

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

**Pseudomonaadide võime lagundada metüül- ja klorosalitsülaate fenooli või salitsülaati
sisaldavatest segudest**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Deili Saan

Juhendajad: PhD Merike Jõesaar

PhD Signe Viggor

TARTU 2025

INFOLEHT

Pseudomonaadide võime lagundada metüül- ja klorosalitsülaate fenooli või salitsülaati sisaldavatest segudest

Selles töös uuriti *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4 võimet lagundada metüül- ja klorosalitsülaate fenooli või Na-salitsülaati sisaldavatest segudest. Katsete käigus kasvatati tüvesid fenooli või salitsülaati sisaldavates minimaal- või R2A söötmetes kuhu oli lisatud metüül- või klorosalitsülaate. Samuti määrati salitsülaadi 1-hüdroksülaase ning katehhooli dioksügenaase kodeerivate geenide ekspressioon segasubstraatidel kasvanud rakkudes ning spektrofotomeetriliselt hinnati substraatide ja vaheühendite kontsentratsiooni muutumist ajas. Töös saadud tulemuste põhjal suudavad tüved *P. putida* NCIB 9816-4 ja *P. fluorescens* PC20 segasubstraatidest lagundada vaid 4- ja 5-metüülsalitsülaati. Kõige efektiivsem segasubstraatide lagundaja on *P. pseudoalcaligenes* C70, mis suudab metüülsalitsülaadid nii fenooli kui ka salitsülaati sisaldavast söötimest ära kasutada.

Märksõnad: salitsülaadi 1-hüdroksülaas, katehhooli dioksügenaasid, redundantus, metüül- ja klorosalitsülaat, *Pseudomonas*

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Degradation of methyl- and chlorosalicylates in the presence of phenol or Na-salicylate in pseudomonads

The ability of *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 and *P. putida* NCIB 9816-4 to degrade methyl- and chlorosalicylates from mixtures containing phenol or Na-salicylate was investigated. The strains were grown in minimal or R2A media. The expression of genes encoding salicylate 1-hydroxylases and catechol dioxygenases in cells grown on a mixture of substrates was measured, and the concentration of substrates and intermediates was assessed spectrophotometrically over time. The most efficient degrader of mixed substrates is *P. pseudoalcaligenes* C70, which can utilize methyl salicylates from both phenol and salicylate-containing media.

Keywords: salicylate 1-hydroxylase, catechol dioxygenases, redundant genes, methyl- and chlorosalicylates, *Pseudomonas*

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1.1. Aromaatsed ühendid ja nende aeroobne lagundamine bakterites	6
1.2. Naftaleeni aeroobne lagundamine	7
1.4.1. Katehooli <i>meta</i> rada	8
1.4.2. Katehooli <i>ortho</i> rada	10
1.4.3. Gentisaadi rada	11
1.5. Metüülsalitsülaatide aeroobne lagundamine	13
1.6. Klorosalitsülaatide aeroobne lagundamine	14
1.7. Fenooli aeroobne lagundamine	16
1.8. Segasubstraatide lagundamine	18
1.9. Töö praktilises osas kasutatud tüvede iseloomustamine	19
1.9.1. <i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816-4	19
1.9.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i> PC20	20
1.9.3. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> C70	21
2. EKSPERIMENTAALOSA	23
2.1. Töö eesmärgid	23
2.2. Materjal ja meetodika	23
2.2.1. Kasutatud bakteritüved	23
2.2.2. Kasvatused minimaalsöötmetes	23
2.2.3. RNA eraldamine geenide ekspressiooni määramiseks	24
2.2.4. Agaroosgeelelektroforees	24
2.2.5. qRT-PCR	24
2.3. Tulemused ja arutelu	25
2.3.1. Kasv segasubstraatidel	25
2.3.1.1. <i>P. putida</i> NCIB 9816-4 kasv metüülsalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates minimaal- ning R2A söötmetes	25
2.3.1.2. <i>P. putida</i> NCIB 9816-4 kasv klorosalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates minimaal- ning R2A söötmetes	31
2.3.1.3. <i>P. fluorescens</i> PC20 kasv metüülsalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates minimaal- ning R2A söötmetes	34
2.3.1.4. <i>P. fluorescens</i> PC20 kasv klorosalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates minimaal- ning R2A söötmetes	39
2.3.1.5. <i>P. pseudoalcaligenes</i> C70 kasv metüülsalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates R2A söötmetes	42
2.3.1.6. <i>P. pseudoalcaligenes</i> C70 kasv klorosalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates R2A söötmetes	48
KOKKUVÕTE	52
KASUTATUD ALLIKAD	55
LISAD	63

KASUTATUD LÜHENDID

PAH - polütsükiline aroomne ühend

SH - salitsülaadi 1-hüdroksülaas

C23O - katehhooli 2,3-dioksügenaas

C12O - katehhooli 1,2-dioksügenaas

HMS - hüdroksümukonosemialdehüüd

KHMS - 5-kloro-2-hüdroksümukonosemialdehüüd

PHE - fenool

SAL - Na-salitsülaad

3MS - 3-metüülsalitsülaad

4MS - 4-metüülsalitsülaad

5MS - 5-metüülsalitsülaad

3KS - 3-klorosalitsülaad

4KS - 4-klorosalitsülaad

5KS - 5-klorosalitsülaad

SISSEJUHATUS

Aromaatsed ühendid ehk areenid on äärmiselt stabiilsed, vähemalt ühe benseenituumaga ühendid. Need on looduses väga levinud, näiteks vabaneb areene nii biomassi lagunemisel ja põlemisel kui ka vulkaanipursete korral. Aromaatsete ühendite alla kuuluvad ka mitmed olulised taimehormoonid. Areenidel on suur roll materjali- ning ravimitööstuses, kust need ühendid loodusesse satuvad ning püsivat reostust tekitavad.

Areenide eemaldamine loodusest on füüsikalis-keemilistel meetoditel ressursikulukas ning tihti ebaefektiivne. Seetõttu on viimastel aastakümnetel laialdasemat kasutust leidnud bioremediatsioon, mis põhineb elusorganismide võimel kasutada raskestilagundatavaid ühendeid energia- ja süsinikuallikana. Looduses tuleb organismidel kokku puutuda paljude erinevate ühendite segudega, mistõttu on eduka kasvu jaoks oluline adapteerumisvõime ja mitmekülgne metaboolne võimekus. Kuna keskkonnas leiduvad ühendid võivad üksteise degradatsiooni väga tugeval määral inhibeerida või soosida, on oluline bioremediatsioonil kasutada vaid selliseid organisme, mille metaboolseid omadusi erinevatel kasvutingimustel on enne põhjalikult uuritud.

Selle töö eesmärgiks on saada teada, kas bakteritüved *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4, *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 suudavad fenooli või Na-salitsülaati sisaldavast keskkonnast metüül- ja klorosalitsülaate ära kasutada ning kuidas mõjutab toitainerikka söötme olemasolu nende ühendite degradatsiooni.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Aromaatsed ühendid ja nende aeroobne lagundamine bakterites

Aromaatsed ühendid ehk areenid on molekulid, milles esineb vähemalt üks benseenituum. Neid saab jagada kolme rühma: polütsükliilised (PAH-id), heterotsükliilised ja asendusrühmadega areenid. Benseenituumade arvu ja molekulmassi suurenemisel väheneb ühendite lahustuvus vees ning keemiline reaktiivsus (Seo jt., 2009). Polütsükliilised aromaatsed ühendid sisaldavad vähemalt kahte benseenituumat ning on oma struktuuri ja sellest tingitud kõrge resonantsenergia tõttu väga stabiilsed (Goyal ja Zylstra, 1997). Naftaleen (kaks benseenituumat) on PAH-de lagundamise uurimisel võetud mudelsubstraadiks, selle bakteriaalsel lagundamisel tekib salitsüülhape (2-hüdroksübensoehape). Salitsüülhape on oluline taimehormoon, millel on suur roll nii vilja valmimisel, stressivastustes kui ka mitmes muus protsessis (Koo jt., 2020). Salitsüülhapet ja selle derivaate sisaldavaid taimeosi, näiteks hõbepaju (*Salix alba*) koort, on kasutatud ravi eesmärgil rohkem kui 2000 aastat (Shara ja Stohs, 2015). Salitsülaatidel on avastatud valu-, põletikku- ja palavikkualandav toime (Klessig jt., 2016). Mõnel salitsüülhappe derivaadil on leitud ka insuliiniresistentsuse- ning kasvajakude vastane mõju (El-Shemy jt., 2007; Weidner jt., 2012; Weidner jt., 2016). Kõige tuntum on aga atsetüülsalitsülaad, mida on alates 1899. aastast mittesteroidse põletikuvastase ravimina aspiriini nime all toodetud (Hedner ja Everts, 1998). Polütsükliilisi aromaatsed ühendid tekib fossiilsete kütuste ning biomassi põlemisel, samuti vabaneb neid vulkaanipursete korral (Seo jt., 2009). PAH-idel on suur roll materjalitööstuses, näiteks naftaleenist toodetakse plastikut, värve ja kahjuritõrjevahendeid (Mallah jt., 2022). Kahjuks jõuavad need aromaatsed ühendid loodusesse ning tekitavad suuremahulist püsivat reostust. Keskkonda kuhjuvad areenid võivad inhibeerida taimede kasvu, fotosünteesi ning seemnete idanemist (Henner jt., 1999; Pašková jt., 2006), loomadele on tuvastatud näiteks nii kartsino- või teratogeenne kui ka geno- ja immunotoksiline mõju (Carlson jt., 2002; Nisha jt., 2017; Farombi jt., 2020). Loodusest on füüsikalise-keemilistel meetoditel aromaatsete ühendite eemaldamine ressursirikas ning tihti ebaefektiivne, mistõttu on viimastel aastakümnetel laialdasemat kasutust bioremediatsioon, mis põhineb mikroorganismide võimel kasutada kompleksseid ühendeid süsiniku- ja energiaallikana (Salari jt., 2022; Baskaran ja Byun, 2024).

Aromaatsete ühendite aeroobsel bakteriaalsel lagundamisel saab eristada kolme etappi (Williams ja Sayers, 1994):

1. mono- või dioksügenaasid lisavad benseenituumale hüdroksüülrühmi,

2. dioksügenaasid lõhuvad benseenituumas olevad süsiniksidemed, lisavad hapniku ja tekitavad sellega alifaatse happe,
3. tekkinud vaheprodukte lagundatakse edasi ning kasutatakse keskses metabolismiradades.

1.2. Naftaleeni aeroobne lagundamine

Naftaleen on kahe benseenituumaga polütsükline ühend, mis lahustub vees paremini kui teised suurema molekulmassiga PAH-id. Seetõttu suudavad paljude mikroobiperekondade, näiteks *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* ja *Streptomyces*, liigid kasutada seda süsiniku- ja energiaallikana (Seo jt., 2009).

Naftaleeni metabolismirada perekonna *Pseudomonas* liikides kirjeldasid esimest korda Davies ja Evans 1964. aastal. Degradatsiooniraja etappe peale benseenituumala lõikamist täpsustasid 1992. aastal Eaton ja Chapman.

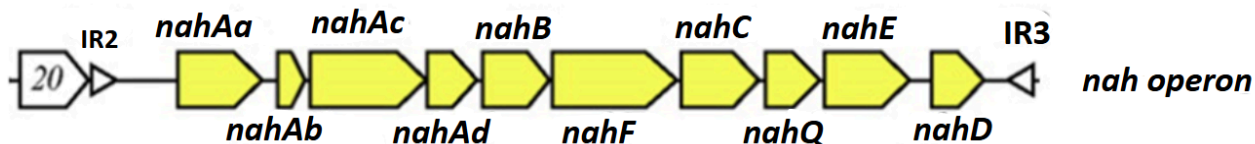
Naftaleeni metabolismirada salitsülaadi kaudu on täpselt kirjeldatud liigi *Pseudomonas putida* tüves G7 (Yen ja Gunsalus, 1982). Sellel bakteril paiknevad plasmiidil NAH7 naftaleeni lagundamiseks kaks operoni, naftaleeni ülemise ja alumise raja operon (Dunn ja Gunsalus, 1973; Yen ja Gunsalus, 1982; Sota jt., 2006). Ülemises, *nah* operonis, asuvad geenid (*nahAaAbAcAdBFCQED*; Joonis 1A), mille abil sünteesitakse ensüüme naftaleeni muutmiseks salitsülaadiks (Joonis 1B). Alumises *sal* operonis on geenid (*nahGTHINLOMKJ*; Joonis 2A), mille abil muudetakse katehool *meta*-raja kaudu atsetaldehüüdiks ja püruvaadiks (Joonis 2B). (Yen ja Gunsalus, 1982; Yen ja Gunsalus, 1985; Sota jt., 2006)

Naftaleeni lagundamine *Pseudomonas putida* tüves G7 algab benseenituumale kahe hüdroksüülrühma lisamisest, mida vahendab naftaleeni dioksügenaasikompleks (*nahAaAbAcAd*) (Yen ja Gunsalus, 1982; Simon jt., 1993). Selle tulemusena tekib *cis*-naftaleeni dihidrodiool, mis mitmete vaheühendite kaudu lõpuks konverteeritakse salitsülaadiks (Joonis 2B; Yen ja Gunsalus, 1982).

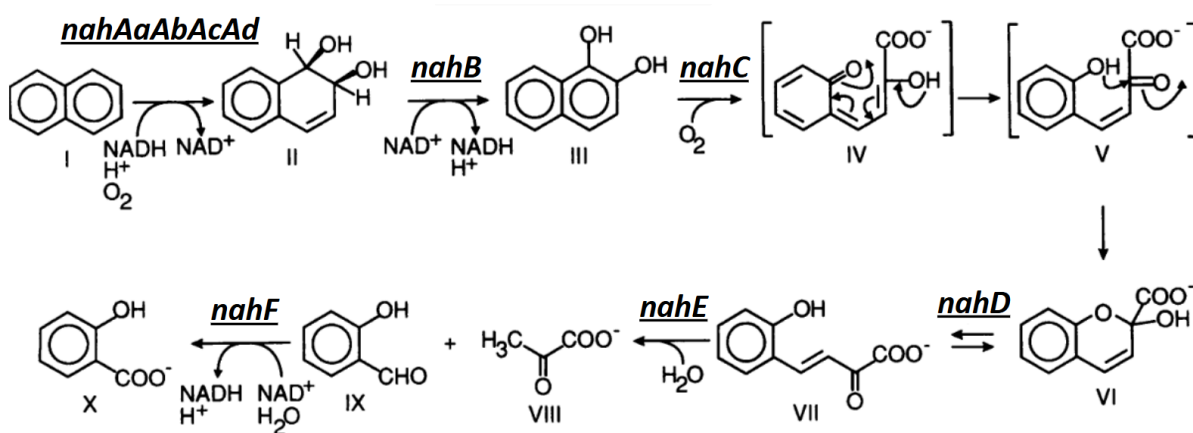
Salitsülaati saab edasi lagundada kas katehooli *meta*, katehooli *ortho* või gentisaadi rada mööda (Davies ja Evans, 1964; Ornston ja Stanier, 1966; Fuenmayor jt., 1998). Katehooli mõlema raja esimeseks sammuks on salitsülaadi konverteerimine katehooliks, mida viib läbi salitsülaadi 1-hüdroksülaas (EC 1.14.13.1) (Davies ja Evans, 1964; Ornston ja Stanier, 1966). Salitsülaadi 1-hüdroksülaas on flavoproteiin, mis NAD(P)H ja hapniku kaasabil konverteerib nii salitsülaadi kui ka mitmed asendusrühmaga salitsülaadid, näiteks 3-, 4-, ja 5-metüülsalitsülaadid, katehooliks (Katagiri jt., 1962; Katagiri jt., 1965; Balashova jt., 2001).

Gentisaadi rajad konverteerivad salitsülaadi 5-hüdroksülaas salitsülaadi gentisaadiks (Fuenmayor jt., 1998). Salitsülaadi 5-hüdroksülaas on multikomponentne monooksügenaas, mis suudab salitsülaadi ning mõned asendusrühmaga salitsülaadid, näiteks 4- ja 5-klorosalitsülaadid, konverteerida gentisaadiks (Zhou jt., 2002).

A



B



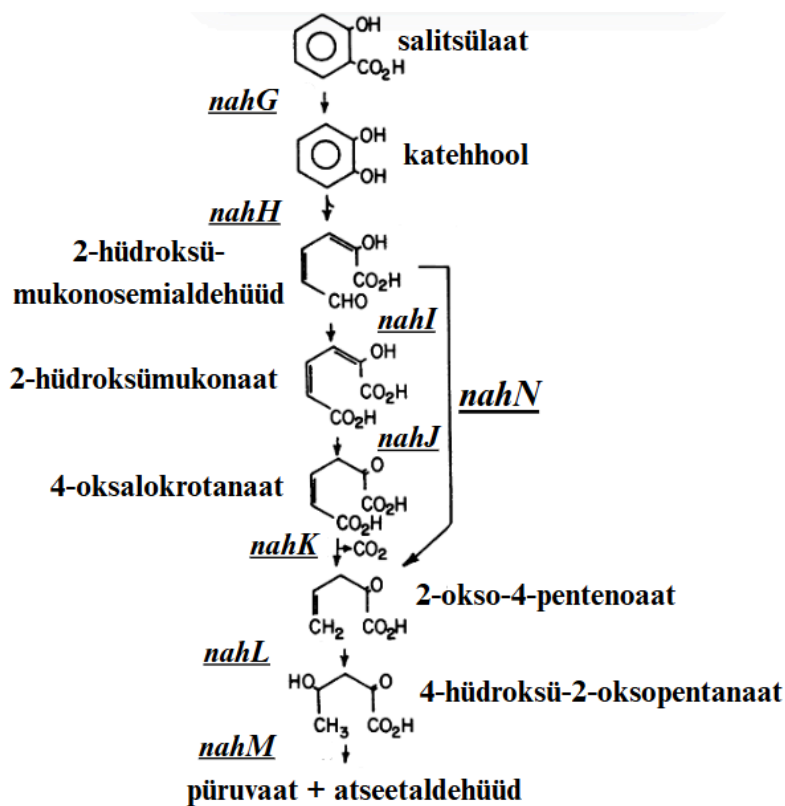
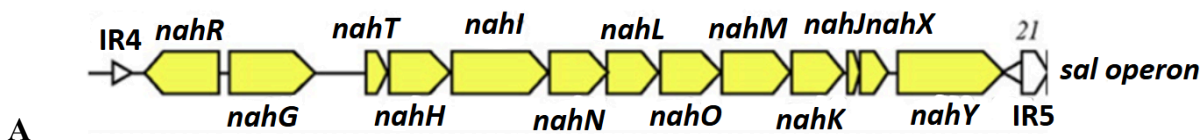
Joonis 1. A. *Pseudomonas putida* G7 plasmiidil NAH7 paikneva naftaleeni lagundamise (*nah*) operoni struktuur (Sota jt., 2006; modifitseeritud). Geenidelt ekspresseritavad produktid: NahAa – ferredoksiini reduktaas, NahAb – ferredoksiin, NahAc – raud-väävel valguga α -subühik, NahAd – raud-väävel valguga β -subühik, NahB – *cis*-dihüdriidooli dehüdronaas, NahF – salitsüülaldehydi dehüdronaas, NahC – 1,2-dihüdronaftaleeni dioksügenaas, NahQ – dibensotiofeeni metabolismi valk, NahE – 2-hüdrosübensüülperuuaadi aldolaas, NahD – 2-hüdrosükromeen-2-karboksülaadi isomeraas (Yen ja Gunsalus, 1982; Harayama ja Rekik, 1984; Simon jt., 1993; Ono jt., 2007; Sota jt., 2006).

B. Naftaleeni lagundamine salitsülaadiks *Pseudomonas putida* tüves G7. Vajalikud ensüümid on märgitud joonisele allajoonituna, nende täispikad nimetused on Joonis 1. allkirjas. Substraadid: I – naftaleen, II – *cis*-(1R,2S)-naftaleeni-dihüdriidool, III – 1,2-dihüdronaftaleen, IV – 2-hüdrosü-4-(2'-okso-3,5-tsükloheksadienüül)-buta-2,4-dienoat, V – *cis*-o-hüdrosübensüülideenperuuaat, VI – 2-hüdrosükromeen-2-karboksülaad, VII – hüdroksübensüülperuuaat, VIII – peruuaat, IX – salitsüülaldehyd, X – salitsülaad (Eaton ja Chapman, 1992; modifitseeritud).

1.4.1. Katehooli meta rada

Meta raja võtmeensüümiks on katehooli 2,3-dioksügenaas (C23O), mis lõikab katehooli benseenituumaga katki teise ja kolmanda süsiniku vahelt, tekitades 2-hüdrosümukonosemialdehydi. See vaheühend lagundatakse astmeliselt peruuaadiks ja atseetaldehydiks. (Davies ja Evans, 1964; Sala-Trepat jt., 1972; Harayama ja Rekik, 1989)

Näiteks lagundab salitsülaati katehhooli *meta* raja kaudu *Pseudomonas putida* G7 plasmiidiselt kodeeritud *sal* operoni (*nahGTHINLOMKJ*) abil (Joonis 2A; Yen ja Gunsalus, 1982; Sota jt., 2006). Salitsülaadist tekib salitsülaadi 1-hüdroksülaasi (NahG) toimel katehhool. Saadud vaheühendit lõikab katehhooli 2,3-dioksügenaas (NahH), selle tulemusel moodustub 2-hüdroksümukonosemialdehüüd, mida võib edasi lagundada kahte teed pidi (Joonis 2B). Mõlemal juhul tekib lõpuks püruvaat ja atsetaldehüüd. (Yen ja Gunsalus, 1982; Harayama ja Rekik, 1984)

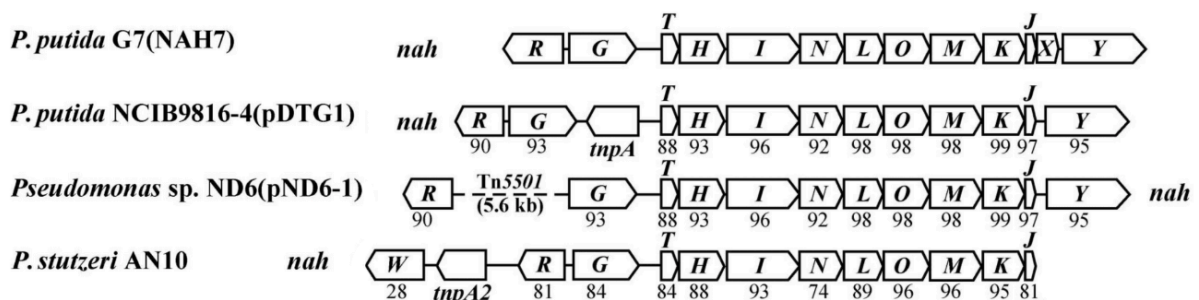


Joonis 2.A. *Pseudomonas putida* G7 plasmiidil NAH7 paikneva salitsülaadi lagundamise (*sal*) operoni struktuur (Sota jt., 2006; modifitseeritud). Geenidelt sünteesitavad produktid: NahR – regulaatorvalk, NahG – salitsülaadi 1-hüdroksülaas, NahT – ferredoksiin, NahH – katehhooli 2,3-dioksügenaas, NahI – 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi dehüdrogenaas, NahN – 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi hüdrolaas, NahL – 2-okso-4-pentenoaadi hüdrataas, NahO – atsetaldehüüdi dehüdrogenaas, NahM – 4-hüdroksü-2-oksovaleraadi aldolaas, NahK – 4-oksalkrotanaadi dekarboksülaas, NahJ – 2-hüdroksümukonaadi tautomeraas, NahX – teadmata funktsiooniga valk, NahY – naftaleeni kemotaksise valk (Yen ja Gunsalus, 1982; Harayama ja Rekik, 1984; Simon jt., 1993; Sota jt., 2006).

B. Salitsülaadi lagundamine katehhooli *meta* raja kaudu NAH7 plasmiidilt ekspresseeritud ensüümidega (allajoonitud). Ensüümide täispikad nimetused on toodud Joonis 3 allkirjas (Yen ja Gunsalus, 1982; Harayama ja Rekik, 1984).

Naftaleeni ja salitsülaadi lagundamiseks *Pseudomonas putida* G7 *sal* operoniga analoogseid operone on leitud paljudes teisteski perekonna *Pseudomonas* liikides, näiteks *P. putida* NCIB 9816-4, *Pseudomonas* sp. ND6, *P. stutzeri* AN10 (Joonis 5; Bosch jt., 2000; Li jt., 2004; Dennis ja Zylstra, 2004).

Kui üldiselt asuvad *nah* ja *sal* operonid plasmiididel, on leitud ka kromosomaalsete operonidega tüvesid (Zuniga jt., 1981; Yen ja Gunsalus, 1982; Rosselló-Mora jt., 1994). Selline on näiteks *Pseudomonas stutzeri* AN10 (Rosselló-Mora jt., 1994), lisaks paikneb selle tüve *sal* operoni ees geen *nahW* (Joonis 3), mis kodeerib veel üht salitsülaadi 1-hüdrosülaasi (Bosch jt., 1999; Bosch jt., 2000). Kaks erinevat salitsülaadi hüdrosülaasi annavad eelise asendusrühmaga salitsülaatide degradeerimisel, NahG suudab efektiivsemalt lagundada metüül-, NahW aga klorosalitsülaate (Bosch jt., 1999). Samuti puudub tüvel AN10 kemotaksise jaoks vajalik *nahY* geen ja teadmata funktsiooniga *nahX* (Grimm ja Harwood, 1999; Bosch jt., 1999; Bosch jt., 2000).



Joonis 3. Perekonna *Pseudomonas* erinevate tüvede *sal* operonide struktuur (Sota jt., 2006; modifitseeritud).

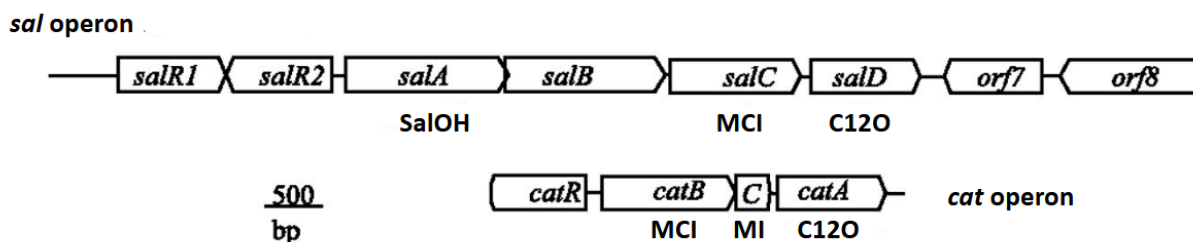
1.4.2. Katehhooli *ortho* rada

Katehhooli *ortho* ehk β -ketoadipaadi raja võtmeensüümiks on katehhooli 1,2-dioksügenaas (C12O), mis lõikab katehhooli benseenituumata katki esimese ja teise süsiniku vahelt ning tekib *cis,cis*-mukonaat. Saadud ühend lagundatakse erinevate ensüümide abil edasi ning saadakse 3-oksoadipaati ehk β -ketoadipaati, mille järgi on rada ka nime saanud. See lagundatakse atsetüül- ja suktsinüül-CoA-ks. (Ornston ja Stanier, 1966; Ornston, 1966; Harayama ja Rekik, 1989)

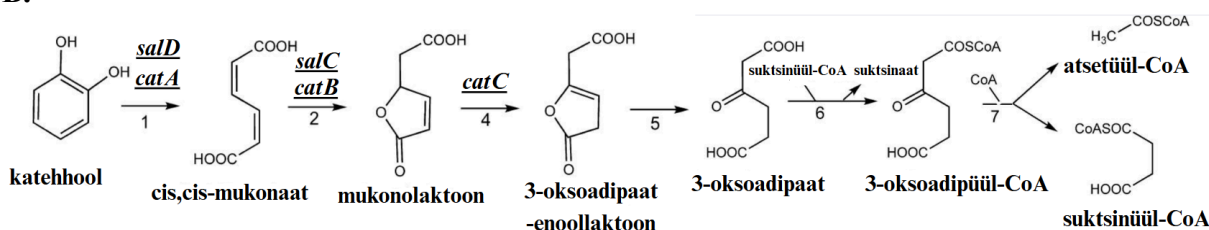
Näiteks *Pseudomonas reinekei* tüvi MT1 lagundab *sal* operonis paikneva *salA* geenilt sünteesitud salitsülaadi 1-hüdrosülaasi abil salitsülaadi katehhooliks. Tekkinud vaheühendi lagundamine toimub seejärel *sal* ja *cat* operonis paiknevate *catA* ja *salD* geenidelt kodeeritud katehhooli 1,2-dioksügenaaside abil *cis,cis*-mukonaadiks (Joonis 4A) (Cámara jt., 2007). Ühend konverteeritakse mukonolaktooni ja 3-oksoadipaati-enoollaktooni kaudu

3-oksoadipaadiks (Joonis 4B). Viimane muudetakse 3-oksoadipüül-CoA, mis lagundatakse tsitraaditsükli vaheühenditeks. (Nikodem jt., 2003; Cámara jt., 2007; Marin jt., 2010)

A.



B.



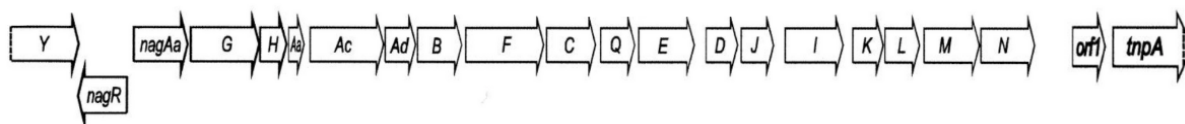
Joonis 4. A. *Pseudomonas reinekei* MT1 salitsülaadi lagundamiseks vajalike *sal* ja *cat* operonide struktuur. Joonisele on märgitud vastavad ensüümid, mida geenid kodeerivad. Tähistused: SalOH – salitsülaadi 1-hüdroksülaas, MCI – mukonaadi tsükloisomeraas, MI – mukonolaktooni isomeraas. (Cámara jt., 2007; modifitseeritud).

B. *Pseudomonas reinekei* MT1 katehooli *ortho* lagundamisrada. Ensüümide märgistused joonisel: 1 – katehooli 1,2-dioksügenaas, 2 – mukonaadi tsükloisomeraas, 4 – mukonolaktooni isomeraas, 5 – 3-oksoadipaate-enoollaktaani hüdrolaas, 6 – 3-oksoadipaate:suksinüül-CoA transferaas, 7 – 3-oksoadipüül-CoA tiolaas. Joonisel on allajoonituna märgitud geenid, mis vastavaid ensüüme kodeerivad. (Nikodem jt., 2003; Marin jt., 2010; modifitseeritud).

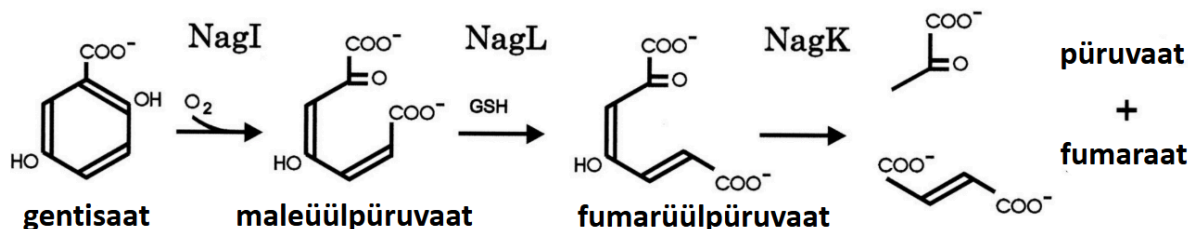
1.4.3. Gentisaadi rada

Ralstonia sp. tüves U2 toimub naftaleeni metabolism üle gentisaadi. Tüvel on selleks plasmiidne, NAH7 plasmiidiga sarnane *nag* operon (Joonis 5A). Metabolismiraja esimese sammuna konverteerib naftaleeni dioksügenaas (NagAaAbAcAd) naftaleeni salitsülaadiks. Edasi muudetakse ühend salitsülaadi 5-hüdroksülaasi (NagGH) abil gentisaadiks. (Fuenmayor jt., 1998) Tekkivat substraati lõikab gentisaadi 1,2-dioksügenaas (NagI), mille tulemusel tekib maleülpüruvaat. Viimane lagundatakse fumarülpüruvaadi kaudu püruvaadiks ja fumaraadiks (Joonis 5B). (Zhou jt., 2001)

A.



B.

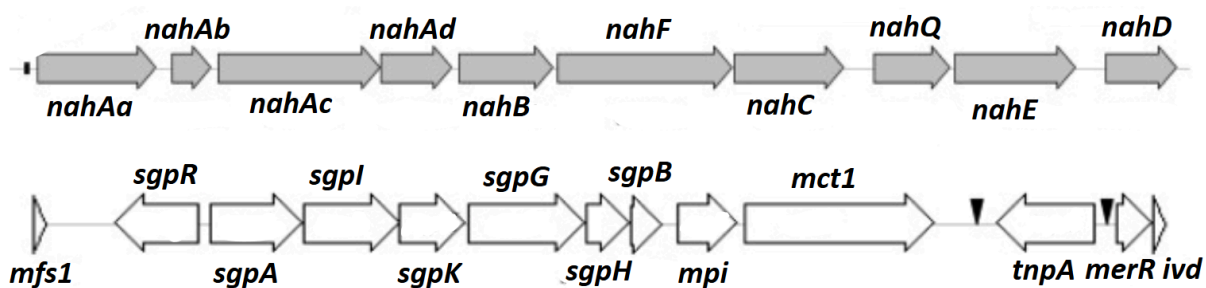


Joonis 5. A. *Ralstonia sp.* tüve U2 naftaleeni lagundamiseks vajaliku operoni, *nag*, struktuur. Geenidelt kodeeritavad ensüümid: NagY – kemotaksise valk, NagR – transkriptsiooni regulaatorvalk, NagAa – ferredoksiini reduktaas, NagG – salitsülaadi 5-hüdroksülaasi oksügenaasi suur subühik, NagH – salitsülaadi 5-hüdroksülaasi oksügenaasi väike subühik, NagAb – ferredoksiin, NagAc – salitsülaadi 5-hüdroksülaasi oksügenaasi suur subühik, NagAd – salitsülaadi 5-hüdroksülaasi oksügenaasi väike subühik, NagB – *cis*-naftaleenidihüdrodiooli dehüdrogenaas, NagF – salitsüülaldehüüdi dehüdrogenaas, NagC – 1,2-dihüdroksünaftaleeni dioksügenaas, NagQ – aldolaas, NagE – *trans*-o-hüdroksübensüülideenpüruvaadi hüdrataas-aldolaas, NagD – 2-hüdroksükromeenkarboksülaadi isomeraas, NagJ – glutatiooni S-transferaas, NagI – gentisaadi 1,2-dioksügenaas, NagK – fumarüülpüruvaadi hüdrolaas, NagL – maleülpüruvaadi isomeraas, NagM – teadmata, NagN – teadmata (Zhou jt., 2001; modifitseeritud).

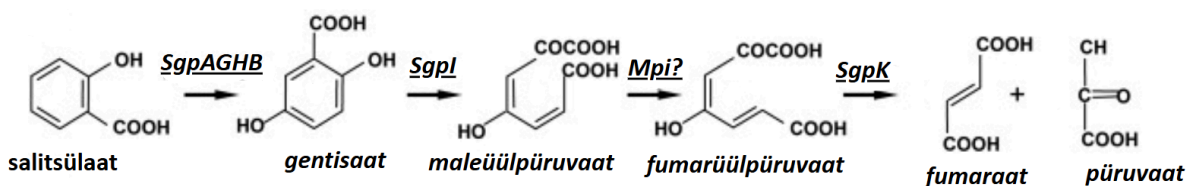
B. Gentisaadi rada salitsülaadi lagundamiseks tüves *Ralstonia sp.* U2. Tähistused: NagI – gentisaadi 1,2-dioksügenaas, NagL – maleülpüruvaadi isomeraas, NagK – fumarüülpüruvaadi hüdrolaas, GSH – glutatioon (Zhou jt., 2001; modifitseeritud).

Pseudomonas putida tüves AK5 toimub naftaleeni lagundamine gentisaadi raja kaudu ning ensüüme kodeerivad geenid paiknevad kahes operonis (Joonis 6A; Izmalkova jt., 2013). Esimene neist on klassikaline *nah* operon, mille abil konverteeritakse naftaleen salitsülaadiks (Izmalkova jt., 2013). Klassikaline *sal* operon tüvel puudub ning salitsülaad lagundatakse *sgpAIKGHB* operoni abil gentisaadi raja kaudu (Joonis 6B; Izmalkova jt., 2013).

A



B

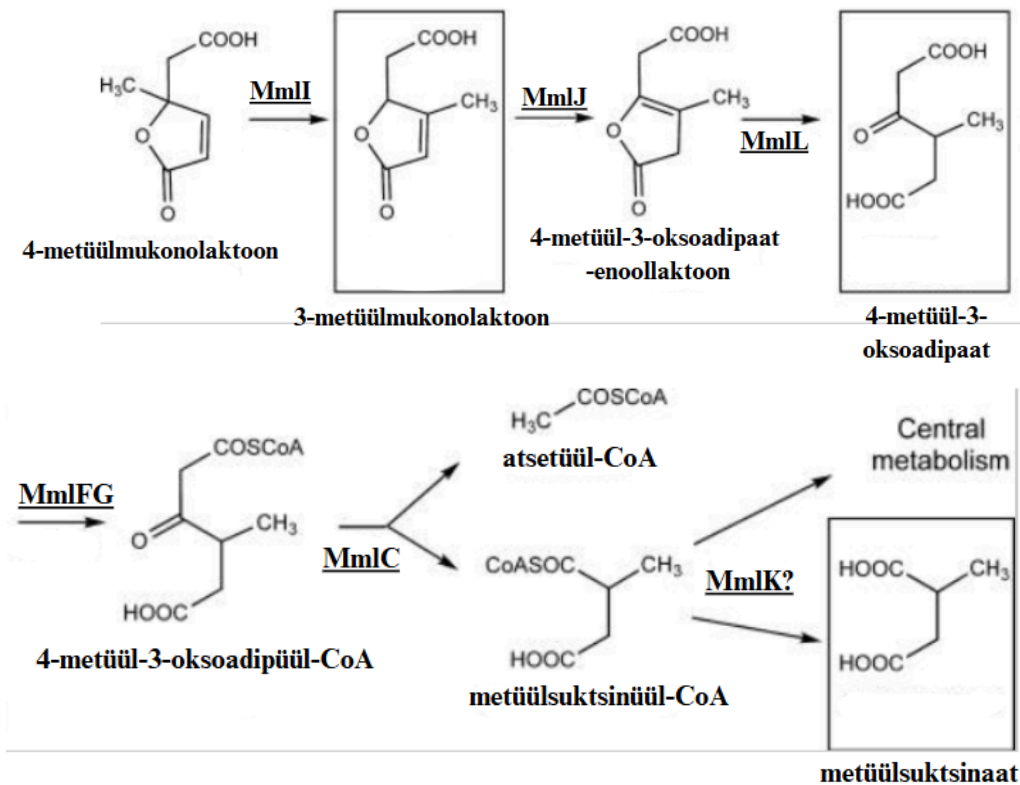


Joonis 6. A. *Pseudomonas putida* tüve AK5 *nah* ja *sgp* operonide struktuur. *sgp* operoni geenide produktid: Mfs1 – transportervalk, SgpR – transkriptsiooni regulaatorvalk, SgpA – salitsülaadi 5-hüdroksülaasi reduktaasi komponent, SgpI – gentisaadi 1,2-dioksügenaas, SgpK – fumarüülpüruvaadi hüdrolaas, SgpG – salitsülaadi 5-hüdroksülaasi oksügenaasi suur subühik, SgpH – salitsülaadi 5-hüdroksülaasi oksügenaasi väike subühik, SgpB – ferredoksiin, Mpi – maleülatsetoatsetaadi isomeraas, Mst1- kemotaksise valk, MerR – transkriptsiooni regulaator, Ivd – isovalerüül-CoA dehüdrogenaas. *nah* operoni geeniproduktide nimetused on Joonis 1. allkirjas.

B. *Pseudomonas putida* AK5 salitsülaadi lagundamine gentisaadi rajal (Izmalkova jt., 2013; modifitseeritud).

1.5. Metüülsalitsülaatide aeroobne lagundamine

Metüülsalitsülaatide täielik lagundamine toimub enamasti üle metüülkatehoolide katehooli *meta* rajal (Murray jt., 1972; Sala-Trepat jt., 1972; Pérez-Pantoja jt., 2010), sest *ortho* raja kaudu ei suuda bakterid seda teha (Pieper jt., 1985). 3- ja 4-metüülkatehooli lagundamisel *ortho* rajal tekib 4-metüülmukonolaktoon, mida pole puuduliku vaba prootoni tõttu võimalik konverteerida 3-oksoadipaat-enoollaktooniks (Bruce jt., 1989). Samas on leitud mitmeid tüvesid, näiteks *Pseudomonas reinekei* MT1, mis suudavad lagundada 4- ja 5-metüülsalitsülaati *ortho* rajal (Joonis 7; Cámara jt., 2007). *Sal* operonilt kodeeritavate SH, C120 ja mukonaadi tsüklomeraasi abil (Cámara jt., 2007) konverteeritakse 4- ja 5-metüülsalitsülaad 4-metüülmukonolaktooniks (Marin jt., 2010). Operoni *mml* kodeeritud ensüümide abil muudetakse see vaheühend metüülsuktsinaadiks (Joonis 7; Marin jt., 2010). Sarnast metabolismirada on kirjeldatud ka tüvedel *Cupriavidus necator* JMP134 ning *Rhodococcus rhodochrous* N75 (Bruce jt., 1989; Pieper jt., 1990; Prucha jt., 1997; Cámara jt., 2007)



Joonis 7. *Pseudomonas reinekei* tüves MT1 4-metülmukonolaktooni lagundamisrada. Vajalikud ensüümid (allajoonitud): MmlI – 4-metülmukonolaktooni metüülisomeraas, MmlJ – metülmukonolaktooni isomeraas, MmlL – 4-metüül-3-oksoadipaati-enoollaktooni hüdrolaas, MmlFG – 4-metüül-3-oksoadipaati-CoA transferaas, MmlC – 4-metüül-3-oksoadipüül-CoA tiolaas, MmlK – atsetüül-CoA transferaas/hüdrolaas. (Marin jt., 2010; modifitseeritud)

1.6. Klorosalitsülaaside aeroobne lagundamine

Erinevalt metüülsalitsülaatidest toimub klorosalitsülaaside metabolism spetsiaalse klorokatehhooli *ortho* raja kaudu (Pieper jt., 2010). Selle raja lõppsaaduseks on klororühmaga 3-oksoadipaati, mis lagundatakse lõpuni tavalises katehhooli *ortho* rajas (Vollmer jt., 1993). Klassikalise katehhooli *ortho* raja kasutamisel klorosalitsülaaside täielikul lagundamisel tekib kaks probleemi (Dorn ja Knackmuss, 1978; Blasco jt., 1995; Prucha jt., 1996; Skiba jt., 2002):

1. ensüümide kõrge substraadispetiifilisus, mis ei võimalda klorosalitsülaate efektiivselt lagundada,
2. protoanemoniini ja *cis*-dieenlaktooni kui toksiliste tupikühendite teke.

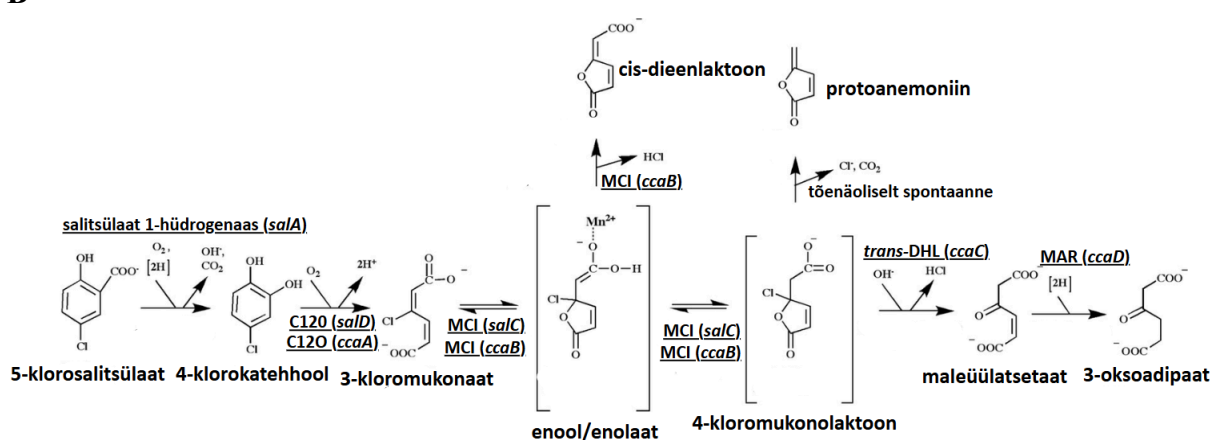
Pseudomonas reinekei tüves MT1 on aga leitud alternatiivne *ortho* rada 4- ja 5-klorosalitsülaaside lagundamiseks (Joonis 8B; Nikodem jt., 2003). Asendusrühmaga salitsülaadid ei indutseeri tüve *cat* operoni ekspressiooni, selliste substraatide lagundamiseks vajab MT1 *sal* ja *cca* operoni (Joonis 4A ja Joonis 8A; Cámara jt., 2007; Cámara jt., 2009). *salA* kodeerib salitsülaati 1-hüdrosülaasi, mille toimel tekib nii 4- kui ka 5-klorosalitsülaadist

4-klorokatehhool, mis lagundatakse C12O-de (SalD ja CcaA) ning mukonaadi tsükloisomeraaside (SalC ja CcaB) abil üle 3-kloromukonaadi 4-kloromukonaadiks (Nikodem jt., 2003; Cámara jt., 2007; Cámara jt., 2009). *trans*-dieenlaktooni hüdrolaasi (CcaC) toimel tekib 4-kloromukonolaktoonist maleüülatsetaat (Joonis 8B) ja tänu sellele kuhjub metabolismi käigus vähem protoanemoniini ning tüvi saab substraati *ortho* raja kaudu lõpuni metaboliseerida (Cámara jt., 2009).

A



B

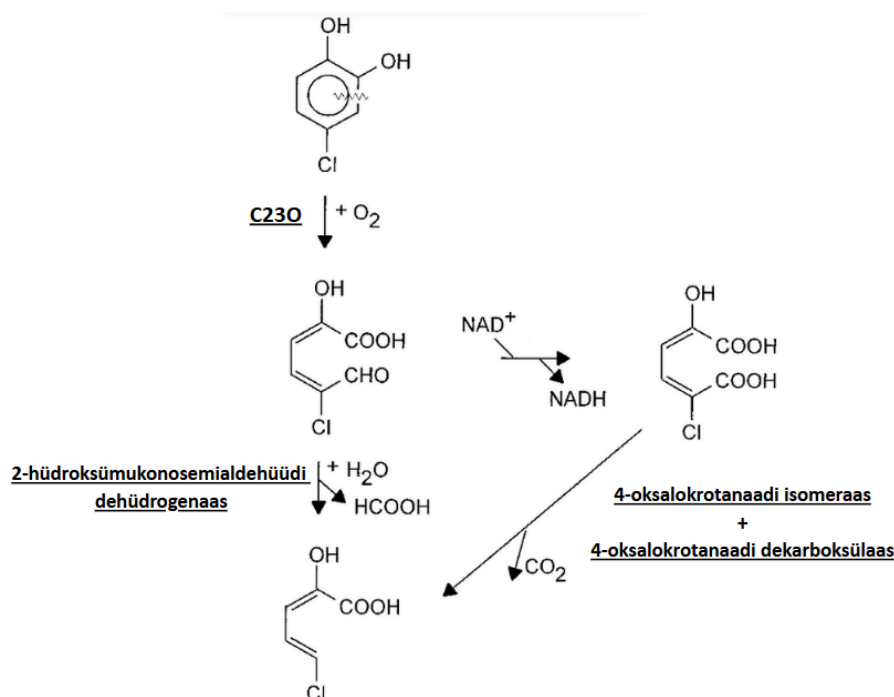


Joonis 8. A. *Pseudomonas reinekei* tüve MT1 *cca* operoni struktuur. Geenidelt kodeeritavad ensüümid: CcaB – mukonaadi tsükloisomeraas, CcaA – katehhooli 1,2-dioksügenaas, CcaR – transkriptsiooniregulaator, CcaC – *trans*-dieenlaktooni hüdrolaas, CcaD – maleüülatsetaadi reduktaas. **B.** 4- ja 5-klorosalitsülaadi lagundamisrada *P. reinekei* tüves MT1. Reaktsioonideks vajalikud ensüümid on allajoonitud, sulgudesse on märgitud neid kodeerivad geenid. Tähistused: C12O – katehhooli 1,2-dioksügenaas, MCI – mukonaadi tsükloisomeraas, *trans*-DHL – *trans*-dieenlaktooni hüdrolaas, MAR – maleüülatsetaadi reduktaas. (Cámara jt., 2009; modifitseeritud)

Klorokatehhoolide lagundamine katehhooli *meta* rajas takistab tupikühendite teke või C23O aktiivtsentris oleva rauaiooni oksüdeerimine ning ensüümi pöördumatu inaktivatsioon (Klecka ja Gibson, 1981; Bartels jt., 1984).

Samas on leitud tüvesid, mis suudavad seda substraati edukalt lagundada *meta* rajas. Näiteks *P. putida* GJ31, mille *cbzE* geenilt kodeeritud klorokatehhooli 2,3-dioksügenaas dekloreerib 3-klorokatehhooli ning konverteerib selle 2-hüdroksümukonaadiks, saadud ühend lagundatakse edasi *meta* rajas (Mars jt., 1999). Samamoodi suudavad 3-klorokatehhooli lagundada näiteks *P. fluorescens* SK1, *P. veronii* 16-6A, *Pseudomonas* sp. MG61 (Mars jt., 1999; Göbel jt., 2004). 4-klorokatehhooli lagundamisel C23O-ga tekib tavaliselt tupikühendina laimikollane (neeldumismaksimum lainepikkusel 378 nm)

5-kloro-2-hüdroksümukonosemialdehüüd (KHMS) (Wieser jt., 1994). Samas leidub ka seda ühendit lagundavaid tüvesid, näiteks *Comamonas testosteroni* JH5, mille 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi dehüdrogenaas ja -hüdrolaas suudavad tupikühendit lagundada ning substraati täielikult *meta* raja kaudu degradeerida (Joonis 9; Hollender jt., 1997).



Joonis 9. 4-klorokatehhooli lagundamine *Comamonas testosteroni* tüves JH5 (Hollender jt., 1997; modifitseeritud).

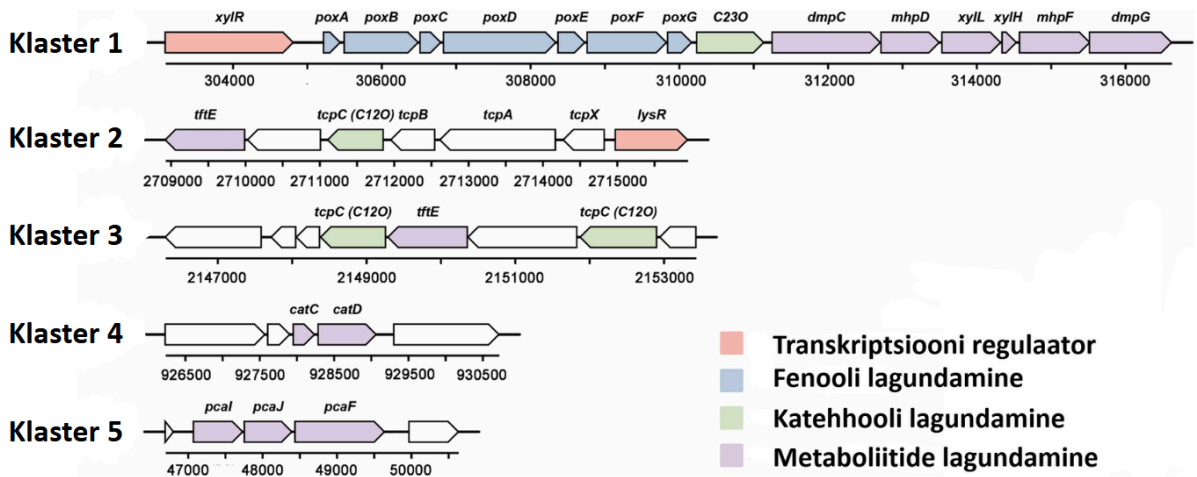
1.7. Fenooli aeroobne lagundamine

Hüdroksübenseen ehk fenool on ühe benseenituumaga aromaadne ühend, mis on inimesele toksiline. Pikaajaline kokkupuude kõrgemate fenooli kontsentratsioonidega võib kahjustada nii südant, neere kui ka hingamis- ja närvisüsteemi, ning põhjustada ka surma. Fenoolseid ühendeid vabaneb keskkonda näiteks biomassi lagunemisel, samas satub neid loodusesse ka ravimi-, fungitsiidide-, materjali- ning toiduainetööstusest (van Schie ja Young, 2000).

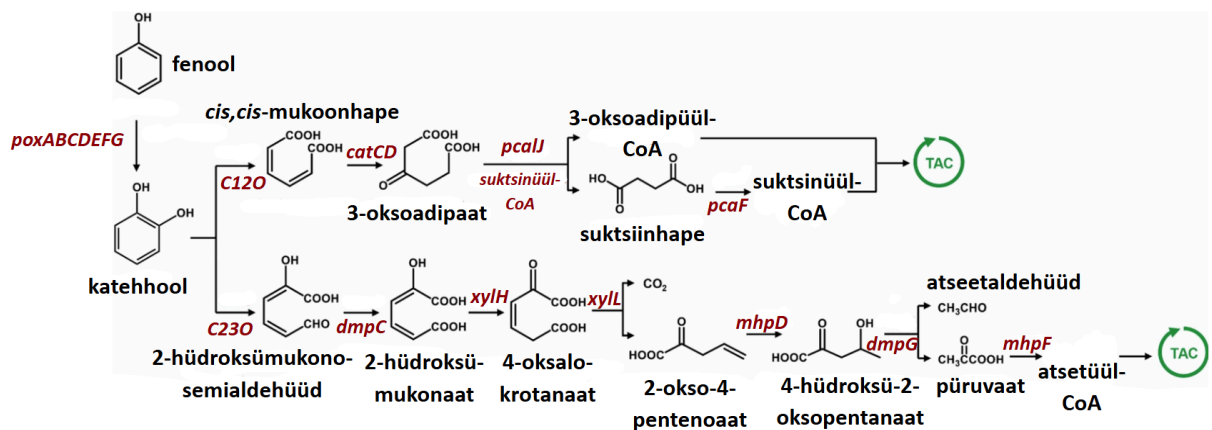
Fenooli aeroobse lagundamise esimeses etapis lisab mitme- või ühe komponendiline fenooli hüdroksülaas benseenituumale *ortho*-positsiooni ühe hüdroksüülrühma, mille tulemusena tekib katehool (Neujahr ja Gaal, 1973). Ühekomponentsed fenooli hüdroksülaasid, näiteks TbuD (*P. pickettii* PKO1) ja PheA (*Pseudomonas* sp. EST1001), on flavoproteiinid, mis kasutavad kosubstraatidena molekulaarset hapnikku ja NAD(P)H-d (Neujahr ja Gaal, 1975; Klecka ja Gibson, 1981; Nurk jt., 1991; Enroth jt., 1994). Multikomponentsed hüdroksülaasid on vähemalt kahest osast koosnevad ensüümid. Üks neist on oksügenaas, mis seob hapnikku ning selle abil hüdroksüleerib substraati. Teine on reduktaas, mis kannab elektrone NAD(P)H-lt üle oksügenaasile. (Powlowski ja Shingler, 1990) Mõnel ensüümil, näiteks

DmpKLMNOP (*Pseudomonas* sp. CF600) ja MopKLMNOP (*Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250), on olemas kolmas komponent, mis reguleerib nimetatud osade vahelist interaktsiooni (Nordlund jt., 1990; Schirmer ja Hillen, 1998).

A.



B.



Joonis 10. A. *Cupriavidus nantongensis* tüve X1 fenooli lagundamiseks vajalike klastrite struktuur (Zhang jt., 2023; modifitseeritud).

B. *Cupriavidus nantongensis* tüve X1 fenooli lagundamisrajad koos vahesubstraatide ning vajalike ensüümidega (Zhang jt., 2023; modifitseeritud). Tähistused: PoxABCDEF – fenooli hüdroksülaas, C12O – katehhooli 1,2-dioksügenaas (TcpC), CatCD – mukonolaktooni isomeraas ja 3-oksoadipaadi enoolaktonaas, PcalJ – 3-oksoadipaati-CoA transferaas, PcaF – β -ketoaladiipüül-CoA tiolaas, C23O – katehhooli 2,3-dioksügenaas, DmpC – 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi dehüdrogenaas, XylH – 2-hüdroksümukonaadi tautomeraas, XylL – 4-oksalkrotanaadi dekarboksülaas, MhpD – 2-okso-4-pentenoadi hüdrataas, DmpG – 4-hüdroksü-2-oksovaleraadi aldolaas, MhpF – atsetaldehyüdi dehüdrogenaas. (Zhang jt., 2023; modifitseeritud).

Saadud katehhooli lagundatakse edasi katehhooli *ortho* või *meta* rajad (Evans, 1947; Shingler jt., 1989; Ehrt jt., 1995; Schirmer ja Hillen, 1998). Samas on leitud ka tüvesid, millel on fenooli lagundamiseks olemas mõlemad rajad. Selline on näiteks *Cupriavidus*

nantongensis tüvi X1, mis suudab kasutada fenooli ainsa süsiniku- ja energiaallikana (Shi jt., 2019). Fenooli lagundamist alustab *poxABCDEFG* geenidelt ekspresseeritav mitmekomponendiline fenooli hüdroksülaas (Joonis 10B). Kuigi katehooli saab tüvi lagundada mõlemat, *meta* ja *ortho*, katabolismirada mööda, leiti katsetes, et katehooli 2,3-dioksügenaasid teevad seda märgatavalt efektiivsemalt ning tõenäoliselt on eelistatud *meta* rada. Kõik degradatsiooniks vajalikud geenid asuvad tüve X1 kromosoomis viies klastris (Joonis 10A). (Zhang jt., 2023)

1.8. Segasubstraatide lagundamine

Looduses puutuvad bakterid sageli kokku erinevate ühendite segudega ning eduka kasvu jaoks on oluline adapteerumisvõime ja mitmekülgne metaboolne võimekus (Choi jt., 2007). Esimesena lagundatakse enamasti kasvukeskkonnast lihtsamaid substraate, näiteks suhkruid, ning alles pärast seda degradeeritakse keerukamaid, spetsiifilisi metabolismi radasid vajavaid substraate, näiteks aromaatsid ühendeid (Harder jt., 1997). Samas on leitud baktereid, mis suudavad mõningaid substraate metaboliseerida samal ajal (Harder jt., 1997).

Kasvukeskkonnas olevad segasubstraadid võivad bakterite kasvu soodustada. Näiteks võib kasvuks sobivam substraat madalal kontsentratsioonil varustada mikroorganisme vajaliku energiaga, et kiiresti paljuneda ning ning sellega suurendada nende bakterite arvukust, mis teist kompleksemat ühendit lagundada suudavad (Schmidt ja Alexander, 1985; Alvarez ja Vogel, 1991; Nzila, 2013). Näiteks suudab fenantreeni või salitsülaati sisaldavas söötmes kasvanud *P. saccharophila* tüvi P15 lagundada energia- ja süsinikuallikana ka benzo(a)püreeni (Chen ja Aitken, 1999). Sarnast efekti on täheldatud *P. putida* tüves ATCC 17484, mis suudab karbasooli (dibensopürrool) energia- ja süsinikuallikana kasutada vaid siis, kui söötmesse on lisatud ka salitsülaati (Loh ja Yu, 2000). Paljud bakteriaalsete metabolismiradade võtmeensüümid (nt katehooli dioksügenaasid) on väga laia substraadispetsiifikaga, tänu millele on võimalik substraatide segudes lagundada ka sarnaseid, nt asendusrühmadega, ühendeid, mis ei pruugi iseseisvalt olla võimelised geeniekspressiooni indutseerima (Reardon jt., 2000). Näiteks suudavad *P. putida* ATCC 49451 ja LY1 kasutada fenooli süsiniku- ja energiaallikana, aga 4-klorofenooli üksiksubstraadina mitte. Nende kahe substraadi segu suudavad tüved aga täielikult metaboliseerida (Wang ja Loh, 2000; Wang jt., 2014).

Samas võib segasubstraatide korral üks ühend inhibeerida teise lagundamiseks vajalike geenide ekspressiooni (Müller jt., 1996; Harder jt., 1997). Sellist efekti on näiteks tuvastatud tüves *Pseudomonas putida* H, millel on fenooli lagundamiseks plasmiidne *phl* operon (Müller jt., 1996). Kui fenooli sisaldavasse söötmesse lisada glükoosi või suktsinaati on operoni transkriptsiooniregulaatori PhIR töö häiritud ning lagundamiseks vajalike geenide ekspressioon inhibeeritud (Müller jt., 1996). Samuti võib tekkida kahe substraadi vahel konkurents ensüümi aktiivsaii seandumisel. Sellist efekti on täheldatud näiteks tüves *P. putida* CCRC 14365, mis suudab üksiksubstraadina lagundada fenooli ja salitsülaati, kusjuures neist esimese degradatsioon on märgatavalt kiirem (Tsai ja Juang, 2006). Lisades fenooli sisaldavasse söötmesse isegi madalal kontsentratsioonil salitsülaati, tekib väga tugev konkurentne inhibitsioon, ning fenooli lagundamiskiirus väheneb märgatavalt (Tsai ja Juang, 2006). Samuti võivad koguneda ühe substraadi lagundamisel toksilised ühendid, mis inhibeerivad teise degradatsiooniks vajalike ensüümide tööd. Näiteks on leitud *Pseudomonas* tüve PPOI puhul, et p-ksüleeni lagundamisel benseeni sisaldavas keskkonnas tekivad toksilised vaheühendid, mis benseeni lagundamist väga tugevalt inhibeerivad (Oh jt., 1994).

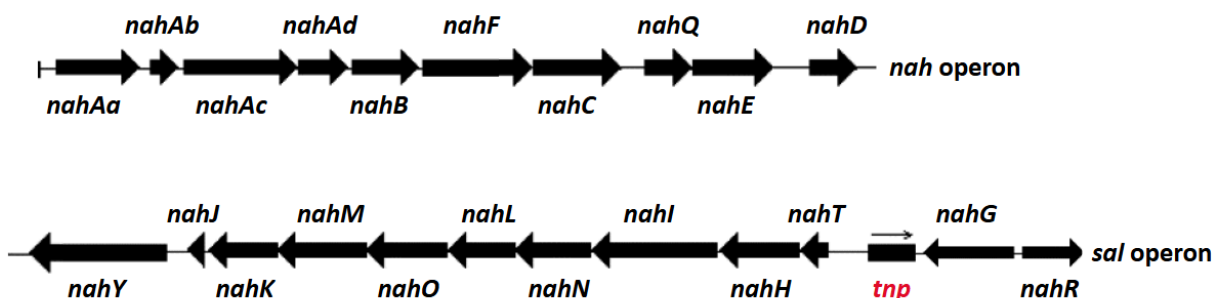
1.9. Töö praktilises osas kasutatud tüvede iseloomustamine

1.9.1. *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4

Pseudomonas putida NCIB 9816 eraldasid Walesis aiamullast 1964. aastal Davies ja Evans (Davies ja Evans, 1964). Erinevates laborites tekkisid aja jooksul uued tüved, mis erinevad naftaleeni katabolismi regulatsiooni ning plasmiidide arvu poolest (Williams jt., 1975; Barnsley, 1976; Serdar ja Gibson, 1989).

Tüve NCIB 9816-4 kirjeldasid esimest korda Serdar ja Gibson (Serdar ja Gibson, 1989) ning see suudab süsiniku- ja energiaallikana kasutada naftaleeni ja salitsülaati, fenooli kohta andmed puuduvad (Serdar ja Gibson, 1989). *P. putida* tüvel NCIB 9816-4 on üks 83042 aluspaari suurune plasmiid pDTG1 (Serdar ja Gibson, 1989), millel asuvad NAH7-tüüpi *nah* ja *sal* operonid (Joonis 11; Dennis ja Zylstra, 2004). Naftaleeni lagundamise raja alumine operon on selles tüves aga inaktiivne, kuna geenide *nahG* ja *nahT* vahele on liikunud insertiooni element (*tnp*) (Dennis ja Zylstra, 2004). Insertiooni element tekitab DNA-s kaksikahelalisi juuksenõelastruktuure, takistades järgnevate geenide ekspressiooni (Dennis ja Zylstra, 2004). Defektse katehooli *meta* raja tõttu toimub salitsülaadi lagundamine tüves NCIB 9816-4 kromosomaalse *ortho* raja kaudu (Dennis ja Zylstra, 2004). Metüül- ja klorosalitsülaadid indutseerivad *P. putida* tüves NCIB 9816-4 vaid katehooli *meta* rada

kodeerivate geenide ekspressiooni, mistõttu ei suuda tüvi neid ühendeid energia- ja süsinikuallikana kasutada (Barrow, 2022; Peegel, 2023).



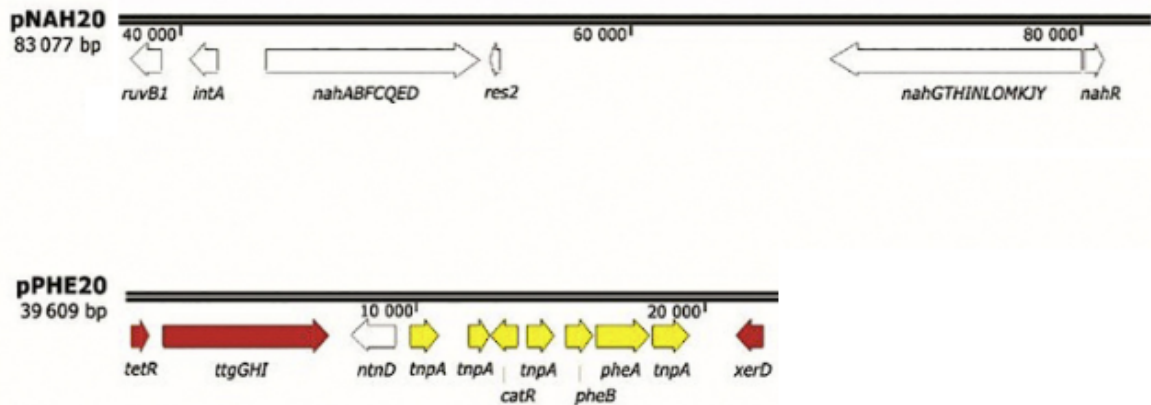
Joonis 11. *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 *nah* ja *sal* operoni struktuur (Dennis ja Zylstra, 2004; modifitseeritud).

1.9.2. *Pseudomonas fluorescens* PC20

1994. aastal eraldas Eeva Heinaru Kohtla jõest tüve *Pseudomonas fluorescens* PC20 (Heinaru jt., 2000). Tüvi suudab ainsa süsiniku- ja energiaallikana kasutada nii naftaleeni, salitsülaati kui ka fenooli, lagundades kaht esimest katehooli *meta* ja viimast *ortho* raja kaudu (Merimaa jt., 2006; Heinaru jt., 2009). Tüvel on kolm plasmidi: pNAH20, pPHE20 ja pG20 (Heinaru jt., 2009; Elken jt., 2020).

Naftaleeni ja salitsülaadi lagundamiseks vajalikku salitsülaadi 1-hüdroksülaasi ja katehooli 2,3-dioksügenaasi kodeerivad geenid *nahG* ja *nahH* asuvad plasmiidil pNAH20 (Joonis 12; Heinaru jt., 2009). See on 83042 aluspaari suurune IncP-9 tüüpi plasmiid on peaaegu identne *P. putida* tüve NCIB 9816-4 plasmiidiga pDTG1 (Dennis ja Zylstra, 2004; Heinaru jt., 2009). Erinevalt pDTG1-st puudub pNAH20 1196 aluspaarine degradatsioonirada inaktiveeriv insertioonielement *nahT* ja *nahG* geenide vahel ning tüvi lagundab naftaleeni täielikult katehooli *meta* raja kaudu (Heinaru jt., 2009).

pPHE20 on 39609 aluspaari suurune plasmiid, kus asuvad *pheBA* ja *ttg* operonid (Elken jt., 2020). Neist esimeses asuvad *pheA* ja *pheB* geenid, millelt sünteesitakse vastavalt fenooli lagundamiseks vajalikku fenooli monooksügenaasi ja katehooli 1,2-dioksügenaasi (Elken jt., 2020). Operonilt *ttg* sünteesitakse valke, mis sarnanevad tolueeni väljavoolu-pumpade omadega (Elken jt., 2020).



Joonis 12. *Pseudomonas fluorescens* PC20 tüve naftaleeni lagundamiseks vajalikud geenid paiknevad plasmiidil pNAH20 ning fenooli degradatsiooniraja operon plasmiidil pPHE20 (Elken jt., 2020; modifitseeritud).

pG20 on 133709 aluspaari suurune plasmiid, mis ei sisalda kataboolseid geene (Elken jt., 2020). Samas on plasmiidil kolm operoni (*mer*, *cop*, *czc*), mis sarnanevad väljavoolu-pumpasid kodeerivate operonidega ning võiksid aidata kaasa raskemetallide resistentsusele (Elken jt., 2020). Fenooli ja salitsülaadi segul kasvades on *P. fluorescens* PC20 rakkudes aktiveeritud mõlemad katehhooli rajad ning tüvi lagundab substraate samaaegselt (Heinaru jt., 2009).

P. fluorescens PC20 lagundab nii metüül- kui ka klorosalitsülaate üksiksubstraatidena katehhooli *meta* raja kaudu (Barrow, 2022; Peegel, 2023).

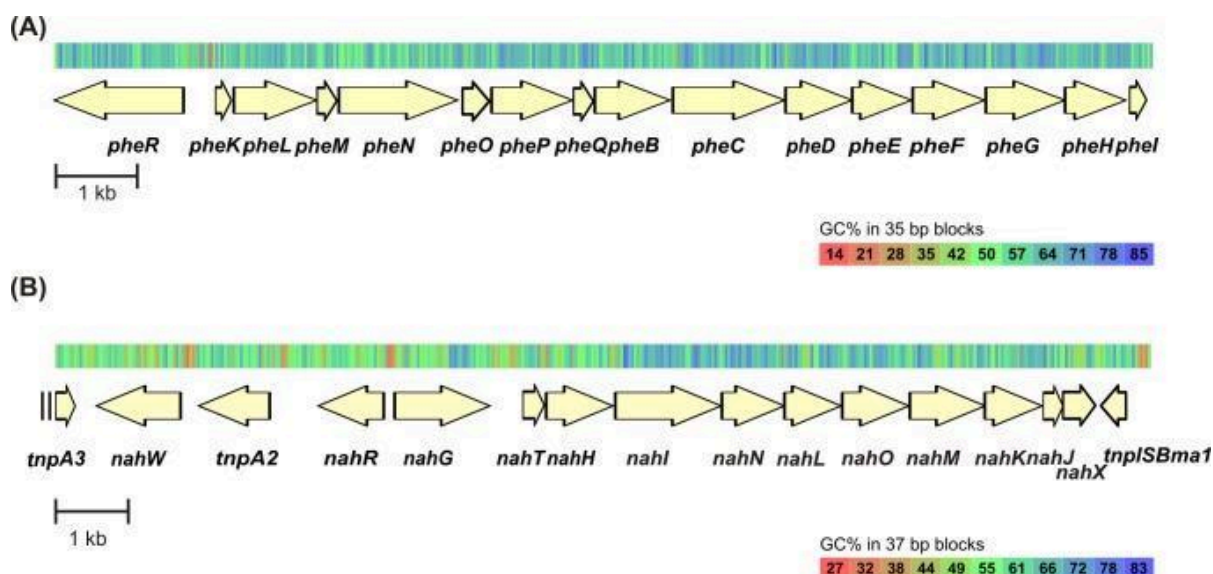
1.9.3. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70

2008. aastal eraldas Eeva Heinaru Narva lahest *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70, mis kasutab süsiniku- ja energiaallikana nii fenooli, naftaleeni kui ka salitsülaati, lagundades neid kõiki katehhooli *meta* raja kaudu (Jutkina jt., 2011; Jõesaar jt., 2017).

Tüves C70 on kataboolsed geenid kromosomaalsed. Fenooli lagundamiseks vajalikud geenid paiknevad operonis *pheRKLMNOPQBCDEFGHI*, mis on sarnane *Pseudomonas sp.* CF600 *dmp* operoniga (Joonis 13; Jõesaar jt., 2017). Katehhooli *meta* raja võtmeensüümi, katehhooli 2,3-dioksügenaasi, kodeerib selles operonis *pheB* geen (Jõesaar jt., 2017). Operoni reguleerib XylR tüüpi regulaator PheR (Jõesaar jt., 2017).

Salitsülaadi lagundamiseks vajalikud geenid on tüvel NAH7-tüüpi *sal* operonis (Joonis 13; Jõesaar jt., 2017). Katehhooli 2,3-dioksügenaasi kodeerib selles operonis *nahH* geen, mida ekspresseeritakse konstitutiivselt (Jõesaar jt., 2017). Tüve C70 *nahGTHINLOMKJX* operon sarnaneb *P. stutzeri* tüves AN10 kirjeldatud operoniga. Nimelt on mõlemal tüvel kaks salitsülaadi 1-hüdroksülaasi kodeerivat geeni *nahW* ja *nahG*, kusjuures mõlema ensüümi

aminohappelised järjestused on tüvedes identsed (Jõesaar jt., 2017). Samuti on selles operonis geen *nahX*, mille funktsioon on teadmata (Jõesaar jt., 2017). Kogu *nah* operon asub tüvel kahe transposooni vahel, mis viitab homoloogilisele geeniülekandele põhinevale päritolule (Jõesaar jt., 2017).



Joonis 13. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve C70 *phe* (A) ja *sal* (B) operonide struktuur (Jõesaar jt., 2017).

Tüve redundantsete katehholi 2,3-dioksügenaasid ja salitsülaadi 1-hüdrosülaasid võimaldavad tüvel ka kõrgetel kontsentratsioonidel efektiivselt fenooli ja salitsülaati lagundada (Jõesaar jt., 2017).

Fenooli ja salitsülaadi segus on *P. pseudoalcaligenes* C70 ekspresseeritud mõlemad katehholi 2,3-dioksügenaasid, PheB ja NahH, ning keskkonda koguneb vähem toksilist katehholi (Jõesaar jt., 2017).

Tüvi lagundab metüül- ning klorosalitsülaate üksiksubstraatidena *meta* raja kaudu (Barrow, 2022; Peegel, 2023).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks on saada teada, kas erinevad *Pseudomonas* tüved suudavad lagundada metüül- või klorosalitsülaate fenooli või salitsülaadi juuresolekul ning kuidas mõjutab nende ühendite degradatsiooni toitainerikka söötme kasutamine. Varasemates töödes näidati, et kataboolsete redundantsete ensüümide olemasolu ei andnud eelist tüvele *P. pseudoalcaligenes* C70 võrreldes ühe SH-ga tüvedega *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 ja *Pseudomonas fluorescens* PC20 üksiksubstraatide lagundamisel. Selles uurimistöös tahetakse teha kindlaks, kuidas need ensüümid mõjutavad tüve C70 võimekust metüül- või klorosalitsülaate sisaldavas substraadisegus.

Eesmärkide saavutamiseks:

1. kasvatati uuritavaid tüvesid fenooli või salitsülaati sisaldavates minimaal- või R2A söötmetes kuhu oli lisatud metüül- või klorosalitsülaate,
2. määrati SH-sid ja katehooli dioksügenaase kodeerivate geenide ekspressioonitasemed segasubstraatidel kasvanud rakkudes,
3. spektrofotomeetriliselt määrati substraatide ja vaheühendite kontsentratsioonide muutumist kasvukeskkonnas.

2.2. Materjal ja meetoodika

2.2.1. Kasutatud bakteritüved

P. pseudoalcaligenes C70 (EEUT C70), *Pseudomonas fluorescens* PC20 (EEUT PC20) ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 (EEUT NCIB 9816-4) on pärit Tartu Ülikooli looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioonist CELMS (<https://eemb.ut.ee/celms>). Tüvesid kasvatati R2A söötmeplaatidel (BD Difco; koostis: pärmiekstrakt, peptoon, kasaminohapped, dekstroos, lahustuv tärklis, Na-püruvaat, K₂HPO₄, MgSO₄, agar) 30 °C juures ning säilitati 4 °C külmikus.

2.2.2. Kasvatused minimaalsöötmetes

Tüvesid kasvatati ette üleöö kahes 250 ml Erlenmeyeri kolvis, mis sisaldasid 50 ml R2A söödet, ühte lisati Na-salitsülaati (2,5 mM; edaspidi kasutatakse tekstis nimetust salitsülaat) ning teise fenooli lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM. Inokulumi jaoks tsentrifuugiti rakud (5000 rpm, 20 °C, 10 min) ning eemaldati supernatant. Rakud suspendeeriti 10 ml minimaalsöötmes (M9 - Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl; mikroelemendid - MgO, CaCO₃, HCl, FeSO₄,

ZnSO₄, MnSO₄, CuSO₄, CoSO₄, H₃BO₃) ja mõõdeti kultuuri neelduvus lainepikkusel 580 nm (Ultrospec 7500; Biochrom). Bakterite kasvukõverate määramiseks tehti külvid ettekasvatusest 50 ml minimaalsöötmesse nii, et lahuse A580 nm oleks ligikaudu 0,1. Kloro- (1,5 mM) ja metüülsalitsülaate (1,5 mM) lagundamist uuriti söötmetes, mis sisaldasid lisaks veel fenooli (3 mM) või salitsülaati (3 mM) (Sigma-Aldrich). Lisaks kasvatati rakke ka vaid salitsülaati (3 mM), fenooli (3 mM) või nende kahe segu (mõlema kontsentratsioon 3 mM) sisaldavas minimaalsöötmes.

Kolvid asetati Multitron Standard (Infors HT) loksutile (30 °C; 130 rpm) ning kasvukõvera määramiseks võeti proove iga kahe tunni tagant ning mõõdeti nende A580nm spektrofotomeetriga Ultrospec 7500 (Biochrom). Substraatide kasutamise ja vaheühendite tekke määramiseks tsentrifuugiti 1 ml proovi (Eppendorf MiniSpin; 1 min, 13400 rpm), valmistati 1:10 lahjendus ja mõõdeti neeldumisspekter lainepikkuste vahemikus 190-580 nm. Katseid viidi läbi vähemalt kaks korda.

2.2.3. RNA eraldamine geenide ekspressiooni määramiseks

Tüvesid kasvatati samamoodi nagu minimaalkasvatuste puhul (Ptk 2.2.2.), kuid minimaalsöötme asemel kasutati R2A vedelsöödet. Logaritmisest kasvufaasist võetud proovid tsentrifuugiti (3 min, 8000 rpm) ning eemaldati supernatant. Rakud külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati - 80 °C juures.

RNA isoleeriti NucleoSpin RNA II kitiga (Macherey-Nagel) tootja juhendi järgi, kuid proove töödeldi täiendavalt Dnaas I-ga (Thermo Fisher Scientific) genoomse DNA eemaldamiseks.

RNA kontsentratsioon määrati NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) spektrofotomeetriga ning puhtust analüüsiti agarosgeelelektroforeesiga (Ptk 2.2.4).

2.2.4. Agarosgeelelektroforees

Proovidest eraldatud RNA puhtuse kontrollimiseks kasutati geelelektroforeesi. Selleks valmistati 1% agarosiga geel 1x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2). RNA visualiseerimiseks lisati geelile etiidiumbromiidi (0,1 µg ml⁻¹). Geelile kanti 3 µl proovi koos 1 µl foresivärviga (Thermo Scientific, Orange Loading dye, (6X)) ning suurusmarker GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). Geelelektroforees (Mupid-ExU; 100V; 10 min) viidi läbi 1x TAE puhvril ning pildistati seejärel UV-valguslual.

2.2.5. qRT-PCR

Katehhooli dioksügenaase (C12O ja C23O) ning salitsülaadi 1-hüdrosülaase (SH) kodeerivate geenide ekspressiooni uuriti qRT-PCR abil. Referentsgeeniks valiti *polA*, mis

kodeerib DNA polümeraas I. qRT-PCR jaoks kasutati Rotor-Gene Q termotsüklerit (Qiagen) ja SOLIScript 1-step SolisGreen qPCR 2.0 kitti (Solis Biodyne). Tootja soovitusel kasutati segudes 2 kordset ensüümikogust. Reaktsioonisegu maht oli 10 µl ning see sisaldas 10 ng RNA-d. Kasutati järgnevat qRT-PCR programmi:

1. 50 °C 20 min
 2. 95 °C 10 min
 3. 95 °C 15 s; 58 / 61 °C (vastavalt kasutatud praimeritele, vt. Lisa 1). Tsükli korrati 40 korda.
 4. 40 °C 1 min
 5. Sulamiskõver 72 – 95 °C, tõus 1 kraadi haaval, 4 s paus enne iga uut etappi.
- Saadud andmeid analüüsiti Rotorgene 2.02 (Qiagen) ja LinRegPCR 2021.2 programmide abil.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Kasv segasubstraatidel

Tüvede *P. putida* NCIB 9816-4, *P. fluorescens* PC20 ja *P. pseudoalcaligenes* C70 puhul on varasemalt uuritud metüül- ja klorosalitsülaate lagundamist üksiksubstraatidena (Barrow, 2022; Peegel, 2023). Looduses peavad bakterid aga kokku puutama erinevate substraatide segudega, mistõttu on efektiivse bioremediatsiooni jaoks oluline valida bakteritüved, mis suudavad kohaneda komplekses kasvukeskkonnas. Mitmete mikroobiliikide puhul on tuvastatud erinevate asendusrühmadega aromaatsete ühendite kometabolismi (Nzila, 2013). Selleks, et teada saada, kas töös kasutatavad tüved on efektiivsed segasubstraatide lagundajad, uuriti nende kasvu erinevaid substraate sisaldavates söötmetes.

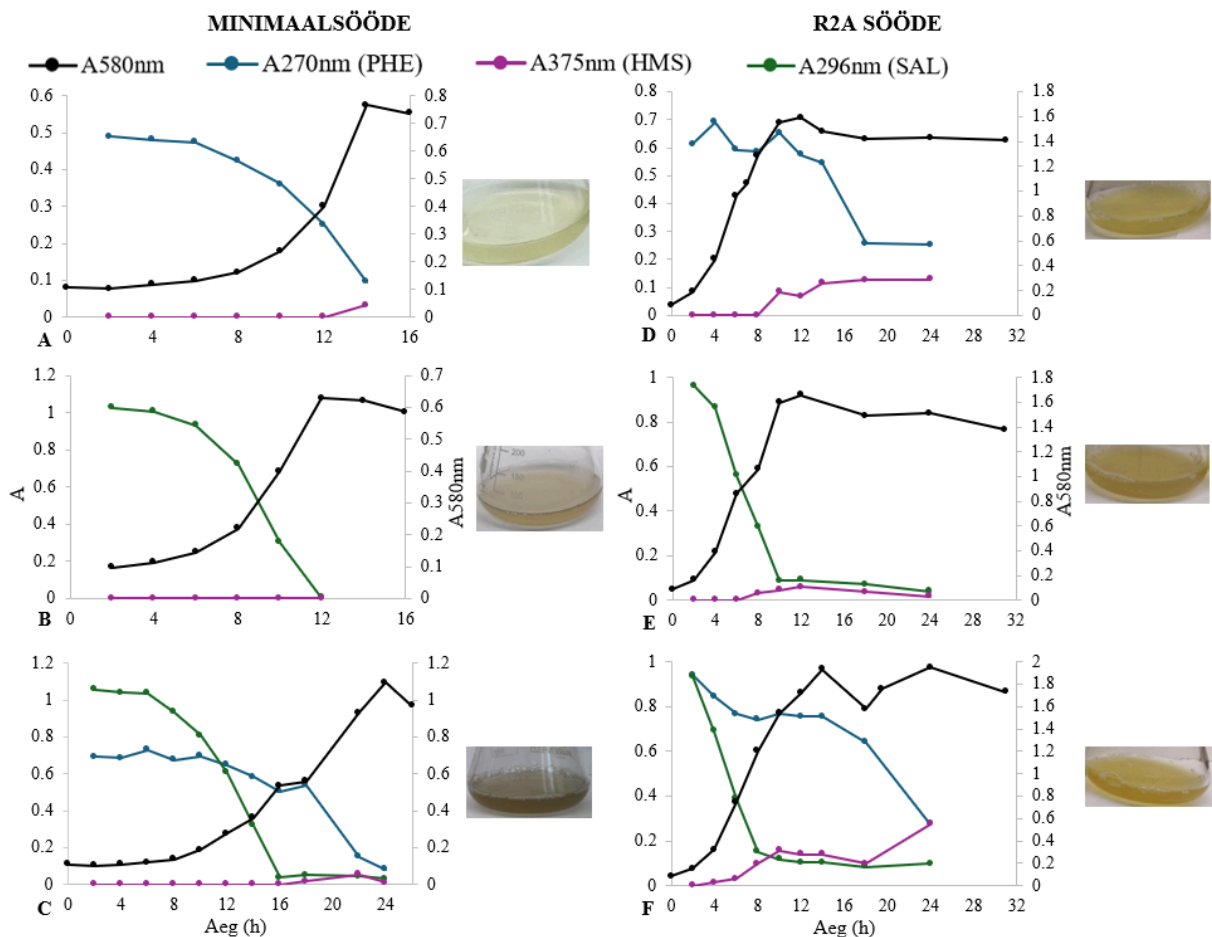
2.3.1.1. *P. putida* NCIB 9816-4 kasv metüülsalitsülaate ning fenooli või Na- salitsülaati sisaldavates minimaal- ning R2A söötmetes

Varasemate uuringute põhjal on teada, et salitsülaati lagundab tüvi NCIB 9816-4 kromosomaalse *ortho* raja kaudu, kuna *sal* operoni inserteerunud element takistab *meta* raja jaoks vajalike ensüümide sünteesi (Dennis ja Zylstra, 2004; Barrow, 2022; Peegel, 2023). Tüvi ei suuda efektiivselt metüülsalitsülaate üksiksubstraatidena lagundada. 4- ja 5MS indutseerivad tüves vaid katehhooli 2,3-dioksügenaasi (NahH) sünteesi ning degradatsioon defektse *meta* raja kaudu on ebaefektiivne. 3MS indutseerib äärmiselt madalal tasemel mõlema raja dioksügenaase kodeerivate geenide (*nahH* ja *catA*) ekspressiooni. (Barrow, 2022)

Kõigi selles uurimistöös tehtud katsete puhul on märgata kasvukeskkonna värvi muutust (Joonis 14-16). Söötmete värvumist pruuniks põhjustavad tõenäoliselt katehhooli spontaansel oksüdatsioonil tekkivad ning polümeriseeruvad kinoonid (Hoffmann-Ostenhof, 1963; Prieto jt., 1993; Park jt., 2004). Kollast värvi annab söötmetele kogunev HMS, oranži tõenäoliselt *meta* raja vaheühendite või mõlema katehhooli degradatsiooniraja samaaegsel aktiveerimisel tekkivate toksiliste ainete kuhjumine (Heinaru jt., 2001; Jiménez jt., 2014).

P. putida NCIB 9816-4 lagundab minimaalsöötmetes üksiksubstraatidena efektiivselt nii fenooli kui ka salitsülaati (Joonis 14A ja B). Minimaalsöötmes lagundab tüvi fenooli peaaegu täielikult 14 tunniga, kuid madalal tasemel koguneb HMS. Fenooli üksiksubstraadina sisaldavas söötmes on *nahG* (SH) ja *catA* (C12O) ning *nahH* (C23O) suhteline mRNA hulk väga madal (Joonis 17), sellest võib järeldada, et *sal* operoni indutseerib ainult salitsülaati. R2A söötmes on kõigis fenooli sisaldavates katsetes selle substraadi lagundamine häiritud ning suuremahulisem degradatsioon algab alles bakterite kasvu statsionaarse faasi saabumisel, mis hetkeks on kasvukeskkonnast tõenäoliselt kogu toitainerikas sööde otsa saanud (Joonis 14 ja 15). R2A-s sisalduv glükoos inhibeerib kirjanduse järgi fenooli lagundamiseks vajalikke ensüüme kodeerivate geenide ekspressiooni (Zhang ja Xia, 2019). Salitsülaatide lagundamine algab R2A söötmetes märgatavalt varem kui minimaalsöötmetes (Joonis 14 ja 16). Seda põhjustab tõenäoliselt R2A-s sisalduv glükoos, mis kirjanduse andmetel soodustab mitmete aromaatsete ühendite, näiteks naftaleeni, degradatsiooni. Glükoos on kergesti lagundatav ning sellest saadava energia abil kiiresti paljunedes suureneb ka kompleksemaid ühendeid degradeerivate bakterite populatsioon (Simarro jt., 2011). Salitsülaati sisaldavas söötmes ekspresseeritakse C23O kodeerivat *nahH* geeni väga madalal tasemel, *nahG* (SH) ja *catA* (C12O) suhteline mRNA hulk on aga palju suurem kui ilma lisa substraadita R2A söötmes (Joonis 17), mis kinnitab salitsülaadi lagundamisel *ortho* raja kasutamist.

Salitsülaadi ja fenooli segus on kasvukõveral näha minimaalsöötmes kahte ja R2A-l ühte logaritmilist kasvufaasi, esmalt kasutatakse rakkude poolt ära salitsülaati ning seejärel alles fenool (Joonis 14C ja F). Minimaalsöötmes kulub salitsülaadi ning fenooli lagundamiseks vastavalt 4 ja 10 tundi kauem kui nende ühendite degradatsioonil üksiksubstraatidena (Joonis 14A-C). Nii SH kui ka fenooli hüdroksülaas kasutavad kosubstraatidena NAD(P)H ja hapnikku ning tekkiv konkurents tõenäoliselt inhibeerib mõlema tööd (Katagiri jt., 1962; Neujahr ja Gaal, 1975; Powlowski ja Shingler, 1990). Fenooli ja salitsülaati sisaldavas segus on *nahG* (SH) suhteline mRNA hulk kõrgem kui ainult salitsülaati sisaldavas R2As, *catA* (C12O) oma aga enam-vähem sama (Joonis 17). Ühendite segu sisaldavas R2A-s kulub salitsülaadi lagundamisele 4 tundi vähem aega kui minimaalsöötmes (Joonis 14C ja F).

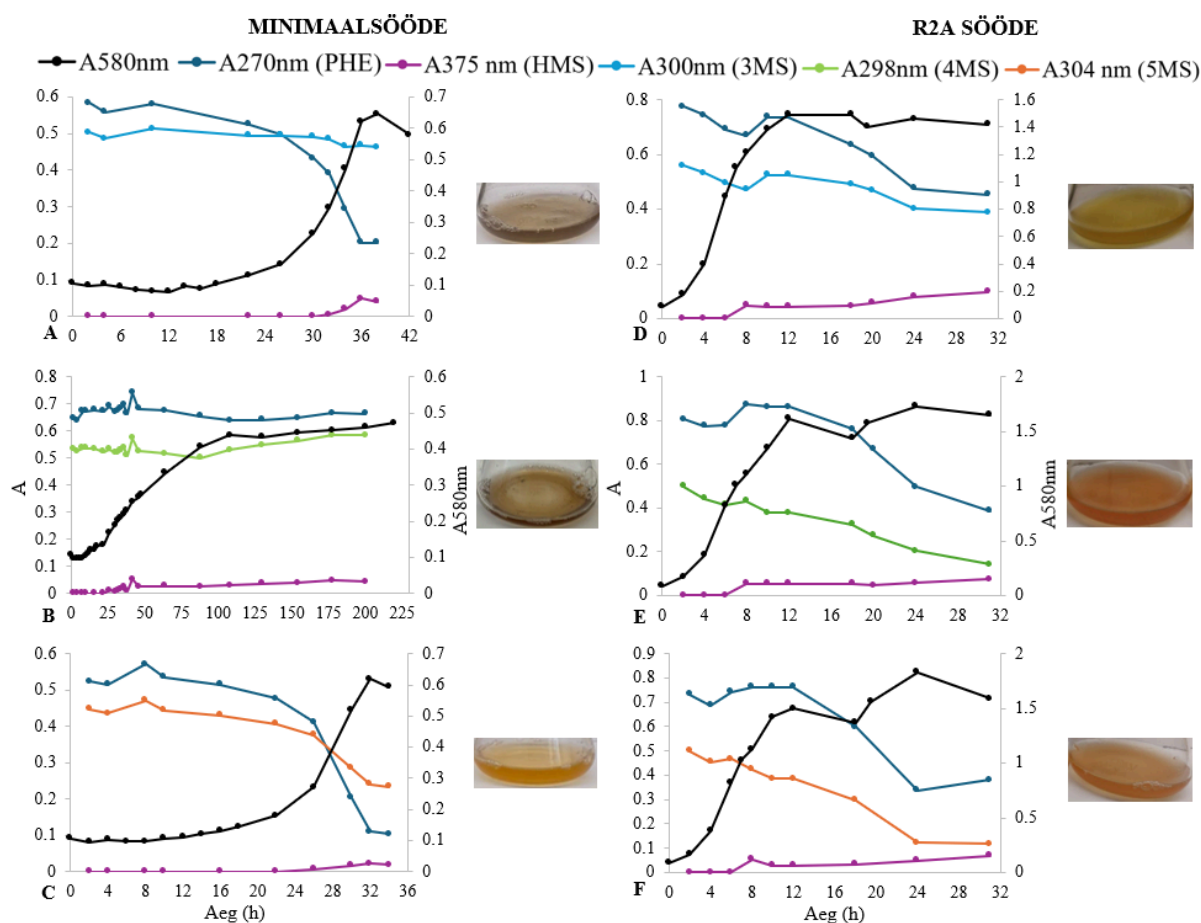


Joonis 14. *P. putida* NCIB 9816-4 kasv fenooli, PHE, (A, D), salitsülaati, SAL, (B, E) ning fenooli ja salitsülaati (C, F) sisaldavates minimaal (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (fenool A270nm, salitsülaat A296nm) ja vaheühendi (2-hüdrosümukonosemialdehüüd, HMS, A375nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud foto vastava söötmega kolvist.

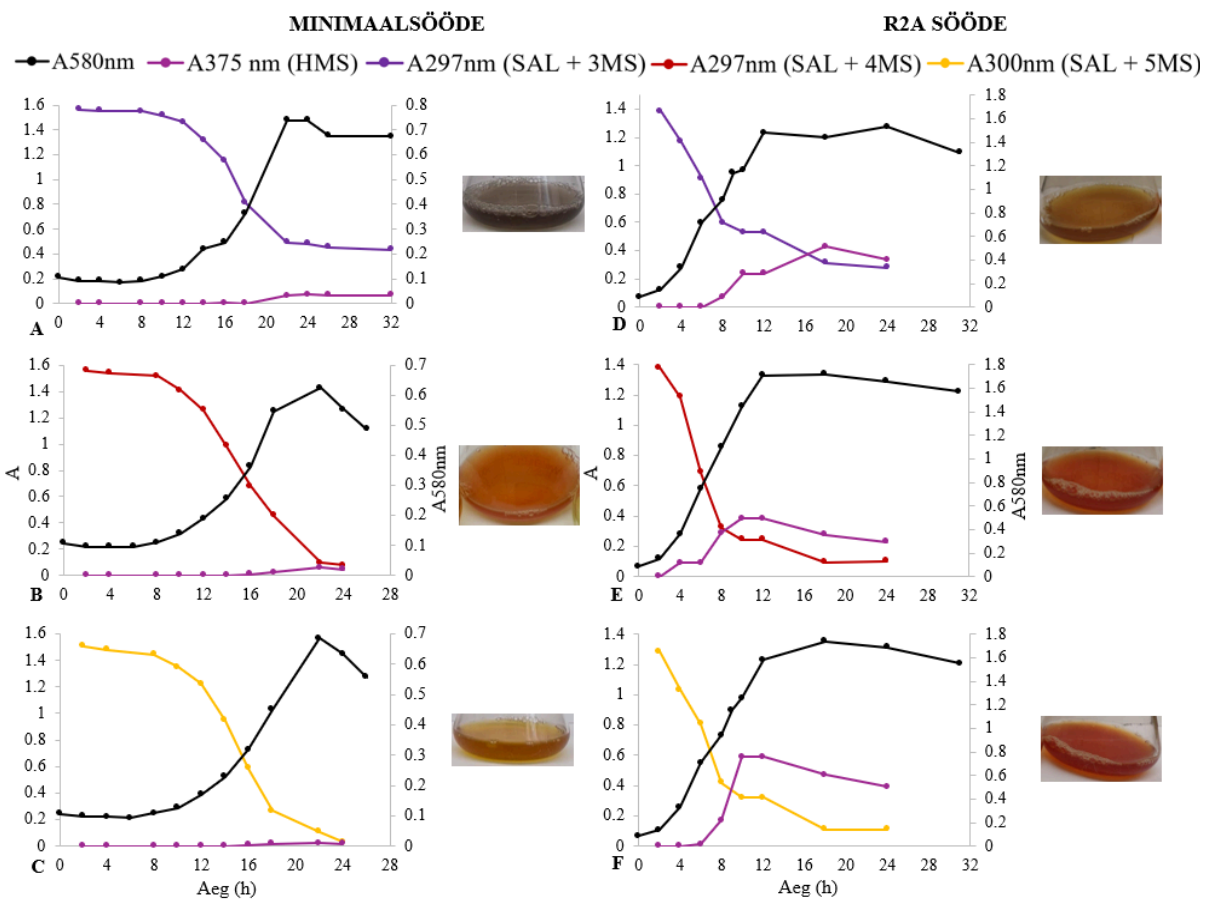
Metüülsalitsülaate ning fenooli sisaldavas minimaalsöötmetes (Joonis 15) pikeneb NCIB 9816-4 lag-faas märgatavalt võrreldes fenooli ja salitsülaati sisaldava söötmega (Joonis 14C). Toitainerikka söötme (R2A) olemasolu võimaldab fenooli sisaldavas keskkonnas lagundada metüülsalitsülaate suuremal määral kui minimaalsöötmes (Joonis 15).

Tüvi ei lagunda minimaalsöötmesse lisatud 3MS ning kogu kasv toimub fenooli lagundamisel saadava energia abil (Joonis 15A). 4-metüülsalitsülaati (4MS) ja fenooli sisaldavas minimaalsöötmes neelduvus lainepikkusel 580 nm suureneb ajavahemikus 22.-102. tund, kuid substraatide neeldumismaksimumide väärtused jäävad samaks (Joonis 15B). Vähesel määral koguneb HMSi ning sööde muutub pruuniks (Joonis 15B), millest võib järeldada, et neelduvuse suurenemist lainepikkusel 580 nm põhjustavad tõenäoliselt kuhjuvad vaheühendid ja nende polümeriseerumine mitte bakterite kasv. 5-metüülsalitsülaati (5MS) ja fenooli sisaldavast minimaalsöötimest (Joonis 15C) kasutatakse 32. tunniks ära fenool ning osaliselt ka 5MS. Metüülsalitsülaate ja fenooli sisaldavas R2A söötmes on *nahG* (SH), *nahH* (C23O)

ja *catA* (C12O) suhteline mRNA hulk väga madal (Joonis 17). Siiski suudab tüvi R2A-s metüleeritud salitsülaate lagundada (Joonis 15D, E ja F), millest võib järeldada, et võib olla sellel ajapunktil kui RNA proovid võeti, substraatide kasutamist veel ei toimunud.



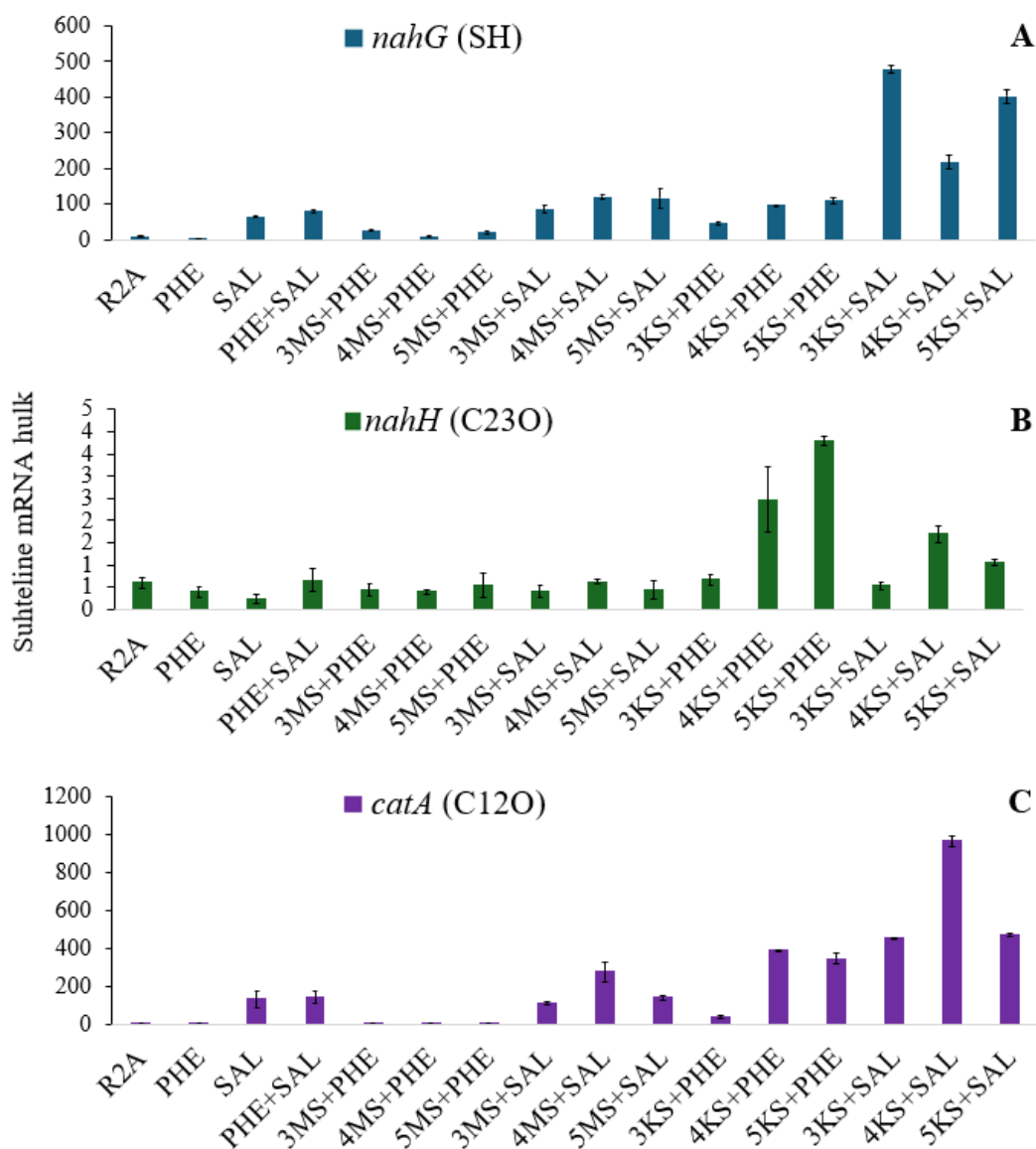
Joonis 15. *P. putida* NCIB 9816-4 kasv fenooli, PHE, ja 3-metüülsalitsülaati, 3MS, (A, D), 4-metüülsalitsülaati (B, E) või 5-metüülsalitsülaati (C, F) sisaldavates minimaal (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (fenool A270nm, 3MS, A300nm, 4MS A298nm, 5MS A304nm) ja vaheühendi (2-hüdroksümukonosemialdehüüd, HMS, A375nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud foto vastava söötmega kolvist.



Joonis 16. *P. putida* NCIB 9816-4 kasv salitsülaati, SAL, ja 3-metüülsalitsülaati, 3MS, (A, D), 4-metüülsalitsülaati (B, E) või 5-metüülsalitsülaati (C, F) sisaldavates minimaal (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (SAL+3MS A297nm, SAL+4MS A297nm, SAL+5MS A300nm) ja vaheühendi (2-hüdroksümukonosemialdehüüd, HMS, A375nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud statsionaarses kasvufaasis tehtud foto vastava söötme ga kolvist.

Asendusrühmadega salitsülaatide ja salitsülaadi neeldumisspektrite maksimumid on väga sarnased ning seetõttu ei ole nende söötmetega katsetes võimalik substraatide kasutamist eristada. Salitsülaati ja 3MS sisaldavas minimaal- ning R2A söötmes väheneb neelduvus 297 nm juures ning võib oletada, et kasutatakse ära salitsülaati (3 mM), kuid 3MS (1,5 mM) ei kasutata või kasutatakse vähesel määral (Joonis 16A ja D). 4- ja 5-metüülsalitsülaati kasutatakse salitsülaati sisaldavas minimaal- ning R2A söötmes täielikult ära (Joonis 16B ja C). *nahG* (SH) suhteline mRNA hulk on metüülsalitsülaate ja salitsülaati sisaldavas söötmes märgatavalt kõrgem kui vaid salitsülaati sisaldavas söötmes (Joonis 17A). Metüülsalitsülaate sisaldavates söötmetes indutseeritakse katehooli 2,3-dioksügenaasi kodeeriva *nahH* ekspressiooni väga madalal tasemel (Joonis 17B). Üldiselt ei suuda bakterid *ortho* raja kaudu metüleeritud katehooli lagundada, sest metüülkatehoolide lagundamisel tekivad tupikühendid - metüleeritud mukonolaktoonid (Cámara jt., 2007). Salitsülaadi ja 3MS või

5MS segus indutseeriti *catA* geeni ekspressioon samal tasemel kui vaid salitsülaati sisaldavas söötmes, 4MS puhul aga märgatavalt suuremal määral (Joonis 17C). 4- ja 5MS täielik lagundamine salitsülaati sisaldavas minimaalsöötmes *meta* raja vaheühendi kuhjumiseta ning kõrgem *catA* suhteline mRNA hulk viitavad substraatide lagundamisele *ortho* raja kaudu.



Joonis 17. *P. putida* NCIB 9816-4 salitsülaadi 1-hüdrosülaasi, *nahG* (A), katehhooli 2,3-dioksügenaasi, *nahH* (B) ja katehhooli 1,2-dioksügenaasi, *catA* (C) kodeerivate geenide suhtelised mRNA hulgad kasvades üksik- ja segasubstraate sisaldavates R2A söötmetes. Tähistused: PHE - fenool, SAL - salitsülaat, MS - metüülsalitsülaat, KS - klorosalitsülaat. Numbrid 3-5 lühendite ees viitavad asendusrühma asukohale. Referentsgeeninena kasutati DNA polümeeras I kodeerivat *polA*.

Ka tüvi *Pseudomonas reinekei* MT1 lagundab 4- ja 5MS selle raja kaudu, konverteerides tekkiva 4-metüülmukonolaktooni 4-metüülmukonolaktooni isomeraasi (MmII) abil 3-metüülmukonolaktooniks, mis teiste *mml* operonis asuvate geenide toimel läbi mitmete

vaheühendite lõplikult degradeeritakse (Cámara jt., 2007; Márin jt., 2010). Sarnaseid lagundamisradu on tuvastatud ka tüvedes *Cupriavidus necator* JMP134 ja *Rhodococcus rhodochrous* N75 (Pieper jt., 1990; Prucha jt., 1997; Cha jt., 1998; Cámara jt., 2007).

Saadud tulemuste põhjal suudab tüvi NCIB 9816-4 olenemata värviliste vaheühendite kuhjumisest 4- ja 5MS salitsülaati sisaldavast kasvukeskkonnast ära kasutada, lagundades ühendeid katehhooli *ortho* raja kaudu. 3MS-i tüvi NCIB 9816-4 salitsülaati sisaldavas minimaalsöötmes ei lagunda või degradeerib väga vähesel määral. Salitsülaate sisaldavas toitainerikkas söötmes on lag-faas küll lühem, kuid kõrgemal tasemel kuhjub HMS ning substraatide lagundamiseks kulub sama kaua aega kui minimaalsöötmes. Fenooli sisaldavas minimaalsöötmes lagundatakse vaid 5MS ja sedagi madalal tasemel. R2A sööde soodustab metüülsalitsülaatide lagundamist fenooli sisaldavas kasvukeskkonnas.

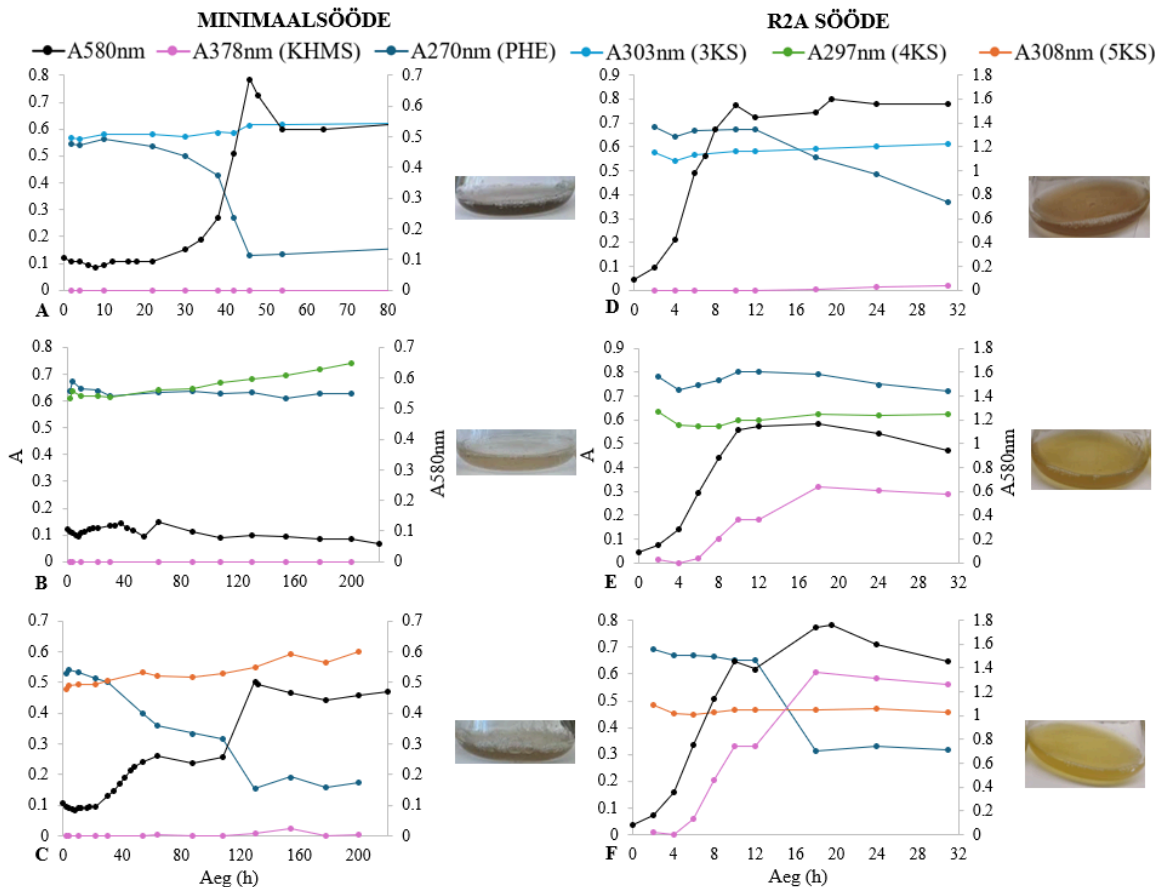
2.3.1.2. *P. putida* NCIB 9816-4 kasv klorosalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates minimaal- ning R2A söötmetes

Varem teostatud katsed näitasid, et *P. putida* NCIB 9816-4 ei suuda R2A söötmes 3-, 4- ega 5-klorosalitsülaati üksiksubstraatidena süsiniku- ja energiaallikana kasutada (Peegel, 2023). Samas on mitmete bakteriliikide puhul tuvastatud klororühmadega aromaatsete ühendite kometabolism (Nzila, 2013). Seepärast uuriti *P. putida* NCIB 9816-4 võimet kasvada 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati (1,5 mM) ja fenooli või salitsülaati (3mM) sisaldaval minimaal- ja R2A söötmetes.

Kõigi teostatud kasvatuste puhul toimus kasvukeskkonna värvi muutus (Joonis 18 ja 19). Söötmete pruuniks värvumist põhjustavad tõenäoliselt katehhooli spontaansel oksüdatsioonil tekkivad ning polümeriseeruvadokinoonid (Hoffmann-Ostenhof, 1963; Prieto jt., 1993; Park jt., 2003). Kollase värvi annab söötmesse kogunev KHMS (Wieser jt., 1994), oranži või punase tõenäoliselt kuhjuvad klorokatehhoolid.

Tüvi NCIB 9816-4 ei lagunda 3-, 4- ja 5-klorosalitsülaati fenooli sisaldavas minimaal- ega R2A söötmes, kusjuures minimaalsöötmes neeldumine substraatide neeldumismaksimumide juures suureneb, mida võib põhjustada katehhoolid kuhjumine kasvukeskkonda (Joonis 18).

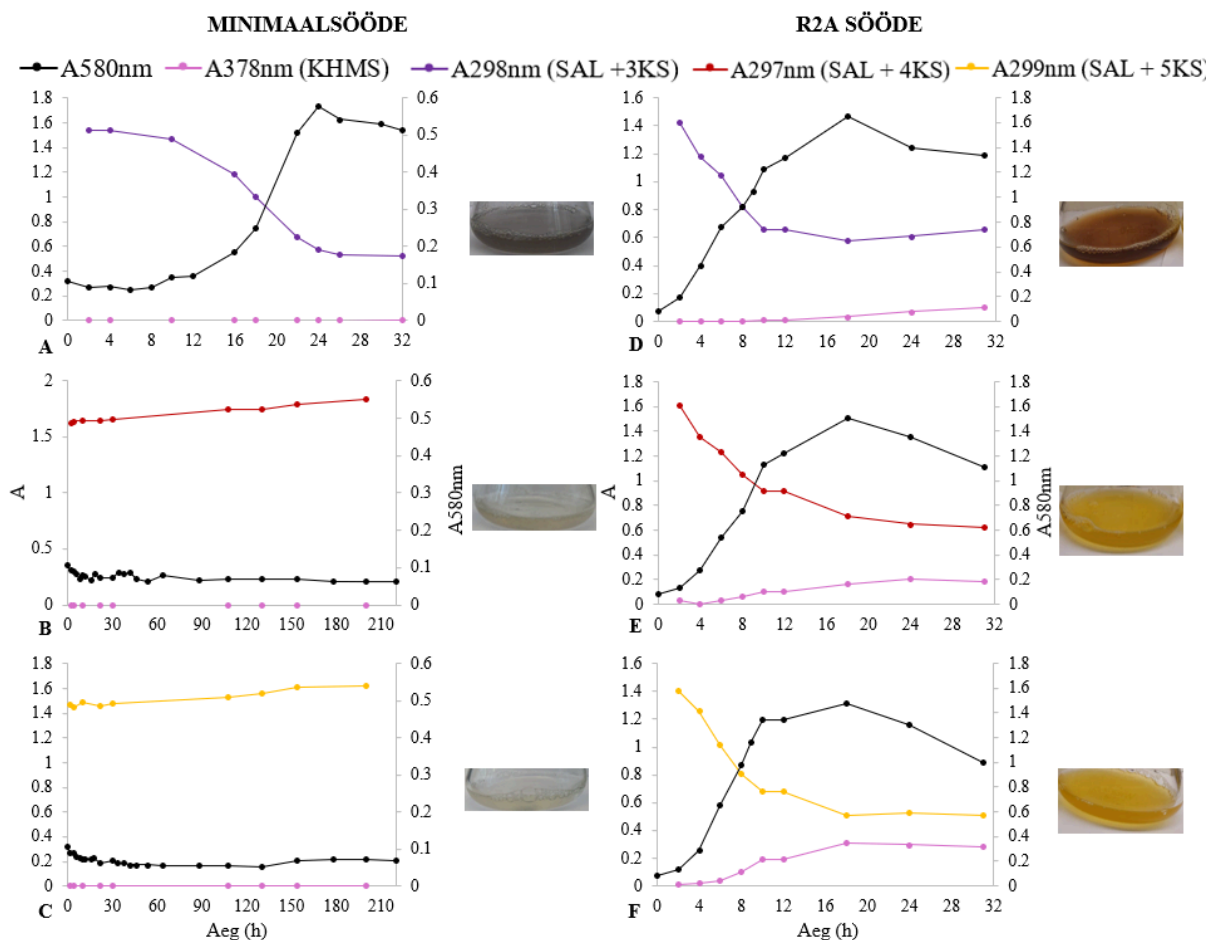
3- või 5-KS ja fenooli sisaldavas minimaalsöötmes on näha vastavalt ühte ja kahte logaritmilist kasvufaasi, mille jooksul lagundatakse suur osa keskkonnas olevast fenoolist (Joonis 18A ja C). Tüvi ei lagunda minimaal- ega ka R2A söötmes 4KS juuresolekul fenooli (Joonis 18B ja E). 4- või 5KS ja fenooli sisaldavas söötmes on geenide *nahG* (SH), *nahH* (C23O) ja *catA* (C12O) suhteline mRNA hulk kõrgem kui vaid salitsülaati sisaldavas R2A-s (Joonis 17). Samas koguneb mõlemas segus väga suurel määral tupikühendina KHMS (Joonis 18E ja F).



Joonis 18. *P. putida* NCIB 9816-4 kasv fenooli, PHE, ja 3-klorosalitsülaati, 3KS, (A, D), 4-klorosalitsülaati, 4KS, (B, E) või 5-klorosalitsülaati, 5KS, (C, F) sisaldavates minimaal- (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (fenool A270nm, 3KS, A303nm, 4KS A297nm, 5KS A308nm) ja vaheühendi (5-kloro-2-hüdrosümukonosemialdehüüd, KHMS, A378nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud foto vastava söötmega kolvist.

Salitsülaati ja 3-klorosalitsülaati sisaldavas minimaalsöötmes väheneb neelduvus A298nm ning võib oletada, et kasutatakse ära salitsülaati (3 mM), kuid 3KS (1,5 mM) ei kasutata või kasutatakse vähesel määral (Joonis 19A). 4- või 5-klorosalitsülaati ning salitsülaati sisaldavas minimaalsöötmes ei teki logaritmilist kasvu ning tüvi ei lagunda, neeldumisspektri andmete põhjal, ühtegi substraati (Joonis 19B ja C). Salitsülaati ning klorosalitsülaate sisaldavates R2A söötmetes on *nahG* (SH), *nahH* (C230) ja *catA* (C120) suhteline mRNA hulk märgatavalt kõrgem kui vaid salitsülaati sisaldavates söötmetes (Joonis 17). Substraatide neeldumisspektrite maksimumid vähenevad ajas (Joonis 19D, E ja F) ning võib oletada, et söötmetest kasutatakse ära salitsülaati aga asendusrühmaga substraate ei lagundata. Klorosalitsülaate sisaldavasse R2A söötmetesse kuhjub märgataval tasemel KHMS (Joonis 19D, E ja F), mis viitab substraatide lagundamisel defektse *meta* raja kasutamist. Tõenäoliselt

ei suuda tüvi NCIB 9816-4 klorosalitsülaate klassikalise *ortho* raja kaudu lagundada C12O kõrge substraadispetsiifilisuse tõttu (Dorn ja Knackmuss, 1978).



Joonis 19. *P. putida* NCIB 9816-4 kasv salitsülaati, SAL, ja 3-klorosalitsülaati, 3KS, (A, D), 4-klorosalitsülaati, 4KS, (B, E) või 5-klorosalitsülaati, 5KS, (C, F) sisaldavates minimaal- (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (SAL+3KS A298nm, SAL+4KS A297nm, SAL+5KS A299nm) ja vaheühendi (5-kloro-2-hüdrosümukonosemialdehüüd, KHMS, A378nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud foto vastava söötmega kolvist.

Kokkuvõtlikult saab tulemuste põhjal öelda, et tüvi *P. putida* NCIB 9816-4 ei suuda kasutada klorosalitsülaate fenooli või salitsülaadi olemasolul ei minimaal- ega ka R2A söötmetest. Minimaalsöötmetes kuhjub kasvukeskkonda katehool, 4- või 5KS sisaldavas söötmes on häiritud ka salitsülaadi lagundamine. Toitainerikas sööde ei soodusta klorosalitsülaatide lagundamist fenooli või salitsülaati sisaldavas keskkonnas. R2A-s lagundab tüvi 4- või 5KS ja salitsülaadi segu osaliselt, kuid söötmesse kuhjub KHMS/HMS viitab defektse *meta* raja kasutamisele.

2.3.1.3. *P. fluorescens* PC20 kasv metüülsalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates minimaal- ning R2A söötmetes

Varasemate uuringute põhjal on teada, et tüvi PC20 lagundab salitsülaati katehhooli plasmiidse *meta* (pNAH20), fenooli aga plasmiidse *ortho* (pPHE20) raja kaudu, kusjuures nende substraatide samaaegsel degradatsioonil minimaalsöötmes ei teki metaboolset konflikti (Heinaru jt., 2009; Elken et al, 2020). Metüülsalitsülaadid indutseerivad üksiksubstraatidena kõrgel tasemel katehhooli 2,3-dioksügenaasi kodeeriva geeni (*nahH*) ekspressiooni ning substraate lagundatakse *meta* raja kaudu (Barrow, 2022).

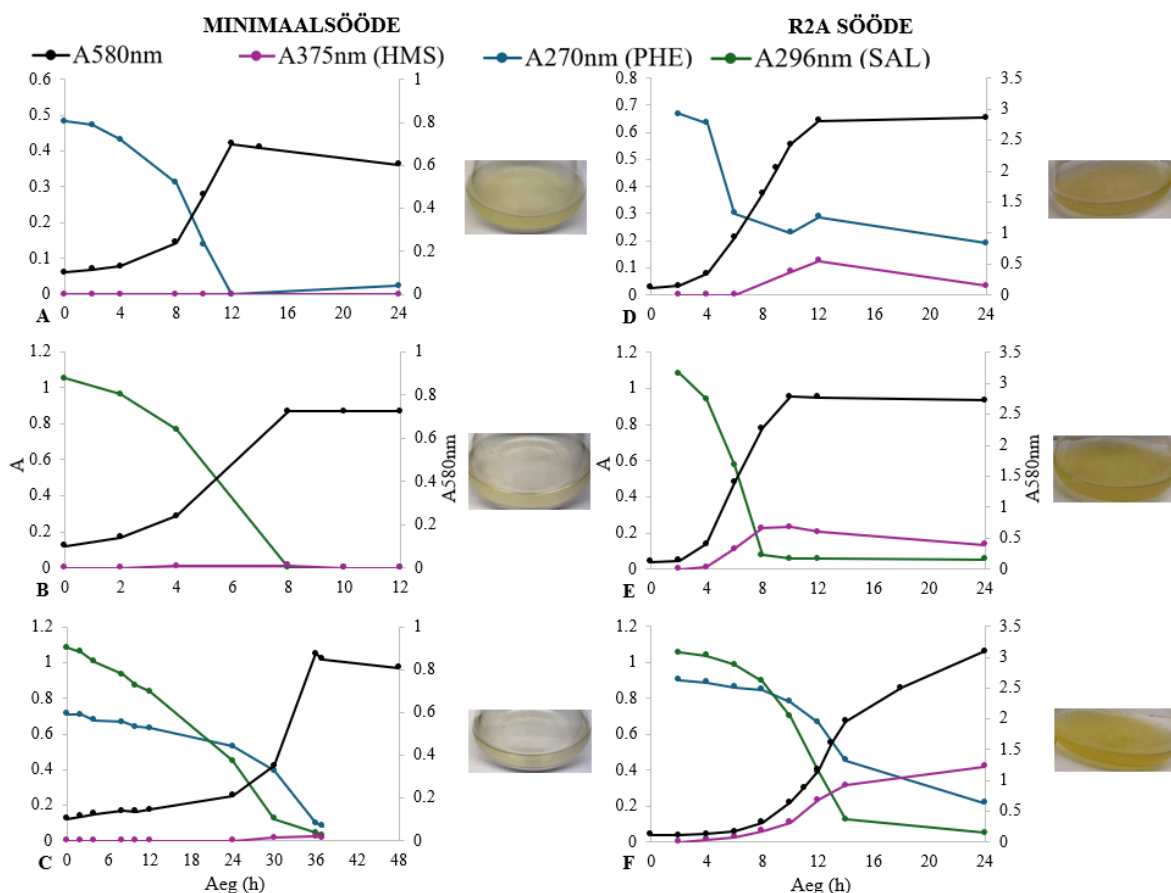
Kõigi tüve PC20 tehtud katsete puhul on märgata kasvukeskkonna värvi muutust (Joonis 20-22). Kollast värvi annab söötmetele kogunev HMS, oranži tõenäoliselt *meta* raja vaheühendite või mõlema katehhooli degradatsiooniraja samaaegsel aktiveerimisel tekkivate toksiliste ainete kuhjumine (Heinaru jt., 2001; Jiménez jt., 2014)

Fenooli, salitsülaati või nende segu sisaldavas minimaalsöötmes ei kuhju kasvukeskkonda HMS, R2A puhul aga küll (Joonis 20). Minimaalsöötmes kasutab tüvi üksiksubstraatidena fenooli ja salitsülaadi täielikult ära vastavalt 12. ja 8. tunniks (Joonis 20A ja B). Fenool ei indutseeri R2A-s *nahG* (SH) ja *nahH* (C23O) geenide ekspressiooni, kuid *pheB* (C12O) suhteline mRNA kogus on väga kõrge, mis kinnitab fenooli lagundamist plasmiidse *pheBA* operoni kodeeritud *ortho* raja kaudu (Joonis 23). Nagu tüve NCIB 9816-4 puhul on ka tüve PC20 korral fenooli lagundamine R2A-s häiritud (Joonis 20 ja 21), tõenäoliselt inhibeerib söötmes sisalduv glükoos vajalikke ensüüme kodeerivate geenide ekspressiooni (Zhang ja Xia, 2019).

Salitsülaadi degradeerimist *sal* operoni kodeeritud *meta* raja kaudu kinnitab *nahG* (SH) ja *nahH* (C23O) kõrge, kuid *pheB* (C12O) madal suhteline mRNA kogus ühendit üksiksubstraadina sisaldavas söötmes (Joonis 23).

Fenooli ja salitsülaati sisaldavas minimaalsöötmes pikeneb lag-faas märgatavalt võrreldes üksiksubstraatidega kasvatustega ning mõlemad ühendid degradeeritakse alles 36. tunniks (Joonis 20A-C). R2A söötmes on sama segu korral lag-faas ligikaudu 4 korda lühem (Joonis 20F). Geenide *nahG* (SH) ja *pheB* (C12O) suhteline mRNA kogus on ühendite segu sisaldavas R2A-s kasvanud rakkudes madalam kui vastavalt vaid salitsülaati või fenooli sisaldavas söötmes (Joonis 23). Saadud tulemused viitavad, erinevalt varasematest uuringutest (Heinaru jt., 2009), nende substraatide samaaegsel kasutamisel tekkivale metaboolsele konfliktile. Salitsülaadi ja fenooli inhibeerivat mõju üksteise degradatsioonile on kirjeldatud ka näiteks *P. putida* ATCC puhul 49451, mis lagundab üksiksubstraatidena salitsülaati (200 mg/ml) ja fenooli (400 mg/l) vastavalt 10 ja 15 tunniga. Salitsülaadi (198 mg/l) ja fenooli

(430 mg/l) segu sisaldavas söötmes kulub tüvel mõlema substraadi lagundamiseks lausa 200 tundi (Lin ja Ho, 2022).

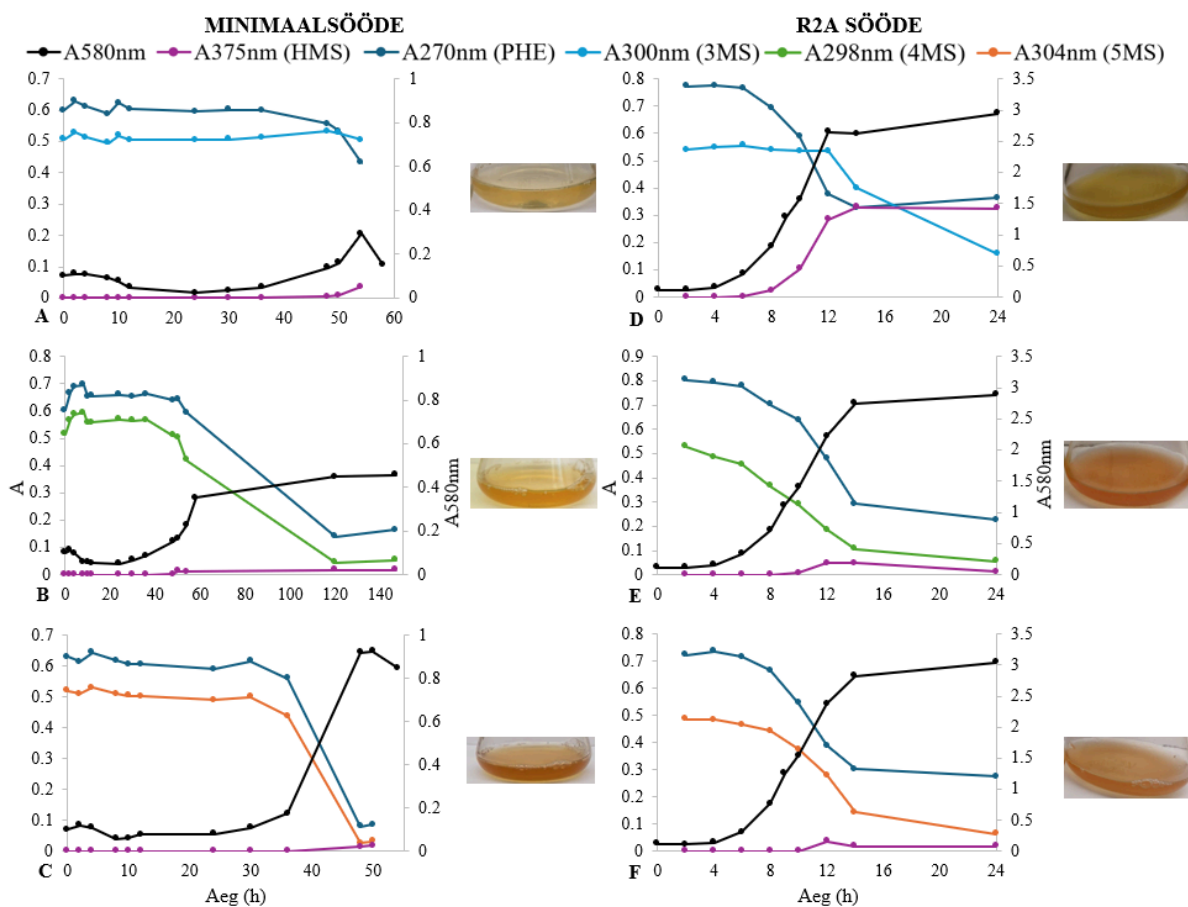


Joonis 20. *P. fluorescens* PC20 kasv fenooli, PHE, (A, D), salitsülaati, SAL, (B, E) ning fenooli ja salitsülaati (C, F) sisaldavates minimaal (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (fenool A270nm, salitsülaat A296nm) ja vaheühendi (2-hüdoksümukonosemialdehüüd, HMS, A375nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud foto vastava söötmega kolvist.

3MS ja fenooli sisaldavas minimaalsöötmes esimesed 24 tundi neelduvus 580 nm juures langeb ning ei lagundata kumbagi substraati (Joonis 21A). Alates 36. kasvutunnist lagundatakse vähesel määral fenooli, kuid kasv on siiski minimaalne. Kõige kiiremini lagundatakse fenooli sisaldavas minimaalsöötmes 5MS, kusjuures 4MS degradeerimisele kulub rohkem kui 2 korda kauem aega (Joonis 21B ja C).

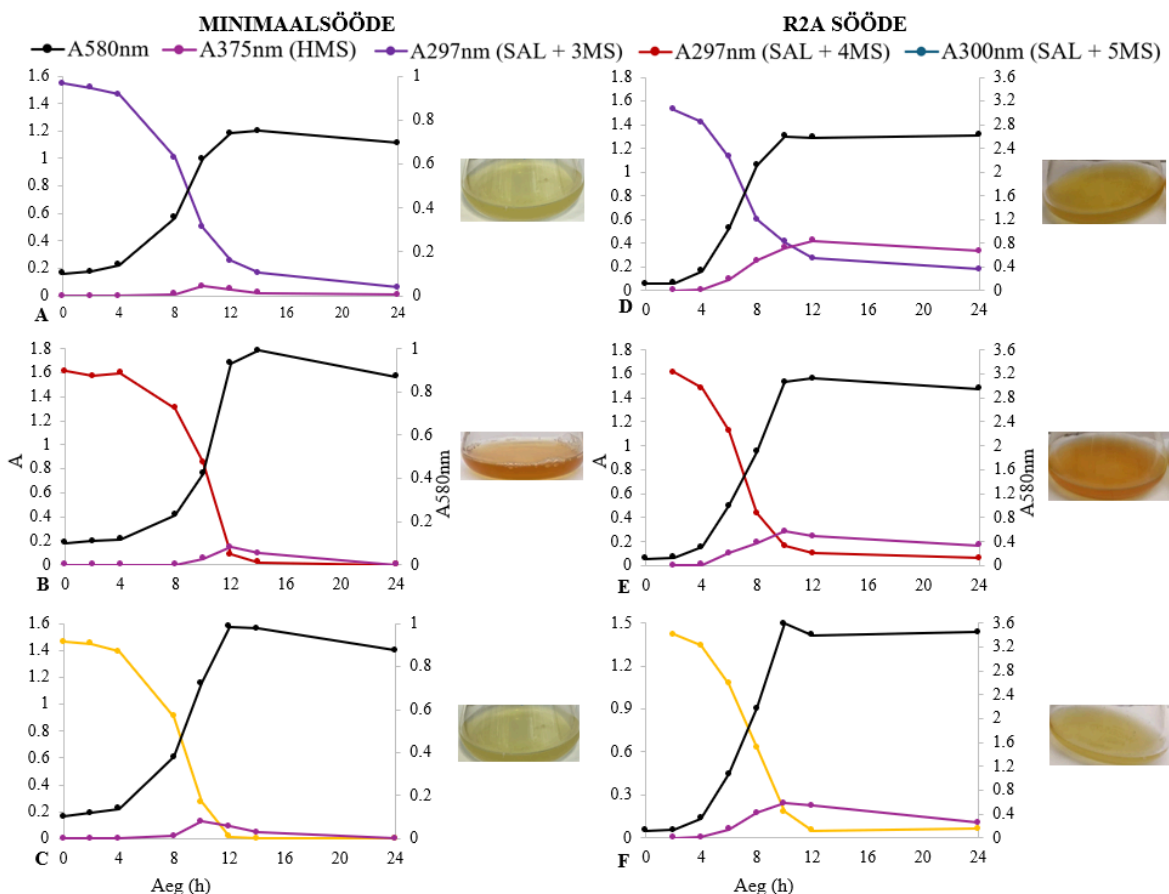
4- ja 5MS degradatsioon on fenooli sisaldavas R2A-s märgatavalt kiirem ning mõlemad ühendid kasutatakse 24. tunniks söötmest ära (Joonis 21E, F), kusjuures madalal tasemel kuhjuv HMS lagundatakse statsionaarses kasvufaasis. 3MS lagundamine fenooli sisaldavas R2A-s algab alles statsionaarse kasvufaasi saabumisel 12. tunnil, mis ajaks on lagundatud enamuse fenoolist ja tõenäoliselt kogu söötmes sisalduvad toitained (Joonis 21D). Samas alates logaritmilise kasvufaasi algusest kuhjub kõrgel tasemel HMS (Joonis 21D), mis vihjab fenooli

lagundamisele hoopis *meta* raja kaudu. Kuna 3MS ja fenooli sisaldavas söötmes on uuritavate geenide (*nahG*, *nahH*, *pheB*) suhteline mRNA hulk sarnane teiste metüülsalitsülaatidega saadud tulemustega (Joonis 23), on tõenäolisem, et 3MS lagundamisel tekivad vaheühend inhibeerib C23O või järgnevaid ensüüme rohkem kui 4- või 5MS-st tekivad vaheühendid. Asendusrühma asetus aromaatses tuumas, aga ka tüüp (nt metüül versus kloro), võivad kirjanduse andmetel häirida substraadi seondumist ensüümi aktiivsaiti ja seeläbi ka aktiivsust (Hupert-Kocurek jt., 2014).



Joonis 21. *P. fluorescens* PC20 kasv fenooli, PHE, ja 3-metüülsalitsülaati, 3MS, (A, D), 4-metüülsalitsülaati (B, E) või 5-metüülsalitsülaati (C, F) sisaldavates minimaal (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (fenool A270nm, 3MS, A300nm, 4MS A298nm, 5MS A304nm) ja vaheühendi (2-hüdroksümukonosemialdehüüd, HMS, A375nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud foto vastava söötmega kolvist.

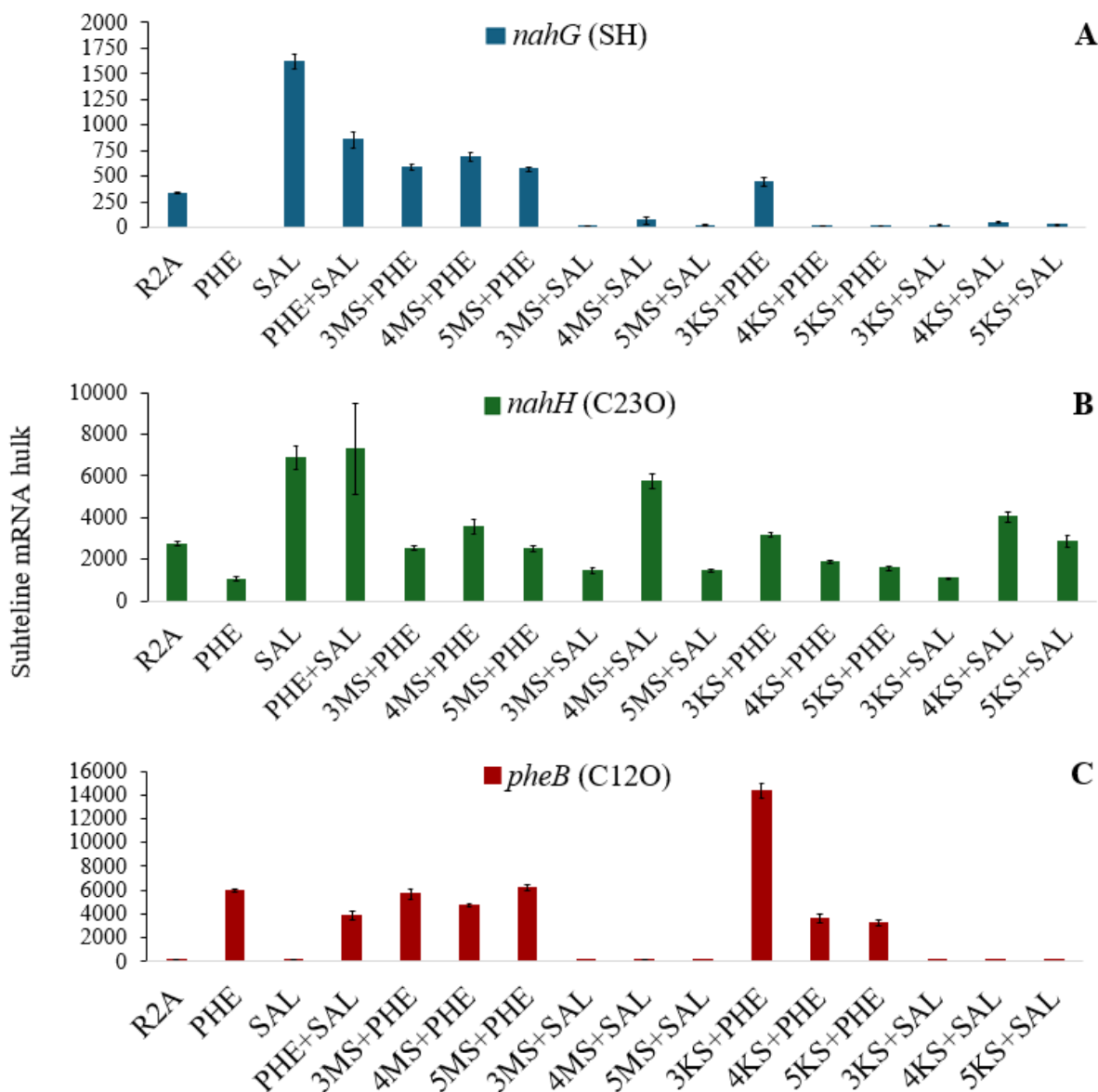
Metüülsalitsülaate ning fenooli sisaldavates söötmetes on *nahG* (SH) ja *nahH* (C23O) geenide suhteline mRNA hulk väga palju madalam kui ainult salitsülaati sisaldavas R2A-s (Joonis 23). *pheB* (C12O) mRNA hulk on 3-, 4- või 5MS ja fenooli sisaldavates söötmetes kõrgem kui fenooli ja salitsülaati sisaldavas R2A-s (Joonis 23C), mis viitab metüülsalitsülaatide väiksemale inhibeerivale mõjule selle geeni ekspressiooni suhtes.



Joonis 22. *P. fluorescens* PC20 kasv salitsülaati, SAL, ja 3-metüülsalitsülaati, 3MS, (A, D), 4-metüülsalitsülaati (B, E) või 5-metüülsalitsülaati (C, F) sisaldavates minimaal (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (SAL+3MS A297nm, SAL+4MS A297nm, SAL+5MS A300nm) ja vaheühendi (2-hüdrosümukonosemialdehüüd, HMS, A375nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud statsionaarses kasvufaasis tehtud foto vastava söötmega kolvist.

Metüülsalitsülaate ja salitsülaati sisaldavates minimaalsöötmetes kestab lag-faas 4 tundi (Joonis 22A-C). Kõige kiiremini kasutatakse minimaalsöötimest ära mõlemad substraadid 5MS korral, järgneb 4MS ning seejärel 3MS, kusjuures 3MS lagundamisele kulub 2 korda kauem aega kui 5MS puhul (Joonis 22A-C). Ajavahemikus 8. - 12. tund koguneb madalal tasemel HMS, mis degradeeritakse statsionaarses kasvufaasis (Joonis 22A-C). Metüülsalitsülaate ja salitsülaati sisaldavate R2A söötmete puhul on kasvu lag-faas 2 tundi lühem, kuid kasvukeskkonda kuhjub HMS suuremal määral ning statsionaarses kasvufaasis seda ära ei lagundata (Joonis 22D-F). Metüülsalitsülaate ning salitsülaati sisaldavas R2A-s on *nahG* (SH) geeni suhteline mRNA hulk väga madal. Võib-olla on tüves salitsülaadi 1-hüdrosülaas NahG väga aktiivne ning omab kõrget afiinsust ka asendusrühmaga salitsülaatide vastu, mis võimaldab mõlemad ühendid *meta* raja kaudu isegi ensüümi

kodeeriva geeni madala ekspressiooni puhul efektiivselt lagundada. Samas on võimalik, et RNA eraldati rakkudest ajapunktis, kus geeni veel või enam kõrgel tasemel ei ekspresseerita.



Joonis 23. *P. fluorescens* PC20 salitsülaadi 1-hüdroksülaasi, *nahG* (A), katehhooli 2,3-dioksügenaasi, *nahH* (B) ja katehhooli 1,2-dioksügenaasi, *pheB* (C) kodeerivate geenide suhtelised mRNA hulgad kasvades üksik- ja segasubstraate sisaldavates R2A söötmetes. Tähistused: PHE - fenool, SAL - salitsülaat, MS - metüülsalitsülaat, KS - klorosalitsülaat. Numbrid (3-5) lühendite ees viitavad asendusrühma asukohale. Referentsgeenina kasutati DNA polümeraas I kodeerivat *polA*.

Täpsema vastuse saamiseks tuleks katset korrata ning jälgida, kas *nahG* suhteline mRNA hulk muutub ajas oluliselt. 3- või 5MS ja salitsülaati sisaldavates söötmetes ekspresseeritakse *nahH* (C23O) madalamal tasemel kui ainult salitsülaati sisaldavas söötmes (Joonis 23B). 4MS ja salitsülaati sisaldavas R2A-s on selle geeni suhteline mRNA hulk sarnane vaid salitsülaati sisaldavas söötmes saadud tulemusega (Joonis 23B).

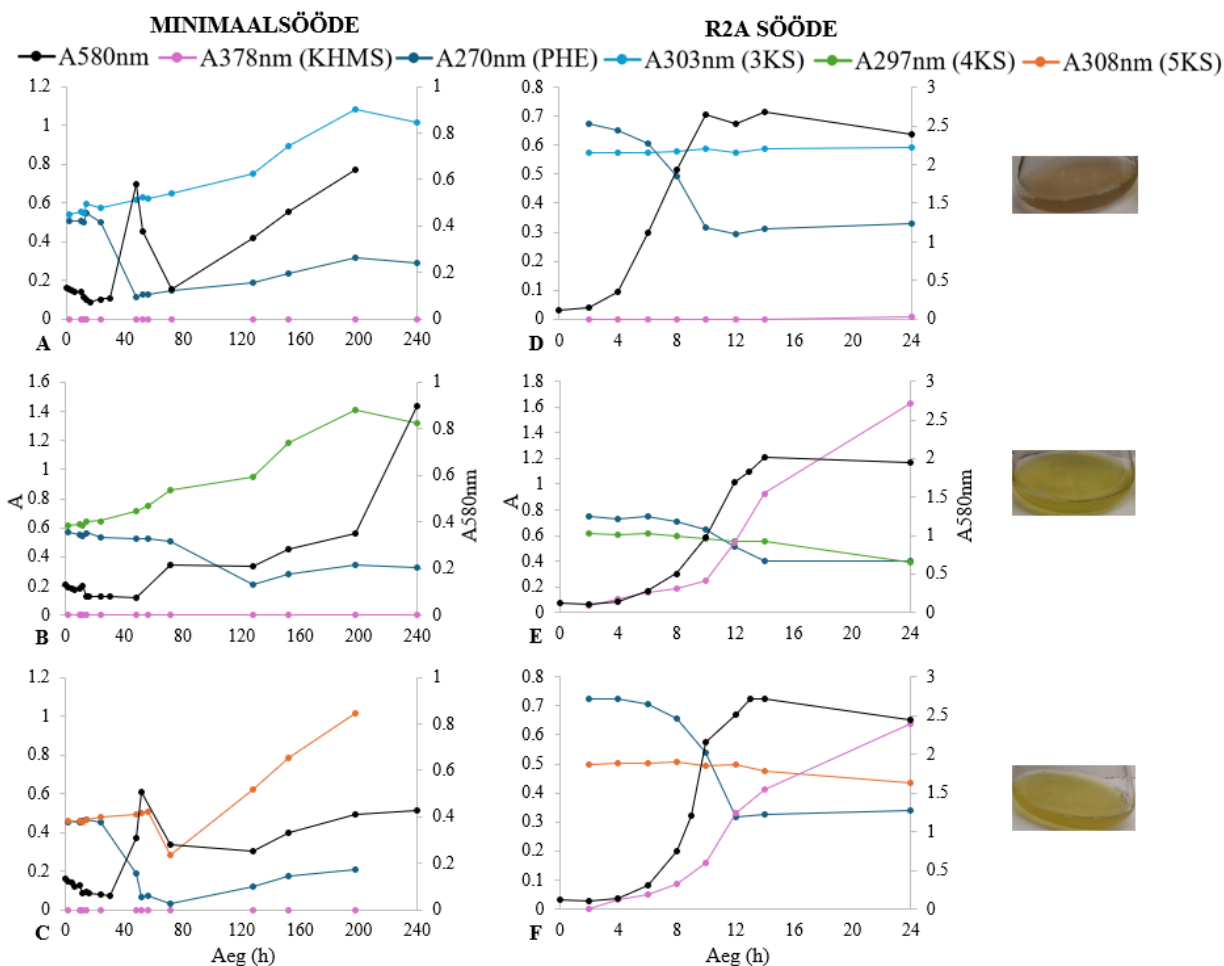
Saadud tulemuste põhjal suudab *P. fluorescens* PC20 salitsülaati sisaldavast minimaalsöötmes metüülsalitsülaadid täielikult ära kasutada, muuhulgas kõige rohkem kulub aega 3MS puhul. Fenooli sisaldavas minimaalsöötmes lagundatakse vaid 4- ja 5MS, kusjuures esimese lagundamiseks kulub rohkem kui 2 korda kauem aega. Sarnaselt tüvele NCIB 9816-4 on salitsülaate sisaldavas toitainerikas söötmes lag-faas küll lühem, kuid kõrgemal tasemel kuhjub HMS ning substraatide lagundamiseks kulub sama kaua aega kui minimaalsöötmes. Samuti soodustab ka selle tüve puhul toitainerikas sööde metüülsalitsülaatide lagundamist fenooli sisaldavast keskkonnast.

2.3.1.4. *P. fluorescens* PC20 kasv klorosalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates minimaal- ning R2A söötmetes

Varasemate uuringute põhjal on teada, et tüvi PC20 ei suuda kasutada katehhooli *meta* raja kaudu lagundatavaid klorosalitsülaate energia- ja süsinikuallikana. 4- ja 5KS lagundamisel kuhjub kasvukeskkonda KHMS ja klorokatehhoool, mis tõenäoliselt inhibeerivad katehhooli 2,3-dioksügenaasi tööd. 3KS degradatsioonil üksiksubstraadina KHMS ei kuhju, kuid C23O (*NahH*) aktiivsus on väga madal. (Peegel, 2023)

Tüvi PC20 ei lagunda, neeldumisspektrite andmete põhjal, klorosalitsülaate fenooli sisaldavas minimaalsöötmes, kuid neeldumine substraatide neeldumismaksimumide juures suureneb, mis viitab klorokatehhoolide kuhjumine söötmesse (Joonis 24). Minimaalsöötmes KHMS tupikühendina ei kogune.

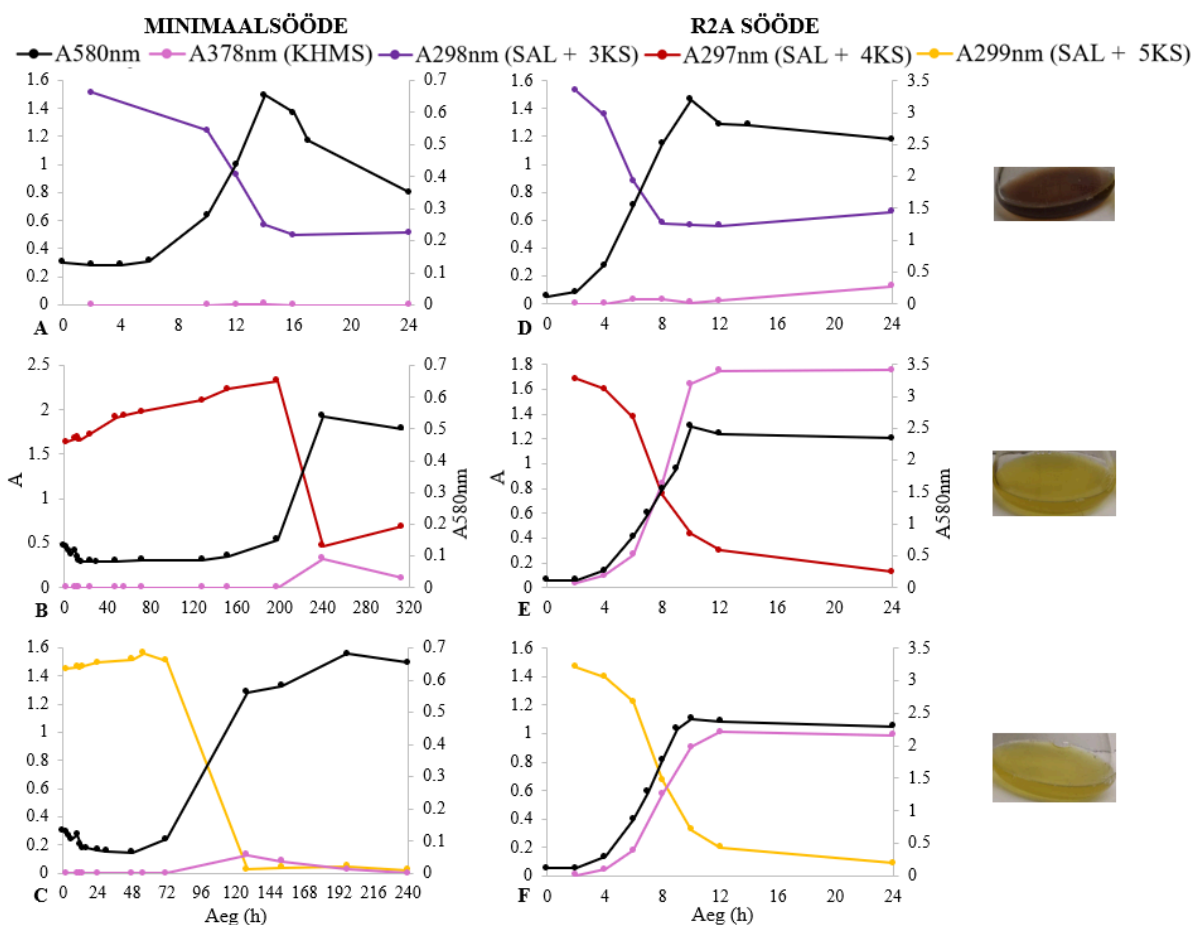
4- või 5KS lagundatakse fenooli sisaldavas R2A-s vaid väga vähesel määral (Joonis 24E ja F) Samas alates logaritmilise kasvufaasi algusest kuhjub väga kõrgel tasemel HMS/KHMS (Joonis 24E ja F), mis vihjab fenooli lagundamisele hoopis *meta* raja kaudu. Mõlemat klorosalitsülaati lagundatakse kirjanduse andmetel 4-klorokatehhooli kaudu (Cámara jt., 2007), võib-olla on selle vaheühendi seondumine ensüümi aktiivsaiti häiritud ning seetõttu ühendeid ei lagundata. *Meta* raja tööd võivad häirida ka söötmesse kogunev HMS/KHMS. 4-või 5KS ja fenooli sisaldavas R2A-s on *nahG* (SH) ja *nahH* (C23O) suhteline mRNA kogus madal, *pheB* (C12O) ekspresseeritakse umbes samal tasemel kui fenooli ja salitsülaati sisaldavas söötmes (Joonis 23). 3KS ei lagundata, neeldumisspektri andmete põhjal, ka fenooli sisaldavas R2A-s ning tupikühendina KHMS ei kogune (Joonis 24D). Samas sööde tumeneb, mis viitab klorokatehhooli kuhjumisele ning oksüdeerumisele. Kõigi uuritavate geenide (*nahG*, *nahH*, *pheB*) suhteline mRNA kogus on 3KS ja fenooli sisaldavas R2A-s märgatavalt kõrgem kui teiste KS puhul, kusjuures C12O kodeerivat geeni (*pheB*) ekspresseeritakse isegi kõrgemal tasemel kui ainult fenooli sisaldavas söötmes (Joonis 23).



Joonis 24. *P. fluorescens* PC20 kasv fenooli, PHE, ja 3-klorosalitsülaati, 3KS, (A, D), 4-klorosalitsülaati, 4KS, (B, E) või 5-klorosalitsülaati, 5KS, (C, F) sisaldavates minimaal- (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (fenool A270nm, 3KS, A303nm, 4KS A297nm, 5KS A308nm) ja vaheühendi (5-kloro-2-hüdrosümukonosemialdehüüd, KHMS, A378nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. R2A söötmete puhul on iga paneeli paremal küljel toodud foto vastava söötme ga kolvist statsionaarses kasvufaasis.

3KS ja salitsülaati sisaldavas minimaalsöötmes väheneb esimese 16 tunni jooksul neelduvus substraatide neeldumismaksimumi juures, tõenäoliselt kasutatakse ära salitsülaati (3 mM), kuid 3KS (1,5 mM) ei kasutata või kasutatakse vähesel määral (Joonis 25A). Kuna selle aja jooksul märgataval tasemel tupikühendina KHMS ei kogune (Joonis 25A), aga sööde muutub tumedaks, on degradatsioon tõenäoliselt häiritud kuhjuva 3-klorokatehhooli poolt inaktiveeritud katehhooli 2,3-dioksügenaasi tõttu. Sarnane tulemus saadi R2A söötmes, kus neeldumine A298nm väheneb esimesed 8 tundi (Joonis 25D). 4KS ja salitsülaadi segu sisaldavas minimaalsöötmes esimesed 200 tundi suureneb neelduvus substraatide neeldumismaksimumi juures, mis viitab taas klorokatehhoolide kuhjumisele (Joonis 25B). Järgneva 40 tunni jooksul väheneb neelduvus A297nm ning võib oletada, et kasutatakse ära salitsülaati (3 mM), kuid 4KS (1,5 mM) ei kasutata või kasutatakse vähesel määral. Samuti

koguneb söötmesse märgataval tasemel KHMS, mis statsionaarses kasvufaasis lagundatakse (Joonis 25B). 5KS ja salitsülaati sisaldavas minimaalsöötmes kestab lag-faas üpris pikalt (72 tundi), kuid 120. tunniks kasutatakse söötmet ühendid täielikult ära (Joonis 25C).



Joonis 25. *P. fluorescens* PC20 kasv salitsülaati, SAL, ja 3-klorosalitsülaati, 3KS, (A, D), 4-klorosalitsülaati, 4KS, (B, E) või 5-klorosalitsülaati, 5KS, (C, F) sisaldavates minimaal- (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (SAL+3KS A298nm, SAL+4KS A297nm, SAL+5KS A299nm) ja vaheühendi (5-kloro-2-hüdrosümukonosemialdehüüd, KHMS, A378nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. R2A söötmete puhul on iga paneeli paremal küljel toodud foto vastava söötmega kolvist statsionaarses kasvufaasis.

4- või 5KS ja salitsülaati sisaldavas R2A söötmes kasutatakse mõlemad substraadid söötme ära 24 tunniga (Joonis 25E-F). Samas viitab mõlema katse puhul väga kõrgel tasemel kuhjuv KHMS, et lagundamine *meta* raja kaudu ei ole efektiivne. Klorosalitsülaate ning salitsülaati sisaldavas R2A-s on *nahG* (SH) ja *nahH* (C230) suhteline mRNA hulk võrreldes ainult salitsülaati sisaldava söötmega märgatavalt madalam.

Saadud tulemuste põhjal ei suuda tüvi *P. fluorescens* PC20 klorosalitsülaate fenooli sisaldavast minimaal- või R2A söötme ära kasutada. Fenooli sisaldavates minimaalsöötmetes tõuseb neelduvus KS neeldumismaksimumide juures, mis viitab klorokatehoolide kuhjumisele, R2As kuhjub 4- ja 5-KS puhul kõrgel tasemel (K)HMS. Salitsülaati sisaldavas minimaalsöötmes suudab tüvi lagundada vaid 5KS, kuid selle jaoks kulub väga kaua aega (120 h). Toitainerikas sööde soodustab 4- ja 5KS lagundamist salitsülaati sisaldavas keskkonnas, kuid äärmiselt kõrgel tasemel kuhjub söötmesse KHMS, mis viitab substraatide ebaefektiivsele degradatsioonile.

2.3.1.5. *P. pseudoalcaligenes* C70 kasv metüülsalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates R2A söötmetes

Tüve C70 kasvatati 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati (1,5 mM) ja fenooli või salitsülaati (3mM) sisaldavates minimaal- ja R2A söötmetes samadel tingimustel kui eelnevalt kirjeldatud katsetes.

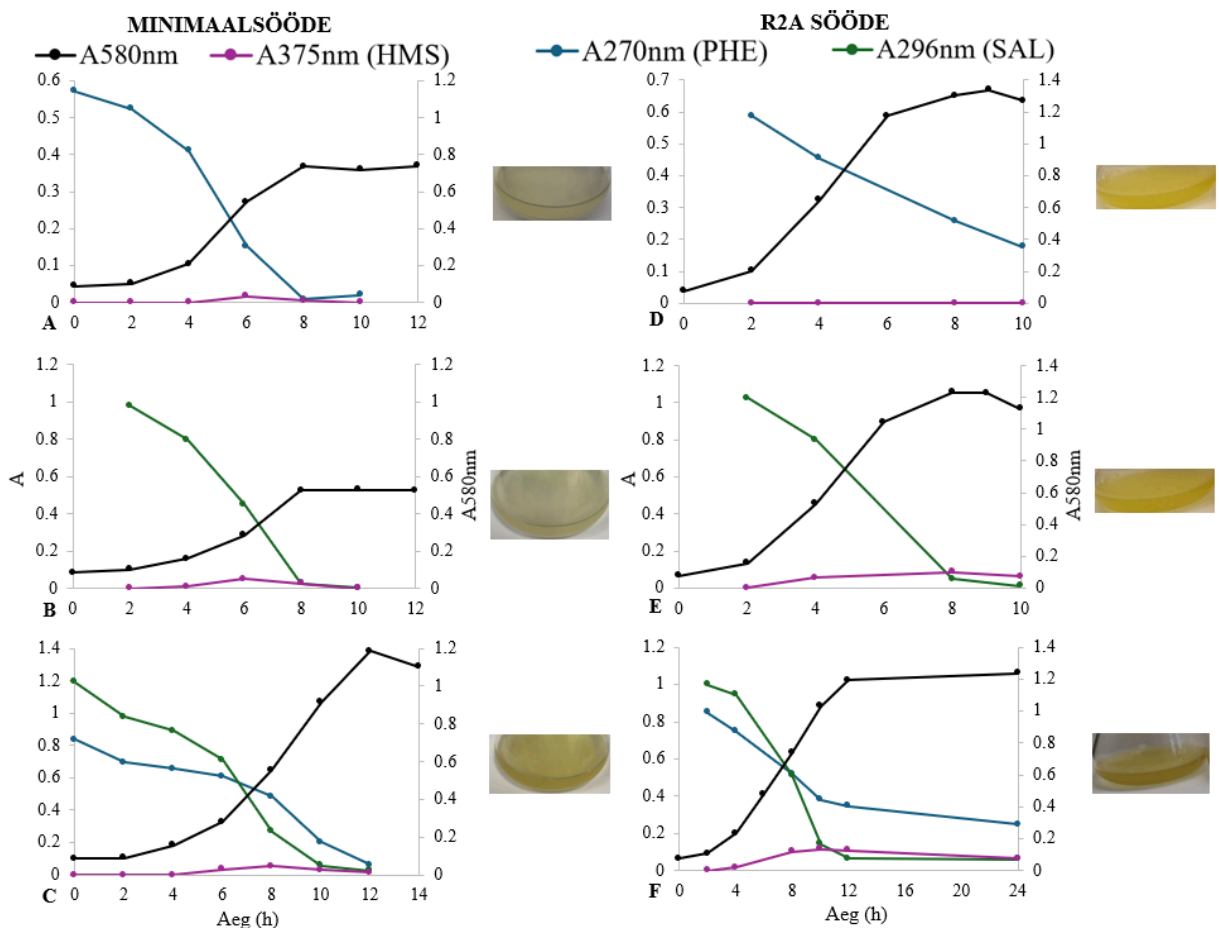
Varasemast uuringust on teada, et tüvel C70 on kaks kromosomaalset *meta* rada, üks fenooli ja teine salitsülaadi lagundamiseks. Mõlema ühendi lagundamisel üksiksubstraadina kuhjub keskkonda HMS, mis inhibeerib katehooli 2,3-dioksügenaaside tööd, põhjustades salitsülaati sisaldavas söötmes katehoolide kuhjumist. Katehhoodid oksüdeeruvad spontaanselt kinoonideks, mis polümeriseeruvad ning häirivad degradatsiooniraja tööd. Fenooli ja salitsülaadi segus tupikühendina HMS ei kuhju ning tüvi talub ka kõrgeid substraatide kontsentratsioone. (Jõesaar jt., 2017) Ka metüülsalitsülaate lagundatakse *nah* operoni kodeeritud *meta* raja kaudu (Barrow, 2022). *P. pseudoalcaligenes* C70-l on erinevalt teistest uuritavatest tüvedest redundantsete SH ja C230 kodeerivad geenid (*nahG* ja *nahW* ning *nahH* ja *pheB*) (Jõesaar jt., 2017)

Kõigi C70 kasvatuste puhul on märgata kasvukeskkonna värvimuutust (Joonis 26 ja 27), kollase värvi annab söötmele kuhjuv HMS, pruuni tõenäoliselt kogunevad metüülkatehhoodid. Fenooli sisaldavas minimaalsöötmes kestab lag-faas 2 tundi ning 8. tunniks lagundatakse kogu substraat. R2A söötmes on fenooli olemasolul geeni *pheB* (C230) suhteline mRNA hulk kõrge, kuid *nahH* (C230), *nahW* (SH) ja *nahG* (SH) omad väga madalad (Joonis 29). Saadud tulemus kinnitab, et fenooli lagundatakse *phe* operoni kodeeritud *meta* raja kaudu ning *sal*

raja ensüüme fenool ei indutseeri. Salitsülaadi lagundamisele üksiksubstraadina kulub minimaalsöötmes sama kaua aega kui fenooli puhul (Joonis 26B ja C). Salitsülaati sisaldavas söötmes on indutseeritud *nahH* (C23O) geeni ekspressioon ning ühend lagundatakse *sal* operoni kodeeritud kromosomaalse *meta* raja kaudu (Joonis 29B). Sarnaselt teisele kirjeldatud redundantsete SH-dega tüvele *Pseudomonas stutzeri* AN10 on ka tüves C70 salitsülaati sisaldavas söötmes indutseeritud mõlema salitsülaadi 1-hüdroksülaasi kodeeriva geeni (*nahW* ja *nahG*) ekspressioon (Joonis 29A; Bosch jt., 1999). Erinevalt tüvega C70 varem tehtud katsetest (Barrow, 2022; Peegel, 2023) on selles töös *nahW* suhteline mRNA hulk kõigis söötmetes kõrgem kui *nahG* oma (Joonis 29A). Barrow ja Peegel kasvasid tüvesid ette vaid salitsülaati sisaldavas R2A-s, võib olla inhibeerib selles töös söötmesse lisatud fenool *nahG* ekspressiooni. Samas on võimalik ka, et RNA eraldati rakkudest ajapunktis, kus *nahG* enam või veel ei ekspresseerita, mistõttu tuleks täpsema tulemuse saamiseks katseid korrata ning jälgida mRNA suhtelise koguse muutumist ajas. Nii fenooli kui ka salitsülaadi lagundamisel üksiksubstraadina kuhjub minimaalsöötmes ajavahemikus 4.-6. tund väga madalas koguses HMS, mis 10. tunniks täielikult degradeeritakse (Joonis 26A ja B).

Fenooli lagundamine on R2A-d sisaldavates söötmetes häiritud (Joonis 26D, F ja 27D-F), tõenäoliselt põhjustab seda söötmes sisalduv glükoos, mis kirjanduse andmetel inhibeerib fenooli degradatsiooniraja ensüümide sünteesi (Zhang ja Xia, 2019). Toitainerikka söötme olemasolu ei mõjuta salitsülaadi üksiksubstraadina lagundamiseks kuluvat aega, kuid söötmetesse koguneb kõrgemal tasemel HMS (Joonis 26B ja E) kui fenooli korral (Joonis 26D).

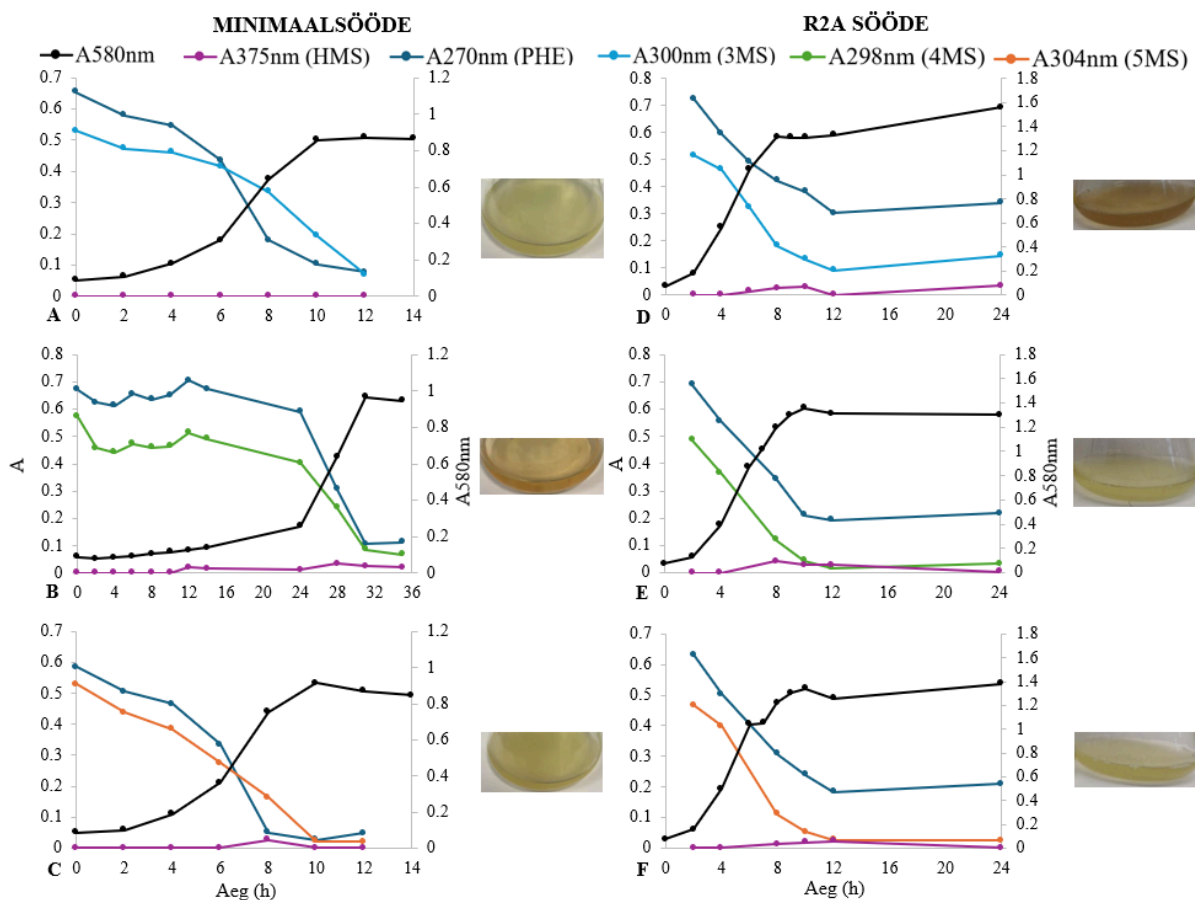
Fenooli ja salitsülaati sisaldavas minimaalsöötmes lagundatakse substraate samal ajal, aga ühendite täielikuks degradeerimiseks kulub 2-4 tundi rohkem kui üksiksubstraatide puhul (Joonis 26C). Söötmes on mõlema SH kodeeriva geeni (*nahG* ja *nahW*) suhteline mRNA hulk väiksem kui ainult salitsülaati sisaldavas R2A-s ning ka C23O kodeerivaid geene (*nahH* ja *pheB*) ekspresseeritakse madalamal tasemel kui üksiksubstraatidega söötmetes (Joonis 29). Segasubstraadi puhul koguneb minimaalsöötmesse vähesel määral HMS, mis 12. tunniks täielikult lagundatakse (Joonis 26C).



Joonis 26. *P. pseudoalcaligenes* C70 kasv fenooli, PHE, (A, D), salitsülaati, SAL, (B, E) ning fenooli ja salitsülaati (C, F) sisaldavates minimaal (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (fenool A270nm, salitsülaat A296nm) ja vaheühendi (2-hüdrosümukonosemialdehüüd, HMS, A375nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud foto vastava söötme ga kolvist.

Metüülsalitsülaate ning fenooli sisaldavas minimaal- või R2A söötmes suudab tüvi lagundada substraate samal ajal, madalal tasemel koguneb HMS, mis kasvu statsionaarses faasis degradeeritakse (Joonis 27). Kõige kiiremini kasutatakse fenooliga minimaalsöötmetest ära 5MS, järgneb 3MS ja seejärel 4MS (Joonis 27 A-C), kusjuures aega kulub 4MS puhul ligikaudu neli korda rohkem kui 5MS korral. Toitaineterikkamas R2A söötmes metüülsalitsülaatide kasutamises sellist erinevust ei ole (Joonis 27 D-F). Metüülsalitsülaate ja fenooli sisaldavates söötmetes on *pheB* (C230) suhteline hulk madalam kui vaid fenooli sisaldavas R2A-s (Joonis 29C). 3MS ja fenooli segus on uuritud geenide (*nahG*, *nahW*, *nahH*, *pheB*) suhteline mRNA kogus kõrgem kui teiste metüülsalitsülaatide puhul (Joonis 29). 5MS ning fenooli sisaldavas söötmes ekspresseeritakse geene *nahW* (SH) ja *pheB* (C230) madalamal tasemel kui 4MS segu puhul, *nahH* (C230) suhteline mRNA hulk on aga pisut

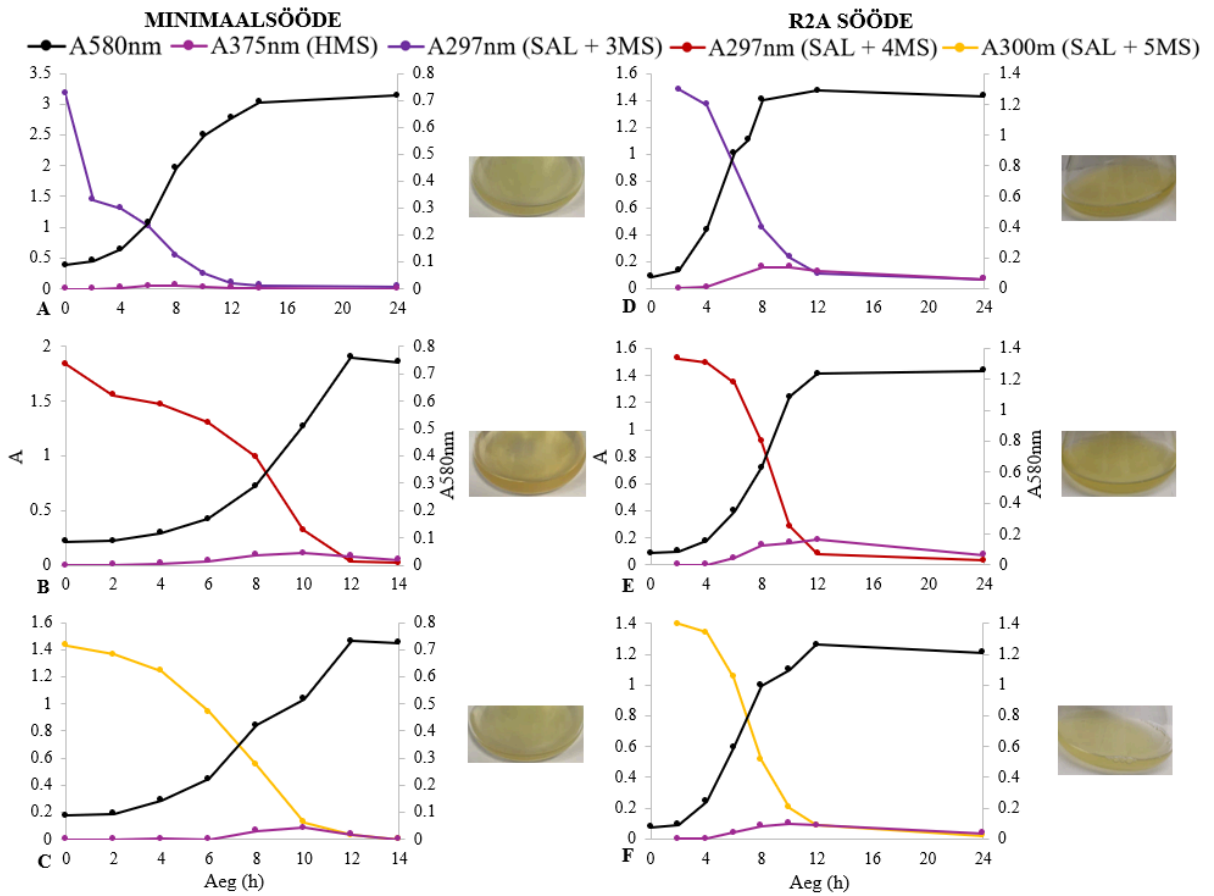
kõrgem (Joonis 29). 4- ja 5MS ei indutseeri fenooli sisaldavas söötmes märgataval tasemel *nahG* (SH) ekspressiooni (Joonis 29A).



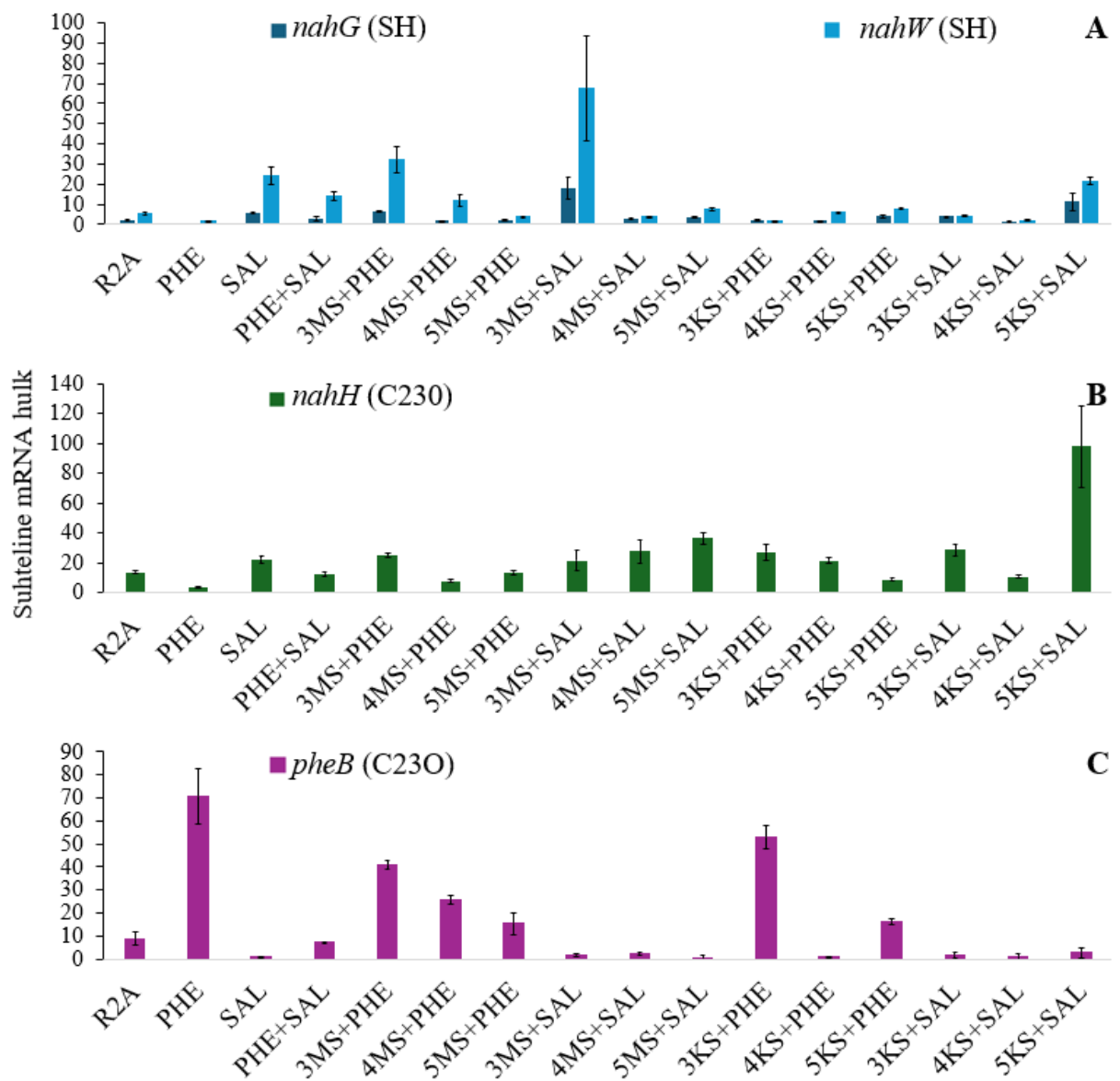
Joonis 27. *P. pseudoalcaligenes* C70 kasv fenooli, PHE, ja 3-metüülsalitsülaati, 3MS, (A, D), 4-metüülsalitsülaati (B, E) või 5-metüülsalitsülaati (C, F) sisaldavates minimaal (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (fenool A270nm, 3MS, A300nm, 4MS A298nm, 5MS A304nm) ja vaheühendi (2-hüdroksümukonosemialdehüüd, HMS, A375nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud foto vastava söötmega kolvist.

Salitsülaati ja metüülsalitsülaate sisaldavatest minimaal- ja R2A söötmetest kasutab tüvi C70 mõlemad substraadid ära 12-14 tunniga, kusjuures madalal tasemel kuhjuv HMS lagundatakse statsionaarses kasvufaasis (Joonis 28). Metüülsalitsülaadid ei indutseeri *pheB* (C230) geeni ekspressiooni, mis kinnitab nende lagundamist plasmiidse *nah* operoni kodeeritud *meta* raja kaudu (Joonis 29C). 3MS ja salitsülaati sisaldavas söötmes on SH-e kodeerivate geenide *nahG* ja *nahW* suhteline mRNA kogus kõrge, 4- ja 5MS puhul aga väga madal (Joonis 29A). Bosh et al., (1999) näitasid oma uurimistöös, et *P. stutzeri* AN10 puhul, mille *sal* operon on identne tüve C70 operoniga, on mõlema SH aktiivsus kõrge 4MS korral, samas 3MS ja 5MS korral oli NahG aktiivsus kõrgem kui NahW.

nahH (C230) ekspressioonitase on vaid 4MS ja salitsülaati sisaldava söötme puhul kõrgem kui asendusrühmata salitsülaadil (Joonis 29B).



Joonis 28. *P. pseudoalcaligenes* C70 kasv salitsülaati, SAL, ja 3-metüülsalitsülaati, 3MS, (A, D), 4-metüülsalitsülaati (B, E) või 5-metüülsalitsülaati (C, F) sisaldavates minimaal (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substratide (SAL+3MS A297nm, SAL+4MS A297nm, SAL+5MS A300nm) ja vaheühendi (2-hüdrosümukonosemialdehüüd, HMS, A375nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud statsionaarses kasvufaasis tehtud foto vastava söötmega kolvist.



Joonis 29. *P. pseudoalcaligenes* C70 salitsülaadi 1-hüdroksülaase, *nahG* ja *nahW* (A), ning katehhooli 2,3-dioksügenaase, *nahH* (B) ja *pheB* (C) kodeerivate geenide suhtelised mRNA hulgad kasvades üksik- ja segasubstraate sisaldavates R2A söötmetes. Tähistused: PHE - fenool, SAL - salitsülaad, MS - metüülsalitsülaad, KS - klorosalitsülaad. Numbrid (3-5) lühendite ees viitavad asendusrühma asukohale. Referentsgeeninena kasutati DNA polümeraas I kodeerivat *polA*.

Saadud tulemuste põhjal suudab tüvi *P. pseudoalcaligenes* C70 salitsülaati sisaldavast minimaalsöötmetest metüülsalitsülaadid täielikult ära kasutada. Kõige kiiremini lagundatakse 5MS (10 tundi), järgneb 3MS (12 h) ja seejärel 4MS (32 h). Salitsülaati sisaldavast söötmetest kuulub metüülsalitsülaatide täielikule ära kasutamisele sarnaselt tüvele PC20 12-14 tundi. Sarnaselt teisele kahele uuritud tüvele ei soodusta toitainerikas sööde salitsülaati sisaldavas keskkonnas metüülsalitsülaatide lagundamist ning kõrgemal tasemel kuhjub HMS. Ka tüves C70 soodustab R2A sööde metüülsalitsülaatide degradeerimist fenooli sisaldavast

keskkonnast. *P. pseudoalcaligenes* C70 on tehtud katsete põhjal uuritud tüvedest efektiivseim segasubstraatide lagundaja.

2.3.1.6. *P. pseudoalcaligenes* C70 kasv klorosalitsülaate ning fenooli või Na-salitsülaati sisaldavates R2A söötmetes

Tüve C70 kasvatati 3-, 4- või 5-klorosalitsülaati (1,5 mM) ja fenooli või salitsülaati (3mM) sisaldavates minimaal- ja R2A söötmetes samadel tingimustel kui eelnevalt kirjeldatud katsetes.

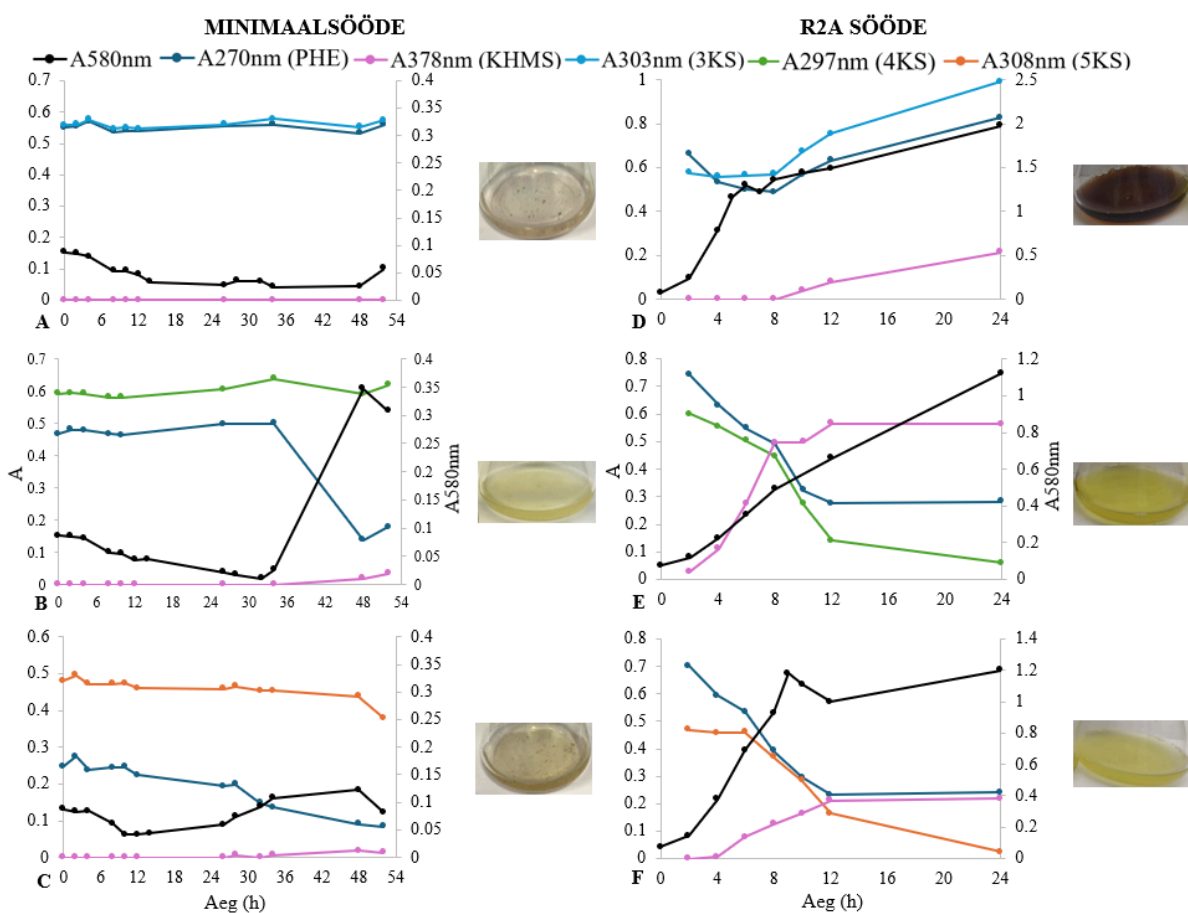
Varasematest katsetest on teada, et C70 lagundab klorosalitsülaate *meta* raja kaudu, kuid ei suuda neid energia- ja süsinikuallikana kasutada. 4- ja 5KS lagundamisel kuhjub tõenäoliselt söötmesse toksiline KHMS, 3KS puhul katehhooli spontaansel oksüdatsioonil tekkivad kinoonid. Lisaks ei indutseeri 4KS tüves märgataval tasemel SH (*nahG* ja *nahW*) ja C23O (*nahH* ja *pheB*) kodeerivate geenide ekspressiooni (Pegel, 2022).

Nii nagu ka metüülsalitsülaatide korral, märgati klorosalitsülaate sisaldavate kasvukeskkondade puhul söötmete värvimuutust (Joonis 30 ja 31). Kirjanduse andmetel annab kollase tooni söötmesse kuhjuv KHMS (Wieser jt., 1994), pruuni aga katehhoolide spontaansel oksüdatsioonil tekkivad ja polümeeriseeruvad kinoonid (Hoffmann-Ostenhof, 1963; Prieto jt., 1993; Park jt., 2004).

P. pseudoalcaligenes C70 ei kasuta klorosalitsülaate fenooli sisaldavas minimaalsöötmes, kasvukeskkonda KHMS ei kogune ning ka fenooli ei lagundata märkimisväärselt (v.a 4KS sisaldav sööde) (Joonis 30 A-C). R2A söötmes, millele on lisatud fenooli ja 4- või 5KS kasutab C70 aromaateid ühendeid, kuid sellega kaasneb söötme värvumine kollaseks ning ka neeldumisspektritelt registreeritakse suured HMS/KHMS neeldumismaksimumi väärtused (Joonis 30 E ja F). 3KS ja fenooli, neeldumisspektrite andmete põhjal, tüvi C70 R2A söötmes kasvades ei kasuta, samas värvub sööde mustaks (viitab katehhoolide kuhjumisele) ning detekteeritakse HMS/KHMS kogunemist (Joonis 30D). Klorosalitsülaate ja fenooli sisaldavates R2A söötmetes on *nahG* (SH) ja *nahW* (SH) suhteline mRNA hulk äärmiselt madal (Joonis 29A). Kuigi *pheB* (C23O) suhteline mRNA hulk on fenooli ja 3KS sisaldavas söötmes väga kõrge ning *nahH* (C23O) ekspresseeritakse enam-vähem samal tasemel kui vaid salitsülaati sisaldavas R2A-s (Joonis 29B ja C; 30A ja D). Tõenäoliselt on söötmetes C23O (PheB ja NahH) inaktiveeritud või inhibeeritud. Kirjanduse andmetel võib seda põhjustada aktiivsaiidi Fe²⁺ oksüdeeriv 3-klorokatehhoool või lagundamisrajas tekkivad reaktiivsed ühendid, näiteks atsüülkloriidid (Klecka ja Gibson, 1981; Bartels, jt., 1984). Samas suudab näiteks *Pseudomonas putida* GJ31 3KS siiski *meta* raja kaudu lagundada. Tüvel on selleks

geenilt *cbzE* kodeeritav klorokatehhooli 2,3-dioksügenaas, mis ei ole nii tundlik lagundamisel tekkivate ühendite suhtes. Nimetatud ensüümi C-terminaalses domäänis asub 297 positsioonis erinevalt C23O-dest isoleutsiini asemel valiniin (Mars jt., 1999).

Fenooli ja 4KS sisaldavas söötmes kasvanud C70 rakkudes on SH (*nahG* ja *nahW*) ning *pheB* (C23O) kodeerivate geenide suhteline mRNA hulk äärmiselt madal, *nahH* (C23O) ekspresseeritakse enam-vähem samal tasemel kui vaid salitsülaati sisaldavas R2A-s.

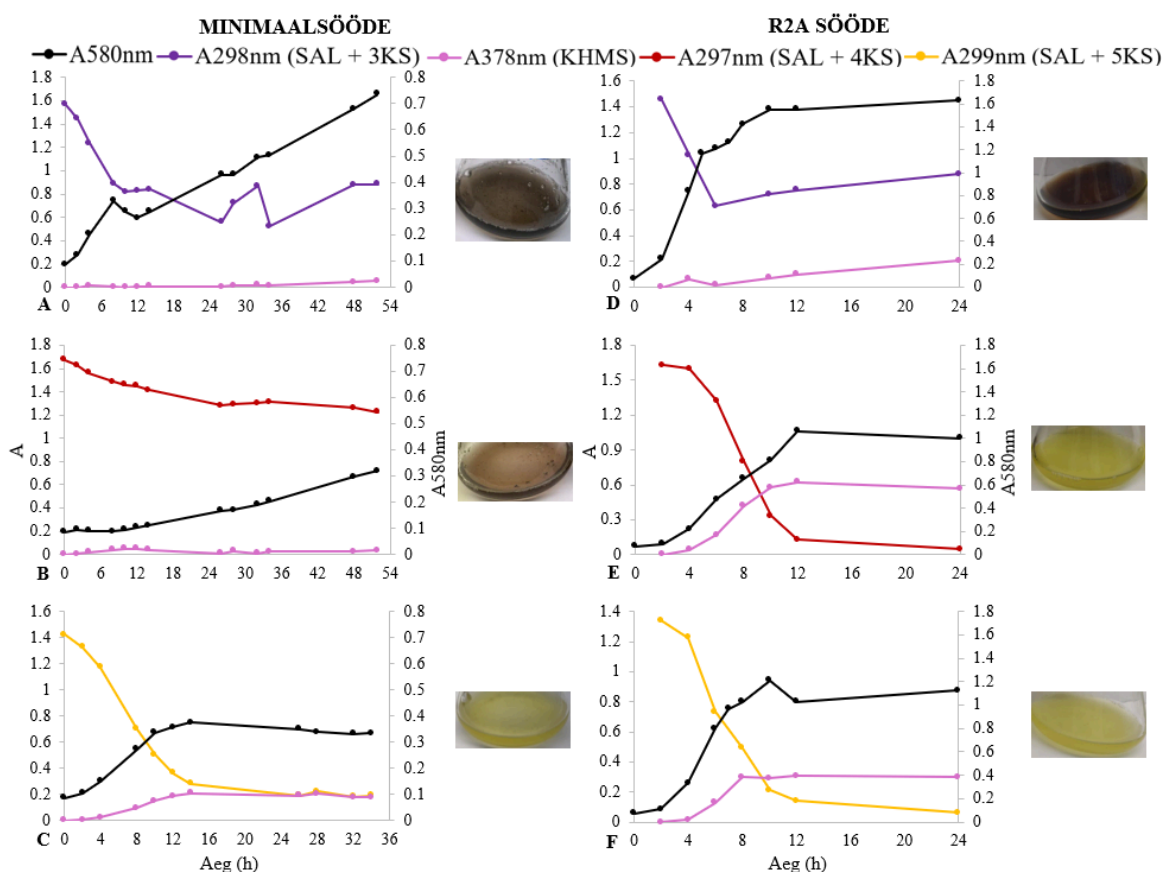


Joonis 30. *P. pseudoalcaligenes* C70 kasv fenooli, PHE, ja 3-klorosalitsülaati, 3KS, (A, D), 4-klorosalitsülaati, 4KS, (B, E) või 5-klorosalitsülaati, 5KS, (C, F) sisaldavates minimaal- (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (fenool A270nm, 3KS, A303nm, 4KS A297nm, 5KS A308nm) ja vaheühendi (5-kloro-2-hüdrosümukonosemialdehüüd, KHMS, A378nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud foto vastava söötmega kolvist.

Söötmele lisatud substraat mõjutab C70 võimet kasutada klorosalitsülaate, sest erinevalt fenoolist toimub salitsülaadi juuresolekul 5KS peaaegu täielik kasutamine minimaalsöötmetest (Joonis 31C), aga 3- või 4KS kasutamist salitsülaat ei soodusta (Joonis 31A, B). Toitainerikkamal R2A söötmel kasutab C70 ära salitsülaadi ning ka 4- ja 5KS (Joonis 31 E-F), 3KS jääb ilmselt kasutamata (Joonis 31D). Kirjanduses on öeldud, et 4KS ja 5KS

lagundamisel tekkiv 4-klorokatehhool on ainus vaheühend, mis ei inhibeeri C23O aktiivsust (Reineke et al., 1982). 3KS ja salitsülaati sisaldavas söötmes on mõlema SH kodeeriva geeni (*nahG* ja *nahW*) suhteline hulk madal. Samasugust ensüümi madalat aktiivsust nähti ka *P. stutzeri* AN10 puhul (Bosh et al., 1999). *nahH* (C23O) ekspresseeritakse tüves C70 enam-vähem samal tasemel kui vaid salitsülaati sisaldavas söötmes. Samas on tüvedest just C70 korral KS sisaldavad söötmed kõige tumedamad, mis viitab jällegi (kloro)katehhooli kogunemisele. *P. stutzeri* AN10 puhul näidati, et klorosalitsülaatide puhul oli aktiivne NahW, samas 3KS ja 5KS puhul oli NahW aktiivsus tunduvalt madalam kui 4KS ning 4KS puhul oli lisaks aktiivne ka NahG (Bosh et al., 1999).

4KS ja salitsülaadi segus on C23O (*nahH* ja *pheB*) ja SH (*nahG* ja *nahW*) kodeerivate geenide suhteline mRNA hulk samuti väga madal (Joonis 29). 5KS sisaldavas söötmes ekspresseeritakse gene *nahW*, *nahG* ja *pheB* märgatavalt kõrgemal tasemel kui 3- või 4KS ja fenooli sisaldavas R2A-s (Joonis 29) ning erinevalt 4KS sisaldavast sööttest tekib oluliselt vähem HMS/KHMS (Joonis 31 E, F).



Joonis 31. *P. pseudoalcaligenes* C70 kasv salitsülaati, SAL, ja 3-klorosalitsülaati, 3KS, (A, D), 4-klorosalitsülaati, 4KS, (B, E) või 5-klorosalitsülaati, 5KS, (C, F) sisaldavates minimaal- (A, B, C)- ja R2A (D, E, F) söötmetes. Joonistel on esitatud kasvukõverad (A580nm), substraatide (SAL+3KS A298nm, SAL+4KS A297nm, SAL+5KS A299nm) ja vaheühendi (5-kloro-2-hüdrosümukonosemialdehüüd, KHMS, A378nm) neeldumisspektrite maksimumide muutused ajas. Iga paneeli paremal küljel on toodud foto vastava söötmega kolvist.

Saadud tulemuste põhjal ei suuda *P. pseudoalcaligenes* C70 klorosalitsülaate fenooli sisaldavas minimaalsöötmes lagundada. Samas R2A söötmes kasutab tüvi fenooli olemasolul 4- ja 5KS täielikult ära 24 tunniga. Ka tüvi C70 degradeerib salitsülaati sisaldavas minimaalsöötmes vaid 5KS, kuid selleks kulub märgatavalt vähem aega kui PC20 puhul (120 versus 24 tundi). Sarnaselt tüvega PC20 soodustab R2A 4- ja 5KS lagundamist salitsülaati sisaldavas keskkonnas, kuid söötmesse kuhjub KHMS.

KOKKUVÕTE

Aromaatsed ühendid on äärmiselt stabiilsed ning nende likvideerimine loodusest füüsikalise-keemilistel meetoditel on ressursikulukas ning tihti ebaefektiivne. Potentsiaalseks meetodiks on seetõttu kujunenud bioremediatsioon, mis põhineb mikroorganismide võimel kasutada kompleksseid ühendeid energia- ja süsinikuallikana. Kuna looduses tuleb bakteritel kokku puutuda erinevate ühendite segudega ning substraatidel võib olla üksteise lagundamisele nii inhibeeriv kui soodustav mõju, on oluline tunda väga täpselt bioremediatsioonil kasutatavate tüvede metaboolseid omadusi erinevates kasvutingimustes. Selles töös uuriti tüvede *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4, *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 võimet lagundada metüül- ja klorosalitsülaate fenooli või salitsülaati sisaldavas kasvukeskkonnas. Samuti taheti saada teada, kas tüve C70 redundantset salitsülaadi 1-hüdroksülaasid ning katehooli 2,3-dioksügenaasid pakuvad segasubstraatidel kasvades eelist võrreldes ühe SH-ga tüvedega *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 ja *Pseudomonas fluorescens* PC20.

Katsetest selgus:

1. *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 suudab salitsülaati sisaldavast kasvukeskkonnast ära kasutada 4- ja 5MS, lagundades ühendeid katehooli *ortho* raja kaudu. Tüvi suudab degradeerida 4- ja 5KS ainult toitainerikkas söötmes ning defektse katehooli *meta* raja kaudu, kuhu kasvu ajal kuhjub KHMS.
2. *Pseudomonas fluorescens* PC20 suudab salitsülaati sisaldavast keskkonnast metüülsalitsülaate ära kasutada. Fenooli sisaldavas söötmes lagundatakse vaid 4- ja 5MS. Klorosalitsülaatidest suudab tüvi ära kasutada vaid 5KS salitsülaadi juuresolekul, kuid sellegi jaoks kulub väga kaua aega.
3. *P. pseudoalcaligenes* C70 suudab fenooli või salitsülaati sisaldavast keskkonnast kasutada ära kõik uuritud metüülsalitsülaadid. Ka selles tüves degradeeritakse 5KS salitsülaati sisaldavast minimaalsöötimest, kuid võrreldes PC20-ga kulub selleks palju vähem aega.
4. Redundantsed salitsülaadi SH ning C23O annavad tüvele C70 selge kasvueelise segasubstraate sisaldavas söötmes.
5. Toitainerikas sööde soodustab fenooli sisaldavast söötimest metüülsalitsülaatide ära kasutamist, tüve C70 puhul ka 4- või 5-klorosalitsülaadi degradeerimist. R2A ei soodusta tüvedes metüülsalitsülaatide lagundamist salitsülaati sisaldavast keskkonnast, küll aga tüvedes PC20 ja C70 4- ja 5KS kasutamist.

Degradation of methyl- and chlorosalicylates in the presence of phenol or Na-salicylate in pseudomonads

Deili Saan

Summary

The chemical industries produce a variety of toxic substances, among them are aromatic compounds. These compounds are extremely stable due to their structure and therefore accumulate in the environment causing persistent large-scale pollution after the spill. Aromatic compounds have proven carcino- and teratogenic as well as geno- and immunotoxic effects on humans and other animals. In addition aromatic compounds can inhibit growth, photosynthesis and seed germination in plants. Therefore it is crucial to limit and reduce the amount of these toxic substances in the natural environment.

Physicochemical methods for the removal of aromatics are not preferred because of high cost, ineffectiveness and the possibility of causing secondary pollution. Bioremediation, however, which relies on the ability of microorganisms to use complex compounds as energy- and carbon sources, has great potential of being the key to successful elimination of persistent pollution.

One compound can strongly impact the degradation of others in the environment. Some of the negative effects include competitive inhibition, repressed gene expression, and production of toxic intermediates that inactivate crucial metabolic enzymes. On the other hand one substrate can induce the synthesis of enzymes with broad substrate specificity or provide energy to grow and increase the size of the population of bacteria able to degrade other compounds in the mixture.

Hence, it is pivotal to study the metabolic capabilities of organisms utilized in bioremediation in various environmental conditions.

The aim of this study was to analyse the ability to degrade methyl- and chlorosalicylates in the presence of phenol or Na-salicylate in three *Pseudomonas* strains. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 harbours redundant salicylate 1-hydroxylases and catechol 2,3-dioxygenases. Redundant genes have been associated with the ability to survive in environments with high concentration of aromatic compounds. This work will determine whether these redundant genes also give *P. pseudoalcaligenes* C70 an advantage over *Pseudomonas fluorescens* PC20 and *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 while grown in mixed substrates.

The results of this study are summarized as follows:

1. *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 degrades 4- and 5-methylsalicylates in the mixture with salicylate through the catechol *ortho* pathway. The mixture of 4- or 5-chlorosalicylate and salicylate is degraded only partially in nutrient-rich R2A medium through the ruined *meta* pathway.
2. *P. fluorescens* PC20 can utilize methylsalicylates from a medium containing salicylate. In the presence of phenol, only 4- and 5MS are degraded. This strain can also metabolize 5-chlorosalicylate in salicylate containing medium, but degradation takes 120 hours.
3. *P. pseudoalcaligenes* C70 is able to utilize methylsalicylates in the presence of phenol or salicylate. Similarly to PC20, this strain can also metabolize 5-chlorosalicylate in salicylate-containing medium, but the degradation requires a lot less time.
4. The redundant salicylate 1-hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes provide the strain C70 with an enormous advantage while growing in mixed substrates.
5. Nutrient-rich medium enhances the degradation of methylsalicylates only in the presence of phenol. Such a positive effect is also seen in mixtures of 4- or 5-chlorosalicylate and salicylate or phenol in strains *P. fluorescens* PC20 and *P. pseudoalcaligenes* C70.

KASUTATUD ALLIKAD

- Alvarez, P. J. & Vogel, T. M. (1991). Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Applied and environmental microbiology*, 57(10), 2981–2985.
- Balashova, N. V., Stolz, A., Knackmuss, H.-J., Kosheleva, I. A., Naumov, A. V. & Boronin, A. M. (2001). Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1. *Biodegradation*, 12(3), 179–188.
- Barnsley E. A. (1976). Role and regulation of the ortho and meta pathways of catechol metabolism in pseudomonads metabolizing naphthalene and salicylate. *Journal of Bacteriology*, 125(2), 404–408.
- Barrow, R. R. (2022). Salitsülaadi ning metüüsalitsülaatide lagundamine erinevates perekonna *Pseudomonas* liikides. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.
- Bartels, I., Knackmuss, H. J. & Reineke, W. (1984). Suicide Inactivation of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-Halocatechols. *Applied and environmental microbiology*, 47(3), 500–505.
- Baskaran, D. & Byun, H.-S. (2024). Current trend of polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation: Mechanism, artificial mixed microbial strategy, machine learning, ground application, cost and policy implications. *Chemical Engineering Journal*, 498, 155334.
- Blasco, R., Wittich, R.-M., Mallavarapu, M., Timmis, K. N. & Pieper, D. H. (1995). From Xenobiotic to Antibiotic, Formation of Protoanemonin from 4-Chlorocatechol by Enzymes of the 3-Oxoadipate Pathway (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29229–29235.
- Bosch, R., García-Valdés, E. & Moore, E. R. B. (2000). Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 245(1), 65–74.
- Bosch, R., Moore, E. R. B., García-Valdés, E. & Pieper D. H. (1999). NahW, a Novel, Inducible Salicylate Hydroxylase Involved in Mineralization of Naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2315–2322.
- Bruce, N. C., Cain, R. B., Pieper, D. H. & Engesser, K. H. (1989). Purification and characterization of 4-methylmuconolactone methyl-isomerase, a novel enzyme of the modified 3-oxoadipate pathway in nocardioform actinomycetes. *The Biochemical journal*, 262(1), 303–312.
- Cámara, B., Bielecki, P., Kaminski, F., dos Santos, V. M., Plumeier, I., Nikodem, P. & Pieper, D. H. (2007). A gene cluster involved in degradation of substituted salicylates via ortho cleavage in *Pseudomonas* sp. strain MT1 encodes enzymes specifically adapted for transformation of 4-methylcatechol and 3-methylmuconate. *Journal of bacteriology*, 189(5), 1664–1674.
- Cámara, B., Nikodem, P., Bielecki, P., Bobadilla, R., Junca, H. & Pieper, D. H. (2009). Characterization of a Gene Cluster Involved in 4-Chlorocatechol Degradation by *Pseudomonas reinekei* MT1. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4905–4915.
- Carlson, E. A., Li, Y. & Zelikoff, J. T. (2002). Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquatic Toxicology*, 56(4), 289–301.
- Cha, C. J., Cain, R. B. & Bruce, N. C. (1998). The modified beta-ketoadipate pathway in *Rhodococcus rhodochrous* N75: enzymology of 3-methylmuconolactone metabolism. *Journal of bacteriology*, 180(24), 6668–6673.

- Chen, S.-H. & Aitken, M. D. (1999). Salicylate Stimulates the Degradation of High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environmental Science & Technology*, 33(3), 435–439.
- Choi, K. Y., Zylstra, G. J., Kim, E. (2007). Benzoate Catabolite Repression of the Phthalate Degradation Pathway in *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl Environ Microbiol* 73: 1370–1374.
- Davies, J. I. & Evans, W. C. (1964). Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. *The Biochemical journal*, 91(2), 251–261.
- Dennis, J. J. & Zylstra, G. J. (2004). Complete Sequence and Genetic Organization of pDTG1, the 83 Kilobase Naphthalene Degradation Plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *Journal of Molecular Biology*, 341(3), 753–768.
- Dorn, E. & Knackmuss, H. J. (1978). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. *The Biochemical journal*, 174(1), 85–94.
- Dunn N. W. & Gunsalus I. C. (1973). Transmissible Plasmid Coding Early Enzymes of Naphthalene Oxidation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 114(3), 974–979.
- Eaton, R. W. & Chapman, P. J. (1992). Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *Journal of bacteriology*, 174(23), 7542–7554.
- Ehrt, S., Schirmer, F. & Hillen, W. (1995). Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *Molecular Microbiology*, 18(1), 13–20.
- Elken, E., Heinaru, E., Jõesaar, M. & Heinaru, A. (2020). Formation of new PHE plasmids in pseudomonads in a phenol-polluted environment. *Plasmid*, 110, 102504.
- El-Shemy, H. A., Aboul-Enein, A. M., Aboul-Enein, K. M. & Fujita, K. (2007). Willow Leaves' Extracts Contain Anti-Tumor Agents Effective against Three Cell Types. *PLoS ONE* 2(1): e178.
- Enroth, C., Huang, W., Waters, S., Neujahr, H., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1994). Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Phenol Hydroxylase from *Trichosporon cutaneum*. *Journal of Molecular Biology*, 238(1), 128–130.
- Evans, W. C. (1947). Oxidation of phenol and benzoic acid by some soil bacteria. *The Biochemical journal*, 41(3), 373–382.
- Farombi, E. O., Ajayi, B. O. & Adedara, I. A. (2020). 6-Gingerol delays tumorigenesis in benzo[a]pyrene and dextran sulphate sodium-induced colorectal cancer in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 142, 111483.
- Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L. & Williams, P. A. (1998). A Gene Cluster Encoding Steps in Conversion of Naphthalene to Gentisate in *Pseudomonas* sp. Strain U2. *Journal of Bacteriology*, 180(9): 2522–2530.
- Goyal, A. K. & Zylstra, G. J. (1997). Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(5–6): 401–407.
- Grimm, A. C., Harwood, C. S. (1999). NahY, a Catabolic Plasmid-Encoded Receptor Required for Chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the Aromatic Hydrocarbon Naphthalene. *Journal of bacteriology*, 181(10), 3310–3316.
- Göbel, M., Kranz, O. H., Kaschabek, S. R., Schmidt, E., Pieper, D. H. & Reineke, W. (2004). Microorganisms degrading chlorobenzene via a meta-cleavage pathway harbor highly similar chlorocatechol 2,3-dioxygenase-encoding gene clusters. *Archives of Microbiology*, 182(2), 147–156.

- Harayama, S. & Reikik, M. (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *The Journal of biological chemistry*, 264(26), 15328–15333.
- Harder, W., Dijkhuizen, L., & Postgate, J. R. (1997). Strategies of mixed substrate utilization in microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 297(1088), 459–480.
- Hedner, T. & Everts, B. (1998). The early clinical history of salicylates in rheumatology and pain. *Clinical Rheumatology*, 17(1), 17–25.
- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U. & Heinaru, A. (2000). Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 195–205.
- Heinaru, E., Vedler, E., Jutkina, J., Aava, M. & Heinaru, A. (2009). Conjugal transfer and mobilization capacity of the completely sequenced naphthalene plasmid pNAH20 from multiplasmid strain *Pseudomonas fluorescens* PC20. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(3), 563–574.
- Heinaru, E., Viggor, S., Vedler, E., Truu, J., Merimaa, M. & Heinaru, A. (2001). Reversible accumulation of p-hydroxybenzoate and catechol determines the sequential decomposition of phenolic compounds in mixed substrate cultivations in pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology*, 37(1), 79–89.
- Henner, P., Schiavon, M., Druelle, V. & Lichtfouse, E. (1999). Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Organic Geochemistry*, 30(8, Part 2), 963–969.
- Hoffmann-Ostenhof, O. (1963). CHAPTER 22—Enzyme Inhibition by Quinones. In R. M. Hochster & J. H. Quastel (Eds.), *Metabolic Inhibitors* (pp. 145–159). Academic Press.
- Hollender, J., Hopp, J. & Dott, W. (1997). Degradation of 4-Chlorophenol via the meta Cleavage Pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4567–4572.
- Hupert-Kocurek, K., Wojcieszynska, D. & Guzik, U. (2014). Activity of a Carboxyl-Terminal Truncated Form of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Planococcus* sp. S5. *The Scientific World Journal*, 2014(1), 598518.
- Izmalkova, T. Yu., Sazonova, O. I., Nagornih, M. O., Sokolov, S. L., Kosheleva, I. A. & Boronin, A. M. (2013). The organization of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas putida* strain AK5. *Research in Microbiology*, 164(3), 244–253.
- Jiménez, J. I., Pérez-Pantoja, D., Chavarría, M., Díaz, E. & de Lorenzo, V. (2014). A second chromosomal copy of the gene endows *Pseudomonas putida* mt-2 with an enzymatic safety valve for excess of catechol. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1767–1778.
- Jutkina, J., Heinaru, E., Vedler, E., Juhanson, J. & Heinaru, A. (2011). Occurrence of Plasmids in the Aromatic Degrading Bacterioplankton of the Baltic Sea. *Genes*, 2(4), 853–868.
- Jõesaar, M., Viggor, S., Heinaru, E., Naanuri, E., Mehike, M., Heinaru, A. & Leito, I. (2017). Strategy of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 for effective degradation of phenol and salicylate. *PLoS ONE*, 12(3). Scopus®.
- Katagiri, M., Maeno, H., Yamamoto, S., Hayaishi, O., Kitao, T. & Oae, S. (1965). Salicylate Hydroxylase, a Monooxygenase Requiring Flavin Adenine Dinucleotide: II. The mechanism of salicylate hydroxylation to catechol. *Journal of Biological Chemistry*, 240(8), 3414–3417.
- Katagiri, M., Yamamoto, S. & Hayaishi, O. (1962). Flavin Adenine Dinucleotide Requirement for the Enzymic Hydroxylation and Decarboxylation of Salicylic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, 237(7), PC2413–PC2414.
- Klecka, G. M., Gibson, D. T. (1981) Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1159–1165.

- Klessig, D. F., Tian, M., & Choi, H. W. (2016). Multiple Targets of Salicylic Acid and Its Derivatives in Plants and Animals. *Frontiers in immunology*, 7, 206.
- Koo, Y. M., Heo, A. Y. & Choi, H. W. (2020). Salicylic Acid as a Safe Plant Protector and Growth Regulator. *The plant pathology journal*, 36(1), 1–10.
- Li, W., Shi, J., Wang, X., Han, Y., Tong, W., Ma, L., Liu, B., & Cai, B. (2004). Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. Strain ND6. *Gene*, 336(2), 231–240.
- Lin, Y.-H. & Ho, B.-H. (2022). Biodegradation Kinetics of Phenol and 4-Chlorophenol in the Presence of Sodium Salicylate in Batch and Chemostat Systems. *Processes*, 10(4), 694.
- Loh, K.-C. & Yu, Y.-G. (2000). Kinetics of carbazole degradation by *Pseudomonas putida* in presence of sodium salicylate. *Water Research*, 34(17), 4131–4138.
- Mallah, M. A., Changxing, L., Mallah, M. A., ... Zhang, Q. (2022). Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overreview. *Chemosphere*, 296, 133948.
- Marín, M., Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Wray, V., González, B. & Pieper, D. H. (2010). Modified 3-oxoadipate pathway for the biodegradation of methylaromatics in *Pseudomonas reinekei* MT1. *Journal of bacteriology*, 192(6), 1543–1552.
- Mars, A. E., Kingma, J., Kaschabek, S. R., Reineke, W. & Janssen, D. B. (1999). Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31. *Journal of bacteriology*, 181(4), 1309–1318.
- Mehike, M. (2016). Redundantsed katehhooli 2,3-dioksügenaasid *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüves C70. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.
- Merimaa, M., Heinaru, E., Liivak, M., Vedler, E. & Heinaru, A. (2006). Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes. *Archives of Microbiology*, 186(4), 287–296.
- Murray, K., Duggleby, C. J., Williams, P. A. & Sala-Trepat, J. M. (1972). The Metabolism of Benzoate and Methylbenzoates via the meta-Cleavage Pathway by *Pseudomonas arvilla* mt-2. *European Journal of Biochemistry*, 28(3), 301–310.
- Müller, C., Petruschka, L., Cuypers, H., Burchhardt, G. & Herrmann, H. (1996). Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas putida* is mediated by the inhibition of the activator protein PhlR. *Journal of bacteriology*, 178(7), 2030–2036.
- Neujahr, H. Y. & Gaal, A. (1973). Phenol Hydroxylase from Yeast. *European Journal of Biochemistry*, 35(2), 386–400.
- Neujahr, H. Y. & Gaal, A. (1975). Phenol Hydroxylase from Yeast. *European Journal of Biochemistry*, 58(2), 351–357.
- Nikodem, P., Hecht, V., Schlömann, M. & Pieper, D. H. (2003). New Bacterial Pathway for 4- and 5-Chlorosalicylate Degradation via 4-Chlorocatechol and Maleylacetate in *Pseudomonas* sp. strain MT1. *Journal of Bacteriology*, 185(23), 6790–6800.
- Nisha, A. R., Haziawati, H., Mohd Azmi, M. L. & Noordin, M. M. (2017). DNA damage and adduct formation in immune organs of developing chicks by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27(3), 215–222.
- Nordlund, I., Powlowski, J., & Shingler, V. (1990). Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *Journal of bacteriology*, 172(12), 6826–6833.
- Nzila, A. (2013). Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. *Environmental Pollution*, 178, 474–482.
- Nurk, A., Kasak, L. & Kivisaar, M. (1991). Sequence of the gene (pheA) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: Expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene*, 102, 13–18.

- Oh, Y.-S., Shareefdeen, Z., Baltzis, B.C. & Bartha, R. (1994). Interactions between benzene, toluene, and p-xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotechnology and bioengineering*, 44(4): 533-538.
- Ono, A., Miyazaki, R., Sota, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y. & Masataka, T. (2007). Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 501–510.
- Ornston, L. N. (1966). The Conversion of Catechol and Protocatechuate to β -Ketoadipate by *Pseudomonas putida*: III. ENZYMES OF THE CATECHOL PATHWAY. *Journal of Biological Chemistry*, 241(16), Article 16.
- Ornston, L. N. & Stanier, R. Y. (1966). The Conversion of Catechol and Protocatechuate to β -Ketoadipate by *Pseudomonas putida*: I. BIOCHEMISTRY. *Journal of Biological Chemistry*, 241(16), 3776–3786.
- Park, W., Jeon, C. O., Cadillo, H., Derito, C. & Madsen, E. L. (2004). Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 in naphthalene-amended soils: toxicity of naphthalene and its metabolites. *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 429–435.
- Pašková, V., Hilscherová, K., Feldmannová, M. & Bláha, L. (2006). Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-heterocyclic derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(12), 3238–3245.
- Peegel, A. (2023). Klorosalitsülaatide lagundamine erinevates perekonna *Pseudomonas* liikides. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.
- Pérez-Pantoja, D., González, B., Pieper, D. H. (2010). Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In: Timmis, K.N. (eds) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Pieper, D. H., Engesser, K.-H., Don, R. H., Timmis, K. N. & Knackmuss, H.-J. (1985). Modified ortho-cleavage pathway in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 for the degradation of 4-methylcatechol. *FEMS Microbiology Letters*, 29: 63-67.
- Pieper, D. H., Stadler-Fritzsche, K., Knackmuss, H. J., Engesser, K. H., Bruce, N. C. & Cain, R. B. (1990). Purification and characterization of 4-methylmuconolactone methylisomerase, a novel enzyme of the modified 3-oxoadipate pathway in the gram-negative bacterium *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *The Biochemical journal*, 271(2), 529–534.
- Pieper, D.H., González, B., Cámara, B., Pérez-Pantoja, D., Reineke, W. (2010). Aerobic Degradation of Chloroaromatics. In: Timmis, K.N. (eds) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology (pp. 839–864). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Pozdnyakova-Filatova, I., Petrikov, K., Vetrova, A., Frolova, A., Streletskii, R. & Zakharova, M. (2020). The Naphthalene Catabolic Genes of *Pseudomonas putida* BS3701: Additional Regulatory Control. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Powlowski, J. & Shingler, V. (1990). *In vitro* analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *Journal of Bacteriology*, 172(12), 6834–6840.
- Prieto, M. A., Perez-Aranda, A. & Garcia, J. L. (1993). Characterization of an *Escherichia coli* aromatic hydroxylase with a broad substrate range. *Journal of Bacteriology*, 175(7), 2162–2167.
- Prucha, M., Peterseim, A., & Pieper, D. H. (1997). Evidence for an isomeric muconolactone isomerase involved in the metabolism of 4-methylmuconolactone by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Archives of Microbiology*, 168(1), 33–38.
- Prucha, M., Peterseim, A., Timmis, K. N. & Pieper, D. H. (1996). Muconolactone Isomerase of the 3-Oxoadipate Pathway Catalyzes Dechlorination of 5-Chloro-Substituted Muconolactones. *European Journal of Biochemistry*, 237(2), 350–356.

- Reardon, K. F., Mosteller, D. C. & Bull Rogers, J. D. (2000). Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnology and Bioengineering*, 69(4), 385–400.
- Reineke, W., Wessels, S. W., Rubio, M. A., Latorre, J., Schwien, U., Schmidt, E., Schlömann, M., & Knackmuss, H.-J. (1982). Degradation of monochlorinated aromatics following transfer of genes encoding chlorocatechol catabolism. *FEMS Microbiology Letters*, 14(4), 291–294.
- Rosselló-Mora, R. A., Lalucat, J. & García-Valdés, E. (1994). Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(3), 966–972.
- Salari, M., Rahmanian, V., Hashemi, S. A., Chiang, W.-H., Lai, C. W., Mousavi, S. M. & Gholami, A. (2022). Bioremediation Treatment of Polyaromatic Hydrocarbons for Environmental Sustainability. *Water*, 14(23), 3980.
- Sala-Trepat, J. M., Murray, K. & Williams, P. A. (1972). The Metabolic Divergence in the meta Cleavage of Catechols by *Pseudomonas putida* NCIB 10015. *European Journal of Biochemistry*, 28(3), 347–356.
- Schirmer, F. & Hillen, W. (1998). The *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250 mop operon mRNA is differentially degraded, resulting in a higher level of the 3' CatA-encoding segment than of the 5' phenolhydroxylase- encoding portion. *Molecular and General Genetics MGG*, 257(3), 330–337.
- Schmidt, S. K. & Alexander, M. (1985). Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compounds at low concentrations. *Applied and environmental microbiology*, 49(4), 822–827.
- Simarro, R., González, N., Bautista, L. F., Sanz, R. & Molina, M. C. (2011). Optimisation of Key Abiotic Factors of PAH (Naphthalene, Phenanthrene and Anthracene) Biodegradation Process by a Bacterial Consortium. *Water, Air, & Soil Pollution*, 217(1), 365–374.
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(1): 278–309.
- Serdar, C. M. & Gibson, D. T. (1989). Studies of nucleotide sequence homology between naphthalene-utilizing strains of bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164(2), 772–779.
- Shara, M. & Stohs, S. J. (2015). Efficacy and Safety of White Willow Bark (*Salix alba*) Extracts. *Phytotherapy research : PTR*, 29(8), 1112–1116.
- Shi, T., Fang, L., Qin, H., Wu, X., Li, Q. X. & Hua, R. (2019). Minute-Speed Biodegradation of Organophosphorus Insecticides by *Cupriavidus nantongensis* X1T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(49), 13558–13567.
- Shingler, V., Franklin, F. C. H., Tsuda, M., Holroyd, D. & Bagdasarian, M. (1989). Molecular Analysis of a Plasmid-encoded Phenol Hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *Journal of general microbiology*, 135(5), 1083–1092.
- Sidorenko, J., Jatsenko, T., Saumaa, S., Teras, R., Tark-Dame, M., Hōrak, R. & Kivisaar, M. (2011). Involvement of specialized DNA polymerases Pol II, Pol IV and DnaE2 in DNA replication in the absence of Pol I in *Pseudomonas putida*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 714(1), 63–77.
- Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., ... Zylstra, G. J. (1993). Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, 127(1), 31–37.
- Skiba, A., Hecht, V. & Pieper, D. H. (2002). Formation of protoanemonin from 2-chloro-cis,cis-muconate by the combined action of muconate cycloisomerase and muconolactone isomerase. *Journal of bacteriology*, 184(19), 5402–5409.
- Smirnova, K. (2019). Redundant salicylate 1-hydroxylase genes of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.

- Sota, M., Yan, H., Ono, A., Miyazaki, R., Ishii, H., Genka, H., Top, E. M. & Tsuda, M. (2006). Genomic and Functional Analysis of the IncP-9 Naphthalene-Catabolic Plasmid NAH7 and Its Transposon Tn4655 Suggests Catabolic Gene Spread by a Tyrosine Recombinase. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4057–4067.
- Zhang, C., Li, S., Sun, Z., Geng, Y., Zhang, Y., Shi, T., Hua, R. & Fang, L. (2023). Dual metabolic pathways co-determine the efficient aerobic biodegradation of phenol in *Cupriavidus nantongensis* X1. *Journal of Hazardous Materials*, 460, 132424.
- Zhang, W. & Xia, X. (2019). Isolation, Kinetics, and Performance of a Novel Phenol Degrading Strain. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 33 (4), 485-494.
- Zhou, N. Y., Al-Dulayymi, J., Baird, M. S. & Williams, P. A. (2002). Salicylate 5-hydroxylase from *Ralstonia* sp. strain U2: a monooxygenase with close relationships to and shared electron transport proteins with naphthalene dioxygenase. *Journal of bacteriology*, 184(6), 1547–1555.
- Zhou, N. Y., Fuenmayor, S. L. & Williams, P. A. (2001). nag genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *Journal of bacteriology*, 183(2), 700–708.
- Zuniga, M. C., Durham, D. R. & Welch, R. A. (1981). Plasmid- and chromosome-mediated dissimilation of naphthalene and salicylate in *Pseudomonas putida* PMD-1. *Journal of bacteriology*, 147(3), 836–843.
- Tsai, S.-Y. & Juang, R.-S. (2006). Biodegradation of phenol and sodium salicylate mixtures by suspended *Pseudomonas putida* CCRC 14365. *Journal of Hazardous Materials*, 138(1), 125–132.
- van Schie, P. M. & Young, L. Y. (2000). Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications. *Bioremediation Journal*, 4(1), 1–18.
- Wang, Q., Li, Y., Li, J., Wang, Y., Wang, C., & Wang, P. (2014). Experimental and kinetic study on the cometabolic biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22.
- Wang, S.-J. & Loh, K.-C. (2000). New cell growth pattern on mixed substrates and substrate utilization in cometabolic transformation of 4-chlorophenol. *Water Research*, 34(15), 3786–3794.
- Weidner, C., de Groot, J. C., Prasad, A., ... Sauer, S. (2012). Amorfrutins are potent antidiabetic dietary natural products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19), 7257–7262.
- Weidner, C., Rousseau, M., Micikas, R. J., ... Sauer, S. (2016). Amorfrutin C Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation in Colon Cancer Cells through Targeting Mitochondria. *Journal of Natural Products*, 79(1), 2–12.
- Wieser, M., Eberspächer, J., Vogler, B. & Lingens, F. (1994). Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1: structure of the meta cleavage product of 4-chlorocatechol. *FEMS microbiology letters*, 116(1), 73–78.
- Williams, P. A. & Sayers, J. R. (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegr. 5*: 195-217.
- Williams, P. A., Catterall, F. A. & Murray, K. (1975). Metabolism of naphthalene, 2-methylnaphthalene, salicylate, and benzoate by *Pseudomonas* PG: regulation of tangential pathways. *Journal of Bacteriology*, 124(2), 679–685.
- Vollmer, M.D., Stadler-Fritzsche, K. & Schlömann, M. (1993). Conversion of 2-chloromaleylacetate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch. Microbiol.* 159, 182–188.
- Yen K. M. & Gunsalus I. C. (1985). Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *Journal of Bacteriology*, 162(3): 1008–1013.

Yen, K. M. & Gunsalus, I. C. (1982). Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(3): 874–878.

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud praimerid koos nukleotiidsete järjestustega, seondumistemperatuuridega, amplifitseeritavate geenide ja ensüümi tüüpide nimetustega. C230 - katehhooli 2,3-dioksügenaas. C120 - katehhooli 1,2-dioksügenaas. SH - salitsülaadi hüdroksülaas. DNA pol I - DNA polümeraas I

Ensüüm/geen/tüvi	Praimer	Nukleotiidne järjestus (5' → 3')	Seondumis-temperatuur	Viide
C230 / <i>nahH</i> / C70 ja NCIB 9816-4	C70aF C70aR	TGGAGCGGGATCTGACGGCA CGGGATTGACCTCATTACA	58 °C	Mehike, 2016
C230 / <i>pheB</i> / C70	C70bF C70bR	TCACCGAGGACCTGCTCAAC CCGGGTTGACCTCGGCCAAG	58 °C	
SH / <i>nahG</i> / C70	nahGF7 nahGR3u	CTGCAACTGCGCGAAGCCTT GCTTCCCGTACCCAGGGAG	61 °C	Smirnova, 2019
SH / <i>nahG</i> / PC20 ja NCIB 9816-4	nahGF3 nahGR2	GGGCTTGAGGACGCCTATTTC GTTGCACACGACAGGCA TGAG	61 °C	
SH / <i>nahW</i> / C70	nahWF nahWR	CGATGACACTGGCGAACAGC CGTACGGTGGAACGCATCC	61 °C	
C120 / <i>catA</i> / NCIB 9816-4	catA4F catA4R	TCGGAATTCAACCTGCGTCG GGTGGTCAGGTGACGATGG	58 °C	Barrow, R. R., 2022
C120 / <i>pheB</i> / PC20	pheB20_F pheB20_R	CACCCGGCCTAGGTTTTGAT CACCCGGCCTAGGTTTTGAT	61 °C	
C230 / <i>nahH</i> / PC20	nahHRT694f nahHRT822r	ATCAGCATGACCGACACCTC ATAGTTGTAGTCCCGCCGC	61 °C	Pozdnyakova-Filatova <i>et al.</i> , 2020
DNA Pol I / <i>polA</i> / C70, PC20 ja NCIB 9816-4	polAXhoylev polAXhoall	GGGGCAGAACGCCAAGTACG TCTGCGCCAGGCTGTCCAT	61/58 °C	Sidorenko <i>et al.</i> , 2011

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Deili Saan,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “Pseudomonaadide võime lagundada metüül- ja klorosalitsülaate fenooli või salitsülaati sisaldavatest segudest”,

mille juhendajateks on Merike Jõesaar ja Signe Viggor,

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

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

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

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

Deili Saan

26.05.2025