

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Alkaanide lagundamise iseloomustamine *Acinetobacter venetianus* tüves ICP1

Bakalaureusetöö

Lõputöö maht (12 EAP)

Celeste Peterson

Juhendajad teadur Signe Viggor, PhD

teadur Merike Jõesaar, PhD

TARTU 2021

Infoleht

Alkaanide lagundamise iseloomustamine *Acinetobacter venetianus* tüves ICP1

Tõsiseid keskkonnaprobleeme põhjustavad naftareostused on ülemaailmne probleem, nende likvideerimiseks on vaja efektiivseid ja keskkonnasõbralikke meetodeid. Käesolevas töös uuriti *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 metaboolset võimet lagundada toornaftas leiduvaid n-alkaane. Tüve ICP1 täisgenoomi analüüsil tuvastati neli alkaani hüdroksülaasi geeni (*alkMa*, *alkMb*, *P450* ja *almA*), mis paiknevad genoomis hajusalt ning eraldi operonides. Geenide *alkMa*, *alkMb* ja *P450* ekspressiooni indutseerivad n-alkaanid C₉-C₃₂ ja toornafta. Geeni *almA* ekspressiooni tasemed olid kõrgemad, kui induktoritena kasutati C₂₂ ja toornaftat. MATH testi tulemused erinevate hüdrofoobsete orgaaniliste solventidega näitasid, et *A. venetianus* tüve ICP1 raku pind on hüdrofoobne. Käesolev uurimistöö näitas, et *A. venetianus* ICP1 on võimeline lagundama alifaatseid süsivesinikke ning seda bakterit võiks kasutada naftareostuse likvideerimiseks bioaugmentatsiooni meetodil.

Märksõnad: *Acinetobacter venetianus*, toornafta, alkaanid, alkaani hüdroksülaasid, hüdrofoobsus

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Characterization of the degradation of alkanes in the *Acinetobacter venetianus* strain ICP1

Oil pollution is a global problem as it causes serious environmental problems all over the world. The present study examined the metabolic capability of *Acinetobacter venetianus* ICP1 to degrade n-alkanes. The analysis of the full genome revealed that strain ICP1 has four alkane hydroxylase genes (*alkMa*, *alkMb*, *P450* and *almA*), which are dispersed in the genome in separate operons. The expression of genes *alkMa*, *alkMb* and *P450* was induced by n-alkanes C₉-C₃₂ and crude oil. Expression levels of the *almA* gene were higher when C₂₂ and crude oil were used as inductors. The result of the MATH assay with various hydrophobic organic solvents showed that the cell surface of *A. venetianus* strain ICP1 is hydrophobic. The present study indicates that *A. venetianus* ICP1 is capable of degrading aliphatic hydrocarbons. Additional tests should be performed to test the effectiveness of the strain in removing oil pollution by bioaugmentation.

Keywords: *Acinetobacter venetianus*, crude oil, alkane, alkane hydroxylase, hydrophobicity

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Toornafta ja keskkond.....	7
1.1.1. Toornafta töötlemistehased ja nende reoveepuhastid.....	8
1.1.2. Naftasaadustega saastunud keskkonna puhastamise meetmed	10
1.2. Alkaanid	13
1.2.1. Alkaanide lagundamise rajad	14
1.2.2. Alkaani hüdroksülaaside mitmekesisus	16
1.3. Perekond <i>Acinetobacter</i>	18
1.3.1. Hüdrofoobsete ühendite omastamine perekonnas <i>Acinetobacter</i>	20
1.3.2. Alkaanide lagundamine perekonnas <i>Acinetobacter</i>	20
1.3.3. <i>Acinetobacter venetianus</i> ICP1	22
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	23
2.1 Töö eesmärgid.....	23
2.2 Materjal ja metoodika	23
2.2.1. Töös kasutatud bakteritüved.....	23
2.2.2. Geenifragmentide amplifitseerimine.....	23
2.2.3. Geелеlektroforees	24
2.2.4. Sekveneerimine	24
2.2.5. Sekveneeritud järjestuste analüüs.....	25
2.2.6. Reaalaja PCR (qRT-PCR).....	25
2.2.7. MATH test.....	26
2.3. Tulemused ja arutelu.....	28
2.3.1. Alkaane lagundavate ensüümide fülogeneetiline analüüs.....	28
2.3.2. Kataboolsete operonide analüüs.....	29
2.3.2.1. <i>P450</i> operoni analüüs	30

2.3.2.2. <i>almA</i> operoni analüüs	32
2.3.2.3. <i>alkM</i> ja <i>rubAB</i> operonide analüüs	34
2.3.3. Geenide <i>alkMa</i> , <i>alkMb</i> , <i>almA</i> ja <i>P450</i> ekspressiooni analüüs	39
2.3.4. Tüve ICP1 rakupinna hüdrofoobsus.....	46
KOKKUVÕTE	49
Summary.....	50
KIRJANDUSE LOETELU.....	51
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	59
LISAD	60
Lisa 1.....	60
Lisa 2.....	61
Lisa 3.....	62
Lisa 4.....	63
Lisa 5.....	64

KASUTATUD LÜHENDID

AH - alkaani hüdroksülaas

AlkB, AlkM - membraaniseoseline alkaani hüdroksülaas

AlmA - flaviiniseoseline monooksügenaas

AlkR - transkriptsiooni regulaator

bp - aluspaari (*base pair*)

MATH - mikroobne kinnitumine süsivesinikele (*Microbial Adherence to Hydrocarbons*)

ORF - avatud lugemisraam (*Open Reading Frame*)

P450 - tsütokroom

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

rpm - pööret minutis (*revolutions per minute*)

RubA - rubredoksiin

RubB - rubredoksiini reduktaas

S - skvalaan

TN - toornafta

qRT-PCR - kvantitatiivne reaalaaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon (*real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*)

SISSEJUHATUS

Toornafta, mis on keerukas orgaaniliste ühendite segu, on väärtuslik tooraine energeetikas ja keemiatööstuses. Selle loodusliku tooraine töötlemisel saadakse erinevaid tooteid nagu gaasid, kütused, õlid, plastik jne. Kaasajal on toornafta kaevandamine ja töötlemine väga intensiivne, mistõttu on sagedased ka juhtumid, kus keskkonda satub toornaftat või sellest valmistatudprodukte. Naftareostus on ohtlik kogu elusloodusele ning seepärast on oluline välja töötada kiireid, efektiivseid ja keskkonnasõbralikke reostuse eemaldamise meetodeid. Üheks selliseks meetodiks on biotervendamine, mille korral mikroobide abil lagundatakse naftas leiduvaid alifaatseid ja aromaatsesid süsivesinikke.

Üheks toornafta komponendiks on alkaanid, mis koosnevad süsiniku ja vesiniku aatomitest. Alkaanide lagundamiseks peab mikroorganism kulutama palju energiat, mistõttu ei ole see bakterite seas levinud süsiniku- ja energiaallikas. Samas leidub mikroorganisme, näiteks hõimkondadesse *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ja *Firmicutes* kuuluvad bakterid, mis on võimelised neid inertseid küllastunud süsivesinikke lagundama. Alkaanide biodegradatsioon toimub tänu erinevatele alkaani hüdroksülaasidele, mis jagatakse rühmadesse vastavalt substraadiks olevate alkaanide ahela pikkusele.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida India toornafta rafineerimistehase reoveepuhastist isoleeritud *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 n-alkaanide lagundamise geneetilist potentsiaali ja alkaanide katabolismis osalevate geenide ekspressiooni erinevate induktorite juuresolekul. Varasemalt on uuritud nimetatud tüve võimet lagundada fenooli, kuid seni puuduvad teadmised tüve ICP1 metaboolsest võimekusest osaleda n-alkaanide lagundamisel.

Bakalaureusetöö teostati Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Toornafta ja keskkond

Toornafta on looduslikult esinev viskoosne vedelik, mille värvus varieerub helekollasest mustani, sõltuvalt selle keemilisest koostisest (Chandra jt., 2013). Tegu on keeruka orgaaniliste ühendite seguga, mis sisaldab valdavalt süsivesinikke. Toornafta keemilised ja füüsikalised omadused sõltuvad oluliselt leiukohast, sisaldades keskmiselt 49% tsükloalkaane, 30% alkaane, 15% aromaatsaid ühendeid ja 6% asfalteene kogumahust. Väiksemates kogustes leidub ka metall-orgaanilisi ühendeid ja teisi orgaanilisi ühendeid, mis sisaldavad hapnikku, lämmastikku ning väävli. (Head jt., 2006; Hyne, 2001)

Toornaftat kaevandatakse nii maismaal kui merel ning see on üks olulisemaid fossiilseid kütuseid. Tööstusrevolutsiooni algusest tänapäevani on toornafta kasutamine olnud väga intensiivne, mistõttu ennustatakse, et seda jätkub veel 2014. aasta andmete kohaselt 53,3 aastaks (<https://oilprice.com>). Toornafta on väärtuslik tooraine nii energeetikas kui ka keemiatööstuses. Kaevandatavast toormest maksimaalse kasu saamiseks töödeldakse toornaftat naftatöötlemistehastes, kus erinevate protsesside (separeerimine, destilleerimine, krakkimine jne) käigus toodetakse erineva koostisega gaase, kütuseid ja õlisid (Talvik, 1996). Need on omakorda tooraineks naftakeemiatööstustele, kus toodetakse näiteks plastikut, sünteetilisi kiude jne (Gloyne ja Ford, 2020; Jafarinejad jt., 2019).

Toornafta ja selle toodete tarbimise ning töötlemisega kaasnevad sageli keskkonnaprobleemid, sest naftas leiduvad ühendid on toksilised nii mikroorganismidele kui ka kõrgematele eluvormidele, kaasa arvatud inimestele (Varjani ja Upsani, 2017; Benedek jt., 2016). Naftasüsivesinikud akumulēruvad looma- ja taimekudedesse, põhjustades nende surma või mutatsioone (Révész jt., 2020). Samas leidub näiteks merevees mikroorganisme, mis kasutavad alifaatsaid ja aromaatsaid süsivesinikke süsiniku- ja energiaallikana, sest looduslike protsesside tulemusena imbib merekeskkonda ~600 000 tonni naftat aastas (National Research Council, 2003). Lokaalsed looduslikud lekked merepõhjas või maismaal on aga märksa väiksemad kui need, mis tekivad tankeri- või puurtorniõnnetuste korral, näiteks *Deepwater Horizon* puurtorni põlengu tagajärjel sattus 2010. aastal 4 kuu vältel Mehhiko lahte hinnanguliselt 780 000 m³ toornaftat (<https://www.britannica.com>).

Suurteks reostuse allikateks on naftakeemia- ja rafineerimistehased, kus tekib palju reovett, mis sisaldab orgaanilisi ja anorgaanilisi saasteaineid. (Kuyukina jt., 2020; Jafarinejad ja Jiang, 2019). Üheks reostusallikaks on lisaks tööstustele ka linnades tekkiv sadevesi, mis sisaldab

tuhandeid erinevaid süsivesinikke, sealhulgas naftasüsivesinikke. Süsivesinikud satuvad äravoolu peamiselt transpordist tuleneva reostuse tõttu. Kuna erinevates tööstusharudes ja linnades tekib suures koguses reovett, mis sisaldavad naftaühendeid, on järjest olulisemaks saanud efektiivsete reovee puhastamise tehnoloogiate väljatöötamine, sealhulgas bioloogiliste meetodite rakendamine. (Kuyukina jt., 2020; Jafarinejad jt., 2019; Varjani ja Upsani, 2017)

1.1.1. Toornafta töötlemistehased ja nende reoveepuhastid

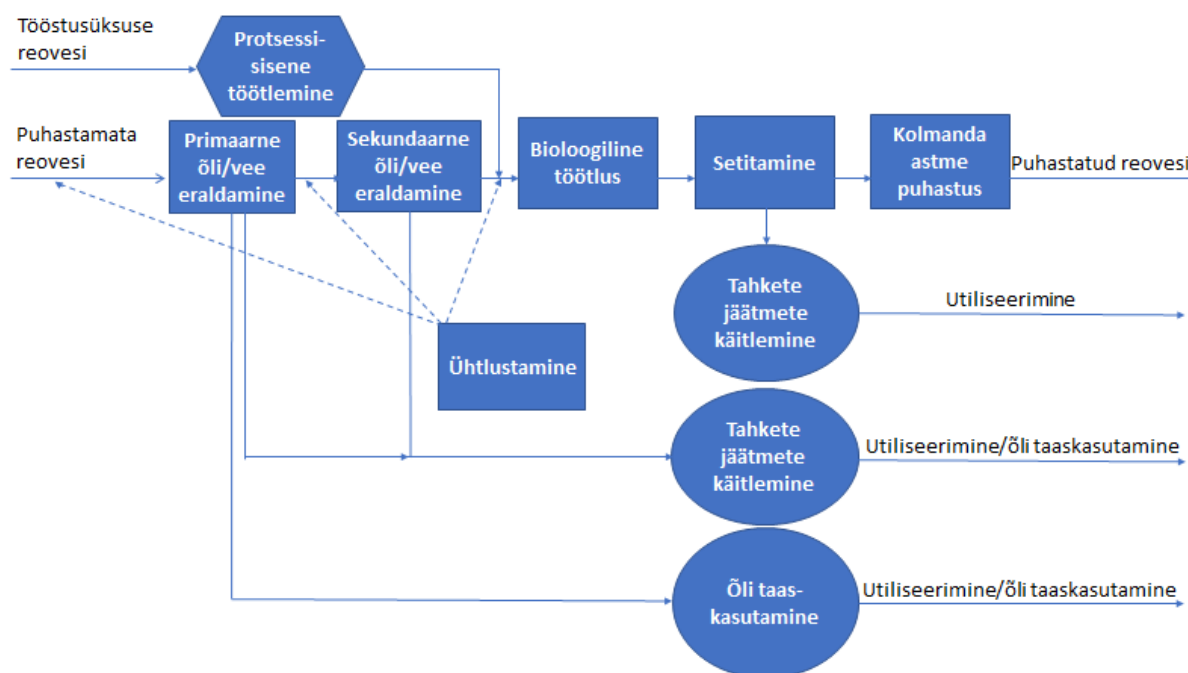
Naftatöötlemistehastes ehk rafineerimistehastes eraldatakse toornaftast esmalt selles lahustunud gaasid ja vesi. Seejärel viiakse läbi fraktsioneeriv destilleerimine (üksikud paljudest ühenditest koosnevad fraktsioonid), mille käigus saadakse näiteks bensiin, ligroiin, petrooleum ja masuut, kokku eraldatakse üldiselt enam kui 60 tehnilist produkti (Talvik, 1996). Bensiini, kui kõige enam kasutatava toote saagise suurendamiseks krakitakse (töötlemine kõrgel temperatuuril ja rõhul) fraktsioone, mille keemistemperatuur on üle 200 kraadi, näiteks ligroini. Need on vaid üksikud näited naftatöötlemistehase tootmisprotsessidest. (Jafarinejad ja Jiang, 2019)

Euroopas töödeldakse aastas umbes 700 miljonit tonni naftat ligikaudu 100 naftatöötlemistehases. Tehaste heitmete tüüp ja kogus on tavaliselt hästi teada. Peamised õhusaasteained on süsiniku, lämmastiku ja väävli oksiidid, põlemisprotsessides tekivad tahked osakesed ja lenduvad süsivesinikud. Vee tarbimise vähendamiseks püütakse võimalikult palju vett taaskasutada erinevates tehnoloogilistes etappides. Tekkiv reovesi sisaldab alifaatseid ja aromaatsed süsivesinikke, sulfiide, ammooniumi, tsüaniide ja tahkeid osakesi (sisaldavad metalliioone ja anorgaanilisi ühendeid). Tahketest jäätmetest moodustavad suure osa õliga/õlita setted mahutite põhjadest või reoveepuhastist ning mitmesugused vedelad, poolvedelad või tahked jäätmed (nt saastunud pinnas, kasutatud katalüsaatorid ja aktiivsüsi, tuhk jne). (<https://eippcb.jrc.ec.europa.eu>)

Reovett tekib tehases erinevate tootmisprotsesside etappides, näiteks aurukondensatsioonil, seadmete ja mahutite puhastamisel, krakkimisel, aromaatsete ühendite tootmisüksustes, aga ka tehnilise vea tõttu võib jahutusvesi saastuda. Tehaste territooriumid on suured, mistõttu on suured ka territooriumilt kokku kogutavate sadevete hulgad. (Jafarinejad ja Jiang, 2019) Kirjanduse andmetel jõuab naftatöötlemistehasesse tarnitud veest 80-90% reoveepuhastisse ning sõltuvalt tootmisprotsessist tekib 1 ühiku toornafta töötlemisel 0,4-1,6 ühikut reovett (Coelho jt., 2006). Näiteks 2015. aastal tarbiti maailmas ööpäevas 95 miljonit barrelit toornaftat, mille töötlemisel tekkis hinnanguliselt ööpäevas 38-152 miljonit barrelit reovett (Jafarinejad ja Jiang, 2019). Euroopas on osades tehastes viidud reovee maht tasemele 0,5 m³

reovett 1 tonni toornafta kohta, kuid kogused sõltuvad oluliselt töödeldava nafta koostisest ning kasutatavatest tehnoloogilistest protsessidest (<https://eippcb.jrc.ec.europa.eu>). Reovee hulk võib sõltuda ka tehase asukohast, näiteks Indias asuva tehase puhasti sissevoolu hulk suureneb vihma perioodil kuni kaks korda võrreldes kuivaperioodiga (vastavalt kuni $700 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ ja $350 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) (<https://www.scribd.com>). Piirkondades, kus puhta vee hulk on piiratud, on väga oluline reovee efektiivne puhastamine ja taaskasutamine (näiteks jahutusveena) (Ahmadun jt., 2009).

Rafineerimistehases on kasutatavad järgmised reovee tötlusprotsessid: primaarne, sekundaarne, bioloogiline ja kolmanda astme tötlus ehk järeltötlus (Joonis 1). Esmase ehk primaarse töötlemise käigus toimub õli ja vee kihtide eraldamine. Juhul kui see ei õnnestu esimese korraga, korratakse seda etappi veelkord, et eraldada võimalikult palju õlitilkasid. Kogutud õli segatakse toornaftaga ning suunatakse uuesti tehasesse. (Jafarinejad ja Jiang, 2019)



Joonis 1. Naftatöötlemis- ja keemiatehaste reoveepuhastite lihtsustatud skeem (modifitseeritud joonis, Jafarinejad ja Jiang, 2019).

Bioloogilise tötluse käigus lagundatakse vees olevad õlid ja teised orgaanilised saasteained mikroobide (bakterid, pärmid ja mikroseed) abil (Zobell, 1973). Bioloogilised puhastusprotsessid viiakse tavaliselt läbi aereeritud laguunides või aktiivmudareaktorites. Nende tehnoloogiate miinuseks on see, et need vajavad suuri maa-alasid, kuid tihedalt asustatud piirkondades, näiteks linnades, pole see võimalik. Seepärast on hakatud kasutama ka biofilmil

põhinevaid reaktorsüsteeme (*biotower*). (Vendramel jt., 2015) Biofilmil põhinevate meetodite eeliseks võrreldes teiste süsteemidega on see, et selle koostises olevad mikroobid suudavad paremini taluda toksilisi saasteaineid (Hamoda jt., 1998).

Puhastusprotsessi kolmandas astmes toimub järeltöötlus, kus bioloogilise puhastuse etapi läbinud vesi juhitakse läbi liiva- või aktiivsöefiltrite või toimub puhastamine keemilise oksüdeerimise teel. Viimasel ajal on hakatud kasutama ka membraanfilter tehnoloogiat, et parandada loodusesse juhitava vee kvaliteeti. Vältimaks tootmisprotsessist sõltuvaid reovee koostise kõikumisi, kasutatakse tehaste reoveepuhastites kogumis- ja ühtlustusbasseine, mis võivad paikneda kas primaarse või sekundaarse puhastusetapi ees või järel (Joonis 1). (Jafarinejad ja Jiang, 2019)

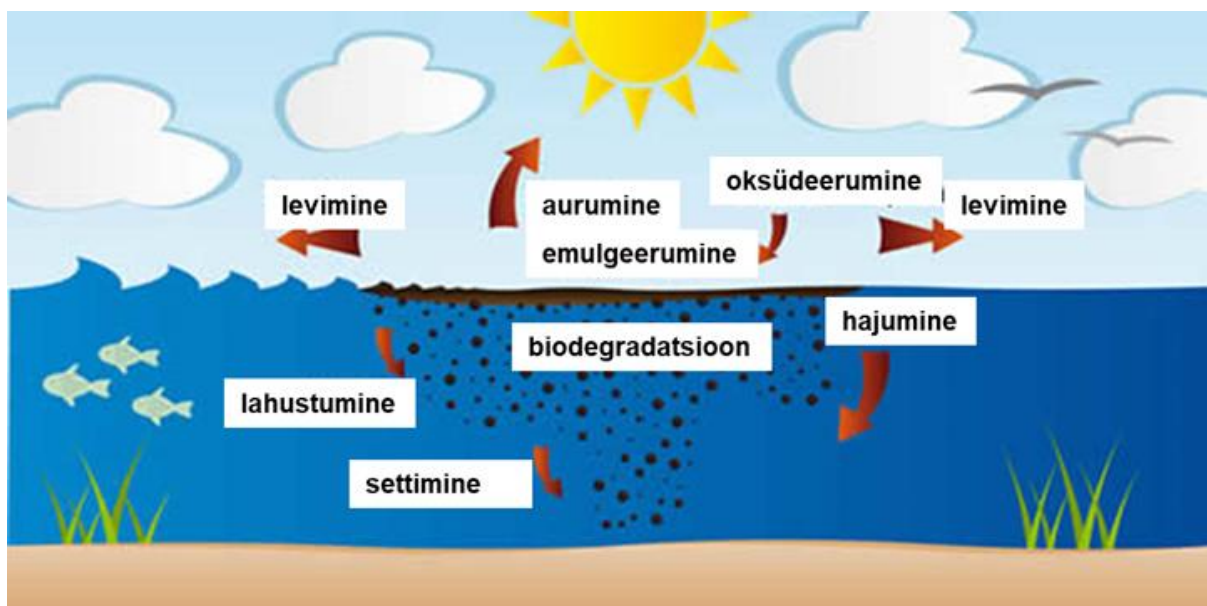
Naftatöötlemistehastes tekib peotsesside käigus lisaks reoveele ka tahkeid jäätmeid, näiteks muda (õliga/õlita), suitsugaaside väävlitustamisel tekkinud jäätmed, lendtuhk, põletustuhk, kasutatud aktiivsüsi, filtrite tolm, anorgaanilised soolad, kasutatud katalüsaatorid, bituumen, kasutatud hapete ja aluste lahused jne (<https://eippcb.jrc.ec.europa.eu>). Need jäätmed, mida ei ole võimalik taaskasutada, põletatakse või viiakse prügilatesse. Jäätmete käitlemisel kasutatakse kas füüsikalisi (filtreerimine, tsentrifuugimine jne), keemilisi (kapseldamine, stabiliseerimine, neutraliseerimine jne) või bioloogilisi meetodeid. Jäätmete põletamisel kasutatakse spetsiaalseid põletusahje (põletusgaaside koostist kontrollitakse) ning tekkinud soojus ja energia taaskasutatakse. (IPIECA, 2014)

1.1.2. Naftasaadustega saastunud keskkonna puhastamise meetmed

Toornafta võib sattuda keskkonda nii looduslike protsesside kui ka inimtegevuse tõttu, põhjustades seal tõsiseid keskkonnaprobleeme (Varjani ja Upsani, 2017; Benedek jt., 2016). Näiteks veekeskkonda sattumisel, võivad naftas sisalduvad süsivesinikud kahjustada veeorganisme (Révész jt., 2020). Naftareostuse likvideerimiseks nii pinnasest kui veekeskkonnast on välja töötatud erinevaid puhastamise meetodeid, mida käsitletakse käesolevas peatükis.

Naftareostused merekeskkonnas on saanud ülemaailmseks probleemiks peamiselt toornafta kaevandamise ja transportimise tõttu. Nafta merre sattumisel võib see aurustuda, lahustuda, emulgeeruda ja settida (Joonis 2). Samuti levib nafta veekeskkonnas tänu hoovustele ja tuulele ning jõudes rannikule võib see kahjustada sealset ökosüsteemi. (Tansel, 2013; Stankovich ja Simeonova, 2018) Naftareostuse likvideerimisel kasutatavate puhastustehnikate valimisel on oluline kindlaks määrata õli tüüp ja hulk ning rannajoone geoloogia. Oluliseks parameetriks on

ka saastunud territooriumi elustik, sest tehnika valimisel ei tohi ökosüsteemi kahjustada. Meetodeid, mida puhastamiseks kasutada on erinevaid. Üheks viisiks on passiivne õli eemaldamine, mis hõlmab looduslike protsesse või looduslike/sünteetiliste adsorbeerivate materjalide kasutamist. Looduslikeks protsessideks on näiteks fotooksüdatsioon, aurustumine ja biolagundamine. Viimase protsessi puhul lisatakse saastunud alale kas looduslike/geneetiliselt muundatud mikroorganisme ja/või toitaineid, mis tõstavad sealsete looduslike mikroobide hulka ning metaboolset aktiivsust (Stankovich ja Simeonova, 2018; Baniasadi, 2018). Mikroorganismid lagundavad saasteained kas täielikult või osaliselt, lähteainest ning metabolismiradadest sõltuvalt võivad tekkivad vaheühendid olla keskkonnale kahjutud või toksilised (Agamuthu jt., 2013). Rannikule jõudnud reostust saab kõrvaldada ka mehaaniliselt, tehes seda käsitsi või kasutades vaakum, madal- või kõrgsurvepesu tehnoloogiatel põhinevaid seadmeid. Eemaldatud õli ja sellega kokku puutunud materjalid kogutakse kokku ning suunatakse kas põletamisele või kompostimisele. (Stankovich ja Simeonova, 2018)



Joonis 2. Merre sattunud naftaga toimuvad protsessid (modifitseeritud joonis; <https://www.itopf.org>).

Merel naftareostuse likvideerimisel kasutatakse füüsikalisi, keemilisi, termilisi ja/või bioloogilisi meetodeid. Füüsikaliste meetodite rakendamisel kasutatakse erinevaid tõkkeid nagu poome, skimmereid ja adsorbeerivaid materjale, et vältida õli edasist levikut. Peale leviku kontrolli alla saamist kasutatakse kemikaale nagu dispergeerijad ja tahkestajad, et muuta õli keemilisi ja füüsikalisi omadusi. Termilise meetodi puhul on võimalik õlireostust kiiresti

likvideerida, kuid seda ei saa kasutada tugeva tuule korral, lisaks ohustavad põletamisel tekkivad kõrvalproduktid inimeste tervist ning keskkonda. Bioloogilistes puhastusmeetodites kasutatakse mikroobe, mis suudavad lagundada süsivesinikke. (Dave ja Ghaly, 2011) Lisaks tavapärastele meetmetele on välja töötatud erinevaid kõrgtehnoloogilisi meetodeid. Näiteks päikeseenergial töötav robot imab õliga reostunud vee endasse, puhastab selle nanotehnoloogiat kasutades ning juhib puhta vee tagasi ookeani. Suurt edu on andnud ka naftareostuse eemaldamisel rauaosakestel põhineva nanotehnoloogia kasutamine, kus õli muudetakse magnetiliseks ja seejärel kasutades magnetit eraldatakse veest. (<https://www.engineering.com>)

Lisaks reostusele veekeskkonnas võib naftasaadustega saastuda ka maapind, millega võib kaasneda ka vee ja õhu reostus (Okoh jt., 2020). Nafta võib sattuda pinnasesse selle kaevandamisel, transportimisel torujuhtmete või veokitega ning kütuseterminalidest ja tanklatest (Ahmad jt., 2020; Rhykerd jt., 1995). Reostuse likvideerimisel on kasutusel füüsikalised, keemilised ja bioloogilised tehnoloogiad, mida rakendatakse kas saastunud alal (*in situ*) või transporditakse pinnas puhastamiseks kohaldatud alale (*ex situ*). Füüsikaliste meetodite puhul eemaldatakse saastunud muld keskkonnast ja pestakse või ekstraheeritakse orgaaniliste lahustitega, et eraldada naftaühendid. (Ezeji jt., 2007; Okoh jt., 2020) Reostuse stabiliseerimiseks kasutatakse keemilisi meetodeid (kapseldamine, seondumine pindadele), mille abil muudetakse reoaine pinnases vähem liikuvamaks (Kriipsalu jt., 2016). Põletamise (keemiline ja füüsikaline meetod) käigus muudetakse toornafta ja teised mürgised ühendid stabiilseteks mittetoksilisteks aineteks nagu vesi, süsinikdioksiid ja lämmastikoksiid, kuid oluline on kontrollida põletusgaaside koostist ja ladustada tuhk (Ezeji jt., 2007). Ulatuslike reostuste puhul on rakendatud ka biotervendamist, kus kahjulike ainete lagundamiseks kasutatakse elusorganisme (Kriipsalu jt., 2016; Balba jt., 1998). Biotervendamise ehk bioremediatsiooni eeliseks teiste meetodite ees on see, et tegu on keskkonnasõbraliku ja suhteliselt odava tehnoloogiaga (Kriipsalu jt., 2016). Bioremediatsiooni üheks alaliigiks on ka fütoremedatsioon ehk taimtervendamine, milles kasutatakse taimede abi pinnases leiduvate saasteainete eemaldamiseks (De Boer ja Wagelmans, 2016).

Naftareostus nii maismaal kui veekeskkonnas võib põhjustada tõsiseid keskkonnaprobleeme, mistõttu on kiire reageerimine reostuse likvideerimisel oluline. Välja on töötatud erinevaid puhastustehnoloogiaid, nende seast sobiva valimisel tuleb silmas pidada eelkõige reostuse põhjustanud õli omadusi. Puhastusmeetmed, mis võivad olla nii füüsikalised, keemilised kui ka bioloogilised, peaksid olema võimalikult keskkonnasõbralikud ja ei tohiks kahjustada saastunud piirkonna ökosüsteemi.

1.2. Alkaanid

Alkaanid on küllastunud süsivesinikud, mis koosnevad süsiniku ja vesiniku aatomitest. Nende molekulid võivad olla lineaarsed (*n*-alkaanid), hargnenud (*iso*-alkaanid) või tsüklilised (*cyclo*-alkaanid) ja sõltuvalt ahela pikkusest esinevad alkaanid toatemperatuuril gaasilises, vedelas või tahkes olekus (Tabel 1). Alkaanid, millel on üks kuni neli süsiniku aatomit on gaasilises olekus. Viie kuni viieteistkümne süsiniku aatomiga molekulid on vedelad ning kaheksateistkümne või enama süsiniku aatomiga alkaanid tahkes olekus. (Labinger ja Bercaw, 2002)

Tabel 1. Erineva ahelapikkusega alkaanide nimetused ja nende molekulaarsed valemid ning füüsikaline olek toatemperatuuril (Labinger ja Bercaw, 2002)

Alkaani nimi	Molekulaarne valem	Füüsikaline olek
metaan	CH ₄	gaasiline
etaan	C ₂ H ₆	gaasiline
propaan	C ₃ H ₈	gaasiline
butaan	C ₄ H ₁₀	gaasiline
pentaan	C ₅ H ₁₂	vedel
heksaan	C ₆ H ₁₄	vedel
heptaan	C ₇ H ₁₆	vedel
oktaan	C ₈ H ₁₈	vedel
nonaan	C ₉ H ₂₀	vedel
dekaan	C ₁₀ H ₂₂	vedel
dodekaan	C ₁₂ H ₂₆	vedel
tetradekaan	C ₁₄ H ₃₀	vedel
heksadekaan	C ₁₆ H ₃₄	vedel
oktadekaan	C ₁₈ H ₃₈	tahke
eikosaan	C ₂₀ H ₄₂	tahke
dokosaan	C ₂₂ H ₅₀	tahke
heksakosaan	C ₂₆ H ₅₄	tahke
dotriakontaan	C ₃₂ H ₆₆	tahke

Alkaanid on hüdrofoobsed ning vees halvasti lahustuvad, homoloogilises reas süsinikuahela pikenedes suureneb ainete tihedus, sulamis- ja keemistemperatuur (Martma, 2005). Alkaanid

on keemiliselt inertsed, sest C-C ja C-H sideme lõhkumiseks kulub palju energiat, mistõttu tuleb aktiveerida molekulis C-H side ehk σ -side, et saaks võimalikuks alkaani osalemine keemilistes reaktsioonides. (Labinger ja Bercaw, 2002)

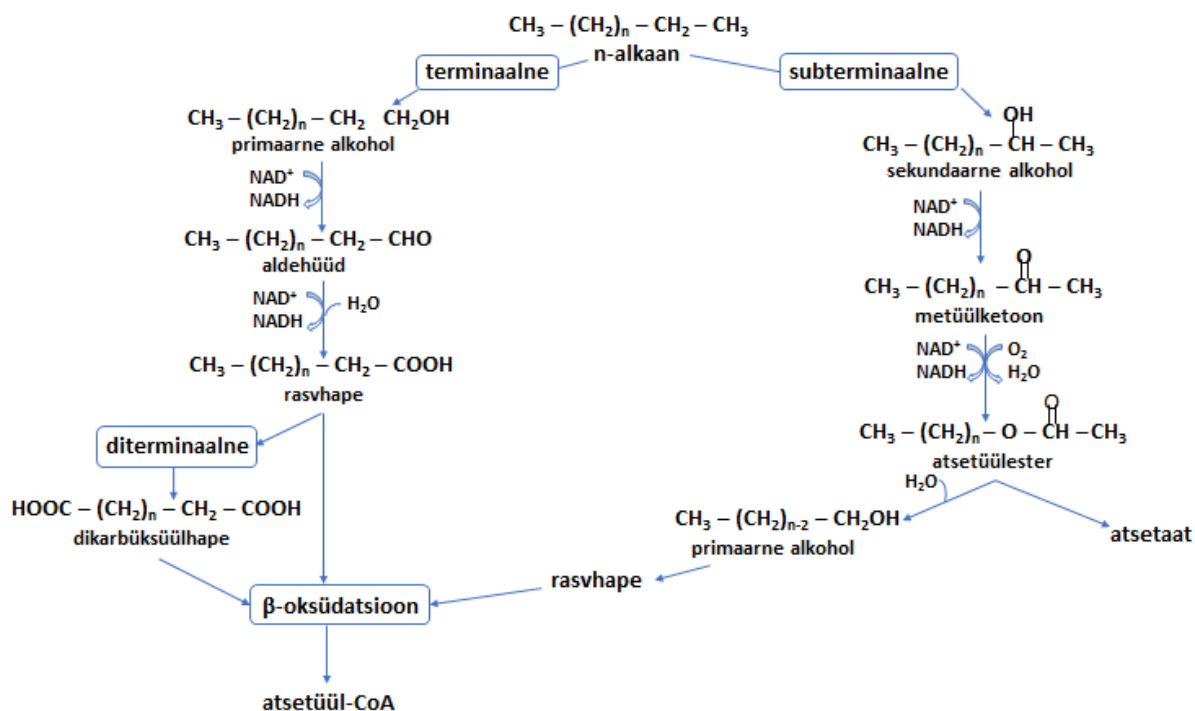
Toornafta, mille peamiseks koostisosaks on alkaanid, on tekkinud maapõues miljoneid aastaid tagasi ladestunud orgaanikarikkast zooplanktoni, taimede ja vetikate kihtidest kõrgel temperatuuril ja rõhul. Alkaane toodavad oma elutegevuse käigus ka mõned elusorganismid, näiteks arhed, bakterid, taimed ja loomad. Samas leidub mikroorganisme (baktereid, seened ja pärmid), mis on võimelised lagundama alkaane (aeroobselt või anaeroobselt) ja kasutama neid molekulide süsiniku- ja energiaallikana. (Widdel ja Rabus, 2001)

1.2.1. Alkaanide lagundamise rajad

Paljud grampositiivsed ja gramnegatiivsed bakterid suudavad lagundada erineva pikkusega alkaane, kasutades neid süsiniku- ja energiaallikana (Ayala ja Torres, 2004). Näiteks paljudel hõimkondadesse *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ja *Firmicutes* kuuluvatel bakteritel on mitmekülgne metabolism ning nad ei kasuta teiste süsinikuallikate olemasolul alkaane esimese substraadina, sest tegu on inertsete ning vees halvasti lahustuvate molekulidega ja nende lagundamine on energiakulukas. Samas on isoleeritud baktereid, millele alkaanid ongi peamiseks energiaallikaks, neid nimetatakse alkanotroofideks. Sellise metabolismiga bakter on näiteks mereveest isoleeritud *Alcanivorax borkumensis*. (van Beilen ja Funhoff, 2007a) Perekonda *Alcanivorax* kuuluvate tüvede arvukused puhtas merevees on madalad, kuid naftareostuse korral tõuseb nende arvukus kiiresti, mistõttu arvatakse, et nendel bakteritel võib olla oluline roll reostuse eemaldamisel. Nimetatud bakterid suudavad lagundada ka hargnenud ahelaga alkaane. (Gregson jt., 2019)

Alkaanide biodegradatsioon saab toimuda bakterites aeroobselt või anaeroobselt. Esimesel juhul on elektronide aktseptoriks hapnik. Teisel juhul kasutatakse elektroni aktseptorina nitraati, rauaiooni, sulfaati või süsihappegaasi. (Widdel ja Rabus, 2001) Aeroobsel biodegradatsioonil võib mikroorganismis eksisteerida korraga terminaalne ja subterminaalne oksüdatsioonirada (Joonis 3). Terminaalse oksüdatsiooni puhul algab n-alkaani, mis sisaldab kahte või enam süsiniku aatomit, lagundamine metüülrühma oksüdeerimisega, mille käigus saadakse primaarne alkohol. Edasisel alkoholi oksüdeerumisel saadakse aldehüüd, millest tekib lõpuks rasvhape. Rasvhappest saadakse β -oksüdatsioonil CoA-ga konjugeerides atsetüül-CoA. (van Beilen jt., 2003) Diterminaalse raja kaudu saadakse n-alkaani terminaalsete metüülrühmade oksüdeerumisel dikarboksüülhape, mis siseneb samuti β -oksüdatsiooni ratta

(Coon, 2005). Subterminaalse oksüdatsiooni puhul tekib sekundaarne alkohol, mille edasisel oksüdatsioonis saadakse ester. Saadud produkti hüdrolyüsides tekib alkohol ja rasvhape. Sarnaselt terminaalsele oksüdatsioonile saadakse rasvhappest β -oksüdatsioonis atsetüül-CoA (Joonis 3).



Joonis 3. Alkaanide aeroobne biolagundamine (modifitseeritud joonis; Singh jt., 2012).

Üheks vähem uuritud aeroobseks oksüdatsioonirajaks on Finnerty rada, mis on omane näiteks *Acinetobacter* sp. tüvele HO1-N. Selles rajas oksüdeeritakse pika ahelaga n-alkaanid dioksügenaasi poolt n-alküülhüdroperoksiidideks. Seejärel saadakse peroksühape ja alküülaldehüüd ning lõpp-produktiks on rasvhape. (Ji jt., 2013)

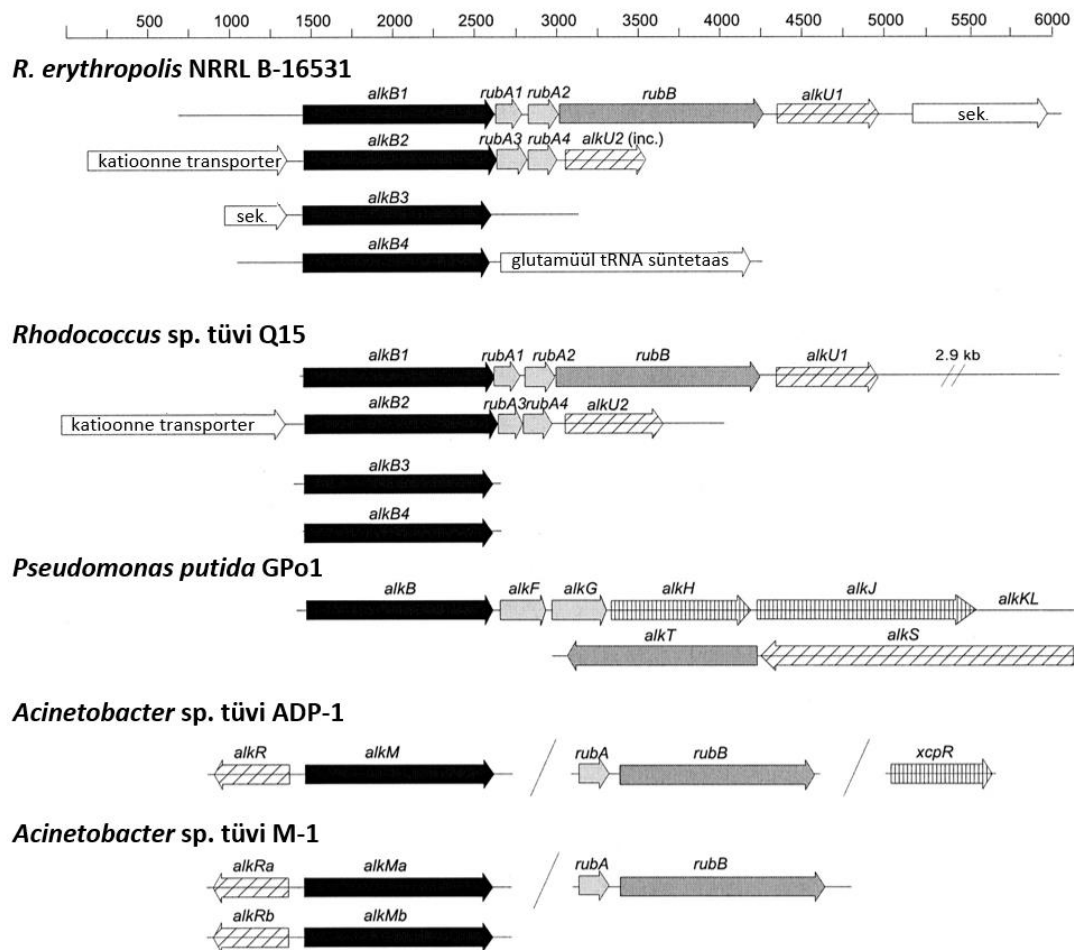
Anaeroobset alkaanide biodegradatsiooni on vähem uuritud, sest anaeroobid kasvavad aeglasemalt ning nende substraadispekter on kitsam kui aeroobidel (Widdel jt., 2010). Alkaanide anaeroobse lagundamise uurimise käigus on tuvastatud kaks rada: fumaraadi liitmise rada ja karboksüülimise rada (Ji jt., 2013). Esimese puhul aktiveeritakse alkaan subterminaalselt fumaraadi molekuli liitmisega, mille tulemusel saadakse alküülsuktsinaat (Kniemeyer jt, 2007; Ji jt., 2013). Tekkinud vaheühend lagundatakse sulfaati või nitraati redutseerivate või denitrifitseerijate bakterite poolt β -oksüdatsiooni rajas. Ainult sulfaati redutseerival *Desulfobacterium* sp. tüvel Hxd3 on kirjeldatud rada, kus alkaanist tekib subterminaalsel karboksüleerimisel rasvhape (happe rühm kolmanda süsiniku juures). Järgneb

kahe terminaalise süsiniku aatomi elimineerimine ning n-rasvhappe β -oksüdatsioon. (So jt., 2003)

1.2.2. Alkaani hüdroksülaaside mitmekesisus

Alkaani hüdroksülaasid ehk monooksügenaasid jagatakse rühmadesse vastavalt sellele, millise ahela pikkusega alkaane nad lagundavad (van Beilen ja Funhoff, 2007a). Esimesse ensüümide rühma kuuluvad metaani monooksügenaasid (MMO), mida on kirjeldatud metanotroofidel (on võimelised kasutama metaani energiaallikana). Monooksügenaasid oksüdeerivad metaani, etaani, propaani ja butaani ehk C_1 – C_4 alkaane ja neid võib esineda mikroorganismides kahes vormis: membraaniseoseliselt (pMMO) ja tsütoplasmaatilisel (sMMO). (Ayala ja Torres, 2004) pMMO, mida on kirjeldatud kõikides metanotroofides, ekspresseeritakse vaseioonide olemasolul ja on suhteliselt kitsa substraadi spetsiifilisusega (Ji jt., 2013; Ayala ja Torres, 2004). Madalatel vaseioonide kontsentratsioonidel ekspresseeritakse aga sMMO-d näiteks metanotroofides *Methylococcus capsulatus* ja *Methylosinus trichosporium* tüves OB3b (Ayala ja Torres, 2004; Rosenzweig jt., 1993). sMMO-l on võrreldes pMMO-ga lai substraadi spetsiifilisus ning oksüdeerib nii küllastunud alkaane kui ka aromaatsid ja kloroaromaatsid ühendeid (McDonald jt., 2006).

Teise rühma moodustavad membraaniseoselised alkaani hüdroksülaasid (AH), mis lagundavad keskmise pikkusega või pikki alkaane (C_5 – C_{24}) kasutades NADH või NADPH redutseerivaid ekvivalente (Singh jt., 2012). Mõned hõimkonna *Actinomyces* esindajad on võimelised hüdroksüleerima ka pikema ahelaga alkaane (kuni C_{32}), enamasti on sel juhul AH seotud rubredoksiini valguga (Nie jt., 2014). Samuti on leitud, et osadel juhtudel on need ensüümid võimelised oksüdeerima ka gaasilisi alkaane nagu propaan ja n-butaan (Johnson ja Hyman, 2006). AH koosneb kolmest valgust - membraaniseoselisest hüdroksülaasist ja tsütoplasma valkudest - rubredoksiinist ning rubredoksiini reduktaasist (Ayala ja Torres, 2004). Membraaniseoselistele alkaani hüdroksülaasidele on omane konserveerunud motiiv NYXEHYG (L/M), mis on vajalik ensüümi aktiivsuse jaoks (Singh jt., 2012). Kõige põhjalikumalt on uuritud *Pseudomonas putida* GPo1 tüvest pärinevat alkaani hüdroksülaasi, AlkB, mis on võimeline lagundama alkaane pikkusega C_6 – C_{13} . Tegu on membraaniseoselise mitteheemse kahte raud(II)iooni sisaldava monooksügenaasiga (van Beilen ja Funhoff, 2007a), mis viib läbi n-alkaanide terminaalset oksüdatsiooni. (van Beilen jt., 1994) Valk saab oksüdatsiooniks vajaminevaid elektrone rubredoksiinilt (AlkF ja AlkG) ja rubredoksiini reduktaasilt (AlkT) (Kok jt., 1989; van Beilen jt., 2001).



Joonis 4. *Rhodococcus* tüvede NRRL B-16531 ja Q15, *Pseudomonas putida* GPo1, *Acinetobacter* sp. tüvede ADP-1 ning M-1 *alk*-geenide operonide võrdlus. Noolte värvide tähendused: mustad - alkaani hüdroksülaasid; helehallid - rubredoksiinid; tumehallid - rubredoksiini reduktaasid; viirutatud - transkriptsiooni regulaatorid; vertikaalselt triibulised - muud *alk*-geenid; valged - ei kuulu *alk*-geenide koosseisu. Noole suund näitab transkriptsiooni suunda. (modifitseeritud joonis; Whyte jt., 2002)

Alkaani hüdroksülaasid on looduses laialt levinud, bakterite hulgas on neid kirjeldatud nii grampositiivsetel kui ka gramnegatiivsetel bakteritel, näiteks perekondade *Rhodococcus*, *Pseudomonas* ja *Acinetobacter* liikmetel (Nie jt., 2014; Ayala ja Torres, 2004). Kuigi on isoleeritud mitmeid mikroorganisme, mis on võimelised alkaane lagundama, on nende AH süsteemide geneetilisi omadusi suhteliselt vähe kirjeldatud. *Pseudomonas putida* tüve GPo1 puhul paiknevad alkaani hüdroksülaasi geenid OCT plasmidi kahes erinevas lookuses. *Acinetobacter* sp. tüvede ADP1 ja M-1 puhul on tegemist kromosomaalsete geenidega, mis paiknevad kolmes erinevas lookuses (Joonis 4). *Acinetobacter* sp. M-1 puhul on leitud, et tüvi omab kahte alkaani hüdroksülaasi geeni (*alkMa* ja *alkMb*) ning perekonda *Rhodococcus*

kuuluvatest tüvedest NRRL B-16531 ja Q15 on leitud lausa neli AH homoloogi (*alkB1*, *alkB2*, *alkB3* ja *alkB4*; Joonis 4.). (Whyte jt., 2002) Need bakterid, millel on mitu alkaani hüdroksülaasi, on enamasti võimelised lagundama laiemat n-alkaanide vahemikku, kui vaid ühte AH omavad tüved (Nie jt., 2014).

Lühikese ja keskmise ahela pikkusega alkaane lagundavad tsütokroom P450 CYP153 perekonda kuuluvad terminaalised monooksügenaasid. Tegu on heemvalkudega, mis koosnevad hüdroksülaasist ja reduktaasist ning kasutavad kofaktorina NAD(P)H-d. (Ayala ja Torres, 2004) P450 monooksügenaase on avastatud peaaegu kõigis elu domeenides (Ji jt., 2013). Enamasti on need ensüümid membraaniseoselised, aga leidub ka tsütoplasmaatilist tsütokroom P450. (Ayala ja Torres, 2004) Näiteks *Mycobacterium* sp. CYP153 klass I kuuluv monooksügenaas on tsütoplasmaatiline ja võimeline lagundama alkaane pikkusega C₆–C₁₁ (Funhoff jt., 2006). Ensüümi P450 kodeerivate geenide järjestusi on leitud hõimkondadesse *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ja *Planctomycetes* kuuluvate bakterite genoomides (Nie jt., 2014).

Pika ahelaga alkaanide (>C₂₀) lagundamises osalevad monooksügenaasid LadA ja Alma (Singh jt., 2012). LadA on flaviinist sõltuv oksügenaas, mis kuulub lutsiferaasi valkude perekonda. Tegu on kahekomponentse valguga, mis koosneb NAD(P)H-sõltuvast flaviini reduktaasist ja monooksügenaasist. (Li jt., 2008) LadA eraldati esmakordselt *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 tüvest ja leiti, et ensüüm suudab lagundada alkaane, mille ahela pikkused on vähemalt C₁₅–C₃₆ või enam (Ji jt., 2013). *Acinetobacter*'i tüvest DSM17874 avastatud *almA* on flaviiniseoselist monooksügenaasi kodeeriv geen (Throne-Holst jt., 2007), mis osaleb C₃₂ või pikemate alkaanide lagundamises (Ji jt., 2013). Kirjanduse andmetel on *almA* geen levinud pikki alkaane lagundavatel merebakteritel (Wang ja Shao, 2012)

1.3. Perekond *Acinetobacter*

Perekond *Acinetobacter* (ladina k. *Acineto*- mitteliikuv; *bacter*- pulk) (<https://lpsn.dsmz.de/genus/acinetobacter>) on looduses laialt levinud, neid leidub nii vees, mullas, elusorganismides kui ka inimese nahal (Bérézin ja Towner, 1996). Perekond, kuhu kuulub 82 liiki, on osa hõimkonnast *Proteobacteria* (<https://lpsn.dsmz.de/genus/acinetobacter>) (Tabel 2). Fenotüübiliste omaduste poolest on tegu gramnegatiivsete kokobatsillidega, mis on ranged aeroobid, mitteliikuvad, katalaas positiivsed ja oksüdaas negatiivsed. (Bérézin ja Towner, 1996)

Tabel 2. Perekonna *Acinetobacter* taksonoomia (<https://lpsn.dsmz.de/genus/acinetobacter>)

Süstemaatika	Nimi
riik	<i>Bacteria</i>
hõimkond	<i>Proteobacteria</i>
klass	<i>Gammaproteobacteria</i>
selts	<i>Pseudomonadales</i>
sugukond	<i>Moraxellaceae</i>
perekond	<i>Acinetobacter</i>

Perekonda *Acinetobacter* kuuluvad tüved on mitmekesise metabolismiga (Towner, 1997), mistõttu on nad äratanud huvi nii meditsiinilises, keskkonnavaldkes kui ka biotehnoloogilises mõttes (Abdel-El-Haleem, 2003). Esimest perekonda *Acinetobacter* kuuluvat bakterit *Acinetobacter calcoaceticus* (esimene nimetus oli *Micrococcus calcoaceticus*) kirjeldati aastal 1911 (Howard jt., 2012). Perekonda kuulub ka patogeenseid liike näiteks *Acinetobacter baumannii*, mis on seotud paljude haiglainfektsioonidega ja põhjustab kuseteede infektsiooni, meningiiti, kopsupõletikku jne. *A. baumannii* poolt põhjustatud infektsioonid ei allu sageli hästi antibiootikumiravile, sest tüvi on võimeline kiiresti omandama resistentsust erinevate antibiootikumide suhtes, lisaks on ta kuival pinnal elujõuline vähemalt 10 päeva. (Towner, 1997)

Acinetobacter´id on saanud suuremat tähelepanu keskkonnatehnoloogilistes rakendustes (Fondi jt., 2016), sest nad on võimelised osalema erinevate orgaaniliste (polütsüklilised aromaatsed ühendid, alkaanid, fenoolid) ja anorgaaniliste (raskemetallid) saasteainete biolagundamises. Selle omaduse tõttu on neid võimalik kasutada ohtlike jäätmetega (näiteks toornafta, kütused jne) saastunud keskkonna puhastamisel. (Abdel-El-Haleem, 2003; Czarny jt., 2019)

Perekonda *Acinetobacter* kuuluvad tüved on silma jäänud ka biotehnoloogilistes rakendustes, sest mõned neist on võimelised produtseerima erinevaid bioemulgaatoreid ja pindaktiivseid aineid (Abdel-El-Haleem, 2003), mida kasutatakse nii nafta-, toidu-, meditsiini-, farmaatsia-, keemia-, paberi- ja tselluloosi, tekstiili- kui ka kosmeetikatööstuses. Looduslikud emulgaatorid ja pindaktiivsed ained on kõrgelt hinnatud ja nende väärtus maailmaturul aina kasvab. (Mujumdar jt., 2019)

1.3.1. Hüdrofoobsete ühendite omastamine perekonnas *Acinetobacter*

Acinetobacter'itel on hüdrofoobne rakupind ja nad on suutelised kleepuma hüdrofoobsetele pindadele (Ishii jt., 2004). Samuti on nad võimelised omastama hüdrofoobseid ühendeid, näiteks toornaftas sisalduvaid n-alkaane, läbi rakumembraani. Alkaani omastamise mehhanisme on perekonnas *Acinetobacter* erinevaid, näiteks *A. venetianus* RAG-1 toodab selleks emulgaatorit emulsaani (Goldman jt., 1982). Bioemulgaatorite olemasolul kiireneb bakterite kasv, sest paraneb hüdrofoobsete ainete kättesaadavus lahustuvuse ning pindadelt desorptsiooni suurenemise tõttu. Samuti on näidatud, et neil on oluline roll ka mikroorganismide kinnitumisel ja eraldumisel erinevatele pindadele. Lisaks emulsaani eritamisele, on RAG-1 rakkudel võime kinnituda spetsiifiliselt hüdrofoobsetele substraatidele, kasutades selleks kas hüdrofoobseid fimbriaid, piilisid, välismembraani lipiide ja valke või rakupinna molekule. (Ron ja Rosenberg, 2014) Peale n-alkaani omastamist läbi rakumembraani järgneb sellele astmeline oksüdatsioon rakus.

1.3.2. Alkaanide lagundamine perekonnas *Acinetobacter*

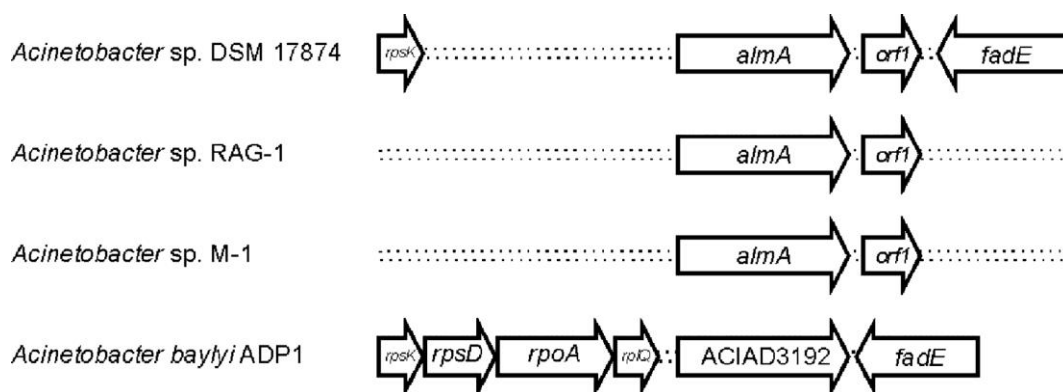
Perekonna *Acinetobacter* liikmed on võimelised lagundama toornaftas leiduvaid n-alkaane, mille ahela pikkus on vahemikus C₆-C₄₄ (Bihari jt., 2007). Selleks kasutavad *Acinetobacter*'id erinevaid alkaani hüdroksülaase: keskmise ja pika ahelaga alkaanide lagundamiseks heemvalku tsütokroom P450, lühikese ja keskmise ahelaga alkaanide lagundamiseks membraaniseoselist AlkB-tüüpi alkaani hüdroksülaasi AlkM (Nie jt., 2014) ning pikema ahelaga alkaanide lagundamiseks flaviiniseoselist hüdroksülaasi AlmA (Throne-Holst jt., 2007).

Acinetobacter'i tüvedel kirjeldatud membraanisesoselised alkaani hüdroksülaasid, AlkM, sisaldavad sarnaselt *Pseudomonas oleovorans* tüves GPo1 iseloomustatud AlkB valgule kaheksat konserveerunud histidiini jääki, kuid *alk* geenide paigutus genoomis on tüvedel täiesti erinev (Ratajczak jt., 1998a). Kui *P. oleovorans* tüves paiknevad geenid *alkBFGHJKL* ja *alkST* OCT plasmidi kahes erinevas osas (van Beilen ja Funhoff, 2007a) siis *Acinetobacter* sp. tüvede ADP1 (Ratajczak jt., 1998b) ja M-1 (Tani jt., 2001) puhul paiknevad *alk* geenid hajusalt kromosoomis ning *Acinetobacter* sp. tüves VE-C3 kahes plasmidis: pAV1 ja pAV2 (Decorosi jt., 2006). Joonisel 4 on näidatud *Acinetobacter* sp. tüve ADP1 n-alkaanide biodegradatsioonil osalevate geenide paigutus genoomis. Alkaanide oksüdatsiooni läbi viiv AlkM vajab elektronide transpordiks rubredoksiini RubA ja rubredoksiini reduktaasi RubB, mis moodustavad eraldiseisva *rubAB* operoni. Geeni *alkM* ekspressioon on reguleeritud *alkR* poolt, mis on sarnane AraC-XylS-tüüpi transkriptsiooni regulaatoritega. (Ratajczak jt., 1998b) *alkM*

ja *alkR* geenide vahealas paiknevad promootorelemendid ja pöördkordusjärjestused (Bihari jt., 2007).

Erinevalt *Acinetobacter* sp. tüvest ADP1 on *Acinetobacter* sp. tüvel M-1 leitud kaks alkaani hüdroksülaasi geeni, *alkMa* ja *alkMb*, mille ennustatavate aminohappeliste järjestuste identsus on 52%. *alkMa* ja *alkMb* geenidest ülesvoolu jäävad transkriptsiooni regulaatorid *alkRa* ja *alkRb* (Joonis 4). Kui geeni *alkMa* ekspressiooni indutseerivad väga pika ahelaga alkaanid ($>C_{22}$), siis *alkMb* ekspressiooni pika ahelaga n-alkaanid ($<C_{22}$). (Tani jt., 2001) Tüves M-1 paiknevad *alkMa*, *alkMb* ja *rubAB* operonid kromosomaalse DNA erinevates lookustes (Joonis 4) (Ishige jt., 2003).

Acinetobacter'i sp. tüvedel ADP1 ja M-1 on lisaks AlkB-tüüpi alkaani hüdroksülaasidele kirjeldatud ka *AlmA*, mille abil toimub pikemate kui C_{32} n-alkaanide lagundamine. Erinevate tüvede *almA* geeni lähiümbruse piirkondade skeemidelt (Joonisel 5) on näha, et enamasti paikneb *almA* kõrval tundmatu funktsiooniga geen, *orf1*. (Throne-Holst jt., 2007)



Joonis 5. Erinevate perekonna *Acinetobacter* tüvede geeni *almA* lähiümbruse skeemid. Joonisel näitavad nooled geenide suhtelist orientatsiooni ja lüngad hinnangulist vahemaad. (Throne-Holst jt., 2007)

Acinetobacter'id kasutavad kasvukeskkonnas leiduvaid n-alkaane süsiniku- ja energiaallikana ehk kasvuks või vahaestrite sünteesimiseks (Ishige jt., 2003). Vahaestrid tekivad rasvhapetest ja pikaahelalistest alkoholidest limiteeritud lämmastikuallika kontsentratsioonidel ning neid säilitatakse rakus inklusioonkehades. Koguneva vahaestri keemiline koostis sõltub oluliselt substraadiks oleva alkaani ahela pikkusest (Ishige jt., 2000; Ishige jt., 2002; Ishige jt., 2003) ning sellel on näidatud rakkudes mitmeid funktsioone, näiteks kaitsevad vahaestrid elusrakke

kuivamise, ultraviolettkiirguse ja patogeenide eest. Samuti on leitud vahaestritele kasutust ka biotehnoloogias, kus neid kasutatakse küünalde, kosmeetikatoodete, trükivärvide, määrdainete ja pinnakatete valmistamisel. (Abdel-El-Haleem, 2003)

1.3.3. *Acinetobacter venetianus* ICP1

Acinetobacter venetianus tüvi ICP1 isoleeriti India toornafta rafineerimistehasest ning on deponeeritud Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis paiknevas looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioonis CELMS (Viggor jt., 2020). Liigi nimetus, *venetianus* (ladina k. Veneetsia), viitab Veneetsia laguunile, millest isoleeriti esimene *Acinetobacter venetianus* tüvi (<https://lpsn.dsmz.de/species/acinetobacter-venetianus>). Eelnevate uuringute käigus selgus, et *A. venetianus* tüvi ICP1 on tõhus aromaatsete ja alifaatsete ühendite lagundaja. Tüve ICP1 kogu genoomi sekveneerimisel tuvastati, et bakteri genoom on 3 604 535 bp ja sisaldab 3515 geeni. *A. venetianus* ICP1 omab näiteks fenooli lagundamiseks multikomponentset fenooli hüdroksülaasi ja tekkiva vaheühendi katehhooli lagundamiseks katehhooli 1,2-dioksügenaasi. Tüve optimaalne kasvutemperatuur on 30 °C. Lisaks täheldati uuringute käigus, et *A. venetianus* ICP1 on võimeline moodustama biofilmi. See omadus annab tüvele eelise toksiliste ühendite lagundamisel, sest biofilmis on mikroobide arvukus suur, nad suhtlevad omavahel, jagavad metaboliite jne. Tänu nendele interaktsioonidele on ka tolerantsus aromaatsete ühendite kõrgematele kontsentratsioonidele kõrgem. (Viggor jt., 2020)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva uurimistöö eesmärkideks on:

- 1) tuua välja *A. venetianus* tüve ICP1 geneetilised tegurid, mis vastutavad alkaanide katabolismi eest,
- 2) määrata alkaanide katabolismis osalevate geenide ekspressiooni tasemed erinevate induktorite juuresolekul,
- 3) määrata tüve ICP1 rakupinna hüdrofoobsus.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud bakteritüved

Töös kasutatud bakteritüvedeks on *Acinetobacter venetianus* tüvi ICP1 ja *Pseudomonas oleovorans* ICTN13 (Viggor jt., 2020). Mõlema tüve puhul on tegu metsiktüüpi bakteritega, mis on isoleeritud India toornafta rafineerimistehasest ning on deponeeritud CELMS kogus (http://eemb.ut.ee/celms/main_list.php).

2.2.2. Geenifragmentide amplifitseerimine

Geenifragmendid (*alkMa*, *alkMb*, *almA*, *P450*) amplifitseeriti PCR meetodil. PCR-i reaktsioonisegu lõppmaht oli 25 µl, mis sisaldas 1x lõppkontsentratsiooniga PCR-i puhvrit [75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20], 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM igat nukleotidi (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,8 µM praimereid (Tabel 4) ja 0,02 U Taq DNA polümeraasi (Thermo Scientific™, Leedu). Matriitsina kasutati 3 µl *A. venetianus* ICP1 genoomse DNA lahust, mis saadi rakususpensiooni kuumutamisel 95 °C juures 15 minutit.

Amplifikatsiooniprogramm koosnes iniitsiatsioonietapist, mis kestis 5 minutit 95 °C juures. Sellele järgnesid etapid, mis kordusid 35 tsüklit: DNA ahelate denaturatsioon 95 °C 1 minut, praimerite seondumine 60 °C 45 sekundit ja DNA süntees 72 °C juures 45 sekundit. Peale viimast tsüklit toimus lõppekstensioon 72 °C juures 10 minutit.

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid

Praimer	Sihtmärk geen	5'→3' järjestus	Produkti suurus (bp)
alkMa-R	<i>alkMa</i>	CCACCAACGTACCAAGTAACG	163
alkMa-F1		TCCACCACTTGATGCGATTGC	
alkMb-R2	<i>alkMb</i>	TTTTCTACAGCTGATTTGAATGAG	215
alkMb-F2		CGCATGAGCTGAGTCATAAGC	
almA-FA	<i>almA</i>	GTTATGGTGAGCGATGTGCC	178
almA-RA		TTGTGTCATTTTCGCGCTGTG	
P450-FP	P450	ACAATCCGAGCTTGATCCCG	141
P450-RP		ACCACATCACCACCTTGTCG	
AcirpoB_RT_F	<i>rpoB</i>	CGTATGAACGTGGGTCAGATT	146
AcirpoB_RT_R		CCACCAACCTTGTTATAAATCTTG	

2.2.3. Geelektroforees

PCR-i edukuse kontrollimiseks kasutati 2% agarosgeeli 1x TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8,2), millele lisati DNA visualiseerimiseks etiidumbromiidi ($0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$). Geeli hambasse kanti 6 μl proovi, mis oli eelnevalt segatud 1 μl laadimispuhvriga [6x MassRuler™ Loading Dye Solution; 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% broomfenoolsinine; 60% glütserool; 60 mM EDTA (Thermo Scientific™, Leedu)]. Produkti suuruse hindamiseks kasutati 1 kb DNA suurusmarkerit (GeneRuler™; Thermo Scientific™, Leedu). Geelektroforees viidi seejärel läbi 1x TAE puhvris 100 V juures. Geeli pildistati UV transilluminaatoris.

2.2.4. Sekveneerimine

Geenifragmentide sekveneerimiseks töödeldi PCR segu praimerite katki lõikamiseks ja nukleotiidide inaktiveerimiseks ensüümidega eksonukleas I (ExoI; Thermo Scientific™, Leedu; lõppkoncentratsiooniga $0,36 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$) ning kreveti aluseline fosfataas (SAP; Thermo Scientific™, Leedu; lõppkontsentratsiooniga $0,14 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$). Töötlus toimus 37 °C 15 minutit, millele järgnes ensüümide inaktiveerimine 80 °C juures 15 minutit. Sekveneerimiseks kasutati

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'i (Applied Biosystems Inc., USA) vastavalt tootja protokollile.

Sekveneerimisreaktsioon viidi läbi PCR programmiga, mis koosnes 35 tsüklist ja kus iga tsükkel koosnes 3 etapist: DNA ahelate denatureerimine 95 °C, praimer seondumine 60 °C 10 sekundit, DNA süntees 60 °C juures 45 sekundit. Geenifragmendid sekveneeriti Applied Biosystems täisautomaatse kapillaarsekvenaatoriga 3730xl DNA Analyzer.

2.2.5. Sekveneeritud järjestuste analüüs

Sekveneeritud DNA järjestuste analüüsiks kasutati programmi BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) ning geenijärjestusi võrreldi BLAST (The Basic Local Tool Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) otsingumootori abil GeneBank andmebaasis olevate järjestustega. Fülogeneetiliste puude tegemiseks kasutati programmi Mega X (versioon 10.2.0).

Tüve ICP1 genoomne DNA eraldati JETquick DNA Spin Kit-ga (Genomed, Portugal) ja Nextera XT protokoll järgi koostatud raamatukogu sekveneeriti Portugalis Instituto Gulbenkian de Ciência laboris kasutades Illumina MiSeq platvormi. Genoomi assambleerimise, annoteerimise ja analüüsi protokollid on toodud artiklis Viggor jt. 2020 ning töö teostati Tanel Ilmjärve poolt. Tüve ICP1 genoom on 3 604 535 bp pikk, N50 on 203 710 bp ja see koosneb 34 kontiigist. Genoomi keskmine GC-sisaldus on 39,08% ning analüüsil tuvastati 3515 geeni. Alkaanide lagundamisel osalevate kataboolsete radade analüüsiks kasutati programmi ORF (Open Reading Frame) Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) ning jooniste tegemiseks kasutati programmi SnapGene Viewer 5.2.4.

2.2.6. Reaalaja PCR (qRT-PCR)

Acinetobacter venetianus´e ICP1 rakke kasvatati 250 ml Erlenmeyer´i kolbides, mis sisaldasid 50 ml R2A söödet, R2A+0,2% nonaani (C₉), dodekaani (C₁₂), tetradekaani (C₁₄), heksadekaani (C₁₆), oktadekaani (C₁₈), dokosaani (C₂₂), dotriakontaani (C₃₂), skvalaani (S; *squalane* ingl.) ehk 2,6,10,15,19,23-heksametüültetrakosaan (C₃₀H₆₂) või toornaftat (TN). RNA eraldati kasvukõvera erinevatest faasidest võetud 1 ml proovidest (rakud fuugiti 3 min, 13000p/min) *alkMa*, *alkMb*, *almA* ja *P450* geenide ekspressiooni hindamiseks.

RNA eraldamiseks kasutati Nucleospin® RNA Kit'i (Machery-Nagel GmbH & Co, Saksamaa) vastavalt tootja poolt etteantud protokollile. Eraldatud RNA proovidele teostati DNA-st vabanemiseks DNAasi töötlus (37 °C 30 minutit), kasutades ensüümi DNAas I (Thermo Scientific™, Leedu). DNAasi töötlusele järgnes sadestamine 3 M naatriumatsetaadi (pH 5,1) ja

96 %-lise etanooliga -20 °C juures 1 tund. Eraldatud RNA kontsentratsiooni ja puhtuse määramiseks kasutati NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit (Thermo Scientific™, Leedu).

qRT-PCR-i jaoks kasutati Rotor-Gene Q (Qiagen, Saksamaa) seadet ja SYBR Green 1-Step qPCR Low Rox Kit'i (Thermo Scientific™, Leedu) vastavalt protokollile. qRT-PCR-i reaktsioonisegu lõppmaht oli 10 µl ning sisaldas 10 ng eraldatud RNA-d. Proove amplifitseeriti kasutades primereid, mis on toodud Tabelis 3. Referentsgeenina kasutati *rpoB* (RNA polümeraasi beta subühik) geeni, mis amplifitseeriti kasutades AcirpoB_RT_F ja AcirpoB_RT_R primereid (Tabel 3). Proove amplifitseeriti kolmes korduses ja samadel tingimustel. qRT-PCR koosnes järgmistest etappidest:

1. 50 °C 15 min
2. 95 °C 15 min
3. 95 °C 15 s; 60 °C 30 s; 70 °C 30 s (korraldi 40 korda)
4. 40 °C 1 min
5. Sulamiskõver 72 - 95 °C, 0,35 °C kaupa, masin töötab 3 s enne järgmist etappi.

Tulemuste analüüsimiseks kasutati programmi RotorGene 2.02 (Qiagen, Saksamaa) ning mRNA hulga arvutamiseks programmi LinReqPCR (2020.2) (Ruijter jt., 2009). Andmete statistiliseks analüüsiks kasutati ANOVA testi (ühesuunaline; usaldusnivoo 0,05).

2.2.7. MATH test

Acinetobacter venetianus ICP1 ja *Pseudomonas oleovorans* ICTN13 rakke kasvatati 250 ml Erlenmeyer'i kolbides, mis sisaldasid 50 ml R2A, R2A+1,3 mM fenool või R2A+0,1% heksadekaani söödet. Kolbidest, mida inkubeeriti loksutil (100 rpm) üleöö temperatuuril 30 °C eraldati rakud tsentrifuugimise teel (20 minutit, 5000 rpm, 15 °C (Universal 320R; Hettich). Peale supernatandi eemaldamist suspendeeriti rakud steriilses PUM puhvris (22,2 g K₂HPO₄×3H₂O, 7,26 KH₂PO₄, 1,8 g urea, 0,2 g MgSO₄×7H₂O/l; pH 7,1) ning tsentrifuugiti (15 °C, 12 min, 5000 rpm). Rakkude pesemist korraldi kokku kaks korda ning rakud suspendeeriti 5 ml PUM puhvris. Seejärel mõõdeti spektrofotomeetriga (Libra S22, Biochrom) lainepikkusel 580 nm mikroobisuspensiooni absorptsioon ja valmistati sellest suspensioon, mille A_{580nm} oli ~0,4. 1,2 ml valmistatud lahust kanti 2 ml tuubi ning lisati 120 µl n-heksadekaani, oktaani või p-ksüleen. Tuub asetati vorteksile (Vortex-Genie2, Mo-Bio) ja lahust segati täispööretel (13000 rpm) 2 minutit. Vee ja orgaanilise solvendi kihtide lahutamiseks hoiti tuube 15 minutit laual ning mõõdeti seejärel vesifaasi neeldumine lainepikkusel 580 nm. Mõõdetud mikroobisuspensiooni absorptsiooni väärtuste põhjal arvutati

Acinetobacter venetianus ICP1 ja *Pseudomonas oleovorans* ICTN13 mikroobirakkude suhteline hüdrofoobsus kasutades valemit: $H\% = (1 - A_t/A_0) \times 100\%$, milles A_0 tähistab mikroobisuspensiooni absorptsiooni lainepikkusel 580 nm enne n-heksadekaani, oktaani või p-ksüleeni lisamist ja A_t vesifaasi absorptsiooni lainepikkusel 580 nm peale orgaanilise ühendi lisamist ja segamist vorteksil.

2.3. Tulemused ja arutelu

Naftareostuse tagajärjel satub keskkonda palju erinevaid elusorganismidele ohtlikke ühendeid, mille likvideerimisel on bakteritel täita suur roll. 2016. aasta jaanuaris Indias asuva toornafta rafineerimistehase puhastist võetud proovist eraldati *Acinetobacter venetianus* tüvi ICP1, mis kasvas fenooli sisaldaval söötmel ja heksadekaani aurudes. Viggor jt., 2020 uurimustöös iseloomustati tüve fenooli lagundamisvõimet ning analüüsiti kataboolsete geenide paigutust genoomis. Käesolevas töös uuritakse *A. venetianuse* tüve ICP1 võimet lagundada alkaane, sest need küllastunud süsivesinikud moodustavad suure osa toornafta koostisest (Widdel ja Rabus, 2001).

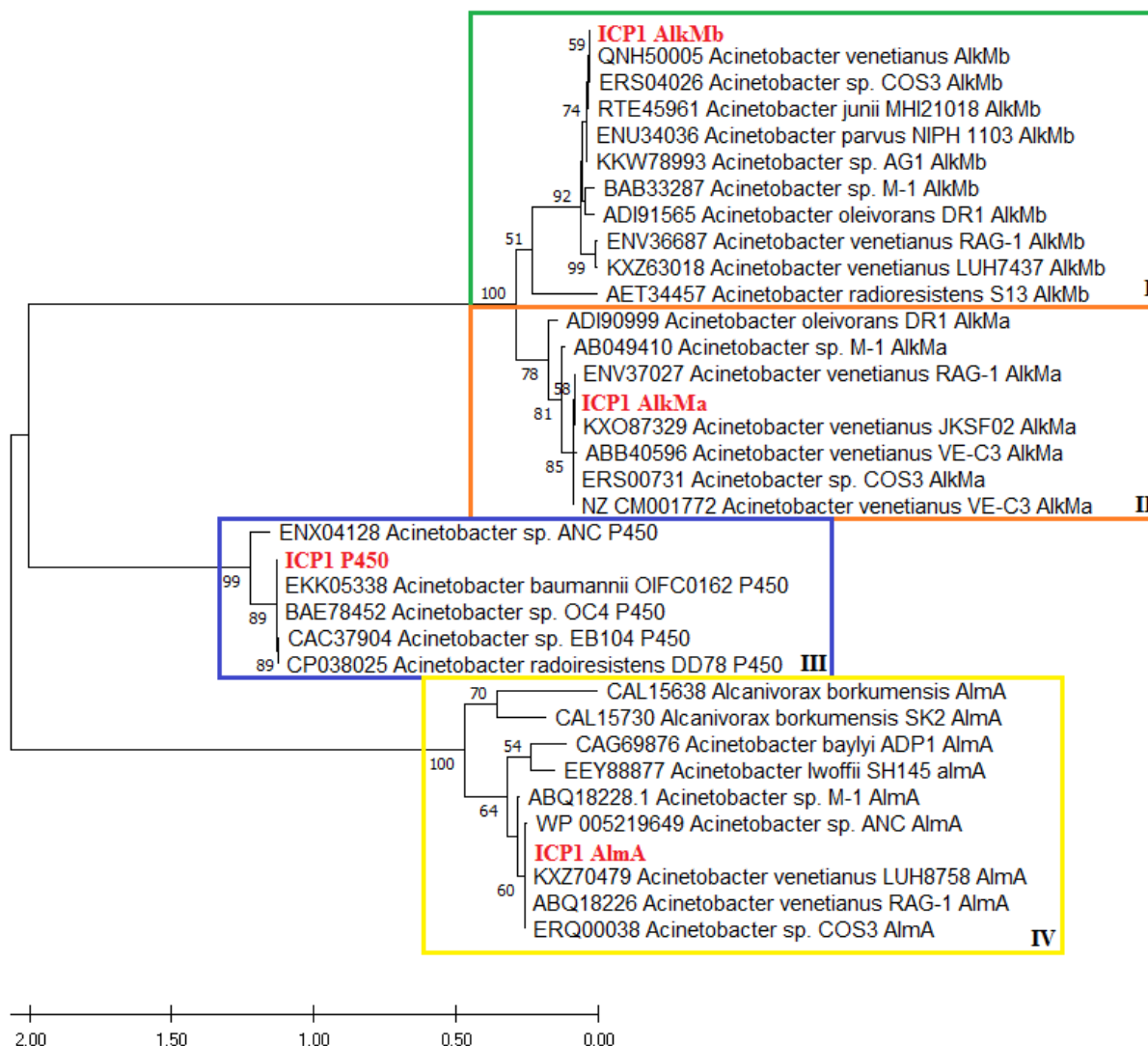
2.3.1. Alkaane lagundavate ensüümide fülogeneetiline analüüs

Alkaanide lagundamises osalevate ensüümide fülogeneetiliseks analüüsiks uuriti esmalt *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 genoomi, mille käigus tuvastati neli alifaatsete ühendite lagundamises osalevat alkaani hüdroksülaasi geeni. Nendeks geenideks on *P450*, *alkA* ning kaks *alkM* geeni: *alkMa* ja *alkMb*.

Tüve ICP1 alkaani lagundamises osalevate geenide järjestused transleeriti ennustatavateks aminohappelisteks järjestusteks ning võrreldi neid BLASTP otsingumootoriga GenBank andmebaasis olevate aminohappeliste järjestustega. *AlkMa*, *AlkMb*, *P450* ja *AlmA* ennustatavate aminohappeliste järjestuste võrdlemisel GenBank andmebaasis olevate vastetega selgus, et tegu on perekonna *Acinetobacter*'i spetsiifiliste valgujärjestustega. Tüve ICP1 ja GenBank saadud järjestuste põhjal koostatud fülogeneetilisel puul (Joonis 6) moodustasid eraldi klastrid. Esimesse klastrisse klasterdusid *AlkMb* (klaster I), teise *AlkMa* (klaster II), kolmandasse *P450* (klaster III) ning neljandasse *AlmA* (klaster IV) järjestused.

Analüüsides ennustatavaid aminohappelisi järjestusi BLASTP programmiga selgus, et *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 *AlkMb* järjestusele oli kõige sarnasem *Acinetobacter venetianus* TUST-DM21 *AlkM* järjestus (QNH50005; identsus 99%). Nimetatud tüvi isoleeriti õliga saastunud Bohai lahe (Hiina) piirkonnast. *AlkMa* järjestusele oli sarnasem San Jacinto jõe (Texas, USA) setetest isoleeritud laia spektrit ksenobiootikume (loodusvõõrad keemilised ühendid, näiteks pestitsiidid) lagundava *A. venetianus* JKSF02 *AlkM* järjestus (KXO87329; identsus 100%). Tüve ICP1 monooksügenaasi *P450* lähimaks vasteks 100% identsusega oli *Acinetobacter baumannii* tüvest OIFC0162 (isoleeritud inimese kopsudest) leitud *P450* järjestus (EKK05338). *AlmA* järjestusele sarnasem järjestus oli *A. venetianus* LUH8758 *AlmA* järjestus (KXZ70479; identsus 99,6%). Viimati mainitud tüvi on isoleeritud Jaapani mere veest

ning Fondi ja teiste poolt (2016) teostatud uurimus näitas, et tüvi on võimeline lagundama efektiivselt n-alkaane.



Joonis 6. Perekonda *Acinetobacter* kuuluvate tüvede alkaani hüdroksülaaside ennustatavate aminohappeliste järjestuste põhjal koostatud fülogeneetiline puu. Punase kirjaga on tähistatud *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 alkaani hüdroksülaasid. Erinevat värvi kastidega ja numbritega on tähistatud ensüümide klasterid: AlkMb (klaster I), AlkMa (klaster II), P450 (klaster III) ja Alma (klaster IV). GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on märgitud GenBank ID number, bakteri nimi ning alkaani hüdroksülaasi lühend. Puu on koostatud lähinaabrite ühendamise meetodil. Bootstrap väärtused on märgitud alates 50%.

2.3.2. Kataboolsete operonide analüüs

Kataboolsete operonide uurimisel saab teada, kuidas kataboolsed geenid operonis paiknevad ja milliste transkriptsiooni regulaatoritega geene reguleeritakse. Näiteks aktiveerib tüves

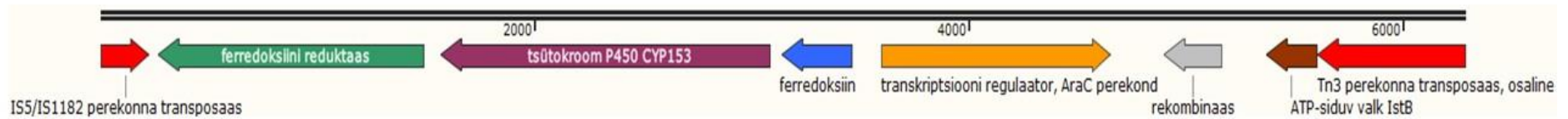
Acinetobacter venetianus ADP1 alkaani hüdroksülaasi ekspressiooni AlkR, mis kuulub AraC transkriptsiooni regulaatori perekonda. Nimetatud valku kodeerib geen *alkR*. AlkR vajab AlkM ekspressiooni aktiveerimiseks kindla ahela pikkusega hüdrofoobse efektormolekuli olemasolu kasvukeskkonnas. Ensüümi induktoriks on keskmise ja pika ahelaga alkaanid või alkeenid, kuid mitte nende oksüdatsioonil tekkivad alkoholid. (Ratajczak jt., 1998b) *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 kataboolsete operonide uurimiseks teostati tüve täisgenoomi järjestuse analüüs, mille käigus tuvastati, et kromosoomis paikneb neli alifaatsete ühendite lagundamisel osalevat kataboolset operoni. Operonide analüüsis leitud ORF-ide (*Open Reading Frame* ehk avatud lugemisraam) funktsioonid ja nende võrdlus referentstüvede ORF-idega on välja toodud Joonistel 7-10.

2.3.2.1. P450 operoni analüüs

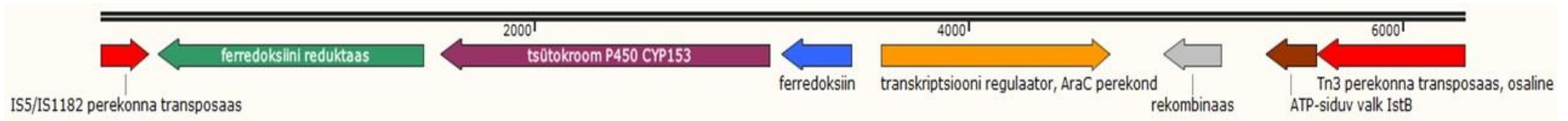
Acinetobacter venetianus tüve ICP1 6282 bp pikkuse genoomse järjestuse (kontiig abyss29; 11 781 bp) analüüsimisel tuvastati 8 ORF-i (Joonis 7), millest 1515 bp pikkune järjestus kodeerib alkaani hüdroksülaasi P450. Operoni struktuur on kõige sarnasem *Acinetobacter radioresistens* tüve DD78 plasmiidis pAR3 paikneva 6282 bp pikkuse operoniga (identsus nukleotiidide tasemel 99,98%). *A. venetianus* ICP1 operon on sarnane ka *Acinetobacter* sp. tüve OC4 kromosoomis paikneva 3193 bp pikkuse operoniga (GenBank andmebaasis olev osaline järjestus) (kattuva ala ulatuses identsus 99,81%) ja *Acinetobacter* sp. tüve EB104 plasmiidis pAC450 paikneva 4379 bp pikkuse operoniga (kattuva ala ulatuses identsus 99,39%).

Geen *P450* paikneb operonis ferredoksiini ja ferredoksiini reduktaasi vahel, mis omavad olulist rolli alkaani hüdroksülaasi varustamisel elektronidega (Ji jt., 2013). Tüve ICP1 operonis paiknevatel ferredoksiini ja ferrodoksiini reduktaaside geenidel on kõrge identsus referentstüvede DD78, OC4 ja EB104 vastavate geenidega - ferredoksiini puhul on identsus 100% ja ferredoksiini reduktaasi korral üle 99%. Ferredoksiini reduktaasi, *P450* ja ferredoksiini geenidest allavoolu paikneb operoni reguleerimises osalev AraC perekonna transkriptsiooni regulaator, *alkR* geen, mille identsus võrdluseks kasutatud tüvede operonides paiknevate geenidega on samuti kõrge (100% ja 99,14% vastavalt tüve DD78 ja EB104 järjestusega). Enamasti toimub *P450*, ferredoksiini ja ferredoksiini reduktaasi toimel regiospetsiifiline n-alkaani monoterminaalne oksüdeerimine vastavaks 1-alkoholiks (näiteks tekib oktaanist 1-oktanool) (Asperger jt., 1981, Maier jt., 2001). Samas näidati *Acinetobacter* sp. tüve OC4 eelnevalt nimetatud kolme geeni kloneerimisel konstrueeritud biotransformatsioonisüsteemiga *E. coli* tüves, et lisaks monoterminaalsele toimub ka biterminaalne oksüdeerimine (näiteks oktaanist tekib 1,8-oktaandiool). Biterminaalse reaktsiooni saaduse saagis on märgatavalt

Acinetobacter venetianus tüvi ICP1



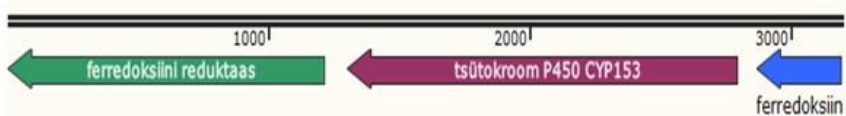
Acinetobacter radioresistens tüvi DD78



Acinetobacter sp. tüvi EB104



Acinetobacter sp. tüvi OC4



Joonis 7. *Acinetobacter venetianus* ICP1, *Acinetobacter radioresistens* DD78 (CP038025), *Acinetobacter* sp. tüvede EB104 (AJ311718) ja OC4 (AB221118) P450 geeni sisaldavate operonide struktuurid. Tüvede DD78 ja EB104 operonid paiknevad vastavalt plasmiidis pAR3 ja pAC450.

madalam kui monoterminaalset, kuid mõlemad ühendid on kaubanduslikult väärtuslikud kemikaalid. (Fujii jt., 2006) Bakteriaalsed P450 esinevad lahustuva valguna ning *Acinetobacter* sp. EB104 P450 uurimisel selgus, et tänu hüdrofoobsetele aminohapetele võib valk seonduda membraanidele ning hüdrofoobsete rakusiseste varuainete graanulitele võimaldades nii hüdrofoobsete substraatide seondumist ensüümiga (Maier jt., 2001).

A. radioresistens DD78 ja *A. venetianus* ICP1 puhul paiknevad P450 operoni kuus ORF-i IS5 ja Tn3 perekonna transposaaside vahel, mistõttu on võimalik operoni liikumine kromosoomi ja plasmidi vahel, tekitades nii uusi kataboolseid radu. Tänu IS elementidele on võimalik geeni P450 levik ka erinevate tüvede ja liikide vahel. (Pemberton ja Schmidt, 2001) Referentstüvede *A. radioresistens* DD78 ja *Acinetobacter* sp. EB104 P450 geeni sisaldavad operonid paiknevad plasmiidides, kuid tüves ICP1 ja *Acinetobacter* sp. OC4 kromosoomis. IS elemendid viitavad sellele, et varasemalt võisid mainitud uuritavad tüved P450 operoni omandada horisontaalse geeni ülekande kaudu.

2.3.2.2. *almA* operoni analüüs

Kirjanduse andmetel on *almA* geen laialt levinud n-alkaane lagundavate mikroorganismide genoomides, eriti merebakterites (näiteks perekondades *Acinetobacter* ja *Alcanivorax*) (Wang ja Shao, 2012). *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 täisgenoomi järjestuste analüüsil tuvastatud *almA* operon on 6254 bp pikk (kontiig spades41; 427 898 bp) ja sisaldab 7 ORF-i. Käesolevas töös võrreldi uuritava tüve ICP1 ning *Acinetobacter* sp. tüvede RAG-1, ADP1 ja M-1 *almA* geeni sisaldavate operonide struktuure (Joonis 8). Tüved RAG-1, ADP1 ja M-1 on võimelised kasvama alkaanidel, mille ahela pikkus on vastavalt kuni C₃₂ ja C₃₆, kui ainsal süsinikuallikal (Throne-Holst jt., 2007). *A. venetianus* ICP1 operon on struktuurselt sarnaseim GenBank andmebaasist leitud *A. venetianus* tüve RAG-1 6238 bp pikkuse operoniga (omavaheline identsus 91,98%). Erinevus kahe tüve operonide vahel tuleneb *almA* geenist ülesvoolu jäävast ORF-ist, mis *A. venetianus* tüve ICP1 puhul kodeerib atsetüültransferaasi ja tüve RAG-1 puhul hüpoteetilist valku. Samuti toimub nendelt geenidelt transkriptsioon erinevas suunas. *Acinetobacter* sp. tüvede ADP1 (operoni pikkus 4749 bp) ja M-1 (pikkus 2271 bp) *almA* operonid on tüve ICP1 operoniga identsed vastavalt 52,94% ja 83,22% (kattuva ala ulatuses). Erinevalt tüvedest ICP1, RAG-1 ja M-1 puudub tüve ADP1 operonis *almA* geenist allavoolu geen, mis kodeerib n-alkaanide lagundamises mitte osalevat DUF2059 domääni sisaldavat valku (Throne-Holst jt., 2007). Järgnevad geenid, mis kodeerivad vastavalt atsetüül-CoA dehüdrogenaasi ja suksinaadi dehüdrogenaasi, on olemas tüvedel ICP1, RAG-1 ja ADP1. Kuna tüve M-1 täisgenoomi järjestust GenBank andmebaasis puudub, pole võimalik ka võrdlust teha.

Acinetobacter venetianus tüvi ICP1



Acinetobacter venetianus tüvi RAG-1



Acinetobacter sp. tüvi ADP1



Acinetobacter sp. tüvi M-1



Joonis 8. *Acinetobacter venetianus* tüvede ICP1 ja RAG-1 (ABQ18226), *Acinetobacter* sp. tüvede ADP1 (CR54861) ning M-1 (EF212875) *almA* geeni sisaldavate operonide struktuurid.

Tüve ICP1 *almA* geeni järjestus on 97,25%, 77,06% ja 86,78% identne tüvede RAG-1, ADP1 ja M-1 vastava järjestusega.

Tüve ADP1 *almA* operoniga väga sarnast operoni omava tüvega *Acinetobacter* sp. DSM17874 tehtud katsed näitasid, et flaviiniseoseline alkaani monooksügenaas AlmA osaleb C₃₂ ja pikemate n-alkaanide lagundamisel (Throne-Holst jt., 2007).

2.3.2.3. *alkM* ja *rubAB* operonide analüüs

Alkaanide lagundamisel osalevatest alkaani hüdroksülaasidest (AH) on kõige enam uuritud membraaniseoselisi AH-se, mida tähistatakse perekonna *Acinetobacter* tüvedes lühendiga AlkM. Käesolevas töös uuritud *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 genoomis tuvastati kaks *alkM* geeni (*alkMa* ja *alkMb*). Täisgenoomi järjestuse analüüsil selgus, et *alkM* geeni sisaldavad operonid paiknevad kontiigil velvet12, kuid on üksteisest ligikaudu 400 000 bp kaugusel, operonide struktuurid on esitatud Joonisel 9. Kirjanduses on näidatud, et *alkM* geenide ekspressiooni eest vastutab AraC perekonda kuuluv transkriptsiooni regulaator AlkR, mille induktoriteks on kindla süsinikuahela pikkusega hüdrofoobne efektormolekul (Ratajczak jt., 1998b), ja mis on tavaliselt sihtgeenile ehk *alkM*-ile vastassuunaline (Ratajczak jt., 1998a). Joonisel 9 on esitatud tüvede ICP1 ja COS3 *alkMa* ja *alkMb* operonide struktuurid, mis on oma ehituselt väga sarnased ka tüvede M-1, RAG-1 ja VE-C3 vastavate operonidega (joonisele ei ole neid lisatud).

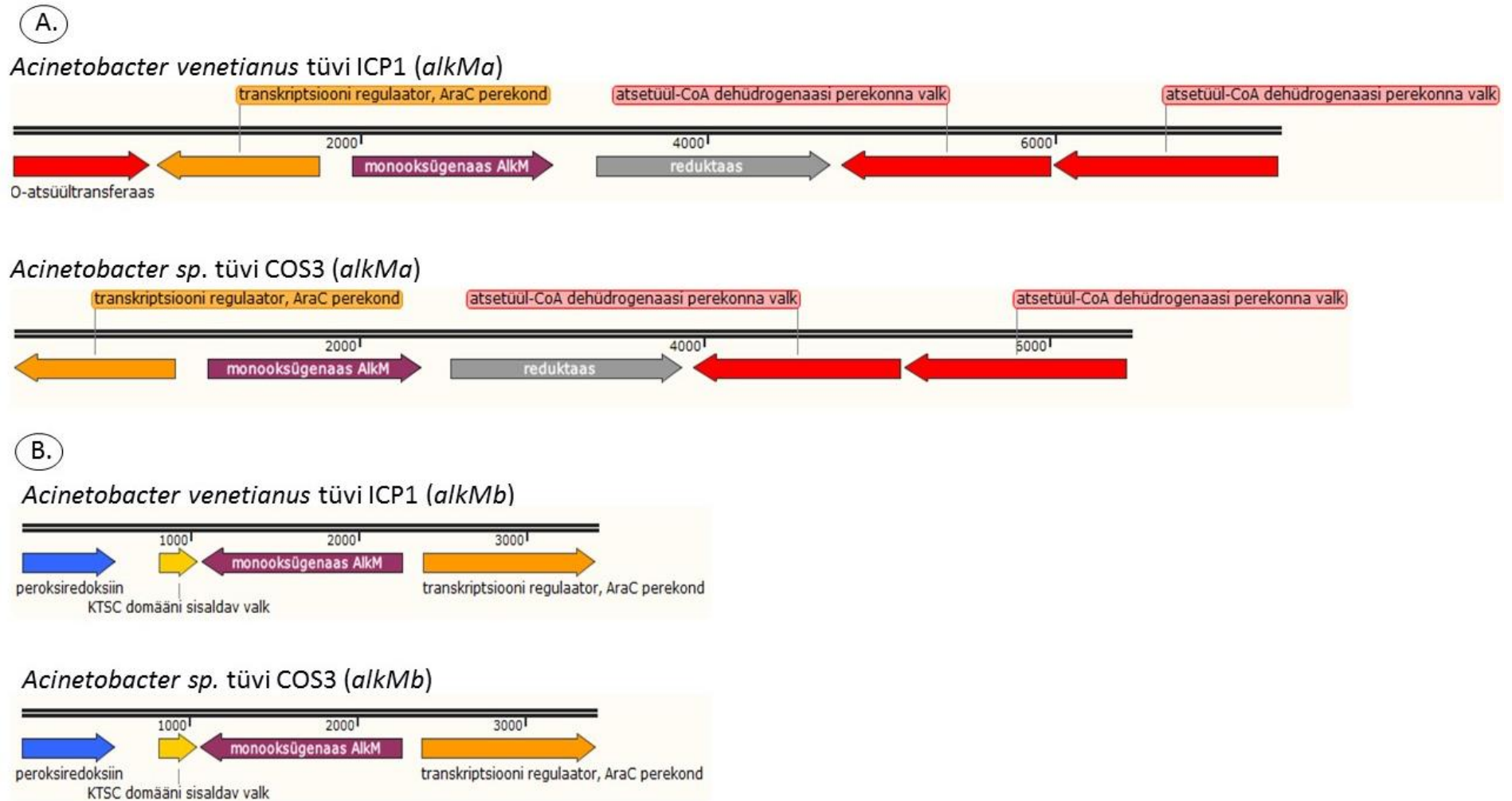
Tüve ICP1 *alkMa* geeni sisaldav operon on 7290 bp pikk (kontiig velvet12; 517 249-524 538 bp), sisaldab kokku 6 ORF-i ning on struktuurselt sarnane tüve COS3 *alkMa* operoniga (6468 bp; kattuva ala ulatuses 97,98% identsed) (Joonis 9A). Operonis kodeerib 1165 bp pikkune *alkMa* järjestus alkaani hüdroksülaasi (96,34% identne tüve COS3 *alkMa* geeniga), millest ülesvoolu jäävad atsetüültransferaasi ja AraC perekonda kuuluva transkriptsiooni regulaatorit kodeerivad geenid. *alkMa* geenist allavoolu asub mõlemal tüvel glutatiooni reduktaasi kodeeriv geen, mis osaleb kirjanduse andmetel arvatavasti n-alkaanide oksüdatsioonil tekkivate hapnikuradikaalide kõrvaldamises (Tani jt., 2001). Alkaani hüdroksülaasi geenist allavoolu paiknevad kaks geeni, mis kodeerivad atsetüül-CoA dehüdrogenaasi perekonda kuuluvaid valke.

Tüvede ICP1 (kontiig velvet12; 118131-121548 bp) ja COS3, *alkMb* geeni sisaldavad operonid on 3418 bp pikad ja sisaldavad nelja ORF-i (Joonis 9B) ning nukleotiidsed järjestused on omavahel 97,63% identsed. Tüvede *alkMb* geenide (mõlemal 1197 bp pikk) järjestuste identsus on 98,5%. *alkMb* geenist ülesvoolu jäävad peroksiredoksiini ja KTSC domääni sisaldavat valku kodeerivad geenid. Esimene neist osaleb rakkude kaitsmisel oksüdatiivse stressi eest (Rocha ja Smith, 1999),

teise täpne funktsioon on teadmata. Allavoolu *alkMb* geenist paikneb operoni ekspressiooni aktiveerimises osalev AraC perekonda kuuluv transkriptsiooni regulaatori geen.

Mitut alkaani hüdroksülaasi omavaid tüvesid on kirjeldatud nii perekonnas *Acinetobacter* kui ka paljudes teistes perekondades, näiteks *Alcanivorax*, *Rhodococcus* jt (van Beilen ja Funhoff, 2007a). Tuntumad n-alkaane lagundavad tüved perekonnast *Acinetobacter* on *Acinetobacter* sp. tüvi M-1 (Tani jt., 2001), *A. oleivorans* tüvi DR1 (Park jt., 2017) ning *A. venetianus* tüved RAG-1 (Liu jt., 2021) ja VE-C3 (Decorosi jt., 2006), mis omavad kahte *alkM* geeni ning *Acinetobacter* sp. tüvi ADP1 (Ratajczak jt., 1998b), millel on kirjeldatud üks *alkM* geen. Tüvede M-1, DR1, RAG-1, VE-C3 ja COS3 kahe *AlkM* ennustatavate aminohappeliste järjestuste omavaheline identsus on vastavalt 52, 61, 66, 59 ja 58%, käesolevas töös uuritud tüvel ICP1 oli see 68%. Tüve ICP1 *AlkMa* järjestuste võrdlemisel ülalnimetatud viie tüve vastavate järjestustega saadi järgmised identsuse protsendid: tüvi M-1 95%, tüvi DR1 87% ning tüved RAG-1, VE-C3 ja COS3 100% (Lisa 1). Võrdluseks kasutatud tüvede *AlkMb* järjestuste identsused tüve ICP1 *AlkMb* järjestusega olid kolme tüve (M-1, RAG-1 ja VE-C3) puhul 93%, tüve DR1 92% ning tüve COS3 järjestusega 99% (Lisa 1). Kuna kirjanduses on näidatud tüvede COS3 (Overholt jt., 2013), RAG-1 (Liu jt., 2021) ja VE-C3 (Decorosi jt., 2016) *AlkMa* osalemist C₂₂-C₃₂ n-alkaanide lagundamises, siis võib oletada, et ka tüvi ICP1 *AlkMa* on võimeline lagundama sama pikki n-alkaane. *AlkMa* osalemist pikemate alkaanide lagundamisel kinnitavad ka katsed tüvedega M-1 (Ishige jt., 2003) ja DR1 (Park jt., 2017), kus ensüüm aktiveeritakse vastavalt kas pikemate kui C₂₂ või C₂₄-C₂₆ n-alkaanide poolt. *Acinetobacter* sp. tüvel ADP1 on kirjeldatud vaid üks *AlkM*, mis osaleb C₇-C₁₈ alkaanide lagundamisel (Ratajczak jt., 1998b) ning on vaid 82% identne tüve ICP1 *AlkMa* järjestusega. Samas kirjanduses on näidatud, et *AlkMb* indutseeritakse lühemaahelaliste n-alkaanide poolt, kusjuures tüveti on induktoriks olevate alkaanide vahemik erinev, tüvel RAG-1 C₁₀-C₂₀ (Liu jt., 2021) tüvel M-1 C_{<22} (Ishige jt., 2003) ja tüvel DR1 C₁₂-C₁₆ (Park jt., 2017).

Tüve ICP1 *alkM* geenide ekspressiooni eest vastutavad transkriptsiooni regulaatorid *alkRa* ja *alkRb* on 51% ulatuses identsed. AraC/XylS regulaatorite perekonda iseloomustab märkimisväärne aminohappelise järjestuse homoloogia, eriti on konserveerunud 100 aminohappeline DNA-d siduv domeen C-terminuses. Regulaatori järjestuse varieeruv osa vastutab efektori seondumise või multimeriseerimise eest ning võib perekonna liikmete seas olla üpriski erinev. (Gallegos jt., 1997) *A. venetianus* ICP1 ja referentstüve COS3 *alkRa* ja *alkRb* järjestuste omavahelisel võrdlusel saadi, et need on vastavalt 99% ja 95% identsed.



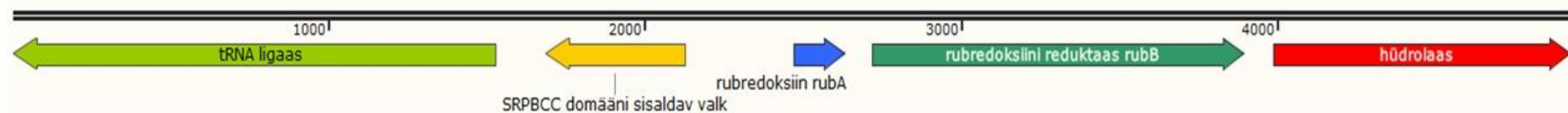
Joonis 9. *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 ja *Acinetobacter* sp. tüve COS3 (AXCD01000003) *alkMa* (A) ja *alkMb* (B) geene sisaldavate operonide struktuurid.

Pseudomonas putida tüvi GPo1, mis on võimeline lagundama C₆-C₁₃ alkaane, omab AlkB järjestuse 55. positsioonis trüptofaani (W). van Beilen ja teised (2005) näitasid oma uurimistöös, et kui asendada trüptofaan (W) lühemat hüdrofoobset külghelat omava aminohappega, näiteks valiini (V), leutsiini (L), isoleutsiini (I) võialaniiniga (A), muutub AlkB substraadi spetsiifilisus ning mutanttüved olid võimelised lagundama lisaks ka pikema ahelaga alkaane (kuni C₁₆). Perekonna *Acinetobacter* tüvede ICP1, COS3, RAG-1, VE-C3, ADP1 ja M-1 AlkMa ning *P. putida* GPo1 AlkB järjestuste joondamisel selgus, et kõikidel *Acinetobacter*´itel paikneb 55. positsioonis leutsiin (Lisa 2). AlkMb järjestuste korral saadi, et tüvedel ICP1, COS3 ja M-1 on selles positsioonis isoleutsiin, kuid tüvedel VE-C3 ja RAG-1 leutsiin (Lisa 3). Saadud tulemuste põhjal võib seega oletada, et võrdluses kasutatud *Acinetobacter*´ite AH-d, AlkMa ja AlkMb, on võimelised lagundama lisaks ka pikemaid n-alkaane kui C₁₃.

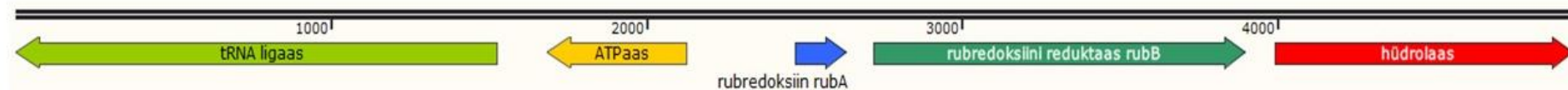
Alkaanide oksüdeerimiseks vastavateks primaarseteks alkoholideks on vaja kolmekomponendilist alkaani hüdroksülaasi kompleksi, mis koosneb alkaani hüdroksülaasist AlkM, rubredoskiinist RubA ja rubredoksiini reduktaasist RubB (Ratajczak jt., 1998b). Kahte viimast valku kodeerivad geenid moodustavad *rubAB* operoni, mis paikneb näiteks *Acinetobacter* sp. tüves M-1 *alkM* geenide operonidest eraldi (Ishige jt., 2003). Ka tüve ICP1 genoomis paikneb *rubAB* operon eraldi (kontiig abyss31; 5972-10906 bp), 4935 bp pikk operon sisaldab kuut ORF-i (Joonis 10) ja on struktuurselt sarnane tüvedes ADP1, COS3, RAG-1 ja VE-C3 kirjeldatud operonidega. Joonisel 10 on välja toodud referentstüvena *Acinetobacter* sp. COS3, mis on tüve ICP1 *rubAB* operoniga nukleotiidide tasemel 98,54% identne. Tüve ICP1 *rubAB* operonides jäävad *rubA* geenist ülesvoolu geenid, mis kodeerivad tRNA ligaasi ja SRPBCC domääni sisaldavat valku. Viimasena mainitud valk võib osaleda hüdrofoobsetele ligandidele seondumisel (Radauer jt., 2008). Erinevalt tüvest ICP1, on tüvel COS3 SRPBCC domääni sisaldavat valku kodeeriva geeni asemel ATPaasi geen. *rubB* geenist allavoolu jääb mõlemal tüvel hüdrolaas. Tüvede ICP1 ja COS3 *rubA* ning *rubB* järjestused on omavahel väga sarnased (identsus vastavalt 100% ja 98,48%). Varem on näidatud, et mikroorganismide RubA ja RubB valgud osalevad erinevates elektronide ülekandmise reaktsioonides, kaasa arvatud elektronide transportimisel AlkM-ile ning nende ensüümide ekspressioon on konstitutiivne ja ei sõltu alkaanide olemasolust. (Ratajczak jt., 1998b)

Ülaltoodud kataboolsete operonide struktuuride analüüsi põhjal võib eeldada, et *Acinetobacter venetianus* tüvel ICP1 on hea kataboolne potentsiaal erineva pikkusega n-alkaanide lagundamiseks. Selle väite kinnitamiseks uuritakse järgnevas peatükis tüve nelja alkaani hüdroksülaasi ekspressiooni alkaanidel C₉ kuni C₃₂ ning toornaftal.

Acinetobacter venetianus tüvi ICP1



Acinetobacter sp. tüvi COS3



Joonis 10. *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 ja *Acinetobacter* sp. tüve COS3 (AXCD01000001) *rubAB* operonide struktuurid.

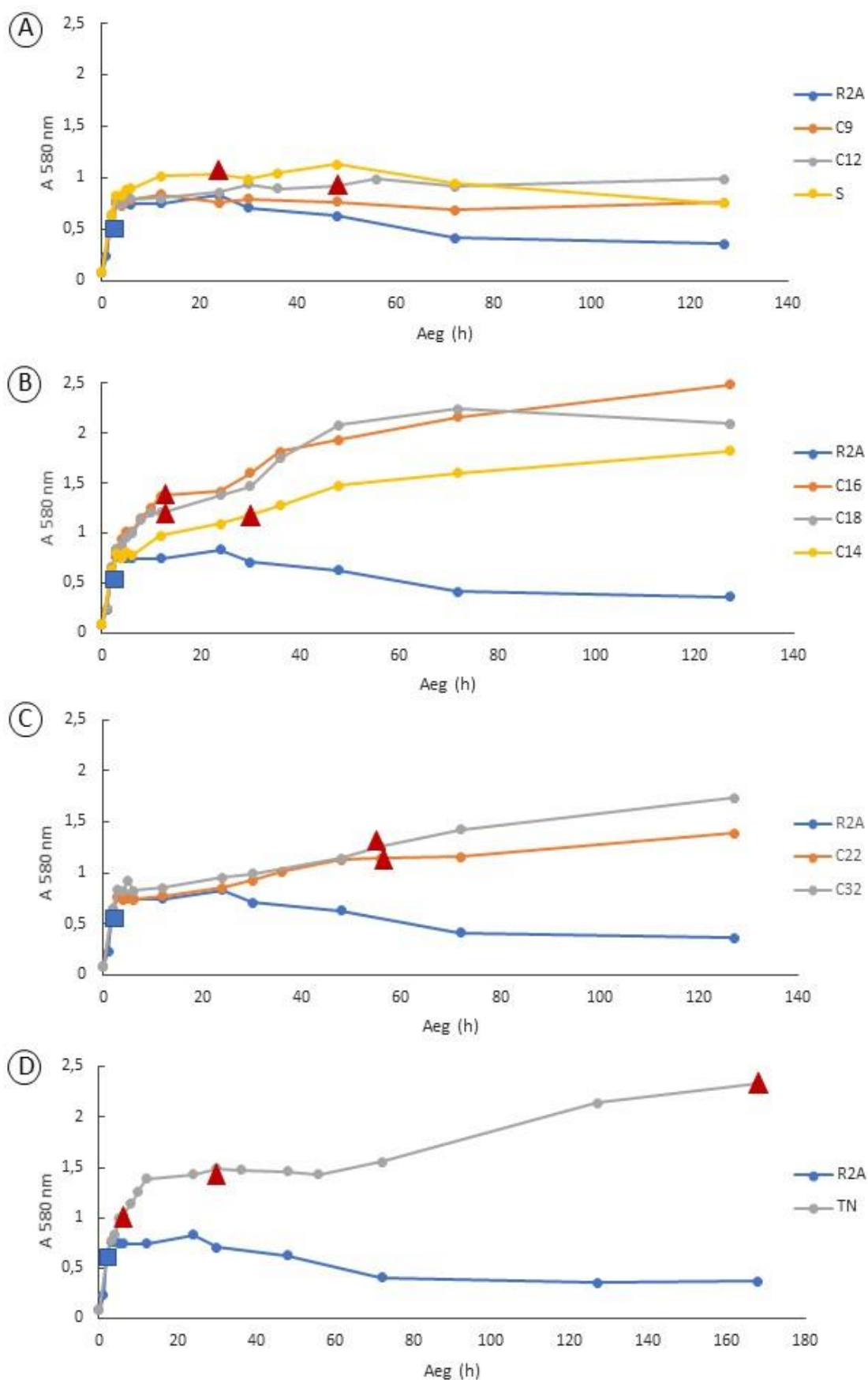
2.3.3. Geenide *alkMa*, *alkMb*, *almA* ja *P450* ekspressiooni analüüs

Acinetobacter venetianus tüvi ICP1 on eraldatud toornafta rafineerimistehase puhastist ning eelnevas uurimustöös selgus, et tüvi on võimeline kasvama nii fenooli kui ka heksadekaani sisaldavatel söötmetel (Viggor jt., 2020). Käesoleva töö raames selgus, et tüve ICP1 genoomis paiknevad hajusalt neli alkaani hüdroksülaasi geeni, mis eeldatavalt annab tüvele võime lagundada laiemat n-alkaanide vahemikku. Oletuse kinnitamiseks määrati alifaatsete ühendite lagundamises osalevate geenide *alkMa*, *alkMb*, *P450* ja *almA* ekspressiooni tasemed tüve ICP1 rakkudes kasutades R2A kasvukeskkonnas induktorina n-alkaane (ahelapikkustega C₉, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈, C₂₂ või C₃₂), hargnenud ahelaga alkaani skvalaan (S) või toornaftat (TN). Geenide ekspressiooni tasemete määramiseks qRT-PCR meetodil eraldati kasvukõvera (Joonis 11) erinevatest faasidest (esimene ajapunkt 2 h peale kasvatuse algust A_{580nm} u 0,6 tähistatud sinise ruuduga; teine ajapunkt tähistatud punase kolmnurgaga, A_{580nm} ≥1) uuritava tüve RNA ja suhtelised mRNA ekspressiooni tasemed arvutati referentsgeeni *rpoB* (RNA polümeraasi beta subühik) suhtes (Joonised 12-13).

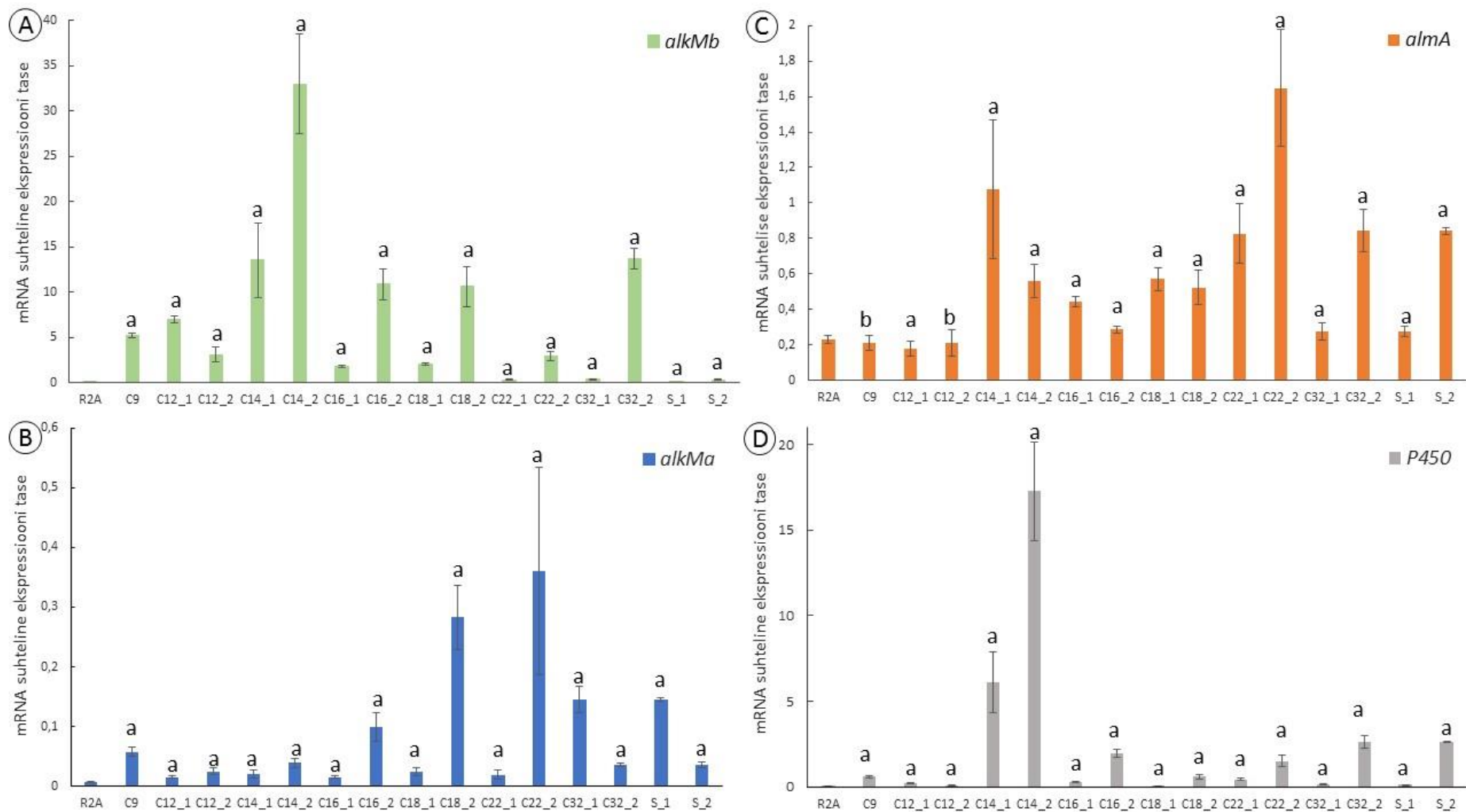
Kõige kõrgem biomassi saagis saadi *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 kasvatamisel C₁₆ sisaldaval R2A söötmel, mõnevõrra madalamad saagised saadi toornafta (TN), C₁₈, C₁₄, C₃₂ ning C₂₂ kasutamisel söötmes (Joonis 11). Kõige madalamad biomassi saagised olid kasvatustes, kus induktorina kasutati lühema ahelalisi alkaane C₉ ja C₁₂ ning hargnenud ahelaga alkaani skvalaani (S) (Joonis 11A). Park ja teised (2017) uurisid *Acinetobacter oleivorans* tüve DR1 kasvu erinevatel alkaanidel ning näitasid samuti, et nimetatud tüvi kasvas kõige paremini heksadekaanil (C₁₆) ja halvemini dodekaanil (C₁₂), mis oli nende töös kasutatud lühim n-alkaan.

Geenide basaalsed ekspressiooni tasemed määrati R2A söötmel (ilma induktorita) kasvanud ICP1 rakkudest. Erinevate geenide basaalsete tasemete väärtused olid erinevad, varieerudes 0,007 kuni 0,231 vastavalt *alkMa* ja *almA* korral (Joonis 12 ja 13).

A. venetianus tüve ICP1 geenide *alkMa* ja *alkMb* ekspressiooni indutseerivad kõik töös kasutatud induktorid (Joonised 12-13). Geeni *alkMa* ekspressiooni tase oli 14 kuni 53 korda kõrgem rakkudes, mida kasvatati pikema ahelaga alkaane C₁₆ - C₃₂ sisaldavatel söötmetel kui indutseerimata rakkudes (Lisa 4). Uuritud geenidest saadi ühed kõige kõrgemad ekspressiooni tasemed geenil *alkMb*, kus induktori juuresolekul mRNA suhteline ekspressiooni tase suurenes näiteks tetradekaanil (C₁₄) juuresolekul 833 korda (Joonis 12A; Lisa 4). Kahe proovipunkti võrdluses saadi *alkM* geenide korral kõrgemad väärtused teise ajapunkti proovides. Erandina võib välja tuua dodekaani C₁₂, kus *alkMb* kõrgem tase määrati just esimeses proovis (Joonis 12



Joonis 11. *A. venetianus* ICP1 kasvukõverad induktorita ja induktoriga R2A söötmel. Esimene proov RNA eraldamiseks võeti 2 h peale katse algust (tähistatud sinise ruuduga), kui suspensiooni neelduvus 580 nm oli u 0,6. Punase kolmnurgaga on tähistatud teine ($A_{580\text{ nm}} \geq 1$) ja toornafta puhul ka kolmas ning neljas RNA proovi võtmise ajapunkt.



Joonis 12. *A. venetianus* ICP1 geenide *alkMb* (A), *alkMa* (B), *almA* (C) ja *P450* (D) suhtelised ekspressiooni tasemed induktorita ja induktoriga (n-alkaanid C9, C12, C14, C16, C18, C22 ja C32; skvalaan, S) R2A söötmel. Esitatud on kolme bioloogilise katse keskmised (kolme paralleeliga) koos standardhällbega. Täht a tulba kohal näitab, et antud induktori korral on geeni suhteline ekspressiooni tase statistiliselt erinev induktorita kasvanud rakkudes määratud tasemest ning täht b, et erinevus ei ole statistiliselt oluline.

A; Lisa 4). Erinevalt geenist *alkMa*, indutseerisid geeni *alkMb* ekspressiooni ka lühemad alkaanid C₉, C₁₂ ja C₁₄ (Joonis 12). Samas saadi kõrged *alkMb* ekspressiooni tasemed ka C₁₈ ja C₃₂ lisamisel kasvukeskkonda (Joonis 12A). Kahe *alkM* geeni erinevat ekspressiooni taset on näidanud oma töös ka Park ja teised (2017) kui nad kasvasid *A. oleivorans* tüve DR1 alkaanidel C₁₂ kuni C₃₀.

Põhinedes kirjanduses toodud andmetele (van Beilen jt., 2005) ja eelnevas peatükis teostatud alkaani hüdroksülaaside AlkM järjestuste analüüsile, tehti oletus, et tüve ICP1 AlkMa ja AlkMb võivad osaleda ka pikemate kui C₁₃ alkaanide lagundamisel. See väide sai käesolevas peatükis kinnitatud, sest mõlemad geenid ekspresseeruvad ka pikemate kui C₁₃ alkaanide juuresolekul (Joonis 12). Varasemad uuringud *Acinetobacter* tüvedega on näidanud, et ühe tüve erinevate *alkM* geenide ekspressioon on indutseeritud erineva pikkusega alkaanide poolt, *alkMa* enamasti pikemate kui C₂₂ (Overholt jt., 2013; Liu jt., 2021; Decorosi jt., 2016) ning *alkMb* C₁₀ kuni C₂₂ alkaanide juuresolekul (Liu jt., 2021; Ishige jt., 2003; Park jt., 2017). Jooniselt 12 on näha, et see üldistus kehtib ka tüve ICP1 korral, kus *alkMa* ekspressiooni indutseerivad alkaanid C₁₆-C₃₂ ning *alkMb* C₉-C₁₈. Erandlik on vaid *alkMb* kõrge ekspressiooni tase kõige pikema n-alkaani, C₃₂, lisamisel söötmele, mida teistes uurimistöodes pole varem näidatud ning vajaks seepärast täiendavat uurimist.

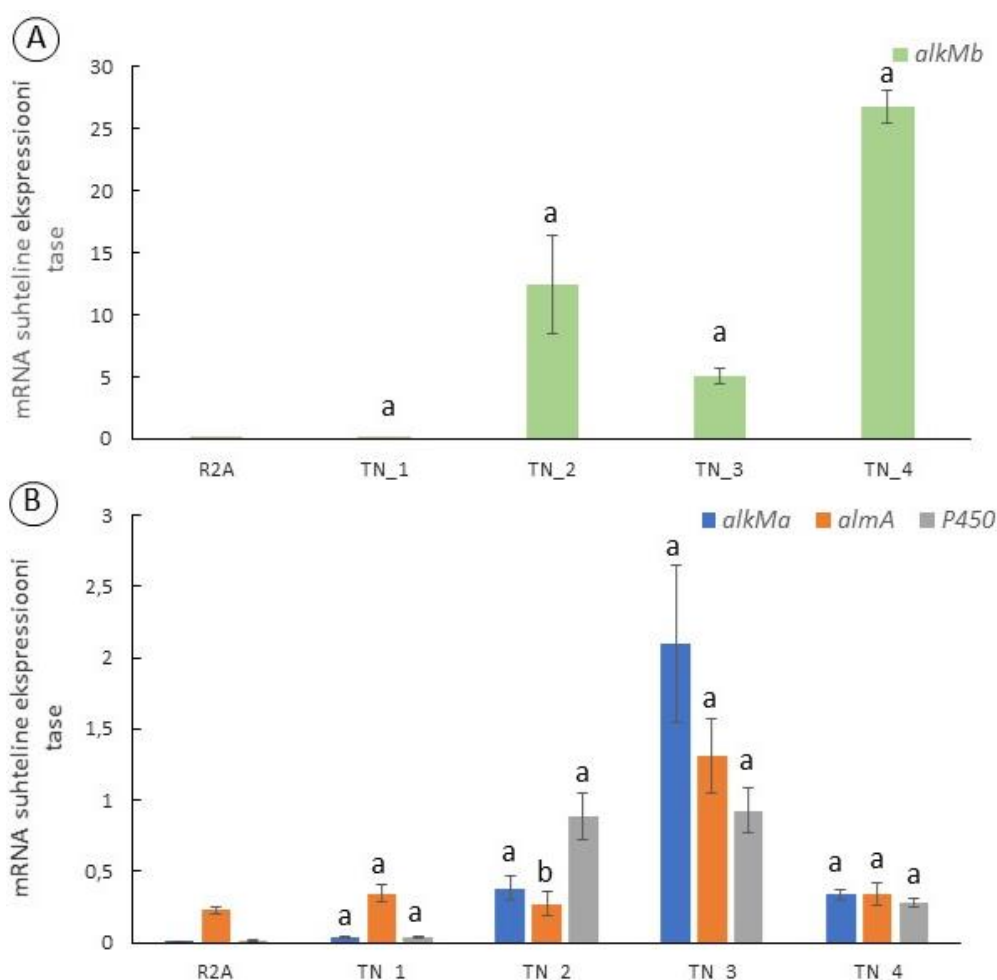
Geeni *P450* ekspressiooni indutseerisid samuti kõik töös kasutatud n-alkaanid (Joonis 12D). Kõige kõrgem geeni *P450* ekspressiooni tase määrati tetradekaani (C₁₄) sisaldaval söötmel, kus tuvastati 1027 korda kõrgem ekspressioon kui induktorita kasvanud rakkudes (Lisa 4). Samas saadi ka kõrgemad ekspressiooni tasemed pikemate alkaanide juuresolekul nagu C₁₆, C₂₂ ja C₃₂. Kirjanduse andmetel osalevad tsütokroom P450 CYP153 perekonda kuuluvad ensüümid lisaks n-alkaanide (C₆-C₁₁) ka teiste alküülasendatud, tsükliliste ja aromaatsete ühendite hüdroksüleerimisel (van Beilen ja Funhoff, 2007b). Gregson jt., 2019 näitasid, et *P450* ekspressioon oli *Alcanivorax borkumensis* tüve SK2 rakkudes indutseeritud ka hargnenud ahelaga alkaanide poolt.

qRT-PCR-il saadud tulemuste põhjal oli geeni *almA* ekspressiooni taseme muutus väike enamuse töös kasutatud n-alkaanide juuresolekul, maksimaalne ekspressiooni taseme tõus määrati C₂₂ sisaldaval söötmel kasvanud rakkudes ning see oli vaid 7,1 korda kõrgem kui induktorita kasvanud rakkudes (Lisa 4; Joonis 12C). Tüve ICP1 rakkudes, mis olid kasvanud alkaanide C₁₄, C₁₆ ja C₁₈ juuresolekul, olid *almA* ekspressiooni tasemed kõrgemad esimeses proovipunktis (Joonis 12C). Samas pikema ahelaga alkaane (C₂₂ ja C₃₂) sisaldavatel söötmetel saadi kõrgemad väärtused teisest proovipunktist eraldatud rakkudes (Joonis 12C). Muriel-

Millan ja teiste (2019) saadud andmete põhjal tõusis ka *Pseudomonas aeruginosa* tüve GOM1 *almA* ekspressiooni tase võrreldes kontrolliga 3-5 korda alkaanidel, mille pikkus oli C₈-C₁₆, ning 6-7 korda alkaanidel, mis olid pikemad kui C₂₀. Kuigi AlmA osaleb tavaliselt pikema ahelaga n-alkaanide lagundamisel, on näidatud *Alcanivorax borkumensis* tüves selle induktsiooni ka lühemate alkaanide, näiteks C₁₄, juuresolekul (Gregson jt., 2019). Samas Wang ja Shao (2012) leidsid, et erinevate *Marinobacter*´ite *almA* ekspressiooni indutseerivad n-alkaanid C₂₄-C₃₆ ning hargnenud ahelaga alkaan pristaan. *Acinetobacter oleivorans* DR1 kasvatamisel alkaanidel C₁₂-C₃₀ olid geenide *almA1* ja *almA2* ekspressiooni tasemed tunduvalt madalamad kui geenidel *alkM1* ja *alkM2* ning töö autorid Park ja teised (2017) tegid järelduse, et AlmA-de panus alkaanide lagundamisel on ebaoluline. Liu ja teised (2021) näitasid *Acinetobacter venetianus* tüve RAG-1 alkaani hüdroksülaaside erinevate deletsiooni mutantide konstrueerimisega, et AlmA osaleb C₂₈-C₃₈ alkaanide lagundamisel. Käesolevas töös saadud *almA* ekspressiooni andmete põhjal võib oletada, et tüve ICP1 AlmA osalus alkaanide C₉-C₃₂ lagundamisel on madal ning sarnaneb *A. oleivorans* tüvega DR1 saadud tulemustega. Täpsustamaks tüve ICP1 geeni *almA* rolli võiks järgmistes töödes määrata ekspressiooni tasemed veel pikemate ahelatega n-alkaanide ning lühemate hargnenud ahelaga alkaanide juuresolekul.

Hargnenud ahelaga alkaani, skvalaani (S), sisaldaval söötmel kasvanud ICP1 rakkudes (Joonis 11A) tõusis geenide *alkMb*, *alkMa* ja *P450* ekspressiooni tase indutseerimata rakkudega võrreldes vastavalt 9, 3 ja 3 korda (Joonis 12; Lisa 4). Geeni *almA* ekspressiooni skvalaan ei indutseerinud. Põhjus, miks hargnenud ahelaga alkaane on mikroorganismidel tihtipeale raskem lagundada on see, et nende rakku jõudmine võib olla takistatud või segavad külgahelad alkaani seondumist ensüümi aktiivtsentrisse. Substraadi struktuur võib lisaks tekitada raskusi ka järgnevate β-oksüdatsiooni raja ensüümide töös. (Schaffer jt., 1979) Kirjanduses on kirjeldatud üksikuid skvalaani (2,6,10,15,19,23-heksametüültetrakosaan, C₃₀H₆₂) lagundavaid baktereid, sellised on näiteks *Alkanindiges illinoisensis* (Bogan jt., 2003) ja erinevad *Mycobacterium* liigid (Berekaa ja Steinbüchel, 2000). Samas skvalaanist lühemaid hargnenud ahelaga alkaane, pristaani (2,6,10,14-tetrametüülpentadekaan; C₁₉H₄₀) ja fütaani (2,6,10,14-tetrametüülheksadekaan; C₂₀H₄₂), on võimelised lagundama perekondadesse *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Nocardia* jt. kuuluvad tüved. *Alcanivorax borkumensis* tüves SK2 indutseeriti nimetatud ühendite juuresolekul geenide *almA* ja *P450* erinevate homoloogide ekspressioon. (Gregson jt., 2019) Tüve ICP1 biomassi saagis skvalaani sisaldaval söötmel ei olnud võrreldes induktorita söötmega väga palju kõrgem ning geenide ekspressiooni taseme muutused olid võrreldes teiste induktoritega suhteliselt madalad. Kinnitamaks tüve ICP1 võimet lagundada

hargnenud ahelaga alkaane tuleks teha lisa katsed lühema hargnenud ahelaga alkaanidega, määrata geenide ekspressiooni tasemed ning substraatide lagundamise määr.



Joonis 13. A. *venetianus* ICP1 geenide *alkMb* (A) ja *alkMa*, *almA*, *P450* (B) suhtelised ekspressioon tasemed induktorita ja induktoriga (toornafta, TN) R2A söötmel. Esitatud on kolme bioloogilise katse keskmised (kolme paralleeliga) koos standardhלבega. Täht a tulba kohal näitab, et antud induktori korral on geeni suhteline ekspressiooni tase statistiliselt erinev induktorita kasvanud rakkudes määratud tasemest ning täht b, et erinevus ei ole statistiliselt oluline.

Toornafta on kompleksne segu, mis sisaldab n-alkaane, hargnenud ahelaga alkaane, aromaatsaid ühendeid ja polütsüklilisi aromaatsaid ühendeid. Toornafta koostis on leiukohati erinev, kuid n-alkaanidest on enamasti esindatud C₁₀-C₃₅. (Chen jt., 2020) Käesolevas töös võeti toornaftat sisaldaval R2A söötmel kasvanud tüve ICP1 nelja alkaani hüdroksülaasi geeni ekspressiooni tasemete määramiseks kasvukõvera erinevatest osadest kokku neli proovi (Joonis 11D). Sarnaselt üksik substraatidele olid geenide ekspressiooni tasemed kõrgemad

teises, kolmandas ja neljandas proovipunktis. Eriti kõrge oli geenilt *alkMb* ekspresseeritud mRNA hulk neljandast ajapunktist võetud ICP1 rakkudes, kus suhteline mRNA ekspressiooni tase oli 676 korda kõrgem kui ilma induktorita kasvanud rakkudes (Joonis 13A; Lisa 4). Samas ei tõusnud *alkMb* ekspressiooni tase ajas ühtlaselt, teises ajapunktis olid tasemed kaks korda ning kolmandas neli korda madalamad kui viimasest proovipunktist eraldatud rakkudest määratud väärtused. Geeni *alkMa* kõige kõrgem ekspressiooni tase oli kolmandas proovipunktis, kus mRNA suhteline tase tõusis 308 korda võrreldes indutseerimata rakkudega. Ka geenide *P450* ja *almA* ekspressiooni tasemed olid kõrgemad just kolmandas proovipunktis. (Joonis 13B) Mis põhjusel *alkM* geenide ekspressiooni tasemed erinevates kasvufaasides olid erinevad, vajab täiendavaid uuringuid. Näiteks võiks määrata proovides ka toornafta komponentide lagundamise määra.

Erineva koostisega toornaftade lagundamist on uuritud *A. venetianus* tüvega RAG-1, mille genoomist leiti kolm alkaani hüdroksülaasi kodeerivat geeni *alkMa*, *alkMb* ja *almA*. Liu ja teised (2021) näitasid erinevate AH deletsioonitüvedega, et toornaftas leiduvate alkaanide biodegradatsiooni efektiivsust saab suurendada kombineerides erinevaid tüvesid vastavalt alkaanide sisaldusele. Sarnaseid katseid võiks planeerida ka tüvega ICP1.

Kokkuvõtteks võib öelda, et *Acinetobacter venetianus* tüvi ICP1 on võimeline kasvama n-alkaanidel ahela pikkusega C₁₂-C₃₂. Kõige rohkem biomassi tekkis keskmise ja pika ahelaga n-alkaanide ning toornafta juuresolekul. Tüve ICP1 genoomist leitud alkaani hüdroksülaasi geenide *alkMa*, *alkMb* ja *P450* ekspressiooni tasemed olid kõigi töös kasutatud induktorite korral kõrgemad kui induktorita söötmes kasvanud rakkudes. Kõige madalamad ekspressiooni tasemed saadi rakkudes, mis eraldati skvalaani sisaldavast kasvukeskkonnast, mistõttu võib oletada, et tüvi ICP1 ei suuda lagundada väga pikki hargnenud ahelaga alkaane. C₉-C₁₈ ja C₃₂ alkaanide lagundamisel osalevad tõenäoliselt alkaani hüdroksülaasid *AlkMb*, C₁₄-C₁₆ ja C₂₂-C₃₂ *P450* ning C₁₈-C₂₂ alkaanide degradatsioonil *AlkMa*. Geeni *almA* ekspressiooni tasemed olid töös kasutatud alkaanide korral madalad, kõige kõrgemad tasemed saadi C₂₂ sisaldaval söötmel kasvanud rakkudes. Katsed üksik substraatidega näitasid, et tüvel ICP1 on head eeldused lagundada keeruka koostisega toornaftat. Nelja alkaani hüdroksülaasi kõrgeid ekspressiooni tasemeid toornaftat sisaldavates söötmetes kinnitasid hüpoteesi ning seepärast tuleks jätkata katseid *Acinetobacter venetianus* tüvega ICP1 ning testida selle rakendatavust naftareostuse likvideerimisel bioaugmentatsiooni meetodil.

Tüve ICP1 kasvatamisel toornaftat sisaldavatel söötmetel oli näha, et 48 h möödumisel ei olnud kolvi seinad enam toornaftaga kaetud (Lisa 5). Perekonnas *Acinetobacter* on leitud tüvesid, mis

on võimelised tootma bioemulgaatoreid ja pindaktiivseid aineid hüdrofoobsete ühendite omastamiseks (Ron ja Rosenberg, 2014). Näiteks on leitud, et *Acinetobacter* sp. HC8-3S (Chen jt., 2020) ja *A. venetianus* RAG-1 (Liu jt., 2021) rakkude kasvatamisel toornaftat sisaldavas keskkonnas toodavad rakud naftasüivesinike omastamise ja lagundamise kiirendamiseks emulgaatorit nimega emulsaan. Seetõttu vääraks uurimist ka tüve ICP1 võime moodustada nimetatud ühendeid.

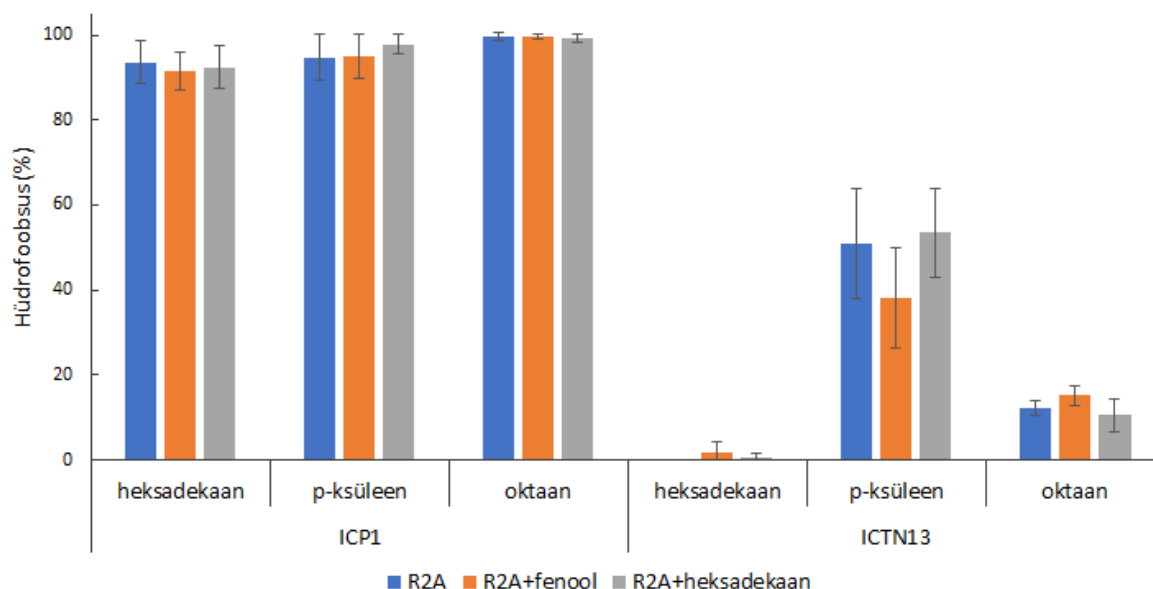
2.3.4. Tüve ICP1 rakupinna hüdrofoobsus

Alkaanid on hüdrofoobsed ja vees halvasti lahustuvad ühendid, seega peavad nende omastamiseks mikroorganismid omama hüdrofoobset rakupinda. Säärane omadus on omane näiteks *Acinetobacter*'i liikidele, mis on võimelised kleepuma ehk agregeeruma hüdrofoobsetele pindadele. Mikroorganismide adhesiivne omadus on kasulik biofiltratsiooniprotsessides ja biofilmi moodustamises. (Ishii jt., 2004) Biofilm on pinnaga seotud mikroobirakkude kogum, milles biomassi tihedus on kõrge ja milles saavad mikroobid omavahel suhelda ning metaboliite jagada. Tänu biofilmile on bakteritel eelis toksiliste ühendite nagu hüdrofoobsete saasteainete lagundamisel. (Viggor jt., 2020)

Käesolevas töös uuriti *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 pinna suhtelist hüdrofoobsust kasutades MATH (*Microbial Adherence to Hydrocarbons*) testi (vt. 2.2.7). Selleks kasvatati rakke üleöö R2A, R2A+1,3 mM fenool või R2A+0,1% heksadekaani söötmetel, tsentrifuugimisel eraldatud rakud pesti PUM puhvriga ja valmistati kindla neelduvusega suspensioon. Valmistatud lahusele lisati n-heksadekaani, oktaani või p-ksüleenini ja segati seejärel vorteksil ning lasti seista vee ja orgaanilise solvendi kihtide lahutamiseks. Tekkinud vesifaasist võeti proov ja mõõdeti selle suspensiooni neelduvust. Saadud tulemuste põhjal arvutati *A. venetianus* ICP1 ja referentstüve suhtelist hüdrofoobsust, kasutades peatükis 2.2.7. toodud valemit ja koostati Joonisel 14 kujutletav diagramm. Referentstüvena kasutati *Pseudomonas oleovorans* tüve ICTN13, mis on samuti eraldatud Indias asuvast toornafta rafineerimistehase puhastist võetud proovist ning on võimeline kasvama toornaftat sisaldaval söötmel (Viggor jt., 2020). *Pseudomonas* perekonna erinevate liikide puhul, näiteks *Pseudomonas putida* tüvedel, on täheldatud, et üldiselt on nende rakupind hüdrofiilne, kuid toksiliste substraatide olemasolul on nad võimelised suurendama pinna hüdrofoobsust (Farrell ja Quilty, 2002).

Sõltumata ettekasvatuseks kasutatud söötmest ning MATH testis lisatud orgaanilisest ühendist, vähenes ICP1 rakkudega suspensiooni ehk veefaasi neelduvus peale loksutamist enam kui 91% (Joonis 14). Kõrged hüdrofoobsuse väärtused näitavad seega, et ICP1 on afiinne uurimistöös

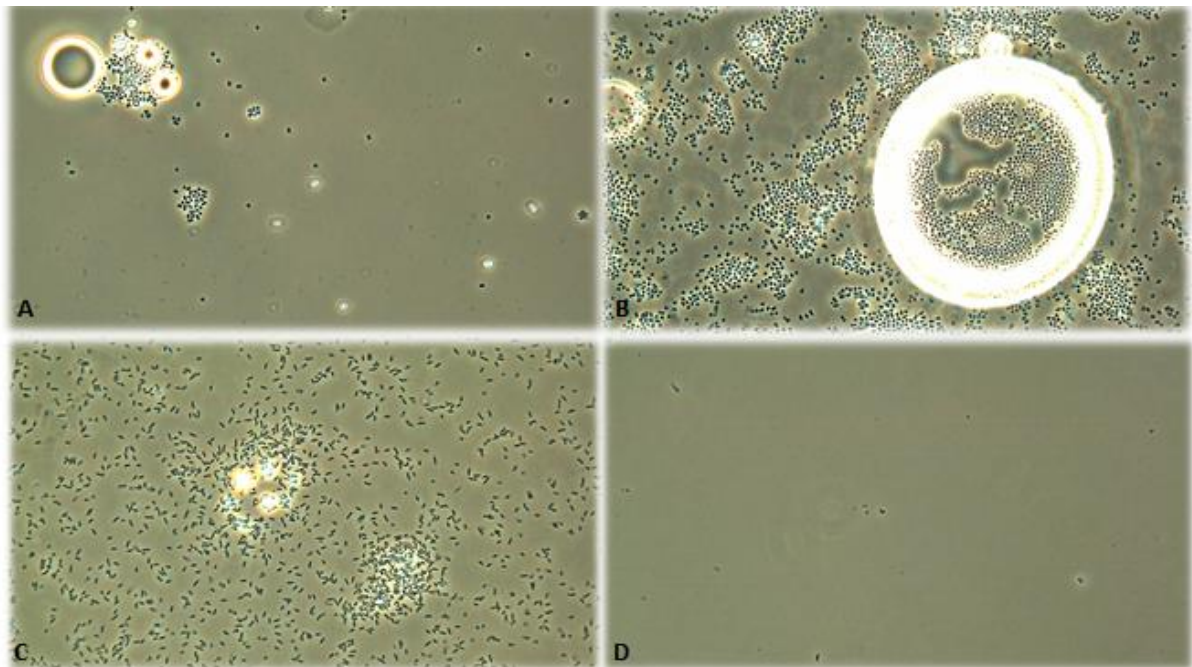
kasutatud lahustite suhtes. Referentstüve ICTN13 puhul oli muutus veefaasi neelduvuses märkimisväärselt väiksem jäädes heksadekaani ja oktaani korral alla 15%, mis viitab hüdrofiilsele rakupinnale. P-ksüleeni kasutamisel saadi aga tüve ICTN13 puhul kõrgemad väärtused (ligikaudu 50%).



Joonis 14. *Acinetobacter venetianus* ICP1 ja *Pseudomonas oleovorans* ICTN13 rakkude suhtelise hüdrofoobsuse määramine MATH testiga heksadekaani, p-ksüleeni ja oktaani suhtes. ICP1 ja ICTN13 rakke kasvatati üleöö R2A (sinine), R2A+1,3 mM fenool (oranž) või R2A+0,1% heksadekaani (hall) söötmetel. Joonisel on esitatud kolme bioloogilise kontrolli (kolm tehnilist kontrolli) tulemused koos standardhälbega.

Lisaks uuriti vee- ja orgaanikafaasist võetud proovidest tehtud preparaate mikroskoobis (Joonis 15). Vaatlused kinnitasid MATH testis saadud tulemusi - vesifaasis (Joonis 15A) on *Acinetobacter venetianus* ICP1 rakke vähem kui heksadekaani (Joonis 15B) faasis. *Pseudomonas oleovorans* ICTN13 puhul on aga rakkude jaotus võrreldes uuritava tüvega vastupidine - vesifaasist võetud proov (Joonis 15C) sisaldab tunduvalt rohkem rakke kui heksadekaani faasisist võetud proov (Joonis 15D).

Nii MATH analüüsi kui ka mikroskoobis vaatlemisel saadud tulemuste põhjal saab seega väita, et *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 puhul on tegu hüdrofoobset rakupinda omava rakuga. Sarnase tulemuse, kus *Acinetobacter* omas kõrget hüdrofoobset pinda, sai ka Hoštacká, kes



Joonis 15. R2A söötmel kasvatatud *Acinetobacter venetianus* ICP1 (A, B) ja *Pseudomonas oleovorans* ICTN13 (C, D) rakud MATH testi vesifaasist (A ja C) ja heksadekaani faasist (B ja D) võetud proovides. Fotod on tehtud faaskontrast mikroskoobiga Olympus BX41 (1000x suurendus).

uuris *Acinetobacter baumannii* tüvesid. Hošacká katse käigus hinnati *A. baumannii* afiinsust ksüleeni suhtes ja saadi, et bakter kleepus 90-94% juhtudest aromaatsese süsivesinikule. Tänu hüdrofoobsele rakupinnale on seega bakter võimeline interakteeruma hüdrofoobsete ühenditega näiteks n-alkaanidega. Samuti võimaldab hüdrofoobne rakupind *Acinetobacter*'itel biofilmi moodustada. Tüve ICP1 biofilmi moodustamist on varasemalt jälgitud Viggor ja teised (2020) fenooli sisaldaval söötmel. Peale 8 tunnist kultiveerimist selgus, et tüvi oli võimeline efektiivselt agregaatide moodustama. MATH analüüsis käigus selgus ka, et töös kasutatud referentstüve ICTN13 puhul oli bakter hüdrofoobsema rakupinnaga kui tüve oli kasvatatud heksadekaani või fenooli sisaldaval söötmel. Saadud tulemus kattub ka Farrell ja Quilty (2002) saadud andmetega. *A. venetianus* ICP1 puhul aga sellist tulemust märgata polnud, sest tüvi ICP1 omas kõrget hüdrofoobset rakupinda isegi juhul, kui seda oli kasvatatud orgaanikat mittesisaldaval R2A söötmel. Seega *Acinetobacter venetianus* tüvi ICP1 ei muuda oma rakupinna hüdrofoobsust tulenevalt substraadist.

KOKKUVÕTE

Toornafta on looduslik orgaaniliste ühendite segu, mis sisaldab erinevaid süsivesinikke, sealhulgas alkaane. Kuna tegu on väärtusliku toorainega, mida kaevandatakse ja tarbitakse intensiivselt, on paratamatu, et nende tegevuste käigus võib tekkida elusorganismidele ohtlik keskkonnareostus. Naftareostuse kõrvaldamiseks on oluline efektiivsete ja keskkonnasõbralike remediatsiooni meetodite olemasolu. Üheks võimaluseks on näiteks kasutada biotervendamist, mille puhul puhastatakse keskkonda sattunud naftasaaduste lagundamiseks mikroobe. Efektiivse biotervendamise toimumiseks on oluline kindlaks teha kasutatavate mikroorganismide füsioloogiline ja ensümaatiline võimekus.

Käesolevas bakalaureusetöö põhieesmärgiks oli tuua välja India rafineerimistehase puhastist isoleeritud *Acinetobacter venetianus* tüve ICP1 geneetilised tegurid, mis vastutavad alkaanide lagundamise eest ning määrata alkaani hüdroksülaasi geenide ekspressiooni tasemed erinevate induktorite (n-alkaanide, hargnenud ahelaga alkaanide ja toornafta) juuresolekul. Kuna alkaanid on hüdrofoobsed ühendid, uuriti ka tüve ICP1 rakupinna hüdrofoobsust.

Töös saadud tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

- *A. venetianus* tüve ICP1 genoomis paiknevad hajusalt eraldi operonides neli perekonna *Acinetobacter* tüvedele spetsiifilist alkaani hüdroksülaasi geeni: *alkMa*, *alkMb*, *almA* ja *P450*;
- geeni *alkMa* ekspressiooni indutseerisid n-alkaanid vahemikus C_{18} - C_{22} ;
- geeni *alkMb* ekspressiooni indutseerisid n-alkaanid C_9 - C_{18} ja C_{32} ;
- geeni *P450* ekspressiooni indutseerisid n-alkaanid C_{14} - C_{16} ja C_{22} - C_{32} ;
- geeni *almA* ekspressiooni tase oli kõige kõrgem n-alkaani C_{22} juuresolekul;
- toornafta indutseeris kõigi nelja geeni ekspressiooni;
- tüve ICP1 rakupind on hüdrofoobne.

Käesoleva bakalaureusetöös saadud tulemuste põhjal võib seega öelda, et *Acinetobacter venetianus* tüvi ICP1 on võimeline lagundama keskmise ja pika ahelaga alkaane ning võiks seepärast leida rakendust toornafta või mõne muu kütuse reostuse kõrvaldamisel. Oluline on siinkohal mainida, et tüvi ICP1 on võimeline lagundama ka aromaatsaid ühendeid (fenooli). Varem arvati, et selline metaboolne aktiivsus ei ole ühes bakteris võimalik, kuid nüüd kui genoomide sekveneerimine on levinud, leitakse selliseid baktereid järjest rohkem.

Characterization of the degradation of alkanes in the *Acinetobacter venetianus* strain ICP1

Celeste Peterson

Summary

Crude oil is a natural mixture of organic compounds that contains various hydrocarbons, including alkanes. As it is valuable raw material, it has been intensively mined and consumed. These activities can cause hazardous pollution that affects all living organisms. It is important to have effective and environmentally friendly remediation methods to eliminate oil pollution. One possible method is the use of bioremediation, where microbes are used to remove petroleum products released into the environment. It is important to know the physiological and enzymatic capacity of the microorganisms used for the bioremediation.

The main focus of the bachelor's thesis was to identify the genetic factors responsible for the degradation of alkanes in the *Acinetobacter venetianus* strain ICP1 isolated from the wastewater treatment plant of an Indian refinery. Another objective was to determine the expression levels of alkane hydroxylase genes in the presence of various inducers (n-alkanes, branched alkanes and crude oil). Because alkanes are hydrophobic compounds, the cell surface hydrophobicity of strain ICP1 was also studied.

The result obtained in the current work can be summarized as follows:

- four *Acinetobacter*-specific alkane hydroxylase genes, *alkMa*, *alkMb*, *almA* and *P450*, are scattered in separate operons of the genome of the *A. venetianus* ICP1;
- expression of the gene *alkMa* was induced by n-alkanes in the range C₁₈-C₂₂;
- expression of the gene *alkMb* was induced by n-alkanes C₉-C₁₈ and C₃₂;
- expression of the gene *P450* was induced by n-alkanes C₁₄-C₁₆ and C₂₂-C₃₂;
- expression level of the gene *almA* was highest in the presence of n-alkane C₂₂;
- crude oil induced the expression of all four genes;
- the cell surface of strain ICP1 is hydrophobic.

The results of this study indicate that *Acinetobacter venetianus* strain ICP1 is capable of degrading medium and long chain alkanes and may therefore find application in the elimination of the crude oil or other fuel pollution. It is important to mention that strain ICP1 is also able to degrade aromatic compounds such as phenol. It was previously thought that such metabolic activity was not possible in a single bacterium, but now that genome sequencing is widespread, such bacterium are now more and more being found.

Abdel-El-Haleem, D. (2003). *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. Afr. J. Biotechnol. 2: 71-75.

Agamuthu, P., Tan, Y. S., Fauziah, B. H. (2013). Bioremediation of hydrocarbon contaminated sites using organic waste. Procedia. Environ. Sci. 18: 694–702.

Ahmad, A. A., Muhammad, I., Shah, T., Kalwar, Q., Zhang, J., Liang, Z., Mei, d., Juanshan, Z., Yan, P., Zhi, D. X., Rui-Jun, L. (2020). Remediation Methods of Crude Oil Contaminated Soil. World J. Agri. Soil Sci. 4(3).

Ahmadun, F. R., Pendashteh, A., Chuah, A., Biak, D. R. A., Madaeni, S. S., Abidin, Z. Z. (2009). Review of technologies for oil and gas produced water treatment. J. Hazard. Mater. 170(2-3): 530-551.

Asperger, O., Naumann, A., Kleber, H. P. (1981). Occurrence of cytochrome P-450 in *Acinetobacter* strains after growth on n-hexadecane. FEMS Microbiol. Lett. 11: 309-312.

Ayala, M., Torres, E. (2004). Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective. Appl. Catal. J. 272: 1-13.

Balba, M. T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. J. Microbiol. Meth. 32(2): 155-164.

Baniasadi, M. (2018). A Comprehensive Review on the Bioremediation of Oil Spills. Microbiol. Action on Hydrocarb. lk. 223-254.

Benedek, T., Tánácsics, A., Szabó, I., Farkas, M., Szoboszlay, S., Fábíán, K., Maróti, G., Kriszt, B. (2016) Polyphasic analysis of an *Azoarcus-Leptothrix*-dominated bacterial biofilm developed on a stainless steel surface in a gasoline-contaminated hypoxic groundwater. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 23: 9019–9035.

Berekaa, M. M., Steinbüchel, A. (2000). Microbial degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane (squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4462–4467.

Bergogne-Bérézin, E., Towner, K. J. (1996) *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 9: 148-165.

Bihari, Z., Pettkó-Szandtner, A., Csanádi, G., Balázs, M., Bartos, P., Kesserű, P., Kiss, I., Mécs, I. (2007). Isolation and characterization of a novel n-alkane-degrading strain, *Acinetobacter haemolyticus* AR-46. Z. Naturforsch. 62c: 285-295.

- Bogan, B. W., Sullivan, W. R., Kayser, K. J., Derr, K., Aldrich, H. C., Paterek, R.** (2003). *Alkanindiges illinoisensis* gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils. *Int. J. Syst. Evol. Micro.* 53(5).
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., Sharma, A.** (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Ann. Microbiol.* 63: 417-431.
- Chen, W., Kong, Y., li, J., Sun, Y., Min, J., Hu X.** (2020). Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers. *Int. Biodeter. Biodegr.* 154: 105047.
- Coelho, A., Castro, A. V., Dezotti, M., Sant'Anna Jr, G. L.** (2006). Treatment of petroleum refinery sourwater by advanced oxidation processes. *J. Hazard. Mater.* 137(1): 178-184.
- Coon, M. J.** (2005). Omega oxygenases: nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 338: 378–385.
- Czarny, J., Staninska-Pięta, J., Piotrowska-Cyplik, A., Juzwa, W., Wolniewicz, A., Marecik, R., Ławniczak, Ł., Chrzanowski Ł.** (2019). *Acinetobacter* sp. as the key player in diesel oil degrading community exposed to PAHs and heavy metals. *J. of Hazard. Mater.* 383: 121168.
- Dave, D., Ghaly A. E.** (2011). Remediation technology for marine oil spills: A critical review and comparative analyses. *Americ. J. Environ. Sci.* 7(5): 423-440.
- De Boer, J., Wagelmans, M.** (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil—practical options for remediation. *CLEAN-Soil Air Water.* 44(6): 648-653.
- Decorosi, F., Mengoni, A., Baldi, F., Fani, R.** (2006). Identification of alkane monooxygenase genes in *Acinetobacter venetianus* VE-C3 and analysis of mutants impaired in diesel fuel degradation. *Ann. Microbiol.* 56(3): 207-214.
- Ezeji, U. E., Anyadoh, S. O., Ibekwe, V. I.** (2007). Clean up of crude oil-contaminated soil. *Terrestrial and aquatic environ. Toxicology.* 1(2): 54-59.
- Farrell, A., Quilty, B.** (2002). Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 28(6): 316–324.
- Fondi, M., Maida, I., Perrin, E., Orlandini, V., Torre, L. L., Bosi, E., Negroni, A., Zanaroli, G., Fava, F., Decorosi, F., Giovannetti, L., Viti, C., Vanechoutte, M., Dijkshoorn, L., Fani, R.** (2016). Genomic and phenotypic characterization of the species *Acinetobacter venetianus*. *Nature.* 6: 21985.
- Fujii, T., Narikawa, T., Sumisa, F., Arisawa, A., Takeda, K., Kato, J.** (2006). Production of α,ω -alkanediols using *Escherichia coli* expressing a cytochrome P450 from *Acinetobacter* sp. OC4. *Biosci. Biotech. Bioch.* 70(6): 1379–1385.

- 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.
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., Ramos, J.L.** (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(4): 393-410.
- Gloyna, E. F, Ford, D. L.** (2020). Petrochemical effluents treatment practices. lk. 6.
- Goldman, S., Shabtai, Y., Rubinovitz, C., Rosenberg, E., Gutnick, D. L.** (1982). Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: distribution of cell-free and cell-associated cross-reacting material. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 165-170.
- Gregson, B. H., Metodieva, G., Metodiev, M. V., McKew, B.** (2019). Differential protein expression during growth on linear versus branched alkanes in the obligate marine hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2T. *Environ. Microbiol.* 21.
- 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.
- Hamoda, M. F., Al-Ghusain, I. A.** (1998). Analysis of organic removal rates in the aerated submerged fixed film process. *Water. Sci. Technol.* 38: 213–221.
- Head, I. M., Jones, D. M., Röling W. F. M.** (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Rev. Microbiol.* 4: 173-182.
- Hošťacká, A.** (1999). Alterations in surface hydrophobicity of *Acinetobacter baumannii* induced by meropenem. *Folia Microbiol.* 44: 267.
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., Sleator, R. D.** (2012). *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence.* 3(3): 243-250.
- Hyne, N. J.** (2001). Nontechnical guide to petroleum geology, exploration, drilling, and production. PennWell Corporation (2. väljaanne). lk. 1-14.
- IPIECA.** (2014). Petroleum refinery waste management and minimization (An IPIECA good practice guide). lk. 19-21.
- Ishige, T., Tani, A., K., Sakai, Y., Kato, N.** (2000). Long-chain aldehyde dehydrogenase that participates in n-alkane utilization and wax ester synthesis in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3481-3486.
- Ishige, T., Tani, A., Sakai, Y., Kato, N.** (2003). Wax ester production by bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 244-250.
- Ishige, T., Tani, A., Takabe, K., Kawasaki, K., Sakai, Y., Kato, N.** (2002). Wax ester production from n-alkanes by *Acinetobacter* sp. strain M-1: ultrastructure of cellular inclusions and role of acyl coenzyme A reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1192-1195.

- Ishii, S., Koki, J., Unno, H., Hori, K.** (2004). Two morphological types of cell appendages on a strongly adhesive bacterium, *Acinetobacter* sp. strain Tol 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5026–5029.
- Jafarinejad, S., Jiang, S. J.** (2019). Current technologies and future directions for treating petroleum refineries and petrochemical plants (PRPP) wastewaters. *J. Environ. Chem. Engin.* 7: 5.
- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., Bartlam, M.** (2013). Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanism of alkane hydroxylases. *Front. Microbiol.* 4: 58.
- Johnson, E. L., Hyman, M. R.** (2006). Propane and n-butane oxidation by *Pseudomonas putida* GPo1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 950–952.
- Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S. M., Knittel, K., Wilkes, H., Blumenberg, M., Michaelis W., Classen A., Bolm C., Joye S. B., Widdel F.** (2007). Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* 449: 898–901.
- Kok, M., Oldenhuis, R., van der Linden, M. P. G., Raatjes, P., Kingma, J., van Lelyveld, P. H., Witholt, B.** (1989). *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene sequence and expression. *J. Biol. Chem.* 264: 5435–5441.
- Kriipsalu, M., Maastik, A., Truu, J.** (2016). Jäätmekäitlus ja pinnase tervendamise. lk. 301-308.
- Kuyukina, M. S., Krivoruchko, A. V., Irena B. Ivshina, I. B.** (2020). Advanced bioreactor treatments of hydrocarbon-containing wastewater. *Appl. Sci.* 10(3): 831.
- Labinger, J. A., Bercaw, J. E.** (2002). Understanding and exploiting C–H bond activation. *Nature.* 417: 507–514.
- 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, J., Zhao, B., Lan, Y., Ma, T.** (2021). Enhanced degradation of different crude oils by defined engineered consortia of *Acinetobacter venetianus* RAG-1 mutants based on their alkane metabolism. *Bioresour. Technol.* 327: 124787.
- Maier, T., Förster, H. H., Asperger, O., Hahn, U.** (2001). Molecular characterization of the 56kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 286(3): 652-658.
- Martma, K.** (2005). Orgaaniline keemia: lühikonspekt gümnaasiumile. lk. 6-10.
- McDonald, I. R., Miguez, C. B., Rogge, G., Bourque, D., Wendlandt, K. D., Groleau, D., Murrell, J. C.** (2006). Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 255(2): 225-32.

Mujumdar, S., Joshi, P, Karve, N. (2019). Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: A review. J. Basic Microb. 59(3): 277-287.

Muriel-Milan, L. F., Mejia, J. L. R., Godoy-Lozano, E. E., Rivera-Gomez, N., (2019). Functional and genomic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from the southwestern Gulf of Mexico reveals an enhanced adaptation for long-chain alkane degradation. Front. Mar. Sci. 6: 572.

National Research Council. (2003). Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects. The National Academies Press.

Nie, Y., Chi, C. Q., Fang, H., Liang, J. L., Lu, S. L., Lai, G. L., Tang, Y. Q., Wu, X. L. (2014). Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. Sci. reports. 4: 4968.

Okoh, E., Yelebe, Z. R., Oruabena, B., Nelson, E. S., Indiamaweji, O. P. (2020). Clean-up of crude oil-contaminated soils: bioremediation option. Internat. J. Environ. Sci. Tech. 17: 1185-1198.

Overholt, W. A., Green, S. J., Marks K. P., Venkatraman, R., Prakash, O., Kostka, J. E. (2013). Draft genome sequences for oil-degrading bacterial strains from beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. genomeA J. 1(6).

Park, C., Shin, C., Jung, J., Lee, Y., Park, W. (2017). Metabolic and stress responses of *Acinetobacter oleivorans* DR1 during long-chain alkane degradation. Microbi. Biotech. 10(6): 1809-1823.

Pemberton, J. M., Schmidt, R. (2001). Catabolic plasmids. Encyclopaedia of life sciences. 1k. 1-9.

Radauer, C., Lackner, P., Breiteneder, H. (2008). The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. BMC Evol. Biol. 8: 286.

Ratajczak, A., Geissdörfer, W., Hillen, W. (1998a). Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1175-1179.

Ratajczak, A., Geißdörfer, W., Hillen, W. (1998b). Expression of alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is induced by a broad range of n-alkanes and require the transcriptional activator *AlkR*. J. Bacteriol. 180: 5822-5827.

Révész, F., Figueroa-Gonzalez, P. A, Probst, A. J., Kriszt, B., Banerjee, S., Szoboszlai, S., Maróti, G., Tánácsics, A. (2020) Microaerobic conditions caused the overwhelming dominance of *Acinetobacter* spp. and the marginalization of *Rhodococcus* spp. in diesel fuel/crude oil mixture-amended enrichment culture. Arch. Microbiol. 202: 329–342.

- Rhykerd, R. L., Weaver, R. W., McInnes, K. J.** (1995) Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. *Environ. Pollut.* 90: 127–130.
- Rocha, E. R, Smith, C. J.** (1999). Role of the alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) gene in oxidative stress defense of the obligate Anaerobe bacteroides fragilis. *J. Bacteriol.* 181: 5701-10.
- Ron, E. Z., Rosenberg, E.** (2014). Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Curr. Opin. Biotech.* 27: 191-194.
- Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A., Lippard, S. J., Nordlund, P.** (1993). Crystal structure of a bacterial non-haem iron hydroxylase that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature.* 366(6455): 537-43.
- Ruijter, J. M., van der Velde, S., Ilgun, A.** (2009). LinRegPCR (11.0) Analysis of quantitative RT-PCR data. *lk.* 9-25.
- Schaeffer, T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S., Fall, R. R.** (1979). Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 742–746.
- Schots, P. C., Pedersen, A. M., Eilertsen, K. E., Olsen, R. L., Larsen, T. S.** (2020). Possible health effects of a wax ester rich marine oil. *Pharamcol.* 11: 961.
- Singh, SN., Kumari, B., Mishra, S.** (2012). Microbial degradation of alkanes. In: Singh S (ed) *Microbial degradation of xenobiotics.* *Environ. Sci. Engin.* Springer, Berlin. 439–469.
- So, C. M., Phelps, C. D., Young, L. Y.** (2003). Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3892–3900.
- Stankovich, K., Simeonova, A.** (2018). Techniques of cleaning up oil spills form contaminated beaches. *Godina VIII Broy.* 2.
- Zobell, C. E.** (1973). Microbial degradation of oil: present statue, problems, and perspectives. D.G. Ahearn, S.P. Meyers (Eds.), *Microbiol. Degradat. Oil. Pollut.* lk. 3-16. Publikatsioon Nr. LSU-SG-73-01.
- Talvik, A. T.** (1996). Orgaaniline keemia (õpik). 424-428.
- 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.
- Tani, A., Sakai, Y., Kato, N.** (2000). Thermostable NADP⁺-dependent medium-chain alcohol dehydrogenase from *Acinetobacter* sp. strain M-1: purification and characterization and gene expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5231-5235.
- Tansel, B.** (2013). Propagation of impacts after oil spills at sea: Categorization and quantification of local vs regional and immediate vs delayed impacts. *Int. J. Disast. Risk. Re.* 7: 1-8.

- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(10): 3327–3332.
- Towner, K. J.** (1997). Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. *J. Med. Microbiol.* 46: 721-746.
- van Beilen, J. B., Smits, T. H. M., Roos, F. F., Brunner, T., Balada, S. B., Röthlisberger, M., Witholt, B.** (2005). Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. *Americ. J. Environ. Sci. J.* 187(1): 85-91.
- van Beilen, J. B., Neuenschwander, M., Smits, T. H. M., Roth, C., Balada, S. B., Witholt, B.** (2002). Rubredoxins involved in alkane oxidation. *J. Bacteriol.* 184: 1722–1732.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G.** (2007a). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 13–21.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G.** (2007b). Alkane activation by P450 oxygenases. *Biocatal. Biotransfor.* 25 (2-4): 186-193.
- 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. Tech.* 58: 427–440.
- van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., Rothlisberger, M., Witholt, B.** (2001). Analysis of the *Pseudomonas putida* alkane degradation gene cluster and flanking insertion sequence: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology.* 147: 1621–1630.
- van Beilen, J. B., Wubbolts, M. G., Witholt, B.** (1994). Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation.* 5: 161–174.
- Varjani, S. J., Rana, D. P., Bateja, S., Sharma, M. C., Upasani, V. N** (2014). Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. *Int. J. Innovative Res. Sci. Eng. Tech.* 3(2): 9205-9213.
- Varjani, S. J., Upsani, V. N.** (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *Int. Biodeter. Biodegr.* 120: 71-83.
- Vendramel, S., Bassein, J. P., Dezotti, M., Sant'Anna Jr, G. L.** (2015). Treatment of petroleum refinery wastewater containing heavily polluting substances in an aerobic submerged fixed-bed reactor. *Environ. Technol.* 36: 16.
- Viggor, S., Jõesaar, M., Sorares-Castro, P., Ilmjärv, T., Santos, P. M., Kapley, A., Kivisaar, M.** (2020). Microbial metabolic potential of phenol degradation in wastewater treatment plant of crude oil refinery: Analysis of metagenomes and characterization of isolates. *Microorgan.* 8(5): 652.

Wang, W., Shao, Z. (2012). Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80: 523–533.

Whyte, L. G., Smits, T. H. M., Labbé, D., Witholt, B., Greer, C. W., van Beilen, J. B. (2002). Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylases systems in *Rhodococcus* Strain Q15 and NRRL B-16531. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12): 5933-42.

Widdel, F., Knittel, K., Galushko, A. (2010) Anaerobic hydrocarbon-degrading microorganisms: An overview. In: Timmis K.N. (eds) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Widdel, F., Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotech.* 12: 259-276.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

https://eippcb.jrc.ec.europa.eu/sites/default/files/2020-03/superseded_ref_bref-0203.pdf, kasutatud 25.02.2021

<https://www.scribd.com/doc/98405308/A-visit-to-Uran-Plant-of-ONGC>, kasutatud 25.02.2021

<https://oilprice.com/Energy/Energy-General/BPs-Latest-Estimate-Says-Worlds-Oil-Will-Last-53.3-Years.html>, kasutatud 25.02.2021

<https://www.britannica.com/event/Deepwater-Horizon-oil-spill/Legal-action>, kasutatud 26.02.2021

https://www.itopf.org/fileadmin/data/Documents/TIPS%20TAPS/TIP_2_Fate_of_Marine_Oil_Spills.pdf, kasutatud 01.03.2021

<https://www.engineering.com/story/a-roundup-of-oil-spill-cleanup-methods>, kasutatud 01.03.2021

<https://lpsn.dsmz.de/genus/acinetobacter>, kasutatud 18.03.2021

<https://lpsn.dsmz.de/species/acinetobacter-venetianus>, kasutatud 20.03.2021

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, kasutatud 25.04.2021

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>, kasutatud 25.04.2021

LISAD

Lisa 1

Acinetobacter venetianus ICP1 AlkMa (kollane) ja AlkMb (sinine) järjestuste identsused *Acinetobacter* sp. tüvede COS3, M-1 ja DR1 ning *A. venetianus* tüvede RAG-1 ja VE-C3 vastavate järjestustega ning *Acinetobacter* sp. tüve ADP1 AlkM järjestusega.

	ICP1 AlkMb	COS3 AlkMb	RAG-1 AlkMb	VE-C3 AlkMb	M-1 AlkMb	DR1 AlkMb	
	100	99	93	93	93	92	ICP1 AlkMb
ICP1 AlkMa	100	100	92	92	93	92	COS3 AlkMb
COS3 AlkMa	100	100	100	98	87	88	RAG-1 AlkMb
RAG-1 AlkMa	100	99	100	100	88	88	VE-C3 AlkMb
VE-C3 AlkMa	100	100	99	100	100	93	M-1 AlkMb
M-1 AlkMa	95	95	95	95	100	100	DR1 AlkMb
DR1 AlkMa	87	87	87	87	87	100	
ADP1 AlkM	82	82	83	82	82	82	100
	ICP1 AlkMa	COS3 AlkMa	RAG-1 AlkMa	VE-C3 AlkMa	M-1 AlkMa	DR1 AlkMa	ADP1 AlkM

Lisa 2

A. venetianus tüvede ICP1, RAG-1 (NZ_KB849558) ja VE-C3 (NZ_CM001772), *Acinetobacter* sp. tüvede COS3 (AXCD01000023), M-1 (AB049410) ja DR1 (NC_014259) AlkMa järjestuste, *Acinetobacter* sp. tüve ADP1 (CR543861) AlkM ning *Pseudomonas putida* GPo1 (CAB54050) AlkB järjestuse joondus programmiga MEGA-X. AlkM/AlkB järjestuse 55. positsioonis (*Pseudomonas putida* GPo1 järgi) olev aminohape on tähistatud punase kastiga.

Species/Abbrv			*						*
1. ICP1 AlkMa	P	I	V	L	H	I	V	I	P
2. COS3 AlkMa	P	I	V	L	H	I	V	I	P
3. RAG-1 AlkMa	P	I	V	L	H	I	V	I	P
4. VE-C3 AlkMa	P	I	V	L	H	I	V	I	P
5. M-1 AlkMa	P	I	V	L	H	I	I	I	P
6. ADP1 AlkM	P	I	V	L	H	I	I	I	P
7. GPo1 AlkB	-	L	V	W	Y	G	A	L	P

Lisa 3

A. venetianus tüvede ICP1, RAG-1 (NZ_AKIQ01000087) ja VE-C3 (NZ_CM001772), *Acinetobacter* sp. tüvede COS3 (AXCD01000003), M-1 (AB049411) ja DR1 (NC_014259) AlkMb järjestuste, *Acinetobacter* sp. tüve ADP1 (CR543861) AlkM ning *Pseudomonas putida* GPo1 (CAB54050) AlkB järjestuse joondus programmiga MEGA-X. AlkM/AlkB järjestuse 55. positsioonis (*Pseudomonas putida* GPo1 järgi) olev aminohape on tähistatud punase kastiga.

Species/Abbrv									*
1. ICP1 AlkMb	P	L	F	I	H	G	V	I	P
2. COS3 AlkMb	P	L	F	I	H	G	V	I	P
3. RAG-1 AlkMb	P	M	F	L	H	G	V	I	P
4. VE-C3 AlkMb	P	I	F	L	H	G	V	I	P
5. M-1 AlkMb	P	L	F	I	H	G	V	I	P
6. ADP1 AlkM	P	I	V	L	H	I	I	I	P
7. GPo1 AlkB	L	L	V	W	Y	G	A	L	P

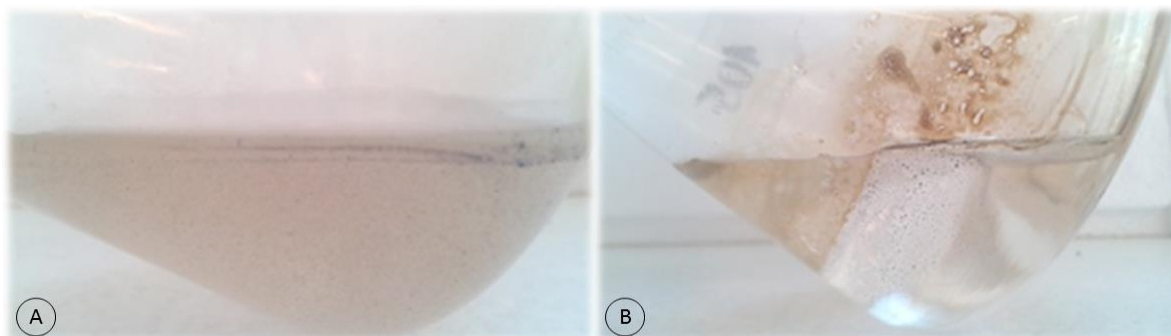
Lisa 4

Geenide *alkMb*, *alkMa*, *almA* ja *P450* ekspressiooni tasemete suhe induktoriga ja induktorita R2A söötmel kasvanud rakkudes.

	<i>alkMb</i>	<i>alkMa</i>	<i>almA</i>	<i>P450</i>
R2A	1	1	1	1
C9	132	8,5	0,9	35
C12_1	177	2	0,8	13
C12_2	78	4	0,9	4
C14_1	342	23	0,9	4
C14_2	832,5	6	2	1027
C16_1	47	2	2	17
C16_2	274,5	15	1	118
C18_1	52	4	2,5	4
C18_2	269	41,5	2	35
C22_1	9	3	4	25
C22_2	73	53	7	90
C32_1	9,5	21	1	8
C32_2	346	5	4	156
S_1	2,5	2	0,7	0,7
S_2	9	3	0,6	3
TN_1	0,6	6	1,5	2
TN_2	314	56	1	53
TN_3	128	308	6	55
TN_4	676	50	1,5	17

Lisa 5

Fotod 0,1% toornaftat sisaldava minimal söötmega kolbidest, kus 48 h on kasvanud *Acinetobacter venetianus* ICP1 (A) ning võrdluseks sama ajapunkti abiootiline kontroll (B).



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Celeste Peterson

(sünnikuupäev: 30.12.1998)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose Alkaanide lagundamise iseloomustamine *Acinetobacter venetianus* tüves ICP1, mille juhendajateks on Signe Viggor ja Merike Jõesaar,
 - 1.1. reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Celeste Peterson

31.05.2021