TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

Keskkonnaproovidest lignotsellulolüütiliste bakterite isoleerimine

Bakalaureusetöö

12 EAP

Tuuli Annok

Juhendajad PhD, Signe Viggor

PhD, Merike Jõesaar

TARTU 2025

INFOLEHT

Keskkonnaproovidest lignotsellulolüütiliste bakterite isoleerimine

Lignotselluloosist jääkainena eraldatud ligniin on biotehnoloogias suure potentsiaaliga biopolümeer, mille struktuuris leidub palju huvipakkuvaid monomeere ja aromaatseid ühendeid, mida väärindada. Käesoleva töö raames isoleeriti tiigiveest ja lehekompostist 45 bakteritüve, millele tehti erinevaid biokeemilisi teste ja fülogeneetilisi analüüse, et tuvastada lignotsellulolüütilise aktiivsusega tüvesid. Katsete käigus selgitati välja tüvede võime lagundada tselluloosi ja hemitselluloosi komponente lignotselluloosis ehk erinevaid süsivesikuid ning ligniini lagunemisel tekkivaid aromaatseid vaheühendeid. Lisaks testiti lignotselluloosi lagundavate ensüümide tsellulaas, amülaas, $\boldsymbol{\beta}$-1,4-glükosidaas ja lakaas olemasolu, millest viimane on oluline ligniini lagundamisel. Kõikidest isoleeritud tüvedest koostati fülogeneesipuu, mis annab infot tüvede jaotumisest hõimkondadesse.

Märksõnad: vee- ja mullaisolaadid, lignotsellulolüütilised ensüümid, ligniin, tselluloos, hemitselluloos.

CERCS: B230, mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Isolating lignocellulolytic bacteria from environmental samples

Lignin, a byproduct extracted from lignocellulose, is a biopolymer with high potential in biotechnology due to its structure, which contains many valuable monomers and aromatic compounds suitable for valorization. In this study, 45 bacterial strains were isolated from pond water and leaf compost. These strains underwent various biochemical tests and phylogenetic analyses to identify those with lignocellulolytic activity. The experiments aimed to determine the ability of the strains to degrade cellulose and hemicellulose components of lignocellulose, meaning various carbohydrates, as well as aromatic intermediates formed during lignin degradation. In addition, the presence of lignocellulose-degrading enzymes such as cellulase, amylase, β-1,4-glucosidase, and laccase was tested, the latter being particularly important for lignin degradation. A phylogenetic tree was constructed from all isolated strains, providing insight into their taxonomic distribution across phyla.

Keywords: water and soil isolates, lignocellulolytic enzymes, lignin, cellulose, hemicellulose.

CERCS: B230, microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISSEJUHATUS 5
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE 6
1.1 Taime sekundaarse rakukesta koostis 6
1.2 Ligniini keemiline struktuur 6
1.2.1 Lignotsellulolüütilises biomassis leiduvad suhkrud 8
1.2.2 Lignotsellulolüütilised ensüümid 8
1.2.3 Tööstuslik ligniini eraldamine lignotselluloosist 10
1.3 Ligniini lagundamine looduses 11
1.3.1 Seened 11
1.3.2 Bakterid 12
1.3.2.1 Proteobakterid 12
1.3.2.2 Hõimkond *Firmicutes* 13
1.3.2.3 Hõimkond *Actinomycetota* 14
1.3.3 Looduslikud kooslused 14
1.4 Ligniini kasutusvõimalused biotehnoloogias 14
2.EKSPERIMENTAALOSA 17
2.1 Töö eesmärgid 17
2.2 Materjal ja metoodika 17
2.2.1 Bakteritüvede isoleerimine 17
2.2.2 Biokeemilised testid tüvedega 17
2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon 18
2.2.4 Geelelektroforees 19
2.2.5 Sekveneerimine 19
2.2.6 Sekveneeritud järjestuste analüüs 20
2.3 Tulemused ja arutelu 21

2.3.1 Tüvede isoleerimine ja identifitseerimine 21
2.3.2 Isolaatide süsivesikute kasutus 25
2.3.3 Isolaatide aromaatsete ühendite kasutus 26
2.3.4 Isolaatide lignotsellulolüütiline aktiivsus 28
2.3.4.1 Tsellulaas 29
2.3.4.2 Amülaas 31
2.3.4.3 $\boldsymbol{\beta}$-1,4-glükosidaas 32
2.3.4.4 Lakaas 33
KOKKUVÕTE 35
SUMMARY 36
KIRJANDUSE LOETELU 38
LIHTLITSENTS 41

SISSEJUHATUS

Ligniin on maailmas üks levinumaid biopolümeere, mis olenemata ulatuslikust levikust leiab siiski vähe tööstuslikku kasutust. Ligniin asub taime sekundaarses rakukestas ning on põimunud tihedalt ümber tselluloosikiudude, võimaldades taime varre puitumist. Kui taimekudedes leiduv tselluloos on biopolümeer, mis koosneb polümeriseerunud glükoosimolekulidest, siis ligniin on palju mitmekülgsem ja keerulisem biopolümeer.

Ligniini koostises on erinevad aromaatsed vaheühendid, mida väärindades oleks võimalik toota keskkonnasõbralikke materjale. Selleks, et ligniinis leiduvaid monomeere tööstuslikuks väärindamiseks kätte saada, peab esmalt lignotselluloosist ligniini komponendi eraldama ning seejärel depolümeriseerima. Kuivõrd ligniini on võimalik keemiliselt lagundada, on see piisavalt energiamahukas ja kulukas protsess, mida laiaulatuslikult rakendada pole kasumlik, mistõttu läheb jääkainena akumuleerunud ligniin peamiselt soojusenergia tootmiseks. Ligniini depolümeriseerimisel on kõige lootustandvam arengusuund ligniini bioloogiline lagundamine. Selleks kasutatakse keskkonnast eraldatud baktereid ja seeni, mis toodavad lignotsellulolüütilisi ensüüme ning suudavad keerulist ligniini polümeeri lagundada väärindatavateks monomeerideks..

Käesoleva töö eesmärgiks on tuvastada tiigiveest ja kompostist isoleeritud bakteritüvede lignotsellulolüütilist aktiivsust, mis võimaldaks hinnata nende tüvede kasutamist tööstuses ligniini väärindamiseks. Selle töö käigus kogutud andmed ja teadmised võiksid viia lähemale teadmisele, kuidas kasutada mikroobe biotehnoloogias jääkainete väärindamisel, käesoleva töö näitel lignotselluloosi lagundamisel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

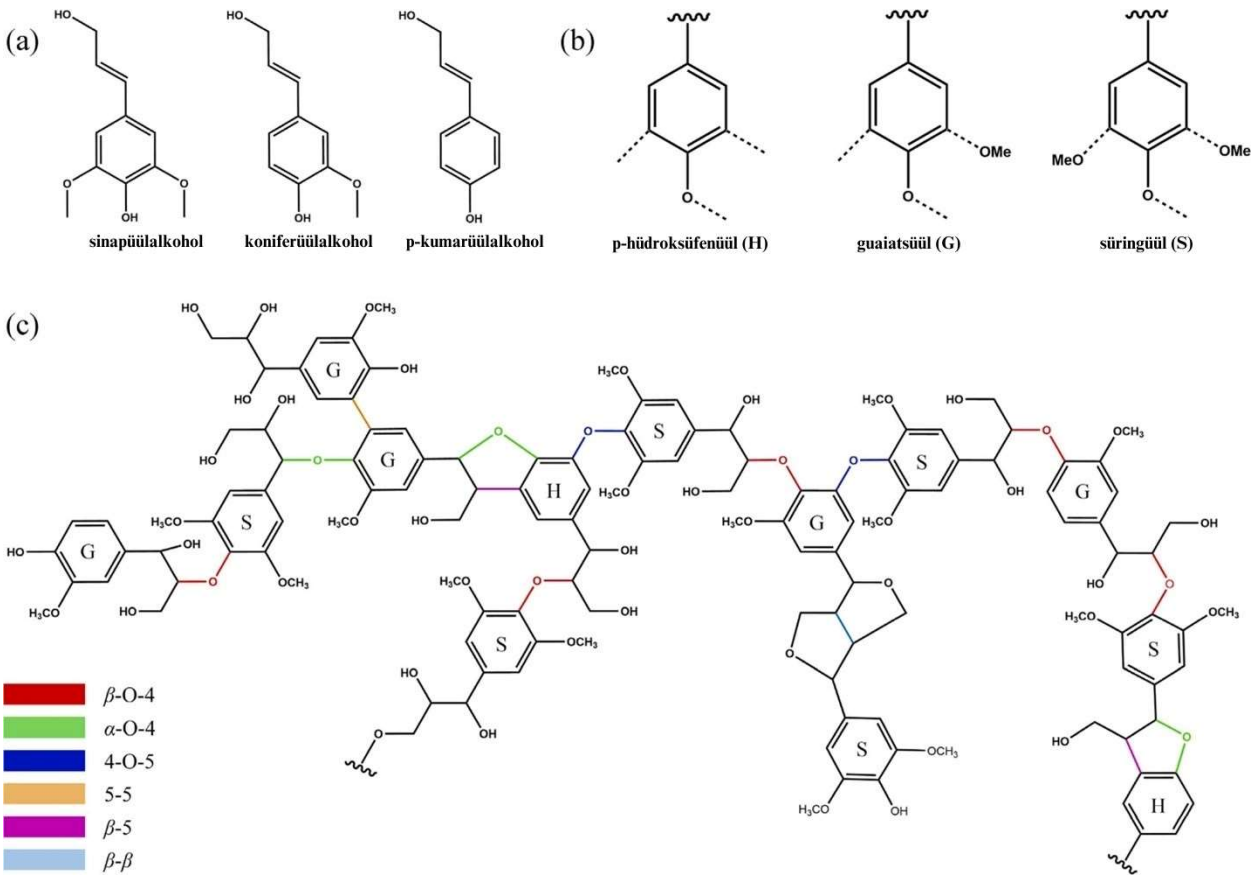
1.1 Taime sekundaarse rakukesta koostis

Taimerakku ümbritseb primaarne rakukest, mis osaleb turgorrõhu reguleerimisel ning raku morfoloogia määramisel. Selle peal asuv sekundaarne rakukest on tugev lignifitseerunud toes, mis võimaldab taime pikkuskasvu. Sekundaarse rakukesta moodustumise käigus käivitatakse erinevate polüsahhariidide süntees Golgi kompleksis ning nende transport raku pinnamaatriksisse. (Meents et al., 2018) Sekundaarse rakukesta peamised komponendid on tselluloos, hemitselluloos ja ligniin, mis interakteeruvad omavahel, mõjutades taime füsioloogilisi protsesse. (Terrett & Dupree, 2019) Kui tselluloos ja hemitselluloos on polümeerid, mida on võimalik depolümeriseerida vastavalt glükoosiks ja ksüloosiks, siis ligniin on palju keerukam molekul, mida on senini peamiselt kasutatud vaid soojusenergia tootmiseks. (Bugg, 2024)

1.2 Ligniini keemiline struktuur

Ligniin on heteropolümeer, mille biosünteesis osalevad monomeerid võivad omavahel moodustada erinevat tüüpi keemilisi sidemeid. Ligniini koostises esineb kolm erinevat fenoolset alkoholi: p-kumarüülalkohol, sinapüülalkohol ja koniferüülalkohol (Joonis 1a). Neile vastavad ligniini molekuli alaühikud ehk monolignoolid on p-hüdroksüfenüül (H-alaühik), süringüül (S-alaühik) ja guaiatsüül (G-alaühik) (Joonis 1b). (Zhao et al., 2022) Erinevate taimede biomassis esineb erineval määral vastavaid monomeere. Näiteks okaspuude ligniin koosneb peamiselt G-monomeeridest, lehtpuude ligniin S- ja G-alaühikutest ning rohttaimed sisaldavad võrdses mahus kõiki kolme monolignooli. (Bugg, 2024)

Ligniini keemilise keerukuse juures on lisaks kolmele erinevale monomeerile oluline tähelepanu pöörata ka monolignoolide vahel olevatele keemilistele sidemetele. Alloleval joonisel (Joonis 1c) on värvidega eristatud kovalentsed sidemed, mis monolignoolide vahel võivad tekkida. Tekkivaid sidemeid on kahte tüüpi: eetersidemed (C-O) ja süsinik-süsinik sidemed (C-C), millest mikroorganismidel on lihtsam lagundada eetersidemeid. (Atiwesh et al., 2022) Kõige levinum keemiline side ligniini molekulis on β-O-4-eeterside, mida leidub okaspuudes 43-50% ning lehtpuudes 50-65%. (Zhao et al., 2022) β-O-4-eetersideme esinemissagedus on korrelatsioonis madalmolekulaarsete ühendite tekkimisega ligniini lagunemisel, olles lignotsellulolüütiliste ensüümide peamiseks märklauaks. (Bugg, 2024)



Joonis 1. Ligniini koostises olevad alkoholi monomeerid (a), neile vastavad ligniini alaühikud ehk monolignoolid (b) ja nendevahelised võimalikud keemilised sidemed (c) (Zhao et al., 2022).

Mikroobne ligniini lagundamine toimub kahes etapis: esimeses faasis lõhutakse ligniini polümeerides enimlevinud β-O-4- eeterside lignotsellulolüütiliste ensüümide poolt. Teises faasis tekib monolignoolide modifitseerimisel palju erinevaid vaheühendeid, mis lõpuks konverteeritakse katehhooliks või protokatehhuaadiks. (Grgas et al., 2023) Ligniini G-alaühiku lagundamisel tekkiv esimene vaheühend on feruulhape, mis võib nelja erineva metaboolse raja kaudu laguneda vanilliinhappeks. Ligniini H-alaühiku lagunedes tekib esmalt p-kumaarhape, mis võib kolme erineva metaboolse raja läbi laguneda p-hüdroksübensoehappeks, mis edasi muundatakse protokatehhuaadiks. Ligniini S-alaühik on aromaatsele tuumale lisatud kahe metoksürühma tõttu raskesti lagundatav ning väga vähesed bakterid suudavad S-ligniini koostises olevat süringüülhapet metaboliseerida. Proteobakterite hõimkonda kuuluv *Sphingomonas* sp. SYK-6 suudab kolme alternatiivset rada kasutades süringüülhappest protokatehhuaati toota. (Z. Xu et al., 2019)

1.2.1 Lignotsellulolüütilises biomassis leiduvad suhkrud

Taime sekundaarses rakukestas olev tselluloos moodustab korrapärase mikrofiibritest struktuuri ning hemitselluloosi ja ligniini molekulid täidavad kiudude vahel olevat ruumi. Hemitselluloosi koostises on D-ksüloos, D-mannoos, D-glükoos, L-arabinoos, D-galaktosüül, D-galakturoonhape ja glükuroonhape, kuid suhkrute täpne vahekord sõltub taimeliigist, rakutüübist ja arengustaadiumist. (Rao et al., 2023) Hemitselluloosis leidub kõige rohkem ksülaani, mis koosneb β-1,4 glükosiidsidemetega ühendatud D-ksüloosijääkidest, mille kõrvalahelates võib leiduda L-arabinoosi, D-/L-galaktoosi või D-glükoosi. (Ebringerová et al., 2005)

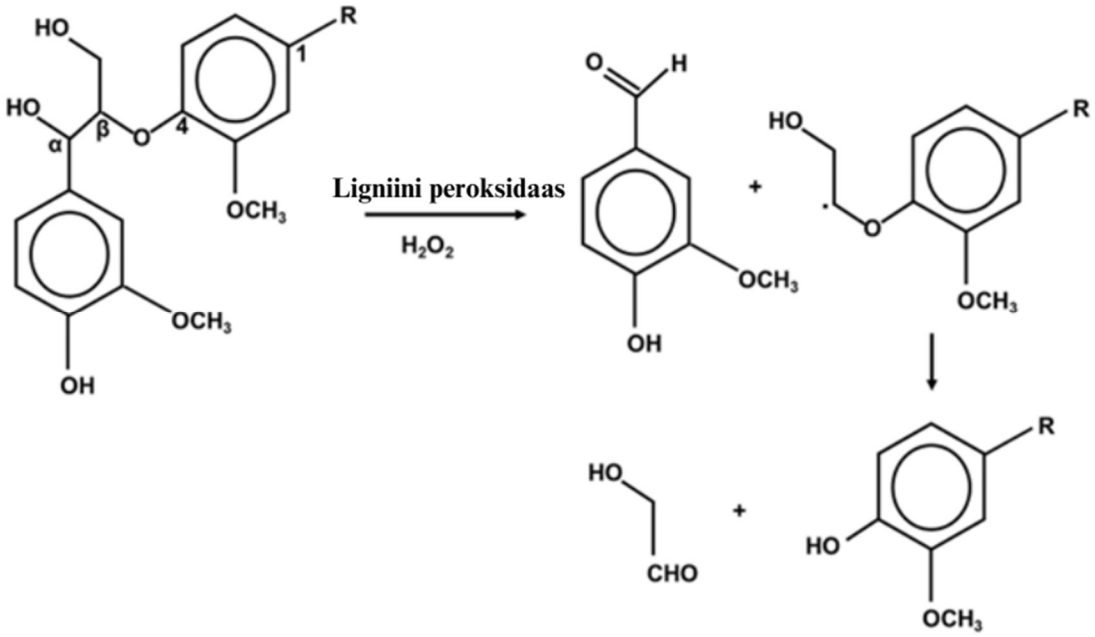
1.2.2 Lignotsellulolüütilised ensüümid

Ligniini depolümeerimise teeb mikroorganismidele keeruliseks mitu asjaolu. Lisaks monolignoolide vahelistele keerulistele keemilistele sidemetele on ligniini molekulid rakukestas põimunud ümber tselluloosi ja hemitselluloosi. Seega on mikroobidel keeruline ligniinis õige sidemeni jõuda ning nad peavad molekuli depolümeriseerimise esimeses faasis kasutama rakuväliseid lignotsellulolüütilisi ensüüme. (Bugg, 2024) Bakteritel ja seentel on kirjeldatud viit erinevat lignotsellulolüütilist ensüümi: ligniini peroksidaasi (LiP), mangaani peroksidaasi (MnP), multifunktsionaalset peroksidaasi (VP), pleegitava toimega peroksidaasi (DyP) ja lakaasi (LaC). Need ensüümid osalevad ligniini depolümeriseerimises ning lõhuvad monolignoolide vahelisi C-C ja C-O keemilisi sidemeid. Mikroobsel ligniini lagundamisel tekib esmalt p-kumarüülalkoholist (H) p-kumaarhape, sinapüülalkoholist (S) bensoehape ja koniferüülalkoholist (G) feruulhape. Edasi toimub tekkinud ühendite kõrvalahelate hüdroksüleerimine, demetülatsioon ja modifitseerimine. Lõpuks tekib neist vaheühenditest ligniini lagundamise lõppfaasis protokatehhuaat või katehhool, mis lagundadakse lõpulikult tsitraaditsüklis. (Grgas et al., 2023) Katehhooli ja protokatehhuaadi lagundamine algab aromaatse tuuma lagundamisest kas orto või meta raja kaudu, milleks kasutatakse dioksügenaase. (Becker & Wittmann, 2019) Orto raja kaudu toodetakse bakterites protokatehhuaadist ja katehhoolist *cis,cis*-mukonaati, millest sünteesitakse edasi β-ketoadipaati. Tekkinud ühend muundatakse vahereaktsioonides lõplikult atsetüül-CoA-ks ning metaboliseeritakse tsitraaditsüklis. (Weng et al., 2021)

<u>Ligniini peroksidaas</u>

Ligniini modifitseerivad ensüümid katalüüsivad ligniini molekuli lagunemist läbi redoksreaktsioonide. Üheks selliseks ensüümiks on ligniini peroksidaas, mis oksüdeerib ligniini

aromaatseid piirkondi. (Paul et al., 2023) Ligniini peroksidaas on rakuväline globulaarne glükoproteiin, mis koosneb umbes 343 aminohappejäägist ning vajab aktiveerumiseks vesinikperoksiidi. (Zhao et al., 2022) Ligniini peroksidaasi redokspotentsiaal on ~700–1400 mV ning optimaalne pH on 3,0-4,5. (Singh et al., 2021) Mitteaktiivne LiP sisaldab kolmevalentset rauaiooni ning vesinikperoksiidi lisandumisel keskkonda oksüdeerub LiP neljavalentse rauaiooniga vaheühendiks. Selline ühend oksüdeerib teisi substraate, mille tulemusel tekivad keskkonda vabad radikaalid. Joonisel 2 on näidatud ühte olulisematest LiPi poolt katalüüsitud oksüdatsioonireaktsioonidest, milleks on C_{α}-C_{β} sidemete lõhkumine ligniini molekuli aromaatsetes piirkondades. (Zhao et al., 2022)



Joonis 2. Ligniini peroksidaasi oksüdatsioonireaktsioonid. (Atiwesh et al., 2022)

Mangaani peroksidaas

Ligniini lagundamise algfaasis on oluline ensüüm mangaani peroksidaas, mille metalliioon mangaan on ligniini lagundamisel oksüdeerija. (Paul *et al*., 2023) Mangaani peroksidaas koosneb neljast heemi sisaldavast isoensüümist, mis on aktiveeritud Mn^{2+} oksüdeerumisel Mn^{3+}-iooniks. Aktiveerunud peroksidaas lagundab ligniini molekulis nii aromaatseid kui ka mittearomaatseid piirkondasid. (Atiwesh et al., 2022)

Lakaas

Lakaasid on taimedes, seentes, bakterites ja putukates leiduvad enamasti rakuväliselt eritatavad vaseioonidega oksüdaasid. Kuigi lakaasid varieeruvad molekulmassi ja struktuuri poolest, kasutavad nad enamasti oksüdeerimiseks nelja vaseiooniga klastreid, redutseerides molekulaarset hapnikku ning tootes kõrvalproduktina vett. Lakaasid on tööstuses laia kasutusega biokatalüsaatorid, mis ei vaja kofaktoreid ning ei tooda kõrvalproduktina mürgist vesinikperoksiidi. Tänu nendele omadustele on seda ensüümi kasutatud bioremediatsioonis tööstusliku reovee puhastamiseks ning samuti toiduainete-, keemia- ja ravimitööstuses. Ligniini depolümeriseerimiseks vajab lakaas lisanduvaid elektronikandjaid, mis liiguksid ligniini molekuli ja lakaasi aktiivsaidi vahel, näiteks lämmastiku aatomit või hüdroksüülrühma sisaldavaid aromaatseid ühendeid. Peamiselt on bakteriaalseid lakaase kirjeldatud *Actinomycetes* hõimkonna *Streptomyces* liikidel. (Gonzalo et al., 2016)

1.2.3 Tööstuslik ligniini eraldamine lignotselluloosist

Ligniini eraldatakse lignotselluloosist tööstuses kolme tehnoloogia abil: füüsikaliselt, keemiliselt ja bioloogiliselt. Füüsikalisel lagundamisel lõhutakse side ligniini ja tselluloosi/hemitselluloosi vahel, kasutades selleks ülerõhku ja kõrget temperatuuri. Lignotselluloosi molekuli mehaaniline lõhustamine sellistel tingimustel toodab kõrgekvaliteedilist ligniini, kuid on tööstuslikul skaalal energiamahukuse tõttu mittetulus meetod ligniini tootmiseks. Bioloogilisel meetodil eraldatakse ligniini lignotselluloosist mikroobide poolt toodetud ensüümidega, kuid praeguste tehnoloogiate juures on see protsess tööstuslikuks tootmiseks liiga aeglane ja madala efektiivsusega. Kolmas, kõige levinum meetod, on keemiline ligniini eraldamine, mis on kõrge tootlikkuse ja vähenõudlike reaktsioonitingimustega protsess. (Cao et al., 2018)

Tehniline ligniin on keemiliselt töödeldud ja tööstuses jääkainena eraldatud vees lahustunud ligniin. Aastal 1874 hakati kasutama sulfiite ligniini eraldamiseks ning kuni 1930ndateni oli see populaarseim ligniini eraldamise tehnoloogia. Puit kuumutati 140 – 170 kraadini sulfiitsooladega rikastatud vees, mille tulemusel sulfiitioonid hüdrolüüsisid ligniini molekulis olevaid eetersidemeid ja tekkis lignosulfaate sisaldav vesilahus. Alates 1930ndatest võeti kasutusele Krafti tehnoloogia, mille käigus kuumutatakse puitu NaOH ja Na_2S vesilahuses 155-175 kraadi juures. Protsessi käigus lõhustavad hüdroksiid- ja vesiniksulfiidioonid ligniini β-O-4 eetersidemeid ning tekib G-monolignoole sisaldav vesilahus. Kolmas võimalus tehnilise ligniini tootmiseks on

sarnane Krafti tehnoloogiale, kus kasutatakse eetersidemete lõhkumiseks 160 – 170 °C ja naatriumhüdroksiidi. Erinevalt Krafti tehnoloogiast, tekivad protsessi käigus nii G- kui ka S-monolignoolid ning kõrvalproduktidena võib tekkida ka ferulaate ja kumaraate.(Becker & Wittmann, 2019)

1.3 Ligniini lagundamine looduses

1.3.1 Seened

Ligniini lagundamise molekulaarseid mehhanisme on enim uuritud kandseente (*Basidiomycetes*) hõimkonnas. Puidu lagundamisel on kõige levinumad seeneliigid valgemädanik, pruunmädanik ning harvemini esinev pehmemädanik. (Bugg, 2024) Looduses esineb valgemädanikke rohkem lehtpuudel ning pruunmädanikke okaspuudel. (Janusz et al., 2017)

Valgemädanikseened suudavad lagundada tselluloosi ja hemitselluloosi ning ligniini, tootes ligniini lagundamiseks erinevaid rakuväliseid oksidoreduktaase: lakaase ja lignotsellulolüütilisi peroksidaase (LiP, MnP ja VP). Need kõrge redokspotentsiaaliga ensüümid avastati esmakordselt valgemädanikseenest *Phanerochaete chrysosporium*i ning praeguseks on leitud 16 erinevat geeni, mis selles seenes lignotsellulolüütilisi ensüüme kodeerivad. (Bugg, 2024) Ligniini peroksidaasi kodeerivaid geene on *P. chrysosporium*is 10 ning nende ekspressioon sõltub süsiniku, lämmastiku ja väävli kontsentratsioonist keskkonnas. Kõik isoensüümid reageerivad toitainevaegusele erinevalt, vajades *lip* geeni ekspressiooniks erinevaid lämmastiku ja süsiniku defitsiidist tulenevaid tingimusi. Näiteks *P. chrysosporium*i tüve BKM-F-1767 isoensüüm *lipA* ja *lipB* ekspresseeruvad lämmastiku- ja süsinikuvaeses keskkonnas, samas kui *lipD* vajab transkriptsiooniks vaid süsinikudefitsiiti. *P. chrysosporium*i mangaani peroksidaasi geenikspressioon on lisaks toitainevaegusele reguleeritud ka Mn^{2+} ioonide kontsentratsiooni, oksüdatiivse ja keemilise stressi ning kuumašoki poolt. Lakaasi geenide ekspressiooni valgemädanikes soodustavad keskkonnas olevad metalliioonid, aromaatsed ühendid (näiteks feruul- vanilliinhape ja katehhool) ja süsiniku- ja lämmastikuvarud. (Furukawa et al., 2014)

Pruunmädanikud on seened, mis lagundavad peamiselt tselluloosi ning selle protsessi käigus demetüleerivad ka ligniini. (Atiwesh et al., 2022) Pruunmädanik *Postia placenta* modifitseerib hüdroksüülradikaali tootes lignotselluloosi struktuuri ning metaboliseerib peamiselt tselluloosi ja hemitselluloosi. (Bugg, 2024) Pruunmädanikud toodavad ligniini molekuli ründava hüdroksüülradikaali Fentoni protsessis, mis kasutab oksüdeerijana vesinikperoksiidi ja

katalüsaatorina Fe^{2+}-iooni. Tselluloosi hüdrolüüsimisel ja ligniini osalisel oksüdeerumisel tekib pruun puitmass, mis on iseloomulik pruunmädanike elutegevusele. (Bugg et al., 2011)

Pehmemädanikud ei oma piisavalt suurt lignotsellulolüütilist aktiivsust, et neid valge- ja pruunmädanikega ligniini lagundamise osas võrrelda. Pehmemädanikud, mis suudavad ligniini lagundada, pärinevad peamiselt *Aspergillus*e perekonnast. (Atiwesh et al., 2022)

1.3.2 Bakterid

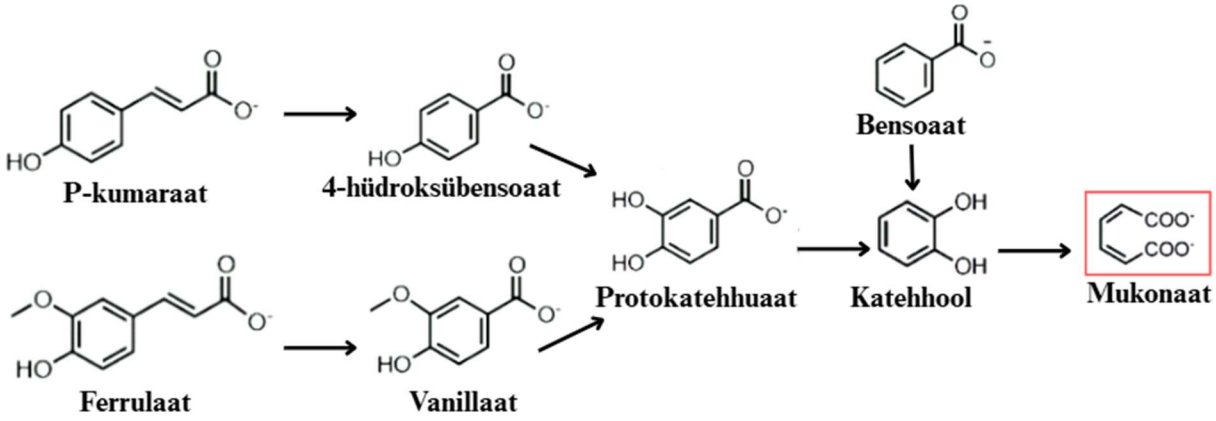
Lignotsellulolüütilisi baktereid on eraldatud mullast, kompostist, setetest, putukate seedetraktidest, loomadest ja reoveest. Bakterite bioloogiline mitmekesisus ja võimekus kasvada erineva pH, temperatuuri ja hapniku osakaaluga keskkondades annab neile ligniini lagundamisel seente ees eelise. (Grgas et al., 2023) Siiani uuritud bakterid metaboliseerivad erinevaid osasid ligniini polümeerist, kasutades selleks erinevaid lignotsellulolüütilisi ensüüme ja ainevahetuslikke radasid. Ligniini lagundavaid baktereid on hetkel teadaolevalt 89 liiki, millest 36 kuuluvad *Proteobacteria,* 28 *Firmicutese* ja 18 *Actinomycetota* hõimkonda. (Gu et al., 2024)

1.3.2.1 Proteobakterid

Pseudomonas putida on bakter, mida on juba 100 aastat võimeka lagundajana risosfääris uuritud ning viimasel kümnendil ka biotehnoloogiate arendamisel kasutatud. 1960. aastal mullaproovist isoleeritud *P. putida* tüvi mt-2 sisaldas tolueeni lagundavat plasmiidi pWW0, mis võimaldas bakteril kasvada aromaatsetel substraatidel nagu tolueen, m- ja p- ksüleen. Vastava plasmiidi eemaldamisel bakterist loodi *P. putida* tüvi KT2440, mis on tänu kõrgele vastupidavusele oksüdatiivse stressi suhtes võimeline lagundama toksiliste omadustega aromaatseid ühendeid. *P. putidale* omased biokeemilised ainevahetusrajad moodustavad bakteri *cis*-metabolismi, mida modifitseerides on võimalik toota soovitud looduslikke metaboliite nagu näiteks *cis,cis*-mukonaat, aminohappeid, terpenoide ja polüketiide. Sünteetlise bioloogia üks väljundeid on *P. putida trans*-metabolismi kasutamine, mis võimaldab olemasolevate ainevahetusradade kombineerimisel ja täiesti uute radade sünteesimisel toota fenooli, 4-hüdroksübensoehapet, halogeniide ja booriühendeid. (Nikel & Lorenzo, 2018)

Ligniini lagundamisel on olulisel kohal just *P. putida cis*-metabolism, läbi mille on võimalik aromaatseid ühendeid nii lagundada kui ka tekkivate vaheühendite kaudu ligniini väärindada. Biotehnoloogiliselt paljulubav ühend on *cis,cis*-mukonaat, millest saab sünteesida tarbeplastiku tootmiseks vajalikke kemikaale, asendamaks taastumatuid naftapõhiseid polümeere looduslike

alternatiividega. *Cis,cis*-mukonaat tekib aromaatsete molekulide lagundamisel katehhooliks, kui aromaatne tuum lõhustatakse katehhooli 1,2-dioksügenaasi poolt. Protsessis osalevate ensüümide modifitseerimise läbi on *cis,cis*-mukonaati võimalik toota ka protokatehhuaadist. Seeläbi kattuvad *cis,cis*-mukonaadi substraadid ligniini lagundamisel tekkivate vaheühenditega: 4-hüdroksübensoaadiga, p-kumaraadiga, vanillaadiga, ferullaadiga ja bensoaadiga. (Nikel & Lorenzo, 2018) Joonisel 3 on toodud mukonaadi tootmise skeem ning erinevad ligniini lagunemisel tekkivad vaheühendid, produktina tekkiv mukonaat eksisteerib erinevate isomeeridena, millest üks on *cis,cis*-mukonaat.



Joonis 3. Mukonaadi tootmine geneetiliselt modifitseeritud *P. putida* KT2440 tüves erinevates ligniini lagunemisel tekkivatest vaheühenditest. (Salvachúa et al., 2018)

Keskkonnas leiduv katehhool on elusorganismidele mürgine. *P. putida* KT2440 on läbi geneetilise modifikatsiooni suudetud muuta katehhooli suhtes tolerantsemaks. Tänu väiksemale tundlikkusele on KT2440 katehhooli kasutavate ainevahetusradade seas suurema tootlikkusega ning üldiselt laiema substraadikasutusega. (Nikel & Lorenzo, 2018) Lisaks *P. putida* KT2440 tüvele lagundavad ligniini näiteks ka *P. putida* A514 ja *P. putida* NX-1. *Enterobacteri* perekonnast suudavad peamiselt Krafti ligniini metaboliseerida *Enterobacter lignolyticus* SCF1, *E. aerogenes* ja *E. soil* sp. nov. (Lee et al., 2019)

1.3.2.2 Hõimkond *Firmicutes*

Bacillus perekonna bakterid on üldiselt mullast isoleeritud bakterid, mille hulka kuuluvad lignotsellulolüütilise aktiivsusega liigid *Bacillus sp., B. pumilus, B. arophaeus, B. ligniniphilus* ja *Paenibacillus glucanolyticus.* (Lee et al., 2019) *B. pumilus* ja *B. atrophaeus* kasutavad ligniini lagundamiseks nii rakusisest kui ka -välist lakaaasi. (Atiwesh et al., 2022)

1.3.2.3 Hõimkond *Actinomycetota*

Perekonnast *Rhodococcus* on ligniini lagundavad liigid näiteks *R. jostii* RHA1, *R. erythropolis, R. opacus* DSM1069 ja *R. opacus* PD630. (Lee et al., 2019) *R. opacus* PD630 on bakter, millel on erinevaid kataboolseid radasid lignotselluloosi biomassis leiduvate nii süsivesikute kui ka aromaatsete ühendite lagundamiseks. *R. opacus* suudab metaboliseerida mitmeid ligniini lagunemisel tekkivaid vaheühendeid (näiteks bensoaati, fenooli, vanilliinhapet) ning Kraft tehnoloogia abil toodetud tehnilist ligniini. Aromaatsete ühendite lagundamine algab substraadispetsiifilisest transpordist rakku, kus nad konverteeritakse vastavalt protokatehhuaadiks ja katehhooliks. Edasi toodetakse rakus β-ketoadipaadi raja kaudu protokatehhuaadist ja katehhoolist atsetüül-CoA-d, mis läheb kasutusse tsitraaditsüklis. *R. opacus rakkudes toimub* glükoosi lagundamine Entner–Doudoroffi rajas. (Anthony et al., 2019)

Perekonnas *Streptomyces* on lignotsellulolüütilist aktiivsust tuvastatud *Streptomyces viridosporus* T7A, *S. badius* ATCC 39117, *S. coelicolor* A3(2) ja *Amycolatopsis* sp. 75iv2 tüvedes. (Lee et al., 2019) *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 on efektiivne aromaatsete ühendite lagundaja ja *cis,cis*-mukonaadi tootja, kasutades selleks guaiatsüüli alaühikut ligniini molekulist. (Becker & Wittmann, 2019)

1.3.3 Looduslikud kooslused

Komposteerumine on bakterite ja seente poolt läbiviidav orgaanilise materjali lagundamine huumuseks. Selle protsessi käigus lagundavad mikroorganismid ligniini, polüsahhariidid ja lämmastikuühendid huumuseks, millega kaasneb süsihappegaasi, vee ja soojuse eraldumine. Ligniini lagundavad kompostimise käigus termofiilsed mikroseened ja aktinomütseedid. (Grgas et al., 2023) Ligniini depolümeriseerimisel on seened edukamad kui bakterid, tootes rakuväliseid lignotsellulolüütilisi ensüüme, mis ligniini polümeeri väiksemateks aromaatseteks ühenditeks lagundavad. Seejärel saavad bakterid tekkinud ühendeid erinevate ainevahetuslike radade läbi metaboliseerida. (Z. Xu et al., 2019)

1.4 Ligniini kasutusvõimalused biotehnoloogias

Puidutöötlemise jääkproduktina akumuleerub puidu biomassist kuni kolmandiku moodustav ligniin. (Liu et al., 2022) Praeguste tehnoloogiate juures on ligniini kasutegur madal, kuna 98% tekkinud massist läheb tööstuses põletamisse ning ainult 2% ligniinist depolümeriseeritakse vanilliini ja muude aromaatsete ühendite sünteesimiseks. Lisaks aromaatsete ühendite tootmisele

on arendamisel tehnoloogia ligniini rakendamiseks tööstusliku sorbendina. See meetod võimaldab ligniini abil tööstuslikku reovett puhastada ning keskkonnast õlireostusi ja raskemetalliioone eemaldada. (Atiwesh et al., 2022)

Rohetehnoloogiate arendamisel on üha enam hakatud uurima bioloogilist päritolu lignotsellulolüütilisi süsteeme, mis suudaksid keeruka heteropolümeerse ligniini lagundada lihtsamateks monomeerideks. Mikroobide poolt toodetud ensüümikomplekse kasutades saab rakuväliselt toota depolümeriseeritud ligniini monomeere, mida suudavad kindlad tööstuses kasutatavad mikroobid dissimileerida. Järgnevalt on vajalik kas uute lignotsellulolüütiliste bakteritüvede isoleerimine loodusest või olemasolevate tüvede geneetiline modifitseerimine selleks, et need suudaksid ligniini monomeere katabolismis kasutada. Kuna depolümeriseeritud ligniini molekulid on segu aromaatsetest ühenditest, mis mõjuvad bakterite metaboliitsele aktiivsusele sageli pärssivalt, on vajalik valitud tüvede geneetiline manipuleerimine bakterite kiiremaks kohanemiseks ligniini lagunemisel tekkivate vaheühenditega. (Liu *et al*., 2022)

Xu jt (2022) sõnul on eelnevalt kirjeldatud süsteemi abil võimalik ligniini mikroobsel teel väärindada. Osadel bakteritüvedel esineb metabolismiradasid, mis kasutavad aromaatseid ligniini monomeere polühüdroksüalkanoaadi (PHA) sünteesimiseks. PHA on bakteritele vajalik rakusisene süsinikuallikas ning energiareservuaar. Tööstuslikult on see huvipakkuv biolagunev ja hüdrofoobne materjal, millega saaks asendada naftapõhiseid plastikuid. Hetkel on leitud üksikud *Pseudomonas putida* tüved, mis lagundavad ensümaatiliselt ligniini ning toodavad aromaatsetest monomeeridest madalakvaliteetset PHA-d. Geenitehnoloogiline tulevikuvaade on isoleerida loodusest huvipakkuvate lignotsellulolüütiliste radadega bakteritüvesid ning uurida PHA-de akumuleerumise taset nende rakkudes. (Xu et al., 2022)

Ligniini depolümeriseerimisel tekkinud monolignoolid, guaiatsüül, süringüül ja p-hüdroksüfenüül, on biotehnoloogias huvipakkuvate polümeeride ja biomaterjalide sünteesimise alguspunktiks. Guiaiatsüülist ehk ligniini G-alaühikust on võimalik toota feruulhapet oksüdeerides või dekarboksüleerides vanilliini. Vanilliini kasutatakse laialt levinud maitseainena, taimede kasvuregulaatorina ja fungitsiidina. Vanilliini dehüdrogenaasi abil on võimalik toota vanilliinhapet, mis on oluline vaheühend protokatehhuaadi tekkeks. Looduslikud bakteritüved toodavad ligniinist vähesel hulgal vanilliini, kuid osad metaboolselt muundatud tüved nagu näiteks *P. putida* KT2440 suudavad 86% ulatuses feruulhappest vanilliini toota. (Gu et al., 2024)

Ligniini väärindamisel on üks olulisemaid ühendeid *cis,cis*-mukonaat, millest on võimalik toota tarbeplastiku koostises olevat adipiin- ja tereftaalhapet, mida tööstuses sünteesitakse naftapõhistest toorainetest. (Becker & Wittmann, 2019) *Cis,cis*-mukonaadi substraadiks on p-hüdroksüfenüül, mis tekib p-kumaarhappe ehk ligniini H-alaühiku lagunemisel. (Davis et al., 2016) Kuna bakterid toodavad β-ketoadipaadi raja kaudu *cis,cis*-mukonaati katehhoolist, mis on ligniini lagunemisel tekkiv mürgine keskne vaheühend, peavad bakterid olema metaboolselt modifitseeritud toksilist vaheühendit suurtes kogustes lagundama. Erinevad liigid, mille taluvust katehhooli suhtes on suurendatud, on näiteks *P. putida* KT2440, *Amycolatopsis* sp, *Corynebacterium glutamicum, Escherichia coli* ja *Sphingobium paucimobilis*. (Becker & Wittmann, 2019) Ligniini lagundamisel on võimalik *cis,cis*-mukonaadi tootmist rakkudes suurendada, blokeerides bakterites protokatehhuaadi rada ning suunates aromaatsete ühendite lagundamine katehhooli ratta. (Dikshit et al., 2020) Lisaks bakterite geneetilisele muundamisele on võimalik *cis,cis*-mukonaadi tootmist rakkudes suurendada ka strateegilise toitmissüsteemiga. Lisades lahusesse dooside kaupa glükoosi, suurendatakse rakkude ATP tootmist ning seeläbi väheneb katehhooli akumuleerumine. Üldiselt on lisasüsinikuallika kasutamine *cis,cis*-mukonaadi tootmisel rakkudes positiivse mõjuga, kuna võimaldab sarnaselt eelneva näitega vältida vaheühendite kuhjumist. Kokkuvõttes on ligniini lagunemisel tekkivaid toksilisi vaheühendeid võimalik toota tänu bakterite tolerantsuse suurendamisele geneetilise modifitseerimise läbi ning produkti tiitri maksimaalse koguse jälgimise ja analüüsimisega, et teha kindlaks selle mõju bakteri metabolismile. (Salvachúa et al., 2018)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud bakalaureusetöö eesmärk on uurida vee- ja mullaisolaatide võimekust metaboliseerida lignotselluloosi lagunemisel tekkivaid süsivesikuid, aromaatseid happeid ja vaheühendeid. Katsetes kogutud tulemuste põhjal on võimalik teha järeldusi lignotsellulolüütiliselt aktiivsete tüvede potentsiaalse kasutuse kohta biotehnoloogiate arendamisel. Lisaks substraadikasutuse uurimisele teostatakse kõigile isolaatidele fülogeneetiline analüüs.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Bakteritüvede isoleerimine

Bakteritüved isoleeriti Võhmas asuvast tarbe- ja iluaiast võetud proovidest R2A, 2,5 mM kontsentratsiooniga salitsülaadi ja fenooli minimaalsöötmetele tehtud väljakülvidest. Kokku eraldati ja puhastati 46 tüve, mis on ka deponeeritud CELMS-kollektsioonis. (https://eemb.ut.ee/celms/main_list.php)

Tüved on märgistatud koodidega, mille tähendused on järgnevad:

KI - ühe talve seisnud lehekompost
KII - kaks talve seisnud lehekompost
RTM - hiljuti rajatud tiigi vesi
RTV - stabiliseerunud ökosüsteemiga tiigivesi
P - fenooli (2,5 mM) minimaalsöötmelt isoleeritud tüved
S - salitsülaadi (2,5 mM) minimaalsöötmelt isoleeritud tüved

2.2.2 Biokeemilised testid tüvedega

Tüvede võimet metaboliseerida erinevaid hemitselluloosi lagunemisel tekkivaid suhkruid testiti süsivesikute kasutamise põhisöötmel toatemperatuuril. Söötmesse lisatud 1% glükoosi, sahharoosi, arabinoosi, galaktoosi või ksüloosi kasutamisel tekivad söötmesse happelised ühendid ning algselt pruunikaspunane sööde muutub kollaseks. (Heinaru *et al*., 2022)

Ligniini lagunemisel tekkivate vaheühendite kasutamist hinnati tüvede kasvu järgi kahe nädala jooksul toatemperatuuril vitamiine, anorgaanilisi soolasid ja ühte süsinikuallikat sisaldanud minimaalsöötmel, kuhu oli lisatud vastavaid ühendeid lõppkontsentratsiooniga 2 mM. Aromaatsetest hapetest testiti vanilliini, protokatehhuaati, p-hüdroksübensoehapet, kaneelhapet ja

p-kumaarhapet. Lisaks testiti kasvu ligniini lagunemisel tekkivatel aromaatseid vaheühendeid, salitsülaat, fenool ja bensoaat (lõppkontsentratsioon 2,5 mM) sisaldavatel minimaalsöötmetel.

Tselluloosi lagundamiseks vajaliku ensüümi tsellulaasi olemasolu tüvedes kontrolliti karboksümetüültselluloosi (CMC) tassil (0,4% CMC, 0,2% $NaNO_3$, 0,1% K_2HPO_4, 1,025% $MgSO_4x7H_2O$, 0,05% KCl, 0,02% peptoon, 1,7% agar). Rakke kasvatati toatemperatuuril 7 päeva ja 14 päeva. Tsellulaasse aktiivsuse tuvastamiseks ilmutati tassid vastava aja möödudes Lygoli lahusega, mis sisaldab joodi ja kaaliumjodiidi (5% I, 10% KI (Calissendorff & Falhammar, 2017)), positiivse testi korral tekkis kolooniate ümber valastunud ala. (Heinaru *et al*., 2022)

Tüvede võimekust tsellobioosi lagundada kontrolliti eskuliini söötmel. $\boldsymbol{\beta}$-1,4-glükosidaasse aktiivsuse korral reageerib vabanenud eskuletiin söötmes olevate rauaioonidega ning sööde muutub tumedaks ja ei fluorestseeru enam. (Heinaru *et al*., 2022)

Lisaks tselluloosile ja tsellubioosile testiti tüvede võimet lagundada taimedes leiduvat energiavaruainet tärklist. Tärklise hüdrolüütiline lagundamine toimub ensüümi amülaas toimel. Amülaasse aktiivsuse määramiseks kasvatati tüvesid 2 päeva tärklisetassidel (1% trüptoon, 1% pärmiekstrakt, 0,5% K_2HPO_4, 0,3% lahustuv tärklis, 1,5% agar) ning ilmutati Lygoli lahusega ja mõõdeti ära valastunud ala läbimõõt külvijoone ümber. (Heinaru *et al*., 2022) Tüvedel, mis toodavad amülaasi, on peale tassi ilmutamist näha külvijoone ümber valastunud ala, sest seal ei ole enam tärklist, millega joodilahus reageerida saaks. (Cheeptham & Lal, 2012)

Ligniini lagundamiseks vajaliku ensüümi lakaas olemasolu tüvedes testiti ligniini sisaldaval söötmel (toiteagar (0,3% lihaekstrakt, 0,5% peptoon, 1,5% agar), 0,9% NaCl, 0,5% ligniin (Fibenol; LIGNOVA™ Crude)). Positiivse tulemuse andnud tüvede korral muutus külvijälje ümber olev ala tumedaks.

2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon

16S rRNA geenijärjestuste amplifitseerimiseks teostati polümeraasi ahelreaktsioon. Reaktsioonisegu lõppmahuga 25 µl moodustas 1x PCR puhver [75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM $(NH4)_2SO_4$; 0,01% Tween 20]; 2,5 mM MgCl2; 0,2 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 10 pmol praimerid PCRI (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') ja Seq1 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'); rakulüsaat; 0,5 U Taq DNA polümeraas (Thermo Fisher Scientific) ja ddH_2O. Rakulüsaadi saamiseks kuumutati rakke 25 µl destilleeritud vees 15 minutit

96 °C. Pärast kuumutamist tsentrifuugiti rakususpensiooni minut aega 12 000 x g Eppendorf lauatsentrifuugiga “Mini Spin”. Reaktsioonisegu asetati PCRi masinasse (Eppendorf Mastercycler), kus teostati polümeraasi 35-tsükline ahelreaktsioon. Tsükli esimeses etapis toimub DNA kaksikahelate denatureerumine 95 °C juures minut aega, teises etapis seonduvad 45 sekundi jooksul 53 °C juures praimerid ning kolmandas etapis toimub 45 sekundiga 72 °C juures DNA süntees. Pärast 35 kordusega tsüklit toimub 10 minutit 72 °C juures lõppekstensioon.

2.2.4 Geelelektroforees

Polümeraasi ahelreaktsiooni käigus ampliftseeritud geenijärjestuste pikkust ning produkti puhtust kontrolliti geelelektroforeesiga. Selleks valmistati 0,8% agaroosgeel 1xTAE puhvrisse (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2), kuhu DNA visualiseerimiseks lisati ka etiidiumbromiidi (0,5 µg/ml). 5 µl proovi segati enne geelile kandmist 1 µl laadimispuhvriga (Thermo Fisher Scientific, Orange Loading dye, (6X)). PCR-i produktide suuruse hindamiseks kanti geelile 3,5 µl GeneRuler 1 kb plus DNA ladderit (Thermo Fisher Scientific). Erineva pikkusega geenifragmentide eraldumine toimus 100 V pingega 1x TAE puhvris 20 minuti jooksul. Pärast geelelektroforeesi lõppu visualiseeriti geel UV-valguslaual.

2.2.5 Sekveneerimine

Geelelektroforeesiga kontrollitud PCR-i produkte töödeldi enne sekveneerimist ensüümidega eksonukleaas I (ExoI; Thermo Fisher Scientific; lõppkontsentratsiooniga 0,36 U μl^{-1}) ja kreveti aluseline fosfataas (SAP; Thermo Fisher Scientific; lõppkontsentratsiooniga 0,14 U μl^{-1}) praimerite ja üksikute nukleotiidide eemaldamiseks. Ensüümidega töötlus toimus 15 minutit 37 °C juures ning ensüümid inaktiveeriti 80 °C juures 15 minutit. Seejärel PCR-i produkt sekveneeriti BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitiga (Applied Biosystems) vastavalt tootjapoolsele juhendile.

Sekveneerimisreaktsioon teostati PCR-i masinas 35 tsükliga. Tsükli esimeses etapis toimus 15 sekundi jooksul DNA ahelate denatureerumine 95 °C juures, teises etapis 10 sekundit praimerite seondumine 55 °C juures ja kolmandas etapis 45 sekundit DNA sünteesi 60 °C juures. Amplifitseeritud DNA sadestati, lisades proovile 2 µl dekstraani ja 30 µl külma 96% etanooli. Segatud proov asetati 15 minutiks -20 °C juurde, misjärel fuugiti proovi 15 minutit täispööretel +4 °C juures (Heraeus Biofuge Pico). Pärast fuugimist pesti sadestunud DNA-d 200 µl 70% etanooliga ning DNA võeti üles 10 µl formamiidis (100% formamiid). Geenifragmentide

nukleotiidne järjestus määrati täisautomaatse kapillaarsekvenaatoriga 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) Genoomika instituudi tuumiklaboris.

2.2.6 Sekveneeritud järjestuste analüüs

Sekveneeritud järjestuste analüüsimiseks kasutati programmi BioEdit (v7.7.1) ning sekventsidele vastavad referenstüved leiti BLAST otsingumootori abil (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Esmalt joondati sekveneerimisjärjestused koos referentstüvede järjestustega MUSCLE programmi kasutades ning seejärel koostati MEGA (v11.0.13) programmiga joondatud järjestustest fülogeneesipuu.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Tüvede isoleerimine ja identifitseerimine

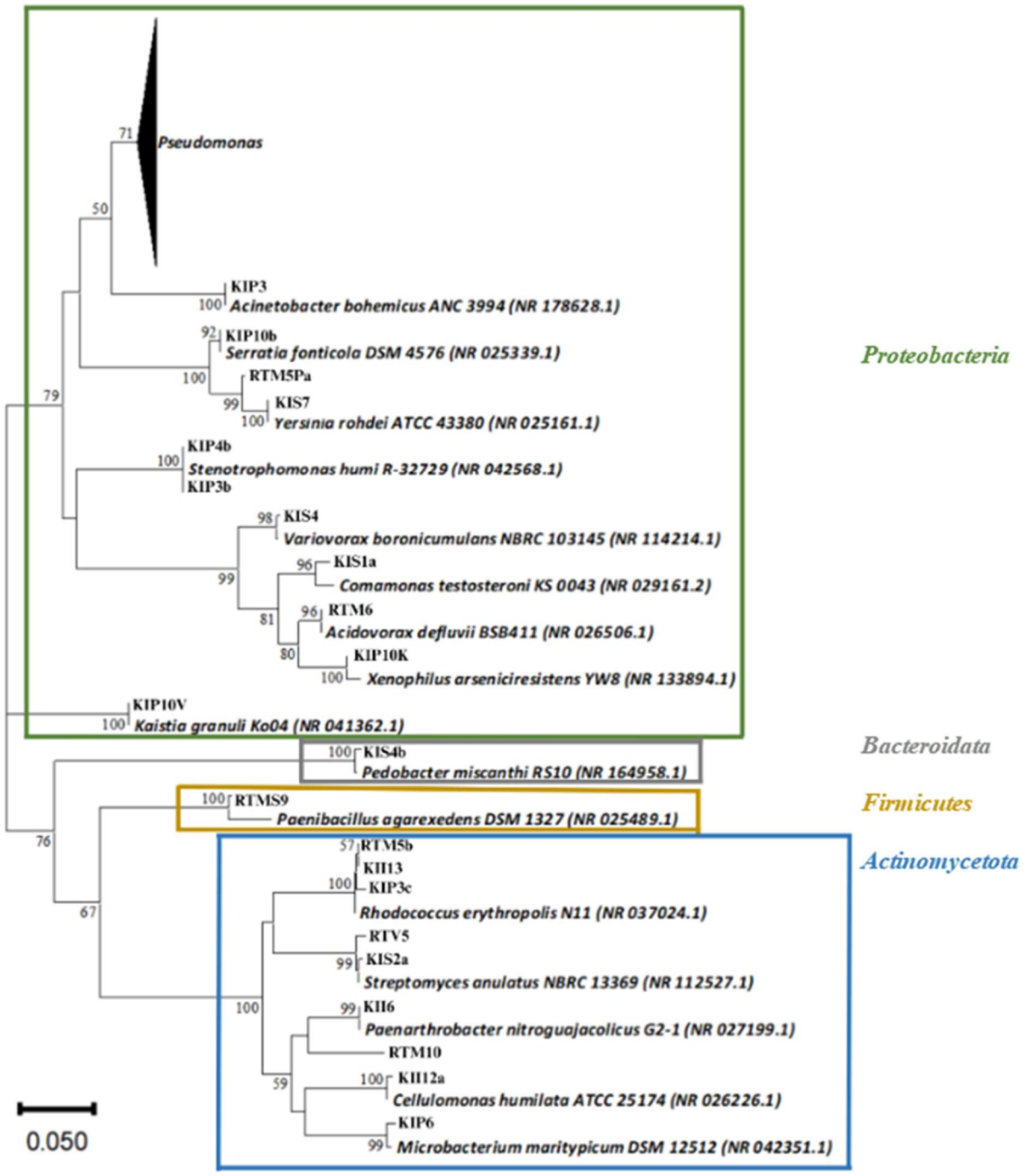
Käesolevas töös käsitletud bakteritüved on isoleeritud neljast erinevate ökoloogiliste kooslustega proovipunktidest. Isolaatide seast 17 on isoleeritud vesikeskkonnast, neist 11 pärinevad hiljuti rajatud tiigi veest (tüvekood RTM) ning 6 stabiliseerunud ökosüsteemiga tiigi veest (tüvekood RTV). Ülejäänud 28 tüve on isoleeritud erineva vanusega kompostist: 5 tüve kaks talve seisnud lehekompostist (tüvekood KII) ning 23 tüve ühe talve seisnud lehekompostist (tüvekood KI). Kogutud proovidest teostati tardsöötmele lahjenduskülv, et isoleerida bakterite puhaskultuure. Segakoloonia puhul külvati erineva välimusega kolooniad uutele söötmeplaatidele, kuni saavutati puhaskultuurid. Iga järgnev samast proovipunktist isoleeritud koloonia tähistati järjestikuste numbritega ning sarnase välimusega kolooniatele, mis andsid biokeemilistes ja füsioloogilistes tesitides erinevaid tulemusi, omastati lisaindeksina täht. Osasid tüvesid kasvatati söötmel, kuhu oli juurde lisatud salitsülaati või fenooli, nende tüvede koodnimes on sees vastavalt täht „S“ või „P“.

Bakteritüvede fülogeneetilisel analüüsil ilmnes, et 76% ehk 34 tüve kuulus *Proteobacteria* hõimkonda. Selle hõimkonna arvukaim perekond oli *Pseudomonas*, kuhu kuulus 23 tüve; lisaks olid esindatud perekonnad *Acinetobacter, Serratia, Yersinia, Stenotrophomonas, Variovorax, Comamonas, Acidovorax, Xenophilus* ja *Kaistia*. Hõimkonda *Actinomycetota* kuulus 20% ehk 9 tüve: 3 kuulusid perekonda *Rhodococcus*, 2 perekonda *Streptomyces*, 2 perekonda *Paenarthrobacter*, perekonnal *Cellulomonas* ja *Microbacterium* oli 1 esindaja. Hõimkonnast *Bacteroidota* isoleeriti 1 *Pedobacteri* perekonna liik. Samuti oli hõimkonnast *Firmicutes* vaid 1 isolaat, mis kuulus perekonda *Paenibacillus*. Kõik eelmainitud hõimkonnad ja perekonnad on toodud joonisel 4, *Pseudomonase* perekonna täpne fülogeneesipuu on toodud joonis 4 järjel.

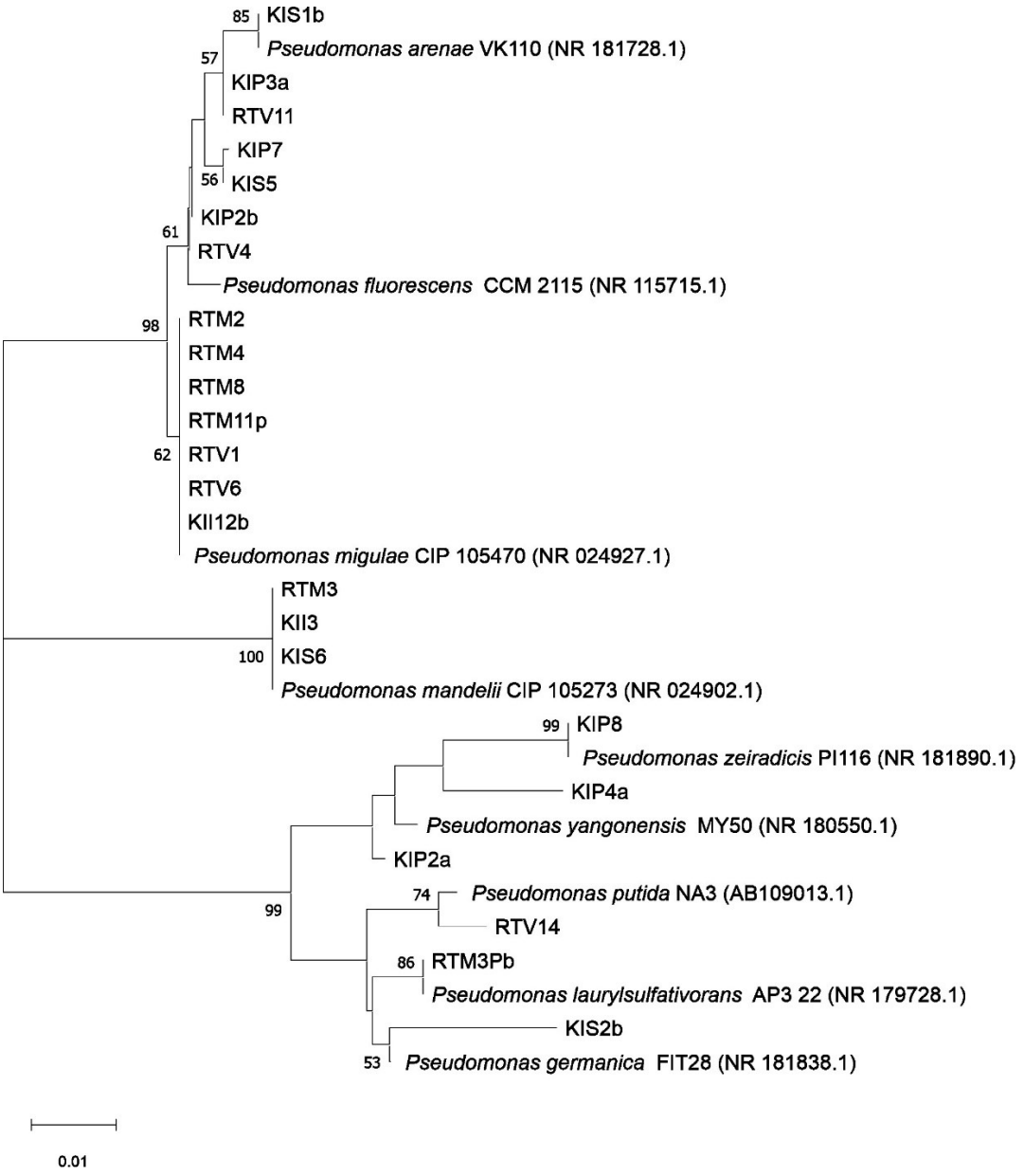
Erinevate proovipunktide tüvesid analüüsides selgub, et 78% ühe talve seisnud komposti liikidest kuulub *Proteobacteria* hõimkonda; 60% kaks talve seisnud komposti liikidest kuulub *Actinomycetota* hõimkonda. Komposti mikroobikooslus muutub ajas ning komposteerumise alguses on kõige arvukam hõimkond *Proteobacteria*, komposti vananedes *Proteobacteria* liikide osakaal väheneb ning suureneb hõimkonna *Actinomycetota* liikide arvukus. Kompostimise algstaadiumis hakkab keskkonna temperatuur tõusma, pH langema ning mikroobid lagundavad lihtsaid orgaanilisi ühendeid, aktiivsed on *Proteobacteria* liigid. Sellele järgneb termofiilne staadium, kus domineerivad *Firmicutese* ja *Actinomycetota* esindajad ning termofiilse staadiumi

lõpus on aktiivsed *Cellulomonase* perekonna liigid. Paljud tsellulolüütilised liigid ei jõuagi tselluloosi lagundamiseni, kuna ei suuda termofiilse faasi ajal kõrgel temperatuuril kasvada. Samuti on komposteerumise lõpufaasis komposti veeaktiivsus madal ning rakuvälised tsellulolüütilised ensüümid ei jõua märklauani. Kuna *Actinomycetota* liigid suudavad termofiilse faasi kõrge temperatuuri üle elada, aktiveeruvad nad just komposti vananemise etapis ning hakkavad aktiivselt tselluloosi metaboliseerima. (Danon et al., 2008)

2015. aastal valmis Elerin Toomiku poolt bakalaureusetöö, milles ta uuris kompostis sisalduvaid bakteritüvesid ning isoleeritud tüvede võimet lagundada lignotselluloosi. Toomik tuvastas fülogeneetilise analüüsi käigus samamoodi hõimkondade *Actinomycetota*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ja *Bacteroidetes* tüved kompostis. Toomiku uurimuses esines perekondade *Paenibacillus, Rhodococcus, Cellulomonas, Streptomyces, Microbacterium, Pedobacter* ja *Pseudomonas* liike. (Toomik, 2015) Need perekonnad on tüüpilised taimekompostis elavad mikroobid ning seeläbi juba paljudes teadustöödes uuritud. Selles töös esines perekondi, mille lignotsellulolüütiline aktiivsus ei ole nii põhjalikult kirjeldatud kui eelnevate perekondade puhul. Lignotsellulolüütilise aktiivsusega tüved esinesid perekondades *Serratia* ja *Xenophilus,* lignotselluloosi lagunemisel tekkivaid ühendeid ja suhkruid lagundasid aktiivselt perekonnad *Yersinia, Paenarthrobacter, Variovorax* ja *Kaistia.* Seega oleks edasiste uuringute käigus huvipakkuv just nende perekondade lignotsellulolüütilist aktiivsust lisanduvate biokeemiliste testitega uurida.



Joonis 4. Isolaatide 16S rRNA geenifragmendi järjestuste põhjal *neighbor-joining* meetodit (Saitou & Nei, 1987) kasutades koostatud fülogeneesipuu. (Saitou & Nei, 1987) Harude kõrval on toodud protsentväärtused, mis näitavad taksonite klasterdumist bootstrap-testis (1000 kordust), arvesse on võetud ainult väärtused üle 50%. (Felsenstein, 1985) Harude pikkused on proportsionaalsed evolutsiooniliste kaugustega, mis arvutati Tamura-Nei meetodi alusel (Tamura & Nei, 1993) ning väljendavad asenduste arvu nukleotiidi kohta. Saidisisese varieeruvuse modelleerimiseks kasutati gammajaotust (kuju parameeter=1). Analüüsis kasutati kokku 70 nukleotiidset järjestust ning joonduses säilitati ainult positsioonid, mille saidikattuvus oli vähemalt 95%. Lõplik andmestik sisaldas 316 joonduspositsiooni. Kõik evolutsioonilised analüüsid viidi läbi programmiga MEGA11. (Tamura et al., 2021)



Joonis 4 järg. Hõimkonda *Proteobacteria* kuuluva perekonna *Pseudomonas* esindajad.

Vesikeskkonna puhul tähelepanuväärset seaduspära tiigi vanuse ja bakteritüvede fülogeneetilise kuuluvuse vahel ei esinenud, 76% tüvedest kuulus sõltumata tiigi vanusest *Proteobacteria* hõimkonda. Võib oletada, et vesikeskkonna mikroobikoosluste lignotsellulolüütiliste omaduste uurimisel on oluline hinnata veekogu paiknemist maastikul ning lähedalasuvate taimede kaugust; sealhulgas vette jõudva taimemassi hulka. Lisaks tuleks kindlaks teha mõlema tiigi setete hulk, sealsed taime- ja loomaliigid ning potentsiaalsed toiduahelad, et hinnata bakterite osakaalu ja

tähtsust vastavas keskkonnas. Hiljuti rajatud tiigi ja stabiliseerunud ökosüsteemiga tiigi vahel ei täheldatud märkmisväärset erinevust, mõlemas keskkonnas domineeris hõimkond *Proteobacteria.*

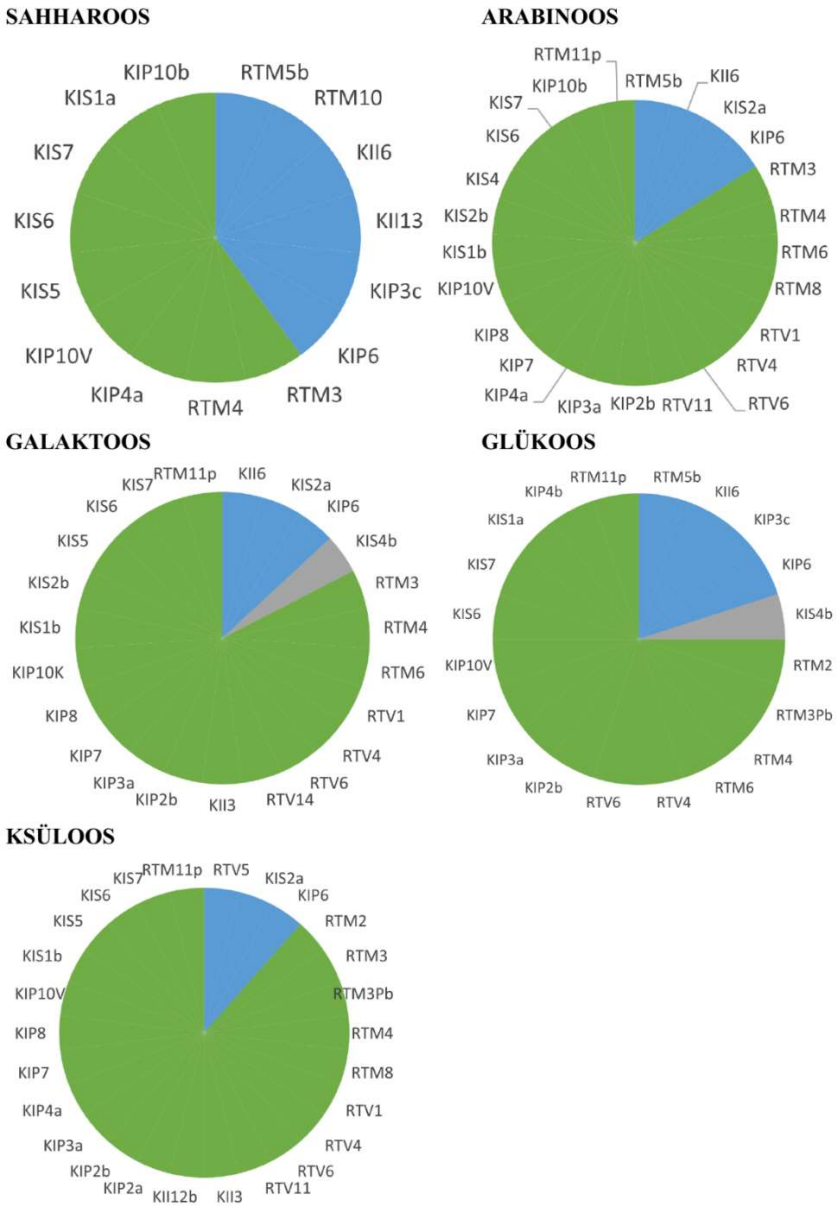
2.3.2 Isolaatide süsivesikute kasutus

Keskkonnast isoleeritud bakteritüvesid kasvatati glükoosi, sahharoosi, arabinoosi, galaktoosi ja ksüloosi sisaldavatel söötmetel, et tuvastada, milliseid tselluloosi ja hemitselluloosi lagunemisel tekkivaid suhkruid bakterid metaboliseerivad. Erinevate süsivesikute kasutamine on toodud joonisel 5, kus on märgitud ära ka bakteritüvede hõimkondlik kuuluvus.

Hõimkonnast *Proteobacteria* kasutasid energiaallikana sahharoosi 26% tüvedest, arabinoosi 62% tüvedest, galaktoosi 56% tüvedest, glükoosi 44% tüvedest ja ksüloosi 68% tüvedest. Tüved, mis kasvasid kõigil viiel substraadil, olid perekonnast *Pseudomonas* tüved RTM4 ja KIS6 ning perekonnast *Yersinia* tüvi KIS7.

Hõimkonnast *Actinomycetota* kasvasid sahharoosil 67% tüvedest, arabinoosil 44% tüvedest, galaktoosil 33% tüvedest, glükoosil 44% tüvedest ja ksüloosil 33% tüvedest. Kõigil viiel süsivesikul kasvas *Microbacterium* perekonda kuuluv tüvi KIP6. Hõimkonna *Bacteroidota* esindaja, *Pedobacteri* perekonda kuuluv tüvi KIS4b, metaboliseeris vaid galaktoosi ja glükoosi. *Streptomycese* perekonna tüved RTV5 ja KIS2a lagundasid ksüloosi ning KIS2a ka arabinoosi. Selle perekonna puhul on kirjanduses esile tõstetud teatud hemitsellulaassed ensüümid, mis võimaldavad bakteritel tarbida hemitselluloosist pärinevat ksüloosi ja arabinoosi. (Saini et al., 2015)

Edukas tselluloosi ja hemitselluloosi lagundaja on bakter *Cellulomonas fimi*, mis toodab tsellulaasi ensüümikomplekse ja hemitsellulaase. *Cellulomonase* liike on isoleeritud erinevatest looduskeskkondadest: kompostist, veest, pinnasest ning see eeldab ka erinevate suhkruallikate kasutamist ning lignotsellulolüütiliste ensüümide tootmist. (Saini et al., 2015) Käesolevas töös isoleeritud *Proteobacteria, Actinomycetota* ja *Bacteroidota* hõimkonna bakteritüved lagundavad edukalt samu süsivesikuid, millest võib järeldada, et neil on *Cellulomonas fimiga* sarnased ensüümikompleksid. Edasiste katsete käigus saaks uurida, kas looduses erinevaid süsivesikuid metaboliseerivad bakterid ja kõrge lignotsellulolüütilise aktiivsusega liigid on omavahel kommensialistlikus suhtes.



Joonis 5. Suhkrute (sahharoos, arabinoos, galaktoos, glükoos ja ksüloos) kasutamine. Sinisega on tähistatud hõimkonna *Actinomycetota*, halliga hõimkond *Bacteroidota* ja rohelisega hõimkond *Proteobacteria* esindajad.

2.3.3 Isolaatide aromaatsete ühendite kasutus

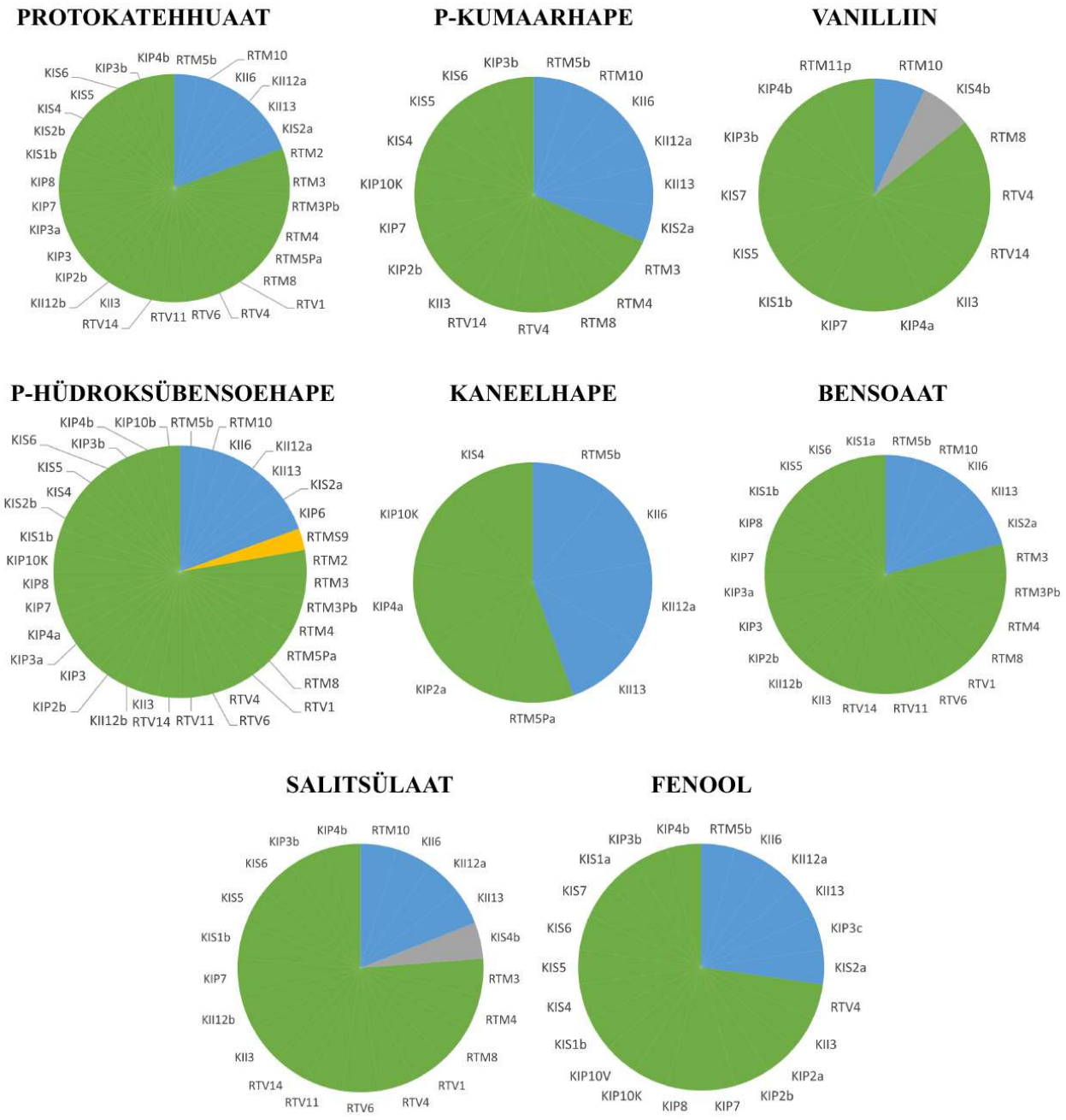
Ligniin on keerulise struktuuriga heteropolümeer, mille lagunemisel tekivad aromaatsed happed, vaheühendid ja monomeerid, mida osad keskkonnast isoleeritud bakterid metaboliseerivad. Käesolevas töös testiti tüvede kasvu ligniini lagunemisel tekkinud vaheühenditel vanilliinil, protokatehhuaadil, p-hüdroksübensoehappel, kaneelhappel, p-kumaarhappel, salitsülaadil,

fenoolil ja bensoaadil, katsete käigus saadud tulemused on esitatud joonisel 6. Vanilliini leidub ligniini G-alaühikus ning selle tootmise substraadiks on feruulhape. P-hüdroksübensoehape on oluline vaheühend ligniini H-alaühiku lagunemisel ning selle substraadiks on p-kumaarhape. (Gu et al., 2024) Protokatehhuaat on ligniini lagunemisel keskne vaheühend, mille edasine lagundamine proteobakterites on toodud kirjanduse ülevaate peatükis 1.3.3 joonisel 3. Kaneelhape, salitsülaat, fenool ja bensoaat on vaheühendid, mis lagundatakse bakterites keskseks vaheühendiks katehhooliks. (Reshmy et al., 2022)

Hõimkonna *Proteobacteria* liikidest 74% kasvasid protokatehhuaadil, 38% p-kumaarhappel, 82% p-hüdroksübensoehappel, 35% vanilliinil ja 15% kaneelhappel. Liigid, mis kasvasid vähemalt neljal aromaatsel happel, kuulusid perekondadesse *Pseudomonas* ja *Stenotrophomonas.* Hõimkonnas *Actinomycetota* oli 67% protokatehhuaati, 67% p-kumaarhapet, 78% p-hüdroksübensoehapet, 11% vanilliini ja 44% kaneelhapet lagundavaid tüvesid. Perekondade *Rhodococcus, Paenarthrobacter* ja *Cellulomonas* esindajad suutsid metaboliseerida vähemalt 4 aromaatset hapet. Hõimkonna *Bacteroidota* esindaja kasvas vanilliini sisaldaval söötmel ja hõimkonna *Firmicutes* esindaja p-hüdroksübensoehappel.

Hõimkonnas *Proteobacteria* kasvasid salitsülaadil ja fenoolil 47% tüvedest ning bensoaadil 56% tüvedest. Hõimkonnas *Actinomycetota* olid vastavad protsendid salitsülaadil 44%, fenoolil 67% ja bensoaadil 56%. Hõimkonna *Bacteroidota* esindaja kasvas salitsülaati sisaldaval söötmel.

Kõige suurem aktiivsus oli bakteritel ligniini H-alaühiku vaheühendite lagundamisel, mis tähendab, et lähtuvalt peatükis 1.4 kirjutatust on nendel tüvedel potentsiaal *cis,cis*-mukonaadi tootmiseks, mis on oluline ühend bioplastikute tootmisel. Seega oleksid kõiki kolme substraati-protokatehhuaati, p-kumaarhapet ja p-hüdroksübensohapet lagundanud bakterid perekondadest *Pseudomonas, Rhodococcus, Paenarthrobacter, Cellulomonas, Streptomyces, Variovorax ja Stenotrophomonas* edasi uurimiseks huvipakkuvad liigid. Uute katsete käigus saaks nende tüvede substraatide lagundamise aktiivsust ja olemasolevate ensüümikomplekside efektiivsust võrrelda näiteks *Pseudomonas putida* KT2440-ga, et tuvastada potentsiaalseid uusi lignotsellulolüütilisi baktereid, mida ligniinipõhisel bioplastiku tootmisel kasutada.



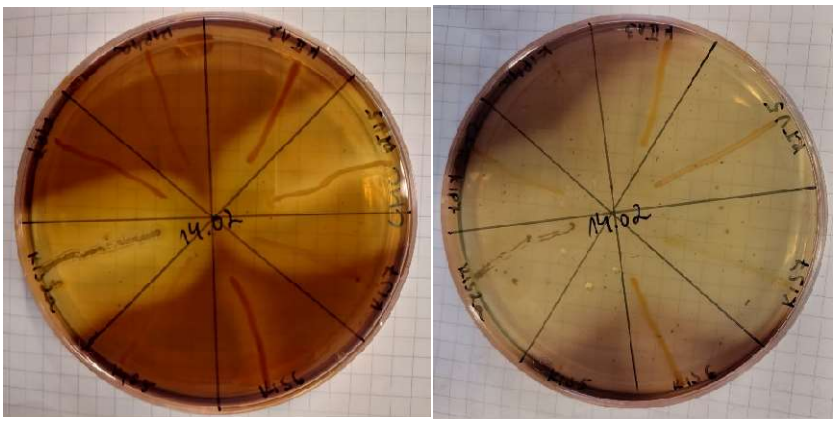
Joonis 6. Ligniini lagunemisel tekkinud aromaatsetel vaheühenditel ja hapetel kasvavad bakteritüved. Sinisega on tähistatud hõimkonna *Actinomycetota*, halliga hõimkond *Bacteroidota* ja rohelisega hõimkond *Proteobacteria* esindajad.

2.3.4 Isolaatide lignotsellulolüütiline aktiivsus

Kõikide isolaatide puhul testiti ensüümide tsellulaas, amülaas, β-1,4-glükosidaas ja lakaas aktiivsust. Tsellulaasi abil lagundavad bakterid tselluloosi, β-1,4-glükosidaasi abil tsellobioosi, amülaasi abil tärklist ja lakaasi abil ligniini.

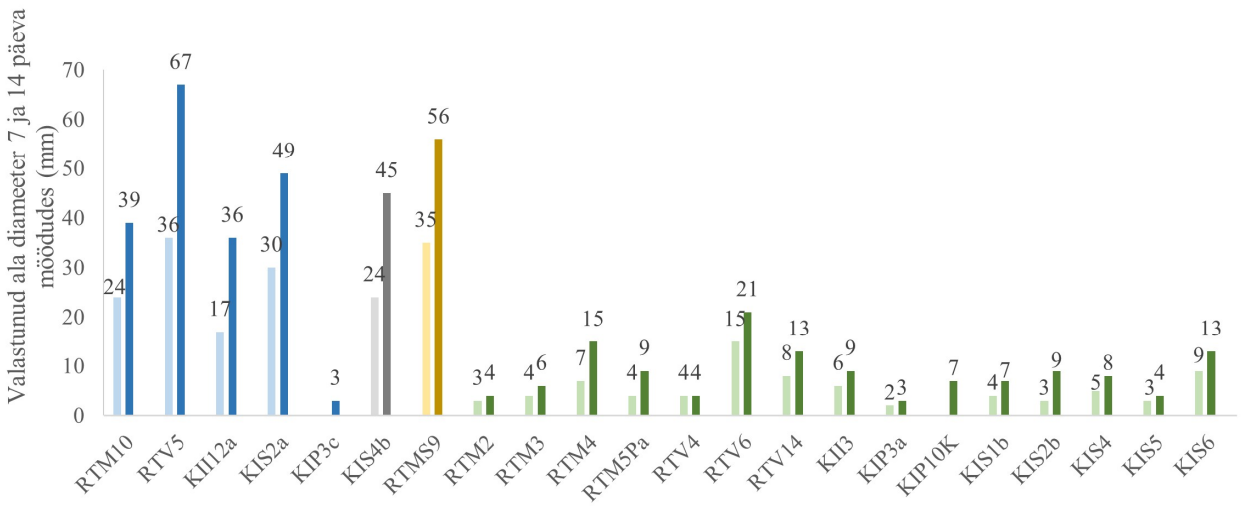
2.3.4.1 Tsellulaas

Tüvede tsellulaasset aktiivsust testiti karboksümetüültselluloosi (CMC) tassidel, kasvatades rakke vastavalt 7 ja 14 päeva. Pärast kasvu toatemperatuuril ilmutati tassid Lygoli lahusega ning näide positiivse tulemuse andnud tüvedest on toodud joonisel 7. Söötmeplaatidel on selgelt näha valastunud ala külvijoone ümber, mis viitab tüvede tsellulaassele aktiivsusele; valastunud alade diameeterid mõõdeti millimeetrites nii 7 kui ka 14 päeva möödudes.



Joonis 7. Lygoli lahusega ilmutatud CMC söötmeplaadid, kus rakud on kasvanud 7 (vasakul) või 14 (paremal) päeva. Fotod: erakogu.

Hõimkonnas *Actinomycetota* esines 56% tüvedest tsellulaasset aktiivsust ning joonisel 7 on näha kahe kõige edukama tüve, *Streptomycese* perekonda kuuluvate RTV5 ja KIS2a ümber tekkinud valastunud alad. *Firmicutese* hõimkonna ainuke esindaja, *Paenibacilluse* perekonda kuuluv RTMS9 ja *Bacteroidota* hõimkonna esindaja, *Pedobacteri* perekonda kuuluv KIS4b olid samuti kõrge tsellulaasse aktiivsusega. *Proteobacteria* hõimkonnas oli tsellulaasne aktiivsus võrreldes teiste hõimkondadega madalam, kuid siiski 44% isolaatidest suutis karboksümetüültselluloosi mingil määral lagundada. Kõikide tsellulaasi tootnud tüvede valastunud alade läbimõõt sentimeetrites on esitatud joonisel 8.



Joonis 8. Tsellulaasse aktiivsusega tüvede valastunud alade diameetrid (mm) CMC tassidel mõõdetuna 7. (heledam värv) ning 14. (tumedam värv) päeval. Sinisega on tähistatud hõimkonda *Actinomycetota*, halliga *Bacteroidota*, kollasega *Firmicutes* ja rohelisega *Proteobacteria* kuuluvad tüved.

Keskkonnast isoleeritud bakterite tsellulaasse aktiivsuse uurimine on oluline tselluloosi tööstusliku lagundamise arendamisel. Tööstuses enimkasutatud tsellulaas pärineb seenelt *Trichoderma reesei*, mille ensüümikompleksis sisalduvad endotsellulaasid, eksotsellulaasid ja β-glükosidaasid. (Merino & Cherry, 2007) Kirjanduse ülevaate peatükis 1.3.2 on toodud välja bakterite kasutamise eelised biotehnoloogias seente ees. Sarnaselt ligniini lagundamisele on ka tselluloosi puhul bakterite kasutamine ensüümide tööstuslikus tootmises kasumlikum, kuna bakterid kasvavad kiiremini kui seened, on geneetiliselt modifitseeritavad ja taluvad paremini tööstuses esinevaid ekstreemseid tingimusi nagu kõrge temperatuur ja varieeruv pH. (Maki et al., 2009)

Firmicutese hõimkonda kuulub mitmeid keskkonnast isoleeritud baktereid, mis suudavad ekstreemsetes tingimustes tsellulaasi toota. Üks selline liik on *Bacillus subtilis* DR, mis isoleeriti kuumaveeallikast ning on võimeline tootma termostabiilset endotsellulaasi, mis säilitab 70% ensümaatilisest aktiivsusest ka 75 °C juures. Sigade väljaheidetest isoleeritud *Brevibacillus sp.* JXL toodab termostabiilseid tsellulolüütilisi ensüüme, mis säilitavad 50% ulatuses ensümatilise aktiivsuse ka pärast 1-tunnist kuumutamist 100 °C juures. Käesolevas töös käsitletud *Firmicutese* hõimkonda kuuluv tüvi RTMS9 kuulub samasse perekonda *Paenibacillus campinasensis* BL11-*ga*, mis on isoleeritud ligniini tööstuslikul lagundamisel tekkinud väga aluselisest keskkonnast

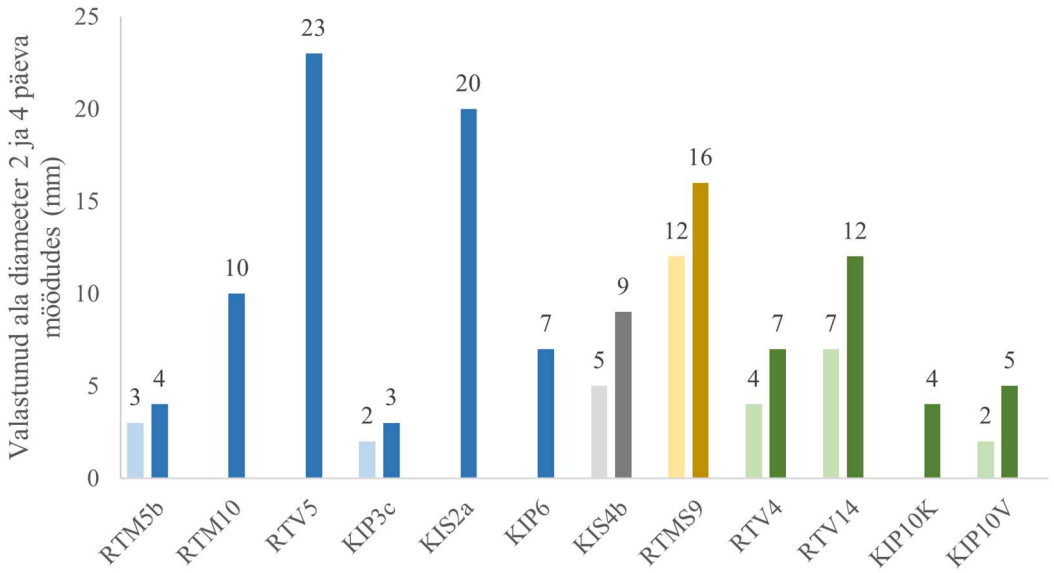
ning toodab mitmeid lignotselluloosi lagundamiseks vajalikke ensüüme, kaasa arvatud tsellulaasi. (Maki et al., 2009) *Actinomycetota* hõimkonda kuuluvad mullast, lehekõdust ja huumusest isoleeritud *Cellulomonase* liigid. Tüvega KII12a samasse perekonda kuuluvad liigid *Cellulomonas fimi, C. uda* ja *C. flavigena* toodavad palju erinevaid endo- ja eksotsellulaase. (Doi, 2008)

2.3.4.2 Amülaas

Tüvede amülaasset aktiivsust testiti tärklist sisaldaval söötmeplaatidel, mis ilmutati pärast 2-päevast kasvu Lygoli lahusega. Joonisel 9 toodud tärklisetassil on amülaasi tootvate tüvede külvijoone ümber tekkinud valastunud ala, mille diameeter mõõdeti millimeetrites.

Joonis 9. Lygoli lahusega ilmutatud tärklisetass pärast kahepäevast kasvu. Foto: erakogu.

Hõimkonnast *Actinomycetota* tootsid amülaasi 6 tüve ehk 67% kogu hõimkonna esindajatest ning neljal neist tüvedest esines ka tsellulaasne aktiivsus. Tselluloosi lagundamisel kõige aktiivsemad tüved, *Streptomycese* perekonda kuuluvad RTV5 ja KIS2a, olid ka tärklisetassidel kõige suurema ensümaatilise aktiivsusega. Hõimkonnast *Proteobacteria* tootsid amülaasi 4 tüve ehk 12% kogu hõimkonna esindajatest ning 3 nendest tüvedest tootsid ka tsellulaasi. Hõimkonna *Firmicutes* tüvel RTMS9 ja hõimkonna *Bacteroidota* tüvel KIS4b esines samuti amülaasne aktiivsus, ühtlasi tootsid nad ka tsellulaasi. Kõik amülaasi tootnud tüved on märgitud ära joonisel 10.



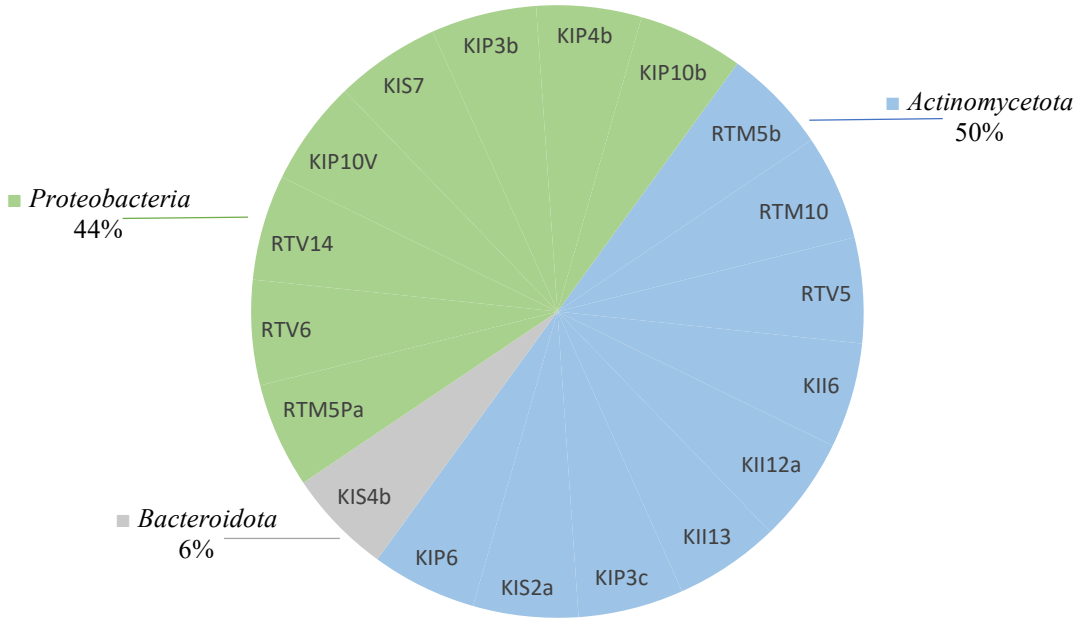
Joonis 10. Amülaasse aktiivsusega tüvede valastunud alade diameetrid (mm) tärklisetassidel mõõdetuna 2. (heledam värv) ning 4. (tumedam värv) päeval. Sinisega on tähistatud hõimkonda *Actinomycetota*, halliga *Bacteroidota*, kollasega *Firmicutes* ja rohelisega *Proteobacteria* kuuluvad tüved.

Tööstuses kasutatakse tärklises olevate α-1,4-glükosiidsidemete lõhustamiseks bakterite ja seente poolt toodetud amülaase. Bakterite perekonnad, kuhu kuuluvad kõrge amülaasse aktiivsusega tüved, on *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* ja *Streptomyces*. (Nimisha et al., 2019) Perekonna *Streptomyces* tüved RTV5 ja KIS2a ja perekonna *Pseudomonas* tüved RTV4 ja RTV14 osutusid varasemaid teadusartiklites kajastatud tulemusi kinnitades ka selles töös aktiivseteks amülaasi tootjateks. Tärklis ja tselluloos on glükoosimolekulidest koosnevad polüsahhariidid, mis on seotud erinevate glükosiidsidemetega. Need bakteritüved, mis toodavad mõlemat ensüümi, on paremini kohastunud keskkonnas leiduvaid taimseid süsinikuallikaid metaboliseerima. Tüved, mis toodavad nii tsellulaasi kui ka amülaasi, isoleeriti hiljuti rajatud tiigi veest ning ühe talve seisnud lehekompostist, millest võib järeldada, et bakterid lagundasid nendes keskkondades pigem lihtsamini lagundatavat tselluloosi ja tärklist kui ligniini.

2.3.4.3 ***β*-1,4-glükosidaas**

Disahhariid tsellobioos tekib tselluloosi lagundamisel ensüümi tsellulaas abil. Tsellobioos koosneb kahest ***β***-1,4-glükosiidsidemega seotud glükoosimolekulist ning isolaatide võimekust ***β***-1,4-glükosiidsidet lagundada testiti eskuliini sisaldaval söötmetassil. Isoleeritud bakteritüvedest

positiivse tulemuse andsid 40% ehk 18 tüve, mille jaotumine erinevatesse hõimkondadesse koos tüvekoodidega on esitatud joonisel 11.



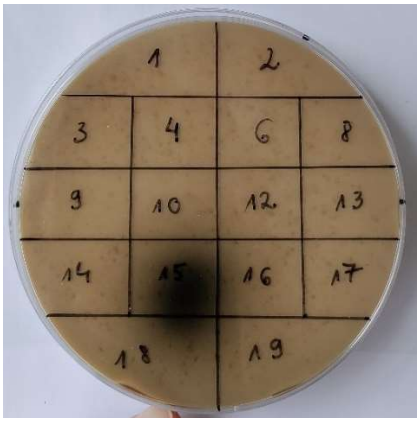
Joonis 11. ***β***-1,4-glükosidaasse aktiivsusega tüved. Sinisega on tähistatud hõimkonna *Actinomycetota* esindajad, halliga hõimkond *Bacteroidota* ja rohelisega hõimkond *Proteobacteria.*

Tsellulaasi ensüümikompleksis on mitmeid sünergilisi ensüüme, mis lõhustavad tselluloosi erineva suurustega oligosahhariidideks, millest üks on kahe glükoosimolekuliga tsellobioos. (Zang et al., 2018) ***β***-1,4-glükosidaas on tselluloosi lagundamisel üks võtmeensüüme, kuna keskkonnas akumuleeruv tsellobioos inhibeerib tsellulaassete ensüümide aktiivsust. (Shokrkar & Ebrahimi, 2018) Hõimkonna *Actinomycetota* tüved RTM10, RTV5, KII12a, KIS2a, KIP3c; hõimkonna *Bacteroidota* tüvi KIS4b ja hõimkonna *Proteobacteria* tüved RTM5Pa, RTV6 ja RTV14 tootsid lisaks ***β***-1,4-glükosidaasile ka tsellulaasi. Edasiste katsete käigus võiks keemiliselt analüüsida nende tüvede, mis tootsid mõlemat ensüümi, tselluloosi ja tsellobioosi lagundamise kiirust. Biotehnoloogias on tselluloosi lagundamisel juba eelmainituna lagundamise inhibiitoriks ***β***-1,4-glükosidaas, mida peab reaktsioonisegudesse eraldi juurde lisama. Ensümaatilise aktiivsuse taseme järgi saaks hinnata nende tüvede võimekust tselluloosi tööstuslikes tingimustes lagundada ning võrrelda neid hetkel tselluloosi lagundamiseks kasutatavate liikidega.

2.3.4.4 Lakaas

Lakaas on ensüüm, mida bakterid ja seened toodavad ligniini lagundamiseks. Lakaasi tootmist kodeerivaid geene on kõige rohkem leitud bakteritel perekondadest *Streptomyces, Bacillus* ja

Pseudomonas. (Gu et al., 2024) Käesolevas töös detekteeriti lakaasne aktiivsus 4 tüvel: *Pseudomonas* perekonnast RTV14 ja RTM11p, *Xenophilus* perekonnast KIP10K ja *Serratia* perekonnast KIP10b. Positiivse tulemuse andnud tüvede külvijoone ümber moodustus tume ala, mille näidis on näha joonisel 12.



Joonis 12. Lakaasse aktiivsuse testimine ligniini sisaldaval söötmel. Positiivse tulemuse korral värvub sööde biomassi ümber tumedaks. Foto: erakogu.

Pseudomonas perekonna tüvi RTV14 tootis kõiki testitud ensüüme ning metaboliseeris kõiki ligniini lagunemisel tekkivaid aromaatseid vaheühendeid peale kaneelhappe ja fenooli. Lisaks näitas tüvi proovikatses tugevat kasvu ligniini sisaldavas vedelsöötmes, millest võib järeldada, et sellel tüvel on lisaks lakaasile erinevad ensüümikompleksid, mille abil ligniini ja selle vaheühendeid lagundada. Lakaasi tootmine näitab bakterite võimekust ligniini lagundada, kuid selle ensüümi olemasolust bakteris ainuüksi ei piisa, et mõista, milliseid ligniini osasid bakter kasutab ning kui suur tähtsus on tselluloosi ja hemitselluloosi komponentidel bakteri metabolismis. Käesolevas töös on selle jaoks teostatud lisanduvad biokeemilised testid erinevate süsinikuallikate ja aromaatsete ühendite testimiseks, kuid kõige täpsema tulemuse selle kohta, millist osa bakter ligniinist kasutab, saab spektrofotomeetrilise analüüsi käigus. Nelja lakaasi tootnud tüve puhul tuleks teostada edasiste uuringute käigus vaheühendite kasutamise kohta täpne keemiline analüüs, et kaardistada tüvedel esinevad ensüümikompleksid ja potentsiaalne tüve kasutusvõimalus biotehnoogias.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös isoleeriti kahest erineva vanusega tiigist ning lehekompostist kokku 46 bakteritüve, mis kuulusid hõimkondadesse *Actinomycetota, Bacteroidota, Firmicutes ja Proteobacteria.* Analüüsi käigus selgus, et erineva vanusega lehekomposti bakterikooslustes domineerivad erinevad hõimkonnad – üheaastases kompostis oli 78% *Proteobacteria* ja kaheaastases kompostis 60% *Actinomycetota* kuuluvaid tüvesid. Kui tüvede puhul testiti kasvu tselluloosi ja hemitselluloosi lagunemisel tekkivatel süsivesikutel, olid kõige arvukamad üheaastasest kompostist ja hiljuti rajatud tiigist isoleeritud tüved. Sama tulemuse andis ka ensüümide tsellulaas ja amülaas aktiivsuse testimine. Sellest võib järeldada, et üheaastases kompostis leidub rohkem baktereid, mis lagundavad lignotselluloosist tselluloosi ja hemitselluloosi komponenete ning ligniini lagundavad bakterid on arvukamad stabiliseerunud looduskeskkonnas.

Ligniini lagunemisel tekkivate vaheühendite testimisel selgus, et lisaks kaheaastasest kompostist ja stabiliseerunud ökosüsteemiga tiigist isoleeritud tüvedele leidus ka üheaastasest kompostist ja tiigiveest pärit tüvesid, mis lagundasid aktiivselt erinevaid vaheühendeid. Kõige enam lagundasid bakterid protokatehhuaati, p-kumaarhapet ja p-hüdroksübensoehapet, mis tekivad ligniini H-alaühiku lagunemisel. Kuigi ligniin on äärmiselt mitmekülgsete kasutusvõimalustega heteropolümeer, on siiani üks suurimaid biotehnoloogilisi väljavaateid olnud bioplastiku tootmine *cis,cis*-mukonaadist, mille substraadiks on protokatehhuaat. Selles töös isoleeritud tüvi RTV14, millele lähim leitud referentstüvi oli *Pseudomonas putida* NA3, oli kõige aktiivsem lignotsellulolüütiline tüvi, mis tootis lakaasi, lagundas ligniini vaheühendeid ning tootis tselluloosi ja hemitselluloosi lagundamiseks vajalikke ensüüme. Edasiste uuringute käigus saaks testida lisaks lakaasile teiste ligniini lagundamisel oluliste ensüümide olemasolu tüves ning teostada tüvele RTV14 spektrofotomeetriline analüüs, et teha keemiliselt kindlaks selle tüve ligniini vaheühendite kasutus.

Käesoleva töö eesmärk oli tuvastada ligniini ja selle vaheühendeid metaboliseerivaid baktereid, mida biotehnoloogias kasutada. Isoleeritud tüvedest metaboliseerivad kõige aktiivsemalt ligniini *Pseudomonas, Rhodococcus, Paenarthrobacter, Cellulomonas*, *Streptomyces* ja *Stenotrophomonas* perekondade esindajad.

Isolating lignocellulolytic bacteria from environmental samples

Tuuli Annok

Summary

Lignocellulose is a biomass consisting of cellulose, hemicellulose and lignin, of which only cellulose and hemicellulose are efficiently used in industrial applications. Lignin, the byproduct, is mainly burned to produce thermal energy as there are currently no economically viable methods of decomposing the complex lignin molecule. The complexity of lignin is apparent in the varying structure of its biopolymer. Lignin is mainly composed of three subunits - G-, H- and S-, which are interconnected mostly by β-O-4- ether bonds. The depolymerization of lignin allows us to refine the monomers obtained and utilize bacteria to produce commercially sought-after bioplastic instead of petroleum-based plastic. Microbially-produced lignocellulolytic enzymes are mainly used in such technologies.

This thesis aims to research the capabilities of water and soil isolates in metabolizing the aromatic acids and intermediates created through the decomposition of lignin. Based on the results collected in the experiments, it is possible to draw conclusions as to the potential use of lignocellulotically active strains in the development of biotechnologies. In addition to the research on substrate use, all isolates are subjected to a phylogenetic analysis.

The bacterial strains analyzed in this thesis have been isolated from four test sites of different ecological compositions. Of the isolates, 17 are isolated from an aquatic environment - 11 of them originate from a recently constructed pond (strain code RTM) and 6 from an ecologically stable pond (strain code RTV). The remaining 28 strains have been isolated from compost of varying age: 5 strains from two-winter-old leaf compost (strain code KII) and 23 from one-winter-old leaf compost (strain code KI). Through phylogenetic analysis it became clear that the bacterial composition of the two composts varied significantly - the younger compost contained 78% of Proteobacteria species and the older compost contained 60% of Actinomycetota species. As the strains were tested for the growth of carbohydrates produced via the decomposition of cellulose and hemicellulose the strains isolated from the recently constructed pond and the younger compost were the most numerous. The activity testing of the enzymes amylase and cellulase also gave the

same results. From this it can be concluded that more bacteria decomposing the cellulose and hemicellulose components of lignocellulose can be found in younger ecosystems, whereas bacteria decomposing lignin are more numerous in already stabilized natural environments.

The bacterial strains isolated from the environments were grown on cultures containing glucose, saccharose, arabinose, galactose and xylose in order to detect which sugars created by the decomposition of cellulose and hemicellulose are metabolized by the bacteria. In addition, the growth of strains was tested on the intermediates derived from the decomposition of lignin - vanillin, protocatechuic acid (PCA), p-hydroxybenzoic acid, cinnamic acid, p-coumaric acid, salicylate, phenol and benzoate. Of these intermediates, bacteria utilized PCA, p-coumaric acid and p-hydroxybenzoic acid derived from the H-subunit of lignin the most. Even though lignin is a heteropolymer of extremely varied uses, the production of bioplastic from cis,cis-muconate (the substrate of which is PCA) remains one of the most promising biotechnological prospects.

All isolates were also tested for the activity of the enzymes amylase, $\boldsymbol{\beta}$-1,4-glycosidase and laccase. Bacteria use cellulase to decompose cellulose, $\boldsymbol{\beta}$-1,4-glycosidase to decompose cellobiose, amylase to decompose starch and laccase to decompose lignin.

The strain RTV14 isolated in these tests, whose closest reference strain was *Pseudomonas putida* NA3, was the most active lignocellulolytic strain that produced laccase, grew on liquid cultures containing lignin, decomposed the intermediates of lignin and produced the enzymes necessary for the decomposition of cellulose and hemicellulose. Of all the strains isolated, bacteria from families *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Paenarthrobacter*, *Cellulomonas*, *Streptomyces* and *Stenotrophomonas* were the most active metabolizers of lignin.

Lignocellulotically active strains can be studied further using a spectrophotometric analysis in order to chemically ascertain the lignin intermediate use of given strains. In addition further testing could be used to study the presence of other enzymes pertaining to the decomposition of lignin in these strains in order to identify new enzymatically active strains for industrial applications in lignin decomposition.

KIRJANDUSE LOETELU

Anthony, W. E., Carr, R. R., DeLorenzo, D. M., Campbell, T. P., Shang, Z., Foston, M., Moon, T. S., & Dantas, G. (2019). Development of Rhodococcus opacus as a chassis for lignin valorization and bioproduction of high-value compounds. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 192. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1535-3

Atiwesh, G., Parrish, C. C., Banoub, J., & Le, T.-A. T. (2022). Lignin degradation by microorganisms: A review. *Biotechnology Progress*, *38*(2), e3226. https://doi.org/10.1002/btpr.3226

Becker, J., & Wittmann, C. (2019). A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products. *Biotechnology Advances*, *37*(6), 107360. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.016

Bugg, T. D. H. (2024). The chemical logic of enzymatic lignin degradation. *Chem. Commun.*, *60*(7), 804–814. https://doi.org/10.1039/D3CC05298B

Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat. Prod. Rep.*, *28*(12), 1883–1896. https://doi.org/10.1039/C1NP00042J

Calissendorff, J., & Falhammar, H. (2017). Lugol's solution and other iodide preparations: Perspectives and research directions in Graves' disease. *Endocrine*, *58*(3), 467–473. https://doi.org/10.1007/s12020-017-1461-8

Cao, L., Yu, I. K. M., Liu, Y., Ruan, X., Tsang, D. C. W., Hunt, A. J., Ok, Y. S., Song, H., & Zhang, S. (2018). Lignin valorization for the production of renewable chemicals: State-of-the-art review and future prospects. *Bioresource Technology*, *269*, 465–475. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.065

Cheeptham, N., & Lal, A. (2012). Starch agar protocol. *American Society for Microbiology*, *1*, 1–9.

Danon, M., Franke-Whittle, I. H., Insam, H., Chen, Y., & Hadar, Y. (2008). Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing. *FEMS Microbiology Ecology*, *65*(1), 133–144. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00506.x

Davis, K. M., Rover, M., Brown, R. C., Bai, X., Wen, Z., & Jarboe, L. R. (2016). Recovery and Utilization of Lignin Monomers as Part of the Biorefinery Approach. *Energies*, *9*(10). https://doi.org/10.3390/en9100808

Dikshit, P. K., Jun, H.-B., & Kim, B. S. (2020). Biological conversion of lignin and its derivatives to fuels and chemicals. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *37*(3), 387–401. https://doi.org/10.1007/s11814-019-0458-9

Doi, R. H. (2008). Cellulases of Mesophilic Microorganisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1125*(1), 267–279. https://doi.org/10.1196/annals.1419.002

Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. T. Heinze (Toim), *Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use* (lk 1–67). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/b136816

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, *39*, 783–791.

Furukawa, T., Bello, F. O., & Horsfall, L. (2014). Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation. *Frontiers in Biology*, *9*(6), 448–471. https://doi.org/10.1007/s11515-014-1336-9

Gonzalo, G. de, Colpa, D. I., Habib, M. H. M., & Fraaije, M. W. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, *236*, 110–119. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.011

Grgas, D., Rukavina, M., Bešlo, D., Štefanac, T., Crnek, V., Šikić, T., Habuda-Stanić, M., & Landeka Dragičević, T. (2023). The Bacterial Degradation of Lignin—A Review. *Water*, *15*(7). https://doi.org/10.3390/w15071272

Gu, J., Qiu, Q., Yu, Y., Sun, X., Tian, K., Chang, M., Wang, Y., Zhang, F., & Huo, H. (2024). Bacterial transformation of lignin: Key enzymes and high-value products. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, *17*(1), 2. https://doi.org/10.1186/s13068-023-02447-4

Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świderska-Burek, U., Jarosz-Wilkołazka, A., & Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(6), 941–962. https://doi.org/10.1093/femsre/fux049

Lee, S., Kang, M., Bae, J.-H., Sohn, J.-H., & Sung, B. H. (2019). Bacterial Valorization of Lignin: Strains, Enzymes, Conversion Pathways, Biosensors, and Perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00209

Liu, H., Liu, Z.-H., Zhang, R.-K., Yuan, J. S., Li, B.-Z., & Yuan, Y.-J. (2022). Bacterial conversion routes for lignin valorization. *Biotechnology Advances*, *60*, 108000. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108000

Maki, M., Leung, K. T., & Qin, W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International journal of biological sciences*, *5*(5), 500–516. https://doi.org/10.7150/ijbs.5.500

Meents, M. J., Watanabe, Y., & Samuels, A. L. (2018). The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. *Annals of Botany*, *121*(6), 1107–1125. https://doi.org/10.1093/aob/mcy005

Merino, S. T., & Cherry, J. (2007). Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. L. Olsson (Toim), *Biofuels* (lk 95–120). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2007_066

Nikel, P. I., & Lorenzo, V. de. (2018). Pseudomonas putida as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic Engineering*, *50*, 142–155. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.005

Nimisha, P., Moksha, S., & Gangawane, A. K. (2019). Amylase Activity of Starch Degrading Bacteria Isolated from Soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *8*(04). https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.804.071

Paul, M., Pandey, N. K., Banerjee, A., Shroti, G. K., Tomer, P., Gazara, R. K., Thatoi, H., Bhaskar, T., Hazra, S., & Ghosh, D. (2023). An insight into omics analysis and metabolic pathway engineering of lignin-degrading enzymes for enhanced lignin valorization. *Bioresource Technology*, *379*, 129045. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129045

Rao, J., Lv, Z., Chen, G., & Peng, F. (2023). Hemicellulose: Structure, chemical modification, and application. *Progress in Polymer Science*, *140*, 101675. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2023.101675

Reshmy, R., Balakumaran, P. A., Divakar, K., Philip, E., Madhavan, A., Pugazhendhi, A., Sirohi, R., Binod, P., Awasthi, M. K., & Sindhu, R. (2022). Microbial valorization of lignin: Prospects and challenges. *Bioresource Technology*, *344*, 126240. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126240

Saini, A., Aggarwal, N. K., Sharma, A., & Yadav, A. (2015). Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. *Enzyme Research*, *2015*(1), 279381. https://doi.org/10.1155/2015/279381

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*, 406–425.

Salvachúa, D., Johnson, C. W., Singer, C. A., Rohrer, H., Peterson, D. J., Black, B. A., Knapp, A., & Beckham, G. T. (2018). Bioprocess development for muconic acid production from aromatic compounds and lignin. *Green Chem.*, *20*(21), 5007–5019. https://doi.org/10.1039/C8GC02519C

Shokrkar, H., & Ebrahimi, S. (2018). Synergism of cellulases and amylolytic enzymes in the hydrolysis of microalgal carbohydrates. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *12*(5), 725–925. https://doi.org/10.1002/bbb.1886

Singh, A. K., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., & Raj, A. (2021). Lignin peroxidase in focus for catalytic elimination of contaminants—A critical review on recent progress and perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, *177*, 58–82. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.032

Zang, X., Liu, M., Fan, Y., Xu, J., Xu, X., & Li, H. (2018). The structural and functional contributions of β-glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 51. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1045-8

Zhao, L., Zhang, J., Zhao, D., Jia, L., Qin, B., Cao, X., Zang, L., Lu, F., & Liu, F. (2022). Biological degradation of lignin: A critical review on progress and perspectives. *Industrial Crops and Products*, *188*, 115715. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115715

Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, *10*, 512–526.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120

Terrett, O. M., & Dupree, P. (2019). Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls. *Current Opinion in Biotechnology*, *56*, 97–104. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.10.010

Toomik, E. (2015). *Puidujäätmete komposti mikroobikoosluse kirjeldamine.* TARTU ÜLIKOOL.

Weng, C., Peng, X., & Han, Y. (2021). Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. *Biotechnology for Biofuels*, *14*(1), 84. https://doi.org/10.1186/s13068-021-01934-w

Xu, Z., Lei, P., Zhai, R., Wen, Z., & Jin, M. (2019). Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: Microorganisms, metabolic pathways, and bio-products. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 32. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1376-0

Xu, T., Zong, Q.-J., Liu, H., Wang, L., Liu, Z.-H., Li, B.-Z., & Yuan, Y.-J. (2022). Identifying ligninolytic bacteria for lignin valorization to bioplastics. *Bioresource Technology*, *358*, 127383. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127383

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Tuuli Annok,

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

Keskkonnaproovidest lignotsellulolüütiliste bakterite isoleerimine,

mille juhendajad on Signe Viggor ja Merike Jõesaar,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Tuuli Annok

26.05.2025