harayama, S.** (2001). Biodegradation of *n*-alkylcycloalkanes and *n*-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. strain MBIC 4326. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1970-1974.

**Dyksterhouse, S. E., Gray, J. P., Herwig, R. P., Lara, J. C., Staley, J. T.** (1995). *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Intern. J. System. Bacteriol.* **45**: 116-123.

**Gauthier, M. J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., Bertrand, J. C.** (1992). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Intern. J. System. Bacteriol.* **42**: 568-576.

**Golyshin, P. N., Chernikova, T. N., Abraham, W. R., Lunsdorf, H., Timmis, K. N., Yakimov, M. M.** (2002). *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **52**: 901-911.

**Golyshin, P. N., Martins Dos Santos, V. A. P., Kaiser, O., Ferrer, M., Sabirova, Y. S., Lünsdorf, H., Chernikova, T. N., Golyshina, O. V., Yakimov, M. M., Pühler, A., Timmis, K. N.** (2003). Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. *J. Biotechnol.* **196**: 215-220.

**Green, J., Dalton, H.** (1989). Substrate specificity of soluble methane monooxygenase. Mechanistic implications. *J. Biol. Chem.* **264**: 17698-17703.

**Guibert, L. M., Loviso, C. L., Marcos, M. S., Commendatore, M. G., Dionisi, H. M., Lozada, M.** (2012). Alkane biodegradation genes from chronically polluted subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microbiol. Ecol.* **64**: 605-616.

**Farinas, E. T., Schwaneberg, U., Glieder, A., Arnold, F. H.** (2001). Directed evolution of a cytochrome P450 monooxygenase for alkane oxydation. *Adv. Synth. Catal.* **343**: 601-606.

**Ferrera-Rodriguez, O., Greer, C. W., Juck, D., Consaul, L. L., Martinez-Romero, E., Whyte, L. G.** (2013). Hydrocarbon-degrading potential of microbial communities from Arctic plants. *J. Appl. Microbiol.* **114**: 71-83.

**Funhoff, E. G., Bauer, U., Garcia-Rubio, I., Witholt, B., van Beilen, J. B.** (2006). CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *J. Bacteriol.* **188**: 5220-5227.

- Hakemian, A. S. ja Rosenzweig, A. C.** (2007). The biochemistry of methane oxidation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 223-241.
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Halsey, K. H., Sayavedra-Soto, L. A., Bottomley, P. J., Arp, D. J.** (2006). Site directed amino acid substitutions in the hydroxylase a subunit of butane monooxygenase from *Pseudomonas butanovora*: implications for substrates knocking at the gate. *J. Bacteriol.* **188**: 4962-4969.
- Hamamura, N., Yeager, C. M., Arp, D. J.** (2001). Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardioides* sp. strain CF6. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4992-4998.
- Hangström, Å., Pinhassi, J., Zweifel, U. L.** (2000). Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat. Microbiol. Ecol.* **21**: 231-244.
- Hara, A., Baik, S., Syutsubo, K., Misawa, N., Smits, T. H. M., van Beilen, J. B., Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A.** (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 205-214.
- Hara, A., Syutsubo, K., Harayama, S.** (2003). *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environ. Microbiol.* **5**: 746-753.
- Head, I. M., Jones, D. M., Röling, W. F. M.** (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 173-182.
- Hedlund, B. P., Geiselbrecht, A. D., Bair, T. J., Staley, J. T.** (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 251-259.
- Herlemann, D. P. R., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., Andersson, A. F.** (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *Intern. J. System. Environ. Microbiol.* **5**: 1571-1579.
- HELCOM** (Helsinki Commission. Baltic Marine Environment Protection Commission) <http://helcom.fi/about-us>.
- HELCOM** (Helsinki Commission. Baltic Marine Environment Protection Commission) (2010). Maritime activities in the Baltic Sea. *Baltic Sea Environment Proceedings* **123**: 6.
- Hilyard, E. J., Jones-Meehan, J. M., Spargo, B. J., Hill, R. T.** (2008). Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth river sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1176-1182.

- Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F. I., Liu, R. L., Li, G.** (2008). Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Marine Pollution Bulletin*. **56**: 1714-1718.
- Hölldfors, G., Niemi, A., Ackefors, H., Lassig, J., Leppäkoski, E.** (1981). Biological oceanography. *The Baltic Sea Voipio A, ed*: 219–274.
- Hyne, N. J.** (2012). Nontechnical guide to petroleum geology, exploration, drilling, and production. *3rd edition Oklahoma: PennWell Corporation* p. 1-12.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **96**: 23-28.
- Jahng, D., Wood, T. K.** (1996). Metal ions and chloramphenicol inhibition of soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 744-749.
- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., Bartlam, M.** (2013). Structural insights into diversity and *n*-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Front. Microbiol.* **4**: 58.
- Johnson, E. L. ja Hyman, M. R.** (2006). Propane and *n*-butane oxidation by *Pseudomonas putida* GPo1. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 950-952.
- Jurelevicius, D., Alvarez, V. M., Marques, J. M., Lima, L. R. F. de S., Dias, F. de A., Seldin, L.** (2013b). Bacterial community response to petroleum hydrocarbon amendments in freshwater, marine, and hypersaline water-containing microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 5927-5935.
- Jurelevicius, D., Alvarez, V. M., Peixoto, R., Rosado, A. S., Seldin, L.** (2013a). The use of a combination of *alkB* primers to better characterize the distribution of alkane-degrading bacteria. *J. Pone.* **8**: 1-10.
- Kaczorek, E., Moszyńska, S., Olszanowski, A.** (2011). Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation. *Biodegradation.* **22**: 359-366.
- Kasai, Y., Kishira, H., Harayama, S.** (2002). Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5625-5633.
- Kiiker, R.** (2010). Membraanseoselist alkaani hüdroksülaasi kodeeriva *alkB* geeni mitmekesisus Läänemeres. Bakalaureusetöö. *Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut.*

- Kim, M. K., Kim, Y. J., Cho, D. H., Yi, T. H., Soung, N. K., Yang, D. C.** (2007). *Solimonas soli* gen. nov., sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **57**: 2591-2594.
- Koskinen, K., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., Kankaanpää, H.** (2011). Spatially different bacterial communities in water columns of the northern Baltic Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**: 99-110.
- Kotani, T., Kawashima, Y., Yurimoto, H., Kato, N., Sakai, Y.** (2006). Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7. *J. Biosci. Bioeng.* **102**: 184-192.
- Kotani, T., Yamamoto, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N.** (2003). Propane monooxygenase and NAD<sup>+</sup>-dependent secondary alcohol dehydrogenase in propane metabolism by *Gordonia* sp. strain TY-5. *J. Bacteriol.* **185**: 7120–7128.
- Kuhn, E., Bellicanta, G. S., Pellizari, V. H.** (2009). New *alk* genes detected in Antarctic marine sediments. *Environ. Microbiol.* **11**: 669-673.
- Labinger, J. A., Bercaw, J. E.** (2002). Understanding and exploiting C-H bond activation. *Nature.* **417**: 507–514.
- Lane, B. G.** (1991). Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *J. FASEB.* **5**: 2893-2901.
- Leahy, J. G., Colwell, R. R.** (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**: 305-315.
- Lee, L. S., Hagwall, M., Delfino, J. J., Rao, P. S. C.** (1992). Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel fuel into water. *Environ. Sci. Technol.* **26**: 2104-2110.
- Li, L., Liu, X., Yang, W., Xu, F., Wang, W., Feng, L., Bartlam, M., Wang, L., Rao, Z.** (2008). Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *J. Mol. Biol.* **376**: 453–465.
- Liu, Y., Song, X. F., Jiang, J. T., Liu, Y. H., Xu, C. H., Li, H., Liu, Z. P.** (2011b). *Hydrocarboniphaga daqingensis* sp. nov., isolated from a freshwater lake. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **61**: 408-411.
- Liu, Z. P., Wang, B. J., Liu, Y. H., Liu, S. J.** (2005). *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **55**: 1229-1232.
- Liu, C., Wang, W., Wu, Y., Zhou, Z., Lai, Q., Shao, Z.** (2011a). Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Environ. Microbiol.* **13**: 1168-1178.

- Long, R. M., Lappin-Scott, H. M., Stevens, J. R.** (2009). Enrichment and identification of polycyclic aromatic compound-degrading bacteria enriched from sediment samples. *Biodegrad.* **20**: 521-531.
- Looper, J. K., Cotto, A., Kim, B. Y., Lee, M. K., Liles, M. R., Chadhain, S. M. N., Son, A.** (2013). Microbial community analysis of Deepwater Horizon oil-spill impacted sites along the Gulf coast using functional and phylogenetic markers. *Environ. Sci. Proc. Impac.* **15**: 2068-2079.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., de Bruijn, F. J.** (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2286-2295.
- Lönström, L., Wiklund, T., Bylund, G.** (1994). *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from Baltic herring *Clupea harengus membras* with eye lesions. *Diseases of aquatic organisms.* **18**: 143-147.
- Marin, M. M., Yuste, L., Rojo, F.** (2003). Differential expression of the components of the two alkane hydroxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **185**: 3232-3237.
- Masuda, H.** (2009). Isolation and characterization of *Aquabacterium njensis* sp. nov., a novel member of the  $\beta$ -*Proteobacteria* active in liquid and solid alkane degradation. *The Graduate School-New Brunswick Rutgers, The State University of New Jersey ja The Graduate school of Biomedical Sciences, University of Medicine and Dentistry of New Jersey.*
- Mulet, M., David, Z., Nogales, B., Bosch, R., Lalucat, J., Garcia-Valdes, E.** (2010). *Pseudomonas* diversity in crude-oil-contaminated intertidal sand samples obtained after the *Prestige* oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 1076-1085.
- Murell, J. C., Gilbert, B., McDonald, I. R.** (2000). Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch. Microbiol.* **173**: 325-332.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G.** (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Ogino, A., Koshikawa, H., Nakahara, T., Uchiyama, H.** (2001). Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 625-635.
- Opelt, K., Berg, G.** (2004). Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic sea coast. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6569-6579.
- Palleroni, N. J., Port, A. M., Chang, H. K., Zylstra, G. J.** (2004). *Hydrocarboniphaga*

*effusa* gen. nov., sp. nov., a novel member of the  $\gamma$ -Proteobacteria active in alkane and aromatic hydrocarbon degradation. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **54**: 1203-1207.

**Peng, F., Liu, Z., Wang, L., Shao, Z.** (2007). An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 1603-1611.

**Prince, R. C., Gramain, A., McGenity, T. J.** (2010). Prokaryotic hydrocarbon degraders. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* **3**: 1671–1692.

**Pärnpuu, L.** (2013). AlkB järjestuste mitmekesisuse võrdlemine Läänemere 2008. ja 2009. aasta *alkB* klooniraamatukogude põhjal. *Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut.*

**Reva, O. N., Hallin, P. F., Willenbrock, H., Sicheritz-Ponten, T., Tümmeler, B., Ussery, D. W.** (2008). Global features of the *Alcanivorax borkumensis* SK2 genome. *Environ. Microbiol.* **10**: 613-625.

**Riemann, L., Leitet, C., Pommier, T., Simu, K., Holmfeldt, K., Larsson, U., Hangström, Å.** (2008). The native bacterioplankton community in the central Baltic Sea is influenced by freshwater bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 503-515.

**Rojo, F.** (2010). Enzymes for aerobic degradation of alkanes. *K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* **3**: 783–790.

**Röling, W. F. M., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R. J. P., Head, I. M.** (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5537-5548.

**Ruskule, A., Kuris, M., Leiputė, G., Vetemaa, M., Zableckis, Š.** (2009). Läänemeri. Meie ühine ja kordumatu aare. *Balti Keskkonnafoorum* p. 9; 18-19; 63–64.

**Sabirova, Y. S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K. N., Golyshin, P. N.** (2006). Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization. *J. Bacteriol.* **188**: 3763-3773.

**Saitou, N., Nei, M.** (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

**Schneiker, S., Martins dos Santos, V. A. P., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., Chernikova, T. N., Denaro, R., Ferrer, M., Gertler, C., Goesmann, A., Golyshina, O. V., Kaminski, F., Khachane, A. N., Lang, S., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Nechitaylo, T., Pühler, A., Regenhardt, D., Rupp, O., Sabirova, Y. S., Selbitschka, W., Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Vorhölter, F. J., Weidner, S., Kaiser,**

- O., Golyshin, P. N.** (2006). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nat. Biotech.* **24**: 997-1004.
- Shanklin, J., Whittle, E., Fox, B. G.** (1994). Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochem.* **33**: 12787-12794.
- Smits, T. H. M., Balada, S. B., Witholt, B., van Beilen, J. B.** (2002). Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **184**: 1733-1742.
- Sohn, J. H., Kwon, K. K., Kang, J. H., Jung, H. B., Kim, S. J.** (2004). *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **54**: 1483-1487.
- Song, J., Choo, Y. J., Cho, J. C.** (2008). *Perlucidibaca piscinae* gen. nov., sp. nov., a freshwater bacterium belonging to the family *Moraxellaceae*. *Intern. J. System Evol. Microbiol.* **58**: 97-102.
- Sotsky, J. B., Greer, C. W., Atlas, R. M.** (1994). Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments. *Can. J. Microbiol.* **40**: 981-985.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., Harayama, S.** (1997). Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 45-51.
- Sullivan, J. P., Dickinson, D., Chase, H. A.** (1998). Methanotrophs, *Methylosinus trichosporium* OB3b, sMMO, and their application to bioremediation. *Crit. Rev. Microbiol.* **24**: 335-373.
- Takei, D., Washio, K., Morikawa, M.** (2008). Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane. *Biotechnol. Lett.* **30**: 1447-1452.
- Tani, A., Ishige, T., Sakai, Y., Kato, N.** (2001). Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J. Bacteriol.* **183**: 1819-1823.
- Throne-Holst, M., Markussen, S., Winnberg, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B.** (2006). Utilization of *n*-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 353-360.
- Throne-Holst, M., Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B.** (2007). Identification of novel genes involved in long-chain *n*-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *J. Bacteriol.* **73**: 3327-3332.

- Tiirik, K., Nõlvak, H., Oopkaup, K., Truu, M., Preem, J. K., Heinaru, A., Truu, J.** (2013). Characterization of the bacterioplankton community and its antibiotic resistance genes in the Baltic Sea. *Biotechnol. Appl. Biochem.* p. 1-29.
- van Beilen, J. B.** (2005a). Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Cur. Opin. Biotechnol* **16**: 308-314.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G.** (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 13–21.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Rothlisberger, M., Li, Z., Witholt, B.** (2006). Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 59–65.
- van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M., Witholt, B.** (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil. Gas. Sci. Technol.* **58**: 427-440.
- van Beilen, J. B., Marin, M. M., Smits, T. H. M., Röthlisberger, M., Franchini, A. G., Witholt, B., Rojo, F.** (2004). Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borlukumensis*. *Environ. Microbiol.* **6**: 264-273.
- van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., Röthlisberger, M., Witholt, B.** (2001). Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology.* **147**: 1621-1630.
- van Beilen, J. B., Penninga, D., Witholt, B.** (1992). Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Biol. Chem.* **267**: 9194–9201.
- van Beilen, J. B., Smits, T. H. M., Roos, F. F., Brunner, T., Balada, S. B., Röthlisberger, M., Witholt, B.** (2005b). Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. *J. Bacteriol.* **187**: 85-91.
- van Beilen, J. B., Smits, T. H. M., Whyte, L. G., Schorcht, S., Röthlisberger, M., Plaggemeier, T., Engesser, K. H., Witholt, B.** (2002). Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environ. Microbiol.* **4**: 676-682.
- van Beilen, J. B., Wubbolts, M. G., Witholt, N.** (1994). Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation.* **5**: 161-174.
- Vedler, E., Kõiv, V., Heinaru, A.** (2000). Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pEST4011 of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* strain EST4002. *Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut.* 281-288.

- Viggor, S., Juhanson, J., Jõesaar, M., Mitt, M., Truu, J., Vedler, E., Heinaru, A.** (2013). Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiol. Res.* **168**: 415-427.
- Viñas, M., Sabate, J., Espuny, M. J., Solanas, A. M.** (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7008-7018.
- Wang, L., Wang, W., Lai, Q., Shao, Z.** (2010). Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylase in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* **12**: 1230-1242.
- Wasmund, K., Burns, K. A., Kurtböke, D. I., Bourne, D. G.** (2009). Novel alkane hydroxylase gene (*alkB*) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7391–7398.
- Watkinson, R. J., Morgan, P.** (1990). Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation.* **1**: 79–92.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelleteier, D. A., Lane, D. J.** (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev S. B., Throne-Holst, M.** (2007). Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 1209-1221.
- Whyte, L. G., Schultz, A., van Beilen, J. B., Luz, A. P., Pellizari, D., Labbé, D., Greer, C. W.** (2002a). Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 141-150.
- Whyte, L. G., Smits, T. H. M., Labbe, D., Witholt, B., Greer, C. W., van Beilen, J. B.** (2002b). Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5933-5942.
- Widdel, F., Rabus, R.** (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 259-276.
- Yakimov, M. M., Denaro, R., Genovese, M., Capello, S., D’Auria, G., Chernikova, T. N., Timmis, K. N., Golyshin, P. N., Giluliano, L.** (2005). Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environ. Microbiol.* **7**: 1426-1441.
- Yakimov, M. M., Giuliano, L., Denaro, R., Crisafi, E., Chernikova, T. N., Abraham, W. R., Luensdorf, H., Timmis, K. N., Golyshin, P. N.** (2004). *Thalassolituus oleivorans* general nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **54**: 141–148.

- Yakimov, M. M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T. N., Abraham, W. R., Lünsdorf, H., Timmis, K. N., Golyshin, P. N.** (2003). *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **53**: 779–785.
- Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Lang, S., Moore, E. R., Abraham, W. R., Lunsdorf, H., Timmis, K. N.** (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Intern. J. System. Bacteriol.* **48**: 339–348.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Golyshin, P. N.** (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Cur. Opin. Biotechnol.* **18**: 257–266.
- Yu, Y., Breitbart, M., McNairnie, P., Rohwer, F.** (2006). A web-based bioinformatics platform for analyses of large 16S rDNA libraries. *BMC. Bioinformatics.* **7**: 57.
- Yuan, J., Lai, Q., Zheng, T., Shao, Z.** (2009). *Novospingobium indicum* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a deep-sea environment. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* **59**: 2084–2088.
- Zhou, R., Huang, C., Zhang, A., Bell, S. G., Zhou, W., Wong, L. L.** (2011). Crystallization and preliminary X-ray analysis of CYP153C1 from *Novospingobium aromaticivorans* DSM12444. *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**: 964–967.

## Kasutatud veebiaadressid

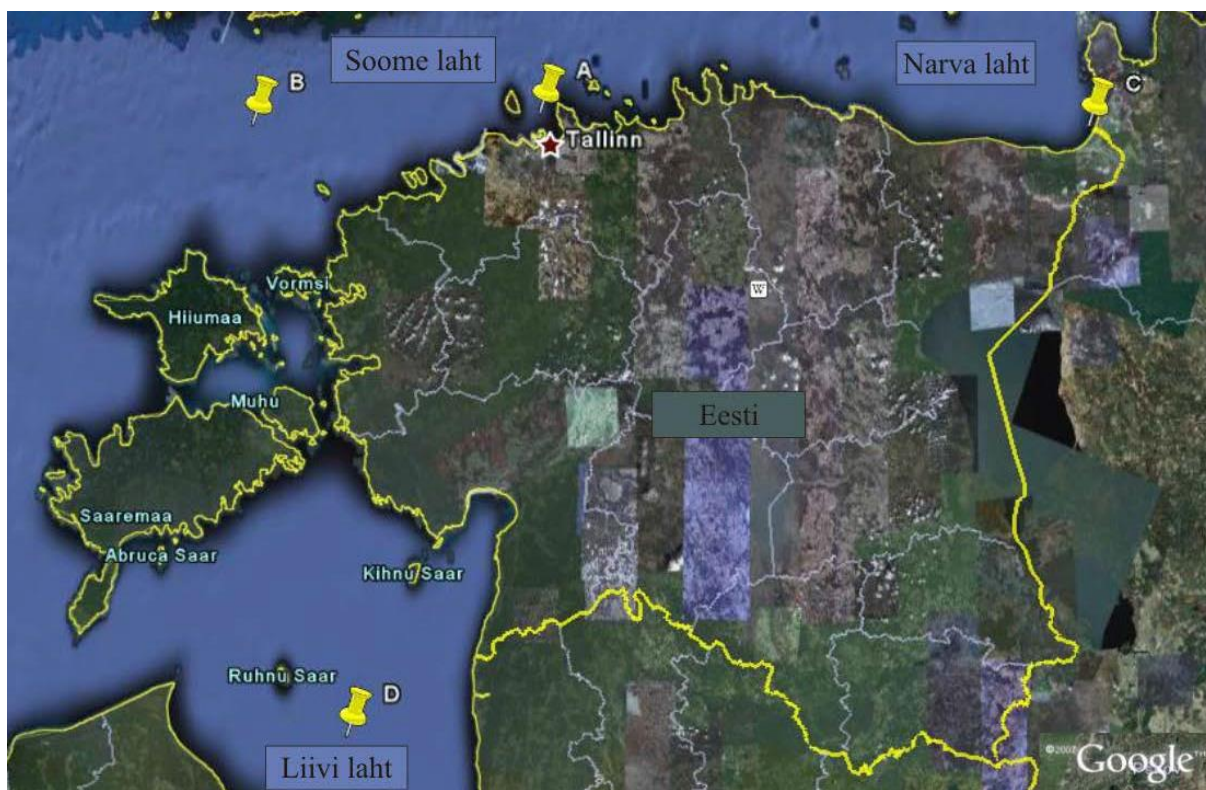
<http://helcom.fi/about-us>

[http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?ec:1.14.15.3](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.14.15.3)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

[http://fastgroup.sdsu.edu/fg\\_tools.html](http://fastgroup.sdsu.edu/fg_tools.html)

## LISA 1



2008. ja 2009. aasta Lääneme veeproovipunktide asukohad (A, B, C ja D) (Kiiker, 2010)

## LISA 2

Töös kasutatud tüvede fenoo- ja genotüüpilised tunnused<sup>1</sup>

Tüvi	Lähim kultiveeritav organism, 16S rRNA geeni järgi (407-418 bp)	GenBank ID	Identsus (%)	AlkB homoloog	Lähim kultiveeritav organism, AlkB järgi (100-102 aa)	GenBank ID	Identsus (%)	E-väärtus	Kasv			
									C <sub>8</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>22</sub>
<i>Gammaproteobacteria</i>												
<b>2A60</b>	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>Pseudomonas pelagia</i> CL-AP6	WP022961651	74	5,00E-48	-	+++	++	nd
<b>2C4</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	74	2,00E-47	+	+++	++	+
<b>ARHd24</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>ARTN3</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>ARHd25B</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>AHd11</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>ARTN28</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>AHd9</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	+	+++	++	nd
<b>ARHd1</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>CRTN26</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	74	2,00E-47	+	+++	++	nd
<b>BRTN3</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>BRTN25</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	74	2,00E-47	*	++	++	nd
<b>AHd10</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>DRHd24</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>2D29</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	99	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	*	+++	++	nd
<b>2C19</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>2C56</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	-	+++	++	nd
<b>2A62</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	*	+++	++	nd
<b>2C69</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	99	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	74	2,00E-47	-	++	++	nd
<b>2B42</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	99	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	*	+++	++	nd
<b>2C72</b>	<i>P. anguilliseptica</i> E141	FM991861	100	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	73	5,00E-47	+	+++	++	*
<b>ATN4</b>	<i>P. anguilliseptica</i> 2C3	JX177867	99	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	100	8,00E-65	-	+++	++	-
<b>D1RTN2</b>	<i>P. putida</i> zol-13	JQ968690	99	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	75	1,00E-47	-	+++	*	nd
<b>CRTN6</b>	<i>P. putida</i> zol-13	JQ968690	99	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	75	2,00E-47	+	+++	++	nd
<b>2A8</b>	<i>P. putida</i> zol-13	JQ968690	99	1	<i>P. pelagia</i>	WP022961651	74	3,00E-47	+	++	++	-

## LISA 2 järg

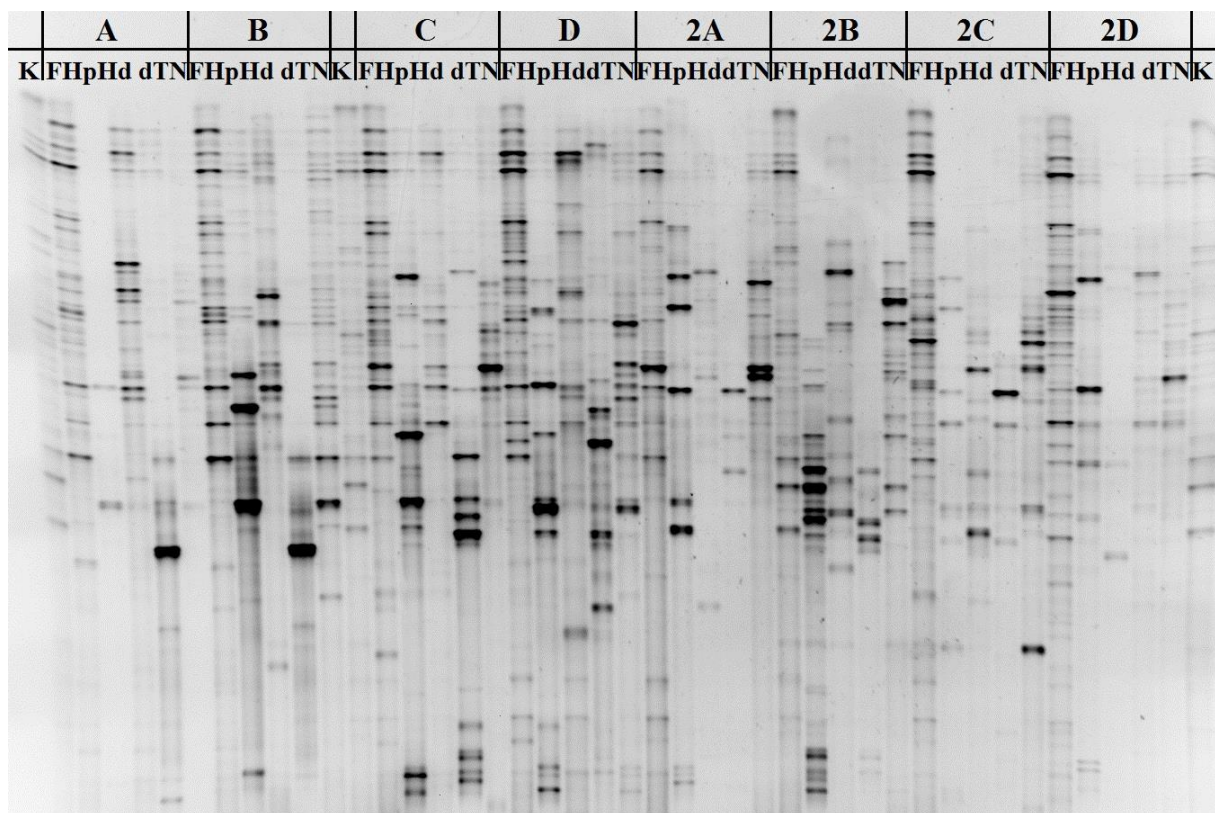
Tüvi	Lähim kultiveeritav organism, 16S rRNA geeni järgi (407-418 bp)	GenBank ID	Identsus (%)	AlkB homoloog	Lähim kultiveeritav organism, AlkB järgi (100-102 aa)	GenBank ID	Identsus (%)	E-väärtus	Kasv			
									C <sub>8</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>22</sub>
<b>C2RTN5</b>	<i>P. fluorescens</i> Incheon 2	KF548533	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	96	1,00E-62	+++	++	++	nd
<b>Ad1</b>	<i>P. fluorescens</i> Incheon 2	KF548533	100	1	<i>P. lini</i>	CDI44588	99	9,00E-64	-	*	*	nd
<b>BRTN4</b>	<i>P. fluorescens</i> Incheon 2	KF548533	100	1	<i>P. lini</i>	CDI44588	99	9,00E-64	-	*	*	nd
<b>2B9</b>	<i>P. fluorescens</i> Incheon 2	KF548533	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	95	1,00E-61	++	+	+	+
<b>D2Rd2</b>	<i>P. fluorescens</i> Incheon 2	KF548533	100	1	<i>P. fluorescens</i>	WP019095522	96	2,00E-58	-	+	-	nd
<b>CRTN21</b>	<i>P. fluorescens</i> Incheon 2	KF548533	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	95	1,00E-61	+	++	+	nd
<b>2B8</b>	<i>P. fluorescens</i> Incheon 2	KF548533	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	95	1,00E-61	+	+	+	nd
<b>DRd4</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	98	1,00E-63	+	++	++	nd
<b>C2Rd24</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	97	1,00E-62	-	+	+	nd
<b>C2RHp4</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	98	1,00E-63	++	*	*	nd
<b>CRHp3</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	98	1,00E-63	-	*	*	nd
<b>DRd1</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	98	1,00E-63	+	++	+	nd
<b>D1RHp26</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. fluorescens</i> DSM50106	AAC36353	99	7,00E-62	*	+	+	nd
<b>2B7</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	98	1,00E-63	*	++	+	nd
<b>2C5</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	96	1,00E-62	-	*	*	nd
<b>2B11</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. fluorescens</i> DSM50106	AAC36353	99	7,00E-62	+	*	*	nd
<b>2B82</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	97	1,00E-62	-	-	+	nd
<b>2C13</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	98	1,00E-63	+	+	++	nd
<b>2B89</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	AB680980	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	98	1,00E-63	-	+	+	nd
<b>D1RHp27</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15838	AB680977	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	95	1,00E-61	+	+	+	nd
<b>2C49</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15838	AB680977	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	95	1,00E-61	-	+	-	nd
<b>2B27</b>	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15838	AB680977	100	1	<i>P. gessardii</i>	CDI44589	96	1,00E-62	-	-	+	nd
<b>2D85</b>	<i>P. alcaligenes</i> M-S-TSA 18	JQ795781	100	1	<i>P. alcaligenes</i> NBRC 14159	GAD61294	86	2,00E-53	-	*	-	nd
<b>ARd5</b>	<i>P. fluorescens</i> A15	HQ288938	100	1	<i>P. fluorescens</i>	WP019095522	96	2,00E-58	*	+	+	nd
<b>2D33</b>	<i>Perlucidibaca piscinae</i> NBRC102354	AB681750	98	1	<i>A. dieselolei</i> S9-7	ACJ22690	79	7,00E-51	++	+++	+	nd
<b>2A27</b>	<i>Hydrocarboniphaga effusa</i> AP102	AY363244	99	1	<i>Hydrocarboniphaga effusa</i>	WP007186520	99	3,00E-63	++	+++	+++	++
<b>2A45b</b>	<i>Solimonas soli</i> DCY 15	EF101904	96	1	<i>Alcanivorax dieselolei</i> S9-7	ACJ22690	76	2,00E-50	-	+	++	-
				2	<i>A. hongdengsis</i> A-11-3	ACD47155	70	1,00E-44	-	+	++	-
				3	<i>A. dieselolei</i> NOIA	AAT91719	70	2,00E-45	-	+	++	-

## LISA 2 järg

Tüvi	Lähim kultiveeritav organism, 16S rRNA geeni järgi (407-418 bp)	GenBank ID	Identsus (%)	AlkB homoloog	Lähim kultiveeritav organism, AlkB järgi (100-102 aa)	GenBank ID	Identsus (%)	E-väärtus	Kasv			
									C <sub>8</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>22</sub>
<i>Betaproteobacteria</i>												
<b>2C79</b>	<i>Acidovorax valerianellae</i> KACC16998	KF931153	100	1	<i>Acidovorax</i> sp. KKS102	YP006854764	83	3,00E-42	-	+	+	-
<b>2D60</b>	<i>Aquabacterium parvum</i> B6	AF035053	99	1	<i>Alcanivorax dieselolei</i> S9-7	ACJ22690	79	7,00E-51	-	+++	++	-
<b>2D47</b>	<i>Aquabacterium parvum</i> B6	AF035053	99	1	<i>A. borkumensis</i> S2-4	ACJ22666	76	9,00E-47	-	+++	+	nd
				2	<i>A. hongdengsis</i> A-11-3	ACD47155	68	3,00E-43				
<i>Alphaproteobacteria</i>												
<b>C1RTN22</b>	<i>Novosphingobium</i> sp YG-D1	KC435022	99		<i>Caulobacter</i> sp. K31	YP001672212	93	6,00E-61	-	*	*	nd
<i>Actinobacteria</i>												
<b>C1RHp1</b>	<i>Rhodococcus erythropolis</i> S13006	KF956668	100	1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ABE72965	99	4,00E-65				
				2	<i>R. erythropolis</i> TMP2	BAG06232	100	1,00E-66	++	+++	++	++
				3	<i>R. erythropolis</i> JCM 3201	AHA51156	100	1,00E-64				
<b>D1RHp1</b>	<i>R. qingshengii</i> B2	KJ028076	100	1	<i>R. erythropolis</i> TMP2	BAG06234	100	9,00E-65				
				2	<i>R. erythropolis</i> TMP2	BAG06235	100	7,00E-65				
				3	<i>R. erythropolis</i> TMP2	BAG06232	100	3,00E-66	++	+++	++	++
				4	<i>R. erythropolis</i> JCM 3201	AHA51156	100	1,00E-64				
<b>2A2</b>	<i>R. fascians</i> SMC6	FR851921	100	1	<i>R. fascians</i> JCM 10002	AHA51157	92	4,00E-61	+	+++	++	++
				2	<i>R. fascians</i> 154-S	CAC40958	97	5,00E-63				
<b>2D43</b>	<i>R. fascians</i> SMC6	FR851921	99	1	<i>R. fascians</i> JCM 10002	AHA51157	93	5,00E-61	++	+++	++	++
				2	<i>R. fascians</i> 154-S	CAC40958	82	2,00E-54				
<b>2D82</b>	<i>R. fascians</i> G2-3-20	KC494315	100	1	<i>R. fascians</i> JCM 10002	AHA51157	98	8,00E-64	++	+++	++	++
				2	<i>R. fascians</i> 154-S	CAC40958	99	1,00E-64				
<b>2D19</b>	<i>R. cercidiphylli</i> IHB B 8033	KF475816	98	1	<i>R. fascians</i> 154-S	CAC40958	82	1,00E-52	++	+++	++	++
				2	<i>R. fascians</i> JCM 10002	AHA51157	94	1,00E-61				
<b>2A59</b>	<i>R. fascians</i> J96	JX976313	98	1	<i>R. globerulus</i> JCM 7472	AHA51158	69	2,00E-42	+	++	+	+
<b>2C1</b>	<i>R. fascians</i> G2-3-20	KC494315	98	1	<i>R. fascians</i> JCM 10002	AHA51157	99	2,00E-64	++	+++	++	++

<sup>1</sup> - Tabelis on toodud tüvede nimed, kasvatusti tulemused ning kõige lähimad kultiveeritavad organismid 16S rRNA geeni (407-418 bp) ning AlkB (100-102 aa) järgi koos GenBank ID numbriga ja identsuseprotsendiga, AlkB puhul on toodud veel ka E-väärtus ja homoloogide arv. Tähistused: (+++) – väga tugev kasv; (++) – tugev kasv; (+) – kasv; (\*) – nõrk kasv; (-) – kasv puudub; (nd) – ei olnud määratud.

## LISA 3



Originaal DGGE geelipilt. Proovipunktide tähistused: A – Tallinna laht, B – Soome laht, C – Narva laht, D – Liivi laht; 2009. aasta koosluste tähistamisel on legendi ette kirjutatud number 2. Rikastuskultuuride tähistused: TN – toornafta, d – diiselküte, Hd – heksadekaan, Hp – heptaan. F-ga on tähistatud filtrilt eraldatud kultuurid. K tähendab kontrollproovi, kontrollptoovina kasutati 2009. aasta Soome lahe veeproovi.

## LIHTLITSENTS

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

Mina Anastassia Lenskaja

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 28.01.1992)

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

Alkaani hüdroksülaasi (AlkB) mitmekesisus Läänemere bakterites,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Signe Viggor,

(juhendaja nimi)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2013 (*kuupäev*)