

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

**Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonnast isoleeritud bakteritüvede multikomponentse
fenooli hüdroksülaasi mitmekesisus**

Bakalaureusetöö
12 EAP
Triinuliis Sillakivi

Juhendajad
Teadur Signe Viggor PhD
Teadur Merike Jõesaar PhD

TARTU 2025

INFOLEHT

Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonnast isoleeritud bakteritüvede multikomponentse fenooli hüdroksülaasi mitmekesisus

Kohtla-Järve piirkonnas esineb põlevkivitööstusest tingitud keskkonnareostust. 1989. aastal peale Estonia kaevanduse põlengut viidi *pheBA* operoniga *Pseudomonas*'e tüvi/tüved kaevanduse kustutusvette fenoolide lagundama. Käesoleva töö raames uuriti multikomponentsete fenooli hüdroksülaaside mitmekesisust ja *pheBA* esinemist keskkonnas. Käesolevas töös saadud tulemuste põhjal on põlevkivitööstuse reostuse mõju all olevates veekogudes multikomponentse fenoolihüdroksülaasi mitmekesisus suur. Kõik analüüsitud tüved kuuluvad 16S rRNA ja *LmPH* geeni järgi *Pseudomonadota* hõimkonda ning valdav enamus kuuluvad perekonda *Pseudomonas*. *pheA* geeni olemasolu tuvastati kahel tüvel.

Märksõnad: põlevkivitööstus, bakterid, fenoolide lagundamine, bioaugmentatsioon

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Multicomponent phenol hydroxylase diversity from bacteria isolated from Kohtla-Järve oil shale industry region

Kohtla-Järve's oil shale industry has polluted its surrounding areas. After the fire in the mine "Estonia" in 1989, a *Pseudomonas putida* carrying the *pheBA* operon was introduced into the phenol-polluted water used for extinguishing the fire. The presence of the *pheBA* operon and a diversity of multicomponent phenol hydroxylases (mPH) was investigated in isolated strains. It was concluded that in the polluted area of the oil shale industry, the diversity of multicomponent phenol hydroxylases is high. According to the analyzed bacteria's 16S rRNA and the large subunit of mPH, most of them belonged to the *Pseudomonadota* phylum, and of those, most belonged to the genus *Pseudomonas*. The presence of the *pheBA* operon was determined only in two strains.

Keywords: oil shale industry, bacteria, degradation of phenol, bioaugmentation

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Põlevkivitööstus	7
1.1.1. Põlevkivi ja selle kaevandamine.....	7
1.1.2. Põlevkivitööstus ja põlevkiviõli	9
1.1.3. Põlevkivitööstuste keskkonnamõju	9
1.1.4. Põlevkiviõli koostis	13
1.1.5. Fenoolsed ühendid.....	13
1.1.7. Fenooli lagundamine	15
1.2. Bioremediatsioon	16
1.3. Estonia kaevanduse põleng	17
1.3.1. Fenooli sisaldava kütustusevee puhastamine.....	18
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1. Töö eesmärgid	20
2.2. Materjal ja meetodika	20
2.2.1. Keskkonnaproovide võtmine ja tüvede isoleerimine.....	20
2.2.2. Fluorestseerivate siderofooride tootmise kontroll	21
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	22
2.2.3. Gelelektroforees.....	23
2.2.4. Geenifragmentide sekveneerimine	23
2.3. Tulemused ja arutelu	24
2.3.1. Tüvede isoleerimine	24
2.3.2. Tüvede 16S rRNA geenijärjestuste analüüs	27
2.3.3. mPH geenide analüüs	31
KOKKUVÕTE	35
SUMMARY	36

KASUTATUD KIRJANDUS.....	37
KASUTATUD VEEBIAADDRESSID	43
LISA 1.....	44
LISA 2.....	47

KASUTATUD LÜHENDID

GSK – gaasilise soojuskandja meetod

LmPH – multikomponentse fenooli hüdroksülaasi suur subühik

mPH – multikomponentne fenooli hüdroksülaas

TSK – tahke soojuskandja meetod

SISSEJUHATUS

Põlevkivi termilisel lagunemisel tekivad jääkproduktidena poolkokk ja fuuss, mis sisaldavad fenooli ja põlevkiviõli (Eesti Keemiatööstuse Liit ja ÅF-Consulting AS, 2013). Kuna nõukogude aegu polnud põlevkivi termilisel töötlemisel tekkivate jääkproduktide ladestamine nii hästi reguleeritud kui tänapäeval on Ida-Virumaa veekogudes reostunud. Fenoolid on aromaatsed süsivesinikud, mis on nii inimestele kui ka loomadele mürgised (Evans, 1952; Patrick *et al.*, 1968). Nende sisaldust keskkonnas vähendavad bakterid, kes omavad vastavaid kataboolseid geene. Ensüüme, mis fenooli lagundavad nimetatakse fenooli hüdroksülaasideks ja need jagunevad kaheks: mono- ja multikomponentsed fenooli hüdroksülaasid.

1988. aastal oli Estonia põlevkivikaevanduses tulekahju ja selle kustutamiseks pumbati kaeveõõntesse vett, mis reostus fenoolidega (Kokk, 1988A; Mikson *et al.*, 2008). Kustutusvette viidi fenoolide vähendamiseks monokomponentse fenooli hüdroksülaasi *pheBA* operoni sisaldav *P. putida* PaW85 tüvi (Heinaru *et al.*, 1991).

Käesolev töö sai alguse sellest, et taheti teada kas keskkonnas endiselt esineb *pheBA* operoni. Töö eesmärkideks on selgitada välja, kas *pheBA* operoni esineb veel Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonnas ja saada ülevaade sealsetest fenooli oma ainsa süsiniku- ja energiaallikana kasutatavatest bakteritest ja nende multikomponentse fenooli hüdroksülaasi suure subühiku mitmekesisusest. Kuna nii suuremahulisi bioaugmentatsioone ei ole palju läbi viidud, on oluline uurida, kuidas kunstlikult keskkonda viidud operon seal säilib.

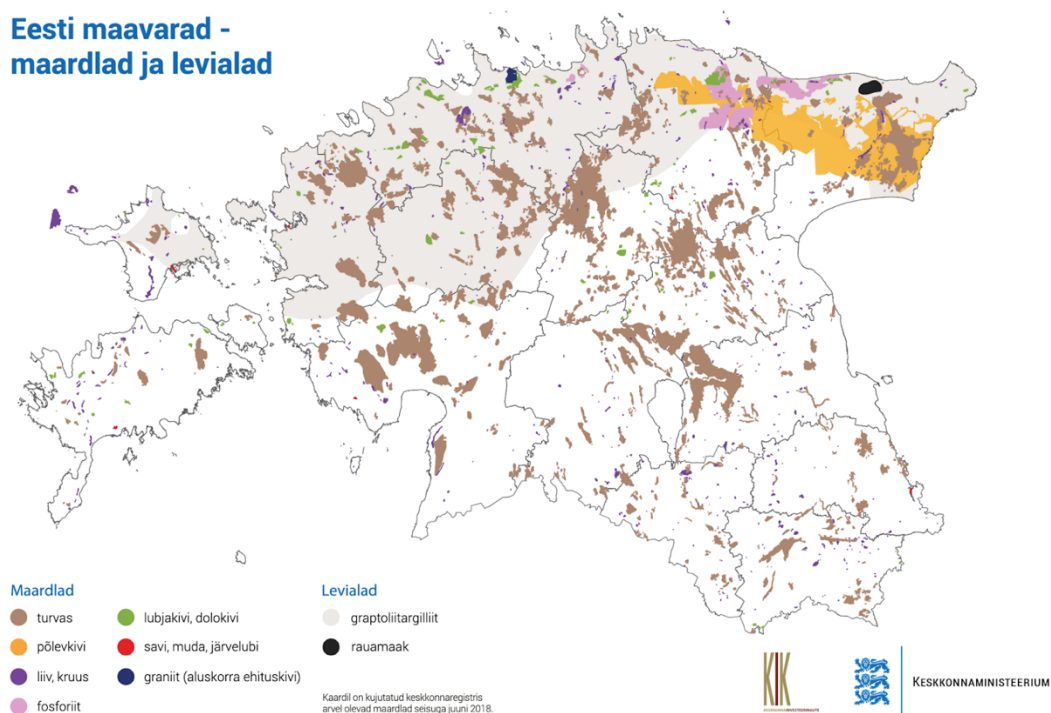
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Põlevkivitööstus

1.1.1. Põlevkivi ja selle kaevandamine

Põlevkivi on kunagiste veeorganismide ladestumisest tekkinud settekivim, mis sisaldab lisaks orgaanilisele ainele palju mineraalühendeid (Viiding, 1984). Mineraalühendite suure sisalduse tõttu annab põlevkivi põlemisel palju tuhka (Viiding, 1984). Põlevkivi orgaanilist osa nimetatakse kerogeeniks (Viiding, 1984). Eesti aladel leidub kahte sorti põlevkivi, milleks on diktüoneemakilt ja kukersiit (Joonis 1) (Viiding, 1984). Eestis kaevandatakse kukersiiti, kuna diktüoneemakilt on tunduvalt väiksema õlisaagisega (Kattai, 2003). Diktüoneemakilt ehk graptoliitargilliit on kvartsirikas savikivim, mille kerogeeni sisaldus on keskmiselt 12-15%, kukersiidi kerogeeni sisaldus on keskmiselt 30-40% (Kivimägi, 1974).

Kukersiidi lademetes on vahelduvate kihtidena põlevkivi ja lubjakivi. Kuna põlevkivi sisaldab võrreldes kivisöega palju vett ja mineraalaineid, siis ei ole see nii hea energiaallikas kui kivisüsi, kuigi põlevkivi orgaanilise osa kütteväärtus on kõrgem kui kivisöel. (Aarna *et al.*, 1954)



Joonis 1. Eesti maavarade maardlad ja levialad. (Kliimaministeerium, 2025)

1.1.2. Põlevkivitööstus ja põlevkiviõli

Tänapäeval on Eestis põlevkiviõli tootjateks Eesti Energia tütarettevõtte AS Enefit Industry, AS Viru Keemia Grupp ja Alexela Gruppi kuuluv OÜ Kiviõli Keemiatööstus. 2024. aastal kaevandati Eestis kokku põlevkivi 10 900 000 tonni ja sellest töödeldi 8 549 302 tonni, kusjuures sellest 4 000 000 tonni töötles AS Enefit Industry (Kundla, 2025).

Põlevkiviõli on põlevkivi termilisel töötlemisel tekkiv kütus, mis sarnaneb koostiselt naftale (Eesti Keemiatööstuse Liit ja ÅF-Consulting AS, 2013; Kattai, 2003). Põlevkivi termilist töötlemist viiakse läbi tavaliselt 500 °C juures, sest sel temperatuuril on kerogeeni pürolüüs kõige kiirem (Tang *et al.*, 2015), madalamatel temperatuuridel kleepuksid põlevkivi tükid omavahel kokku ja õli ei saaks koguda (Kattai, 2003). Protsessi, mille käigus põlevkivi kuni 500 °C-ni kuumutatakse, nimetatakse utmiseks ehk poolkoksimiseks (Eesti Keemiatööstuse Liit ja ÅF-Consulting AS, 2013; Kattai, 2003).

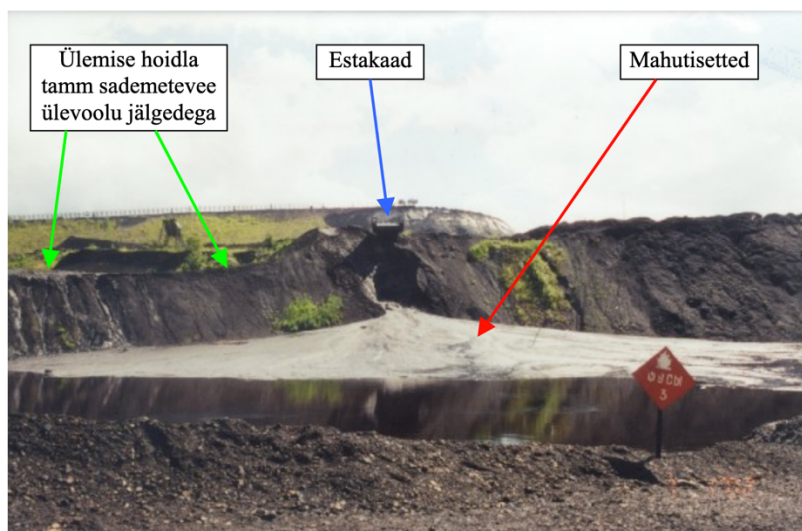
Eestis kasutatavad põlevkivi termilise töötlemise võtted jagunevad tänapäeval kaheks – on gaasilise (GSK) ja tahke soojuskandja meetod (TSK). GSK meetodi puhul taaskasutatakse järgmise põlevkivi kuumutamiseks osa eelneva laadungi uttegaasist ja põhiliseks jääkproduktiks on poolkoks. TSK meetodi puhul kasutatakse järgmise laadungi kuumutamiseks eelneva laadungi tuhka, mis saadakse utmisel saadud poolkoksi edasisel termooksüdeerimisel. (Eesti Keemiatööstuse Liit ja ÅF-Consulting AS, 2013)

Põlevkivi utmisel saadakse poolkoks, tuhk, tuharikas raskeõli ehk fuuss, põlevkiviõli, veeaur, erinevad suitsugaasid, fenoolvesi ja uttegaas. Põlevkivi termilisel töötlemisel tekkivat kuuma tuhka kasutatakse ka lähedal olevate linnade küttevee soojendamiseks. Uttegaas on kõrge kütteväärtusega ning seda saab kasutada soojuse ja elektri tootmiseks. Fenoolvesi defenoleeritakse, et fenooli müüa saaks. TSK kasutades tekib vähem fenoolvett kui GSK meetodil. Ainult TSK meetodil saadud fenoolvee defenoleerimine ei ole majanduslikult kasumlik, aga kui TSK saadud fenoolvesi liita GSK omaga siis tasub defenoleerimine end ära. (Eesti Keemiatööstuse Liit ja ÅF-Consulting AS, 2013)

1.1.3. Põlevkivitööstuste keskkonnamõju

2003. aastal tekkis aastas 800 000 tonni poolkoksi, 18 000 tonni pigijäätmeid e fuussi (Kattai, 2003). Fuuss koosneb peamiselt lenduvatest orgaanilistest süsivesinikest, polüaromaatsetest süsivesinikest ja fenoolidest (Salu *et al.*, 2002). Enne 1970. aastat ladestati fuuss ja poolkoks koos Kiviõli ja Kohtla-Järve prügimägedele, selle tõttu on loodusesse sattunud palju

pigijäätmeid (Kattai, 2003). Peale 1970. aastat ladestati fuuss poolkoksimägede vahelisse orgu rajatud kahel eritasapinnal olevates hoidlates (Joonis 3) (Salu *et al.*, 2002). Fuusside maht nendes hoidlates oli 2001. aastal hinnanguliselt 100 000 tonni ja sealt filtreerus pidevalt ohtlike ühendeid ümbritsevasse keskkonda (Salu *et al.*, 2002). Fuussi ladestamine lõpetati 2002. aastal ning nüüd seda põletatakse, kas lisakütuse või lihtsalt hävitamise eesmärgiga (Kattai, 2003). Fuusihoidlad olid pealt avatud ja sademevesi, mis sinna tuli, reostus ning suurendas sellega ohtliku vedeliku taset (Gross ja Šmeljova, 2002). 2002. aastal otsustati see probleem lahenda hoidlate katmisega poolkoksikihtide, tugevdusvõrgu ja geotekstiiliga (Gross ja Šmeljova, 2002).



Joonis 3. Alumine fuusihoidla Kohtla-Järvel asuvas poolkoksiprügilas (Gross ja Šmeljova, 2002).

Kohtla-Järve piirkonnas ei peeta põlevkivitööstust oluliseks õhusaastajaks. Kuid kuiva ja tuulise ilma korral paiskub tuulega õhku tolmu. (Kattai, 2003)

Põlevkivi termilisel töötlemisel tekib palju poolkoksi ja tuhka. Poolkoks sisaldab kuni 10% orgaanilist süsinikku ja sellest osa moodustuvad kantserogeensed polüaromaatsed süsivesinikud. Poolkoksi ja põlevkivituhka käsitletakse kui ohtlikku jäadet (Jäätmete liigitamise kord ja jäätmenimistu, 2021). Poolkoks on isesüttiv, sisaldab raskemetalle ning selle leovesi on aluseline pH=11-12 (Eesti Keemiatööstuse Liit ja ÅF-Consulting AS, 2013). Eestis ladestatakse neid jääkprodukte prügilatesse, mille tulemusena on tekkinud Kirde-Eesti tööstuspiirkonnas suured poolkoksi- ja tuhamäed (Joonis 2,4,5) (Eesti Keemiatööstuse Liit ja ÅF-Consulting AS, 2013). 2003. aastal oli üle 100 m kõrguste poolkoksimägede aluspindala 2,5 km² ja poolkoksi kogus nendes umbes 90 mln tonni (Kattai, 2003). Poolkoksimäed on

spetsiaalselt mõeldud poolkoksi ladestamise jaoks ning neid ümbritsevad nõrgvett koguvad kraavid. Loodusele ohtlik nõrgvesi suunati Kohtla jõkke, sealt edasi Purtse jõkke, kust see Läänemere jõudis (Kattai, 2003). Poolkoks transporditakse mäe juurde kallurite või traktoritega ja tihendatakse 3-4 korda päevas teerulliga. Tuhka ladestatakse kas poolkoksimägedes poolkoksiga segamini või eraldi märke moodustatud aukudes, või üldse eraldi tuhamägedes (Kattai, 2003).

Nõukogude ajal ei olnud põlevkivitööstuse jääkainete käitlemine ja ladestamine nii hästi reguleeritud ja ei hoolitud nii palju keskkonna kahjustuste pärast kui tänapäeval. Selle tööstuseks on 2017. aastal registreeritud Kohtla-Järvel 65000 m² pindalaga jääkreostusobjekt - fenoolisoo (Keskkonnaportaali, 2017).

Põlevkivikaevanduse keskkonna mõju uuriti juba 1991. aastal, siis järeldati, et kaevandusveed tõstavad pinnavee SO₄²⁻, Cl⁻, HCO₃⁻, K⁺ ja Na⁺ ionide taset (Heinaru *et al.*, 1991). Uuringu tulemusel jõuti järeldusele, et vee parandamiseks on vaja suuremaid settebasseineid (Heinaru *et al.*, 1991). Tänapäeval juhitakse kaevandusvesi settetiikidesse, kus selitamise järel (sulfaatide ja heljumi vähendamiseks) juhitakse see looduslikesse veekogudesse. 2011. aastal puhastati sel viisil 99,9% kaevandusveest (Energiatalgud, 2021).

2008. aastal määrati reostusnäitajaid Ida-Virumaa jõgedest, kuhu varasemalt suunati tööstuslik heitvesi. Leiti, et Purtse jõe setteproovis oli 10,2 mg l⁻¹ ühealuselisi fenooli, 9100 mg l⁻¹ naftasaadusi (C10-C40 alkaanid) ja 883 mg l⁻¹ polüaromaatilisi süsivesinikke ning Kohtla jõe setteproovis oli 1,22 mg l⁻¹ ühealuselisi fenooli, 37000 mg l⁻¹ naftasaadusi (C10-C40) ja 883 mg l⁻¹ polüaromaatilisi süsivesinikke (Tamm, 2008). Tänapäeval on tööstustest loodusesse juhitavatele puhastatud heitvetele kehtestatud järgmised reostusnäitajate piirväärtused: ühealuselised fenoolid 0,1 mg l⁻¹, kahealuselised fenoolid 15 mg l⁻¹, naftasaadused 1 mg l⁻¹, pH 6-9 (Reovee puhastamise ning heit- ja sademevee suublasse juhtimise kohta esitatavad nõuded, heit- ja sademevee reostusnäitajate piirmäärad ning nende nõuete täitmise kontrollimise meetmed, 2017). Kuid kuna varasemal ajal loodushoiust ei hoolitud, on Purtse ja Kohtla jõed jätkuvalt väga reostunud. 2018. aastal alustati nende veekogude puhastamist, reostunud pinnas ja setted kaevati jõepõhjast välja ja transporditi Kohtla-Järve VKG põlevkiviõlitootmise jääkide prügimäele (Kundla, 2023).



Joonis 4. Kohtla-Järve poolkoksिमägi 2025. aastal (Foto: Signe Viggor).

Tamm (2007) näitas oma uurimuses, et Viru Keemia Grupp AS Kohtla-Järvel asuvad põlevkivi poolkoksिमägede ümbruses on pinna ja põhjavesi saastunud ühealusteliste fenoolide, naftasaaduste ja lenduvate orgaaniliste ühenditega, milleks olid benseen, toluen, ksüleen ja etüülbenseen. Pinnavette jõudis reostus peamiselt poolkoksिमägi ümbritsevate kraavide kaudu, kuna need suubusid Kohtla jõkke (Tamm, 2007). Tänapäeval suunatakse poolkoksिमäelt ja tööstusaladelt tulev vesi esmalt ühtlustusmahutisse ja olenevalt reostusastmest edasi, kas Kohtla-Järve reoveepuhastisse või loodusesse (Ideon ja Butsenko, 2010).



Joonis 5. Auvere tuhamägi ja leelisljäv (Foto: Signe Viggor).

Kuigi enamuse tänani kehvast saastusest pärineb vanalt poolkoksिमäelt, siis on kindlaks tehtud, et ka praegusel ajal satub Viru Keemia Grupp AS tootmisterritooriumilt põlevkiviõlisaaduseid pinnavette. 2007. aastal kehtiva keskkonnaministri määruse nr 12 tööstustsooni piirarvude kohaselt oli tootmisterritooriumilt tuleva kraavi põhjaproovis üle piirväärtuse baarium, naftasaadused ja mõned polütsükliised aromaatsed süsivesinikud nagu naftaleen (Tamm,

2007). Oma aruandes spekulatsioon Tamm (2007), et senini kestva reostuse põhjuseks võivad olla vanad torustikud, tööstusala pinnasaastus ja varasemalt reostunud kraavide põhjasetted. Saastunud on ka Ida-Virumaa pealmine põhjaveekiht, seal on üle piirnormide ülealuselised fenoolid, nahtasaadused ja sulfaadid (Tamm, 2007; Energiatalgud, 2021).

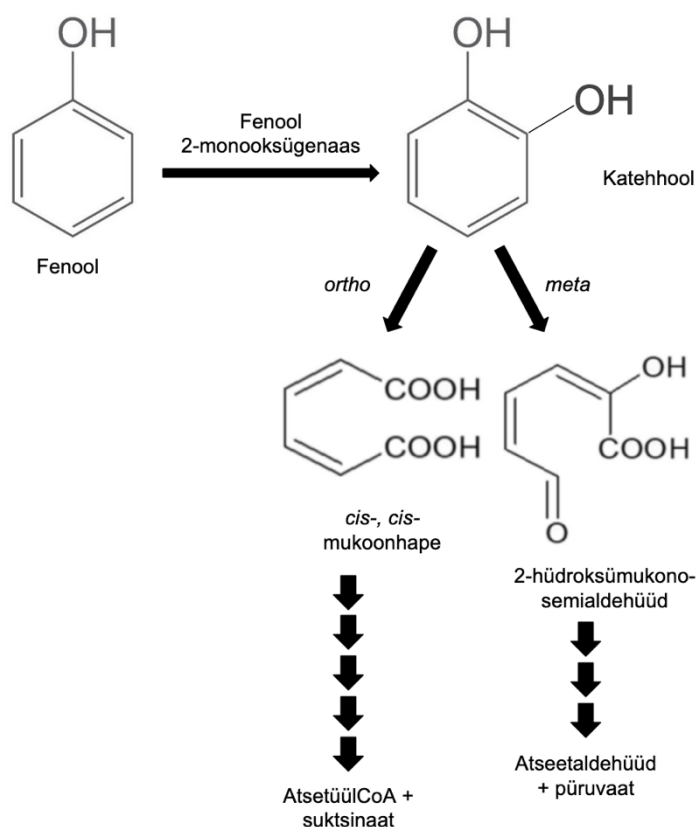
1.1.4. Põlevkiviõli koostis

Kukersiidist valmistatud õli tihedus 20 °C juures on 968 kg m⁻³ ja molekulmass 276 g mol⁻¹. Elementide osakaal: C 81,8%; H 10,1%; S 0,9%; N 7,2%; O 7,2%. Süsivesinike osakaalud: 12% on alkeenid, 25% alkaanid ja tsükloalkanid, 26% aromaatsed süsivesinikud ja 16% fenoolid. (Yefimov *et al.*, 1995)

1.1.5 Fenoolsed ühendid

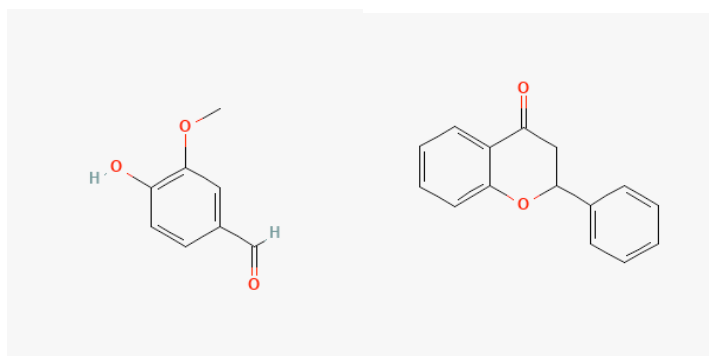
“Fenoolid on ühendid, millel on benseeni või benseenilaadse tuuma küljes hüdroksüülrühm” (Joonis 6). Fenooli hüdroksüülrühm võimaldab molekulil moodustada vesiniksidemeid ning seetõttu lahustuvad fenoolid vees võrdlemisi hästi. (Carey ja Giuliano, 2014)

19. sajandi alguses eraldati fenool esmakordselt söetõrvast. 1895. aastal võeti fenool kasutusele antiseptikuna. Tänapäeval toodetakse fenoolist ravimeid, näiteks aspiriini, värve, vaike, liime ja plaste. (Carey ja Giuliano, 2014)



Joonis 6. Fenooli lagundamine (Dagley, 1971; Harwood ja Parales, 1996; Olajire ja Essien, 2014)

Taimedes leidub erinevaid fenoole, näiteks vanillikaunas vanilliin (Joonis 7) ja tüümianis tümool. On ka olemas antioksüdatiivse mõjuga fenoole – taimede tritsüklilised fenoolid ehk flavonoidid (Joonis 7). (Carey ja Giuliano, 2014)



Joonis 7. Vanilliini (PubChem, n.d.) ja flavanooni (PubChem, n.d.) struktuurivalemid.

Ka teisi fenoolseid ühendeid esineb looduses väikeses koguses, näiteks eraldub neid tammelehtede lagunemisel. Sellises koguses looduslikud fenoolid pigem ei mõjuta vee elustikku negatiivselt (McConnell ja Adams 1973). Küll on, aga täheldatud, et suurema koguse

puuprahi sattumisel vette, näiteks üleujutuse puhul, võivad veeloomade järglased surra vette sattunud fenoolide rohkuse tõttu. Seda tõestasid oma katsetes Buchanan ja teised (1976). Nemat näitasid, et Sitka kuuse *Picea stichensis* ja läänetsuuga *Tsuga heterophylla* koorest eraldatud ekstraktid mõjuvad surmavalt lõhele *Oncorhynchus gorbuscha*. Kuigi nende katsete raames ei olnud kindlaks tehtud, mis aine täpsemalt lõhedele surmavalt mõjus, siis spekulēriti, et nendeks olid tanniinid (Buchanan *et al.*, 1976). Tanniinid on polüfenoolid. Artiklis ei olnud ka mainitud kui palju looduslikult neid veekogudes leidub, aga oli välja toodud, et puukoorest erituv ekstrakti oht on eelkõige palkide transportimiseks või hoiustamiseks kasutatavatel seisvatel veekogudel (Buchanan *et al.*, 1976).

Patrick *et al.* (1968) näitasid oma uurimuses, et fenool on ohtlik kaladele. Mitrovic *et al.* (1968) katsed vikerforellidega näitasid, et kõige kiiremini ja ulatuslikumalt kahjustuvad forellide lõpused.

Fenool on mürgine, nahale sattudes põhjustab põletust ning suurema koguse korral kahjustub maks. Näiteks sattus 43,5% fenooli lahust inimese jalgadele (umbes 250 cm² ala). Vaatamata sellele, et kohe hakati jalgu puhastama vee ja etanooliga ilmned patsiendil šoki sümptomid. Kemikaaliga kokku puutunud alal olid põletushaavad, hiljem tuvastati haigel ka maksakahjustus (Evans, 1952).

1.1.7. Fenooli lagundamine

Fenoolsete ühendite aeroobne bakteriaalne lagundamine jaguneb kaheks etapiks: esimeses etapis lisab monooksügenaas aromaatile tuumale ühe hüdroksüülrühma ning tekib katehhool; teises etapis lõikab katehhooli 1,2- või 2,3-dioksügenaas katki benseeni tuuma hüdroksüülrühmade vahelt või kõrvalt (Joonis 6). Tuuma lõikekoha järgi jaguneb fenooli lagundamise rada omakorda kaheks: katehhooli *ortho* ja *meta* rada. (Dagley, 1971; Harwood ja Parales, 1996)

Fenoolide lagundamise esimest etappi läbiviivaid ensüüme kutsutakse fenooli 2-monooksügenaasideks ehk fenoolihüdroksülaasideks. Fenooli hüdroksülaasid jagunevad subühikute hulga järgi kaheks: mono- ja multikomponendilised fenooli hüdroksülaasid. (Chenprakhon *et al.*, 2020)

Multikomponendilise fenooli hüdroksülaasi (mPH) puhul on ensüümi toimimise jaoks vajalikud komponendid kahe raud(II)iooniga aktiivtsenter, reguleeriv komponent, mis ühendab elektronide transpordi ja substraadi aktivatsiooni, ning reduktaas, mis transpordib

elektrone NADH-It aktiivtsentris asuvale raud(II)ioonile (Divari *et al.*, 2003; Sazinsky ja Lippard, 2006). Üks esimesi mPH, mis avastati oli *Pseudomonas* sp. CF600 dmp operon (Powlowski ja Shingler, 1994).

Monokomponendiline fenooli hüdroksülaasi puhul viib kogu reaktsiooni läbi ühe geeni poolt kodeeritav ensüüm, selline on näiteks pheA geeni poolt kodeeritav fenooli hüdroksülaas (Nurk *et al.*, 1991). Fenooli lagundamise esmaseks vaheproduktiks on katehhool, mille aromaadne tuum lõigatakse katki ning seda viivad läbi ortho raja puhul katehhooli 1,2-dioksügenaas ja meta raja puhul katehhooli 2,3-dioksügenaas (Hardwood ja Parales, 1996). Tekkinud metaboliidid konverteeritakse üle eri metabolismiradade TCA tsükli vaheühenditeks (Hardwood ja Parales, 1996; Powlowski ja Shingler, 1994).

1.2 Bioremediatsioon

Bioremediatsioon on bioloogiliste protsesside kasutus, mille eesmärk on puhastada saastunud maad või vett (Gillespie ja Philp, 2013; Sharma, 2021). Seda on vaja kuna inimtegevuse tagajärjel saastub rohkem keskkonda kui ära puhastatakse (Gillespie ja Philp, 2013). Bioremediatsiooni strateegiad jagatakse suures osas kaheks: *in situ* ja *ex situ* (Gillespie ja Philp, 2013).

Ex situ strateegia jaguneb omakorda kaheks: tahke- ja vedelfaasi bioremediatsioon. Mõlemat kasutatakse pigem pinnase puhastamiseks. Tahkefaasi bioremediatsioon on näiteks kompostimine. Vedelfaasi bioremediatsiooni mõte on kiirendada juba pinnases olevaid mikroorganismide elutegevust. Kiirendamiseks segatakse reostunud pinnas bioreaktoris kokku vee, toitainete ja hapnikuga, lõpuks tuleb pinnas vedelikust uuesti eemaldada ning vedelik puhastada. (Sharma, 2021)

In situ bioremediatsioon jaguneb ka mitmeteks alamstrateegiateks, näiteks biostimulatsioon, fütoremediatsioon ja bioaugmentatsioon. Biostimulatsiooni eesmärk on stimuleerida olemasolevaid organisme keskkonna muutmisega, näiteks lisatakse puudu olevaid toitaineid (Omokhagbor Adams *et al.*, 2020). Bioaugmentatsiooni puhul viiakse reostuskohta mikroorganisme, kes lagundaksid ohtlikke ühendeid (Omokhagbor Adams *et al.*, 2020). Tihti kasutatakse bioaugmentatsiooni korral *Pseudomonas* spp., kuna neil on palju erinevaid metaboolseid radu (Ramírez-García *et al.*, 2019). Bioaugmentatsiooni kasutati ka Eestis 1989. aastal, kui peale Estonia kaevanduse põlengut lisati fenooli sisaldavasse kustutusvette fenooli ja m-toluaati lagundavad *P. putida* tüved (Peters *et al.*, 1997). Fütoremediatsioon kasutab taimi

reostuse leevendamiseks või kõrvaldamiseks (Kafle *et al.*, 2022). Eestis tehti katseid poolkoksimägede fenoolide ja põlevkiviõli alifaatsete ja aromaatsete ühendite leevendamiseks. Selle jaoks istutati taimi koos ja ilma fenoolide lagundavate bakteriteta poolkoksimägedele ning tulemused näitasid, et saasteainete kontsentratsioonid vähenesid kiiremini bioaugmentatsiooni ja fütoremediatsiooni kooskasutamisel (Juhanson *et al.*, 2007).

1.3. Estonia kaevanduse põleng

Estonia põlevkivikaevandust ehitati 8 aastat ning see hakkas põlevkivi tootma 1973. aastal (Mikson *et al.*, 2008). Kaevandust oli vaja, et tagada piisav hulk põlevkivi Balti ja Eesti soojuselektrijaamadele (Kattai, 2003). 2003. aastal oli Estonia kaevanduse kogutoodang 128 088 000 tonni (Kattai, 2003).

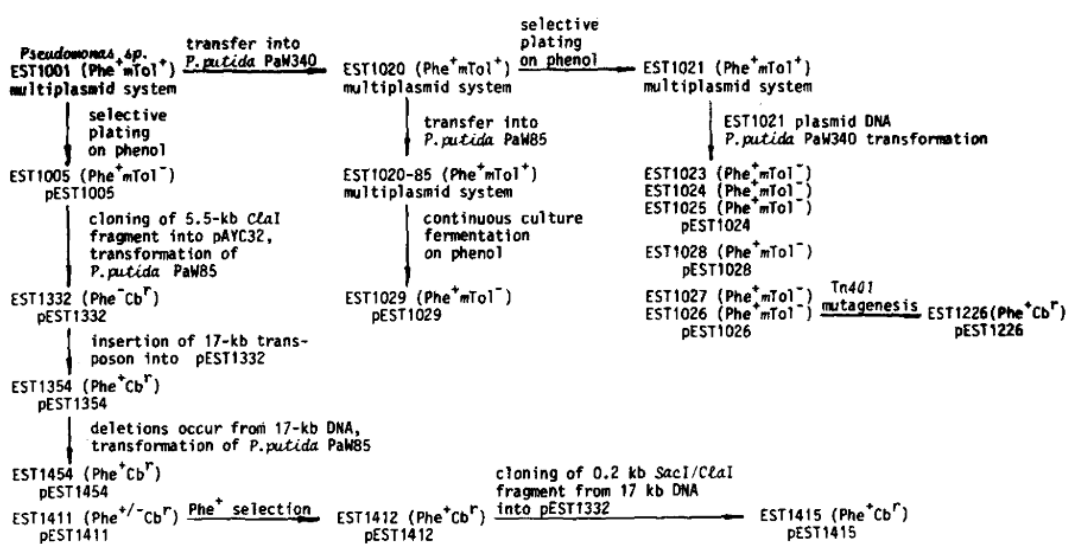
1988. aasta 3. novembril puhkes tulekahju Estonia kaevanduses neljandas paneelistrekis umbes 60 m sügavusel (Mikson *et al.*, 2008; Parahhonski, 1991). Tulekahjut kustutama asunud mäepäästeüksus tugines esmalt kivisöökaevanduse põlengu protokollile, mille kohaselt lasti põlengualale vett, kustutuspulbrit ja -vahtu, kuid tulutult. Lõpuks kustutati tulekahju kustutusmeetodiga, mis arvestas põlevkivi halva märgumisega ja põlemisel tekkiva termobituumeniga. Selle jaoks kasutati inertgaasi ja veeauru segu. Põlenguala uuesti süttimise ärahoidmiseks piirati see betoonseintega ja lasti vett täis. (Parahhonski, 1991)

Kaevandusse pumbatud vesi saastus fenoolidega (Kokk, 1988A; Mikson *et al.*, 2008). Tartu Ülikoolilt oli tellitud juba varem aruanne põlevkivikaevanduse mõjust keskkonnale (Heinaru *et al.*, 1991). Aruande raames kogutud proovide analüüsidesid oli selgelt eristatav põlenguaegne lipolüütiliste mikroobide arvukuse kasv (Heinaru *et al.*, 1991), seda seostati põlevkiviõli ja fenoolide kontsentratsiooni suurenemisega kaevandusest välja pumbatud vees (Parahhonski, 1991).

Miks põleng Estonia kaevanduses algas, ei teata tänini (Gamzejev, 2008). 1989. aastal koostatud ekspertide komisjon suutis kindlaks teha ainult nii palju, et tulekahju algas suure koguse tuleohtliku vedeliku süttimisest (Kokk, 1988B; Parahhonski, 1991). Tulekahju süttimise uurimiseks algatati isegi kriminaalasi, aga ei suudetud kindlaks teha, miks vedelik kaevanduses oli ja kuidas see süttis (Kokk, 1989).

1.3.1. Fenooli sisaldava kustusvee puhastamine

P. A. Williamsi isoleeris 1976. aastal Rootsi põllumullast *Pseudomonas sp.* tüve S13 (Williams ja Worsey 1976, viidatud Kivisaar *et al.*, 1989 kaudu), mis kasvas m-ksüleeni, m-toluuaati, fenooli või salitsülaati sisaldaval minimaalsöötmel ehk tüvi S13 oli võimeline kasutama aromaatsaid süsivesinike ainsa süsiniku- ja energiaallikana. Kivisaar ja teised (1989) tegid kindlaks, et aromaatsete süsivesinike lagundamine on tagatud erinevatel metaboolsetel plasmiididel paiknevate kataboolsete geenidega. Fenooli lagundamise eest vastutasid *pheA* ja *pheB* geenid, mis kodeerivad vastavalt monokomponentset fenooli hüdroksülaasi ja katehooli 1,2-dioksügenaasi (Kivisaar *et al.*, 1990). Kui *Pseudomonas sp.* tüve S13 kasvatati m-toluuaati sisaldaval minimaalsöötmel, siis tekkis spontaanselt *Pseudomonas sp.* tüvi EST1001, mis ei kasvanud enam m-ksüleeni. EST1001 tüve fenooli ja m-toluuaadi lagundamise eest vastutavad plasmiidid viidi transkonjugatsiooni abil üle *P. putida* PaW340 laboritüvesse ning saadi *P. putida* tüvi EST1020. (Kivisaar *et al.*, 1989) Saadud tüve ja *P. putida* PaW85 transkonjugatsioonil saadi *P. putida* EST1020-85 (Joonis 8), mis Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi direktori Maia Kivisaare, kes tol ajal tegeles *Pseudomonas sp.* EST1001 tüvega, arvates oli saadud tüvi just see, mida kasutati Estonia kaevanduse põlengul tekkinud fenoolirikka vee puhastamiseks. Laboripäevikuid tollest ajast ei ole kahjuks säilinud, ilmunud artiklites on nimetatud tüve EST9101 (Parakhonsky, 1995) ja hiljem lisaks ka EST9102 (Peters *et al.*, 1995) või märgitakse, et kasutati kahte tüve (Peters *et al.*, 1997), siis ei ole võimalik enam tuvastada milliseid tüvesid täpselt kasutati.



Joonis 8. *Pseudomonas putida* tüvest EST1001 konstrueeritud tüved ja plasmiidid (Kivisaar *et al.*, 1990).

1991. aastal valminud aruande “Põlevkivikaevanduste heitvete mõju Kirde-Eesti veekogudele” (Heinaru *et al.*, 1991) põhjal kasutati Estonia kaevanduse fenooli sisaldava kustutusvee puhastamiseks *Pseudomonas putida* EST9101m bakteritüve, mis oli võimeline efektiivselt lagundama fenooli ja ei olnud imetajatele ega taimedele patogeenne. Pilootkatses lisati 200 liitrit *P. putida* EST9101m biomassi Estonia kaevanduse rikastusvabriku rõngasbasseini pumbatud 1500 tonnile kustutusveele. Viie päevaga vähenes lenduvate fenoolide sisaldus neli korda. Puhastatud vesi pumbati settebasseini ja kui kaevandus oli piisavalt jahtunud, sisestati maa alusele kustutatud põlengualale 400 liitrit biomassi. Mõlemal juhul nähti lenduvate fenoolide kontsentratsiooni langust, mille järgi eeldati, et katse oli edukas. (Heinaru *et al.*, 1991)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

1989. aastal viidi Estonia kaevanduse kustutusvette *P. putida* Paw85 tüved, mille plasmiidis paiknes fenooli lagundamise *pheBA* operon. 2023. aastal toodi Ida-Virumaa põlevkivitööstusega seotud aladelt proovid ning sooviti kindlaks teha, kas looduses on säilinud veel *pheBA* operon ja milline on aromaatsaid ühendeid lagundavate mikroobide mitmekesisus antud proovipunktides. Selleks uuriti proovivõtupunktidest isoleeritud tüvede fenooli kasutamise võimekust kasutades markeritena multikomponentset fenooli hüdroksülaasi ja monokomponentset fenooli hüdroksülaasi kodeerivaid geene. Sellest tulenevalt on käesoleva uurimistö eesmärgid järgmised:

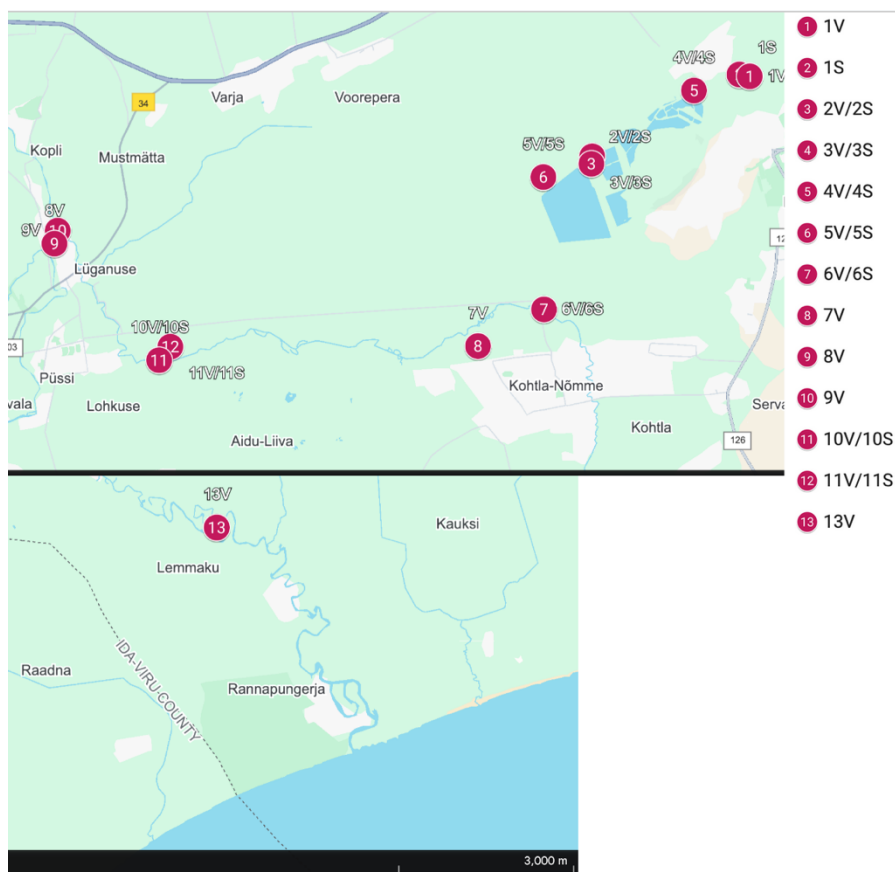
- Saada ülevaade Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonnas elavate fenooli oma ainsa süsiniku- ja energiaallikana kasutatavatest bakteritest ja nende multikomponentse fenooli hüdroksülaasi suure subühiku mitmekesisusest
- Selgitada välja, kas *pheA* geeni esineb veel Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonnas

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1 Keskkonnaproovide võtmine ja tüvede isoleerimine

Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonnast võeti 2023. aastal vee- ja sedimendiproovid (Joonis 9). Proove lahjendati füsioloogilise lahusega (0,9% NaCl) ning tehti väljakülvid 2,5 mM fenooli (100 %, Sigma-Aldrich) sisaldavale minimaalsöötmele (1xM9 (10xM9: 70 g l⁻¹ Na₂HPO₄, 30 g l⁻¹ KH₂PO₄, 5 g l⁻¹ NaCl, 10 g l⁻¹ NH₄Cl, pH 6,8; Adams, 1959), 1x mikroelementide segu ME (400xME: 10,75 g l⁻¹ MgO, 2 g l⁻¹ CaCO₃, 51,3 ml l⁻¹ HCl, 4,5 g l⁻¹ FeSO₄ * 7H₂O, 1,44 g l⁻¹ ZnSO₄ * 7H₂O, 1,12 g l⁻¹ MgSO₄ * 4H₂O, 0,25 g l⁻¹ CuSO₄ * 5H₂O, 0,28 g l⁻¹ CoSO₄ * H₂O, 0,06 g l⁻¹ H₃BO₃; Bauchop ja Elsdon, 1960); 1,5% agar), millele oli lisatud eukarüootide kasvu pärssimiseks tsükloheksimiidi (lõppkontsentratsioon 50 µg ml⁻¹; Acrosorganics, 95%). Lisaks tehti rikastuskatse, kus 250 ml Erlenmeyeri kolbidesse pandi 45 ml 2,5 mM fenooli minimaalsöödet ning 5 g sedimenti või veeproovide korral 50 ml proovi ning lisati fenool ja M9. Kolvid asetati üheks nädalaks loksutile (100 pöret/min) (Infors HT Multitron) 25 °C juurde. Seitsme päeva möödumisel tehti rikastuskultuuridest lahjendused ning külvid fenooli sisaldavatele minimaalsöötmetele. Lisaks jätkati sedimendiproovidega rikastuskatset - 45 ml 2,5 mM söötmele lisati 5 ml esimesest rikastusest. Nädala möödudes tehti uuesti proovidest

vajakülvid fenooli minimaalsöötmetle. Söötmeplaatidel väljakasvanud erineva morfoloogiaga kolooniatest tehti lahjenduskülvid R2A söötmele (0,5 g l⁻¹ pärmiekstrakt, 0,5 g l⁻¹ pepton, 0,5 g l⁻¹ CAA, 0,5 g l⁻¹ glükoos, 0,5 g l⁻¹ lahustuv tärklis, 0,3 g l⁻¹ Na-püruvaat, 0,3 g l⁻¹ K₂HPO₄, 0,05 g l⁻¹ MgSO₄, 15 g l⁻¹ agar; BD) puhaskultuuride saamiseks. Töö käigus eraldatud tüved säilitatakse CELMS kollektsioonis (https://eemb.ut.ee/celms/main_list.php).



Joonis 9. Proovivõtukohad

2.2.2 Fluorestseeruvate siderofooride tootmise kontroll

Perekonda *Pseudomonas* kuuluvate tüvede identifitseerimisel on oluline tunnus võime toota siderofoore. Selle tunnuse määramiseks tehti joonkülv kõigist tüvedest KingB (20 g l⁻¹ pepton, 10 g l⁻¹ glütserool, 1,5 g l⁻¹ MgSO₄ * 7H₂O, 1,5 g l⁻¹ KH₂PO₄, 15 g l⁻¹ agar, pH 7,2) (Millipore) söötmeplaatidele ning inkubeeriti toatemperatuuril 24 h. Seejärel vaadeldi tase UV valguslaual (Uvitec Cambridge Uvidoc HD6), kus siderofoore tootvad tüved fluorestseerusid.

2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR jaoks esmalt bakterid külvati uuele R2A söötmeplaadile kasvama 24 tunniks. Siis tehti katsutisse bakterilüsaat 25 µl vee ja pipeti otsikutäie biomassiga. Järgmiseks lüüsi rakke, kuumutades neid 96 °C juures 15 minutit. Rakukestade eraldamiseks tsentrifugeeriti (Eppendorf Centrifuge 5418 R) lüsaate 1 min 13 000 rpm juures.

PCR segu koostis 2,5 mM puhver (75mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄-MgCl₂; 0,01% Tween20), 2,5 mM MgCl₂, 0,8 µM praimerid vastavalt amplifitseeritavale geenile (Tabel 1), 0,2 mM nukleotiide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 U Taq DNA *Polymerase* (Thermo Fisher Scientific) ja 3 µl bakterilüsaat.

Geenifragmendi amplifitseerimiseks, kasutati PCR programmi, mis algas ühekordse DNA denaturatsiooniga 180 s 95 °C, sellele järgnes 35 tsüklit DNA denaturatsioon 45 s 94 °C, praimerite seondumine 45 s (16S rRNA ja pheA puhul üks temperatuur (Tabel 1); *LmPH* puhul 5 tsüklit 58 °C, 5 tsüklit 57 °C ja 25 tsüklit 56 °C; C23O puhul 10 tsüklit järjestikust temperatuuri langemist 60 °C-lt 56°C-le ja 25 tsüklit 56 °C), elongatsioon 90 s 72 °C ja kõige viimaks ühekordne lõplik elongatsioon 480 s 72 °C.

Tabel 1. Töös kasutatud praimerid (R - G või A; Y - C või T; M - A või C; K - G või T; S - C või G; W - A või T; B - C, G või T)

Sihthärg geen	Praimeri nimetus	5' → 3' järjestus	Seondumis- temperatuur (°C)	Produkti pikkus (ap)	Viide
16S rRNA	PCRI	AGAGTTTGATCATGGC TCAG	53	~1500	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
	SEQ1	GTATTACCGCGGCTGC TGG	57	~480	Vedler <i>et al.</i> , 2000
pheA	pheA1	CAGGATCGAATATCGG TGGCCTCG	61	947	Heinaru <i>et al.</i> , 1997
	pheA2	CTTCACGCTGGCGTAA CCAATCGC			
LmPH	pheUf	CCAGGSBGARAARGAG ARGAARCT	58→56	~580	Futamata <i>et al.</i> , 2001

	pheUr	CGGWARCCGCGCCAGA ACCA			
--	-------	--------------------------	--	--	--

2.2.3. Geelelektroforees

Geelelektroforeesi kasutati tuvastamiseks kas PCR-l saadi eeldatud suurusega produktid. Selleks valmistati 1xTAE puhvriga (0,4 M tris atsetaat, 0,01 M EDTA; pH 8,3) 1% agarosgeel, millele lisati DNA visualiseerimiseks etiidiumbromiidi ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich). Geeli esimesse kaevukesse lisati produktide suuruse hindamiseks 3 μl DNA suurusmarkerit (GeneRuler™ 1 kb Plus, Thermo Fisher Scientific). Enne geelile kandmist värviti 6 μl PCR produkti 1 μl laadimispuhvriga (6x MassRuler™ Loading Dye Solution; 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% broomfenoolsinine; 60% glütserool; 60 mM EDTA; (Thermo Fisher Scientific)). Elektroforeesi (100 V, 18 min) (Advance Mupid-exU) järel pildistati geel UV valguslaual.

2.2.4. Geenifragmentide sekveneerimine

Enne sekveneerimist puhastati PCR segu dNTP-st ja praimeritest. Selleks lisati 5 μl PCR segule 1 μl kreveti aluselist fosfataasi (SAP; Thermo Fisher Scientific; lõppkontsentratsiooniga $0,14 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$) ning 1 μl eksonukleaasi (ExoI; Thermo Fisher Scientific; lõppkontsentratsiooniga $0,36 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$). Saadud proov asetati PCR masinasse (Eppendorf Mastercycler personal) ning käivitati järgmine programm: 15 minutit $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (ensüümide töötemperatuur) ja 15 minutit $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (ensüümide inaktiveerimine).

Puhastatud proov sekveneeriti BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-i (Applied Biosystems Inc.) vastavalt tootja protokollile. Sekveneerimisreaktsiooni PCR programm koosnes 35 tsüklist, igas tsükli DNA denaturatsioon 15 s $95 \text{ }^\circ\text{C}$, praimerite seondumine 10 s vastavalt praimerile (16S rRNA ja pheA puhul üks temperatuur (Tabel 1); *LmPH* puhul 5 tsükli $58 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 tsükli $57 \text{ }^\circ\text{C}$ ja 25 tsükli $56 \text{ }^\circ\text{C}$; C23O puhul 10 tsükli järjestikust temperatuuri langemist $60 \text{ }^\circ\text{C}$ -lt $56 \text{ }^\circ\text{C}$ -le ja 25 tsükli $56 \text{ }^\circ\text{C}$), elongatsioon 45 s $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sekveneerimine telliti teenusena ja selle jaoks kasutati Genoomika instituudi tuumiklabori Applied Biosystems täisautomaatset kapillaarsekvenaatorit 3730xl DNA Analyzer.

2.2.5 Järjestuste analüüs

Sekveneerimisel saadud järjestused analüüsiti kasutades BioEdit (versioon 7.7.1) programmi. Geenide vastavust kontrolliti ja otsiti referentstüvesid BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) otsingumootoriga.

Joondamiseks ja puu tegemiseks kasutati MEGA 12 programmi.

2.3. Tulemused ja arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida fenooli hüdroksülaaside mitmekesisust põlevkivitööstuspiirkonna veekogudes elavates bakterites. Fenooli hüdroksülaasid jagunevad vastavalt subühikute arvule kahte gruppi: multi- ja monokomponentsed. Multikomponentsed fenooli hüdroksülaasid koosnevad kuuest subühikust ning on looduses kõige enam esindatud (Peters *et al.*, 1997) Monokomponentseid fenooli hüdroksülaase esineb looduses harvemini. 1989. aastal kasutati Ida-Virumaa põlevkivi tööstuspiirkonnas Estonia kaevanduse põlengu kustutamisel tekkinud fenoolide rikka vee puhastamiseks Eesti alal mitteesinevat monokomponentset fenooli hüdroksülaasi sisaldavat *pheBA* operoni kandvat/kandvaid *Pseudomonas putida* PaW85 tüve/tüvesid (Parakhonsky, 1995; Peters *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1997).

Aastatel 1993-1995 koguti proove Kohtla-Järve poolkoksimägesid ümbritsevatest kraavidest ning Kohtla ja Purtse jõgedest. Nendest proovidest isoleeriti 11 *pheBA* operoni omavat tüve. Nendest 11 tüvest kaheksa oli *P. fluorescens*, kaks *P. putida* ja üks *P. corrugata*. Proovipunkt, kust enim *pheBA* operoniga tüvesid leiti, jääb käesoleva töö punktist 9V (Joonis 8) natuke Lüganuse poole. (Heinaru *et al.*, 2000)

2012. aastal võeti proove Kohtla-Järve poolkoksimägesid ümbritsevatest kraavidest ning Kohtla ja Purtse jõgedest, mis olid pideva põlevkivitööstusest lähtuva reostuse surve all. Keskkonna proovidest eraldatud DNAlt õnnestus *pheA* geenifragment amplifitseerida Püssi alajaama juurest võetud proovist, mis langeb kokku käesoleva töö 10V ja 11V (Joonis 8) proovivõtupunktide asukohaga. (Õispuu, 2013)

Enne käesoleva töö jaoks proovide kogumist püstitati hüpotees, et kui *pheBA* operon on keskkonnas alles, on ta fluorestseeruvaid siderofoore tootvas *Pseudomonas sp.* tüves, mis saab fenooli kasutada ainsa süsiniku- ja energiaallikana.

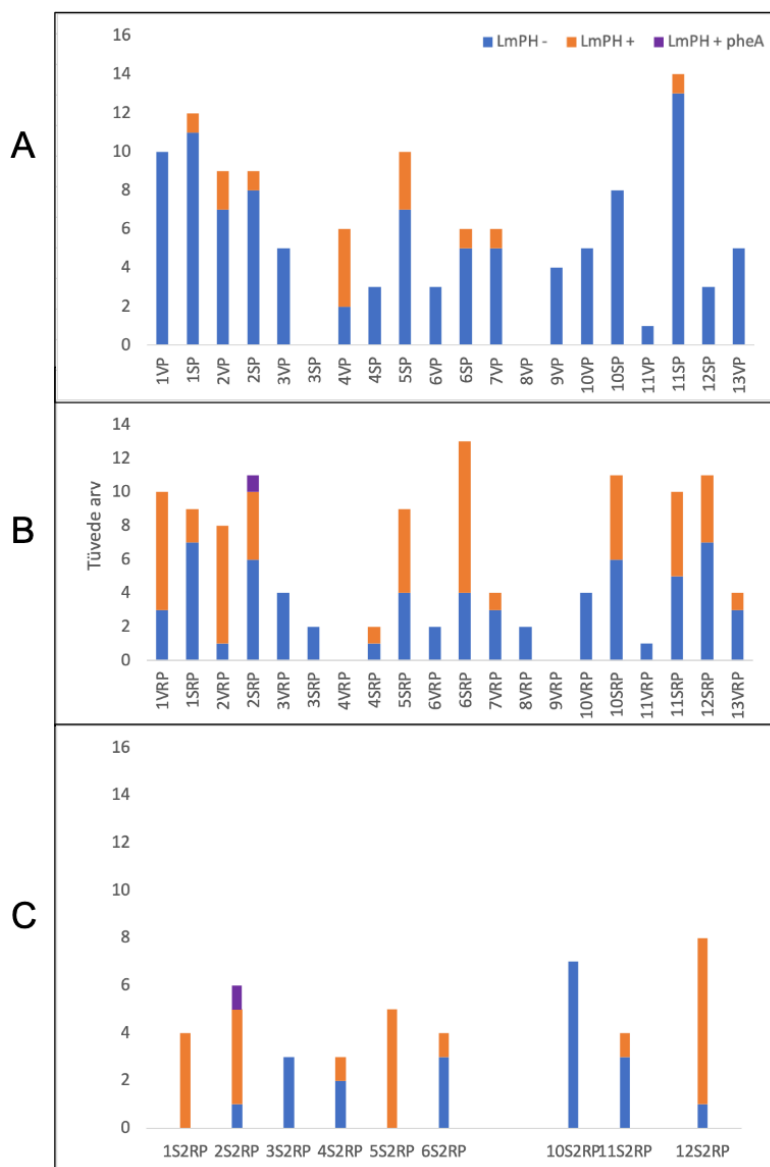
2.3.1. Tüvede isoleerimine

Tüvede isoleerimiseks võeti proovid pideva põlevkivitööstusest tingitud reostuse all olevatest Kohtla-Järve piirkonna veekogudest ja nende sedimentidest (Joonis 9). Veeproovidel mõõdeti ka pH ja hinnati veekvaliteeti visuaalselt ja olfaktoorselt. Eesti voolavates veekogudes peaks pH väärtus jääma vahemikku 6-9 (Reovee puhastamise ning heit- ja sademevee suublasse juhtimise kohta esitatavad nõuded, heit- ja sademevee reostusnäitajate piirmäärad ning nende nõuete täitmise kontrollimise meetmed, 2017). Peaaegu kõikidel käesoleva töö raames kogutud veeproovidel jäi pH vahemikku 7-9 (Lisa 1). Vaid proovipunktis 4V (poolkoksi mäe jalamilt tulev kraav) oli pH väärtus 10,9. Vee visuaalsel ja olfaktoorsel hindamisel ei täheldatud saastumist kusagil peale veeproovivõtupunkti 4V, kus oli vesi oranžikat värvi ja lõhnas aromaatika järele.

Veeprooviidest eraldatud tüvedel on multikomponentse fenooli hüdroksülaasi suure subühikut kodeeriva *LmPH* geeni (edaspidi *LmPH*) esinemine harvem kui sedimentiproovidest eraldatud tüvedel, välja arvatud esimesed kaks proovivõtupunkti, kus veeproovi rikastuskatse (peatükk 2.2.1.) *LmPH* geeniga tüvede sisaldus oli kõrgem sedimentiproovi rikastuskatse külvidest. Proovivõtupunktide 1V ja 1S puhul (puhasti aerotank) on loogiline, et vees leidub rohkem baktereid kuna puhasti aerotangis käib vesi ringi pidevalt ja bakteritel pole võimalust settida. Punkti 2V ja 2S puhul järelduste tegemiseks peaks veeproovidega rohkem katseid tegema ja kirjeldama punkti asukohta, kuna pH 7,95 (Lisa 1) ei indikeeri kõrgemat reostust kui teistes punktides.

Fenooli lagundavate bakteritüvede isoleerimiseks tehti proovidest väljakülvid fenooli minimaalsöötmetele, nii algsetest proovidest kui ka fenooli minimaalsöötmetel teostatud rikastuskultuuridest. Kokku saadi 268 tüve (Joonis 10), neist 77 tootis KingB söötmel UV-valguses fluorestseeruvaid siderofoore. *pheA* ja *LmPH* spetsiifiliste praimerite abil kontrolliti mono- ja multikomponentse fenooli hüdroksülaasi kodeerivate geenide olemasolu isolaatides. Positiivne *LmPH* tulemus saadi 87 tüvel (Joonis 10) ja neist kahel tuvastati lisaks ka *pheA*. Mõlemad *pheA* geeniga tüved saadi punktist 2 (Viru Keemia Grupi uus kanal, poolkoksi prügila läheduses) (Joonis 9) võetud sedimenti proovi rikastuskatsetest– 2SRP2 esimesest rikastusest ja 2S2RP1 teisest rikastusest. Tüvede 2SRP2 ja 2S2RP1 genoomide sekveneerimine teostati koostööpartnerite poolt Massachusettsi Tehnoloogia Instituudis, kust selgus, et mõlemal tüvel on plasmidsed *pheBA* operonid. Operoni pikaajaline säilimine selektiivse surve tingimustes näitab, et seda kandvatele bakteritel on oluline roll fenooli lagundamisel. Kuna fenooli tekib lisaks põlevkivitööstuse ka farmaatsia-, nafta-, paberi- ja puidutööstuses (Ventura *et al.*, 2020)

on oluline teada kuidas fenooli keskkonnast eemaldada saab. Laboratoorseid katseid bioaugmentatsiooni võimalustest on tehtud palju. Kohtla-Järve juhtumiga sarnane on näiteks Pepper ja teiste (2002) läbiviidud katse, kus näidati, et mujalt reostuspiirkonnast eraldatud tüve lisamine keskkonda kiirendab ohtlike ainete lagundamist. Paraku tänapäeval on seaduste tõttu raskendatud bioaugmentatsiooni rakendamine looduses ning seepärast on oluline sügavuti analüüsida Kohtla-Järve ja sellega samalaadseid bioaugmentatsioonikatseid (Chemla *et al.*, 2025).



Joonis 10. Käesolevas töös otsekülvidest (A), esimesest (B) ja teisest (C) rikastuskatses isoleeritud tüvede arvud. Sinisega on tähistatud *LmPH* geenita, oranžiga *LmPH* geeniga ja tüved lillaga *LmPH* ja *pheA* geeniga tüved.

LmPH sisaldavate tüvede osakaal suurenes fenooli minimaalsöötmel teostatud rikastuskatsete käigus: otsekülvidest saadud tüvedest kandsid *LmPH* geeni 12%, esimese rikastuskatses 44% ja teisest rikastuskatses, mis tehti ainult sedimendiproovidele, 53%. Sellest võib järeldada, et siinses töös uuritavat *LmPH* geeni sisaldavad tüved lagundavad fenooli efektiivsemalt kui teised bakterid ehk toimus selektiivne surve. Seda järeldust toetab ka Kafilzadeh ja Mokhtari (2013) läbi viidud uurimus, kus näidati, et perekonda *Pseudomonas* ja *Acinetobacter* kuuluvad fenooli lagundavad tüved on fenooli lagundamises efektiivsemad kui teised fenooli lagundavad bakterid. Järeldust saab kinnitada kontrollides kõigi selle töö raames isoleeritud tüvede fenooli lagundamise efektiivsust.

Saadud perekondade määramiseks analüüsiti nende 16S rRNA geeni järjestusi.

2.3.2. Tüvede 16S rRNA geenijärjestuste analüüs

Selles töös kasutati tüvede perekonna määramiseks universaalset 16S rRNA geenijärjestuste analüüsi, sest 16S rRNA geen esineb kõikides bakteritüvedes.

16S rRNA geen sekveneeriti 80-l 85-st analüüsitud *LmPH* geeni sisaldavatest tüvedest. Viiel tüvel ei sekveneeritud 16S rRNA geeni järjestust, kuna töögrupis teostatud morfoloogiliste ja keemiliste katsete tulemusena oldi kindlad, et tegemist on samade tüvedega. Kasutades BLAST otsingumootorit leiti isolaatide 16S rRNA geeni nukleotiidsetele järjestustele suurima identsusprotsendiga referentstüved GenBank andmebaasist (Lisa 2).

BLAST tulemuste analüüsist selgus, et kõik analüüsitud tüved kuulusid hõimkonda *Pseudomonadota*. 80-st tüvest 79 kuulusid *Gammaproteobacteria* klassi, nendest 66 tüve kuulusid perekonda *Pseudomonas* ning koondusid fülogeneetilise puu peal esimesse klastrisse (I) (Joonis 11.1 ja 11.2). Ülejäänud 13 *Gammaproteobacteria* klassi tüve kuulusid perekonda *Acinetobacter* ning koondusid puu peal teise klastrisse (II). Üks tüvi kuulus klassi *Betaproteobacteria* perekonda *Alcaligenes* ja moodustas kolmanda klatri (III).

Varasemalt Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonnas läbi viidud uuringus domineerisid isoleeritud tüvedest perekonna *Pseudomonas* esindajad (Heinaru *et al.*, 2000), seetõttu oli perekonna *Pseudomonas* ülekaal oodatav. *Pseudomonas spp.* omavad tööstuspiirkondade saastatud keskkondades olulist rolli oma võimega lagundada aromaatilisi süsivesinikke (Yu *et al.*, 2001).

Samuti oli perekonna *Acinetobacter* esinemine keskkonnas oodatav, kuna Heinaru ja teised (2000) identifitseerisid oma töös 39-st tüvest ühe *Acinetobacter* perekonna esindaja. Siinse töö

raames identifitseeriti 16S rRNA järgi 80-st tüvest 13 *Acinetobacter* perekonna esindajat. Selle perekonna esindajaid, kes omavad mPH, on leitud ka väljaspool Eestit fenooli sisaldavas keskkonnas (Paller *et al.*, 1995; Sabri *et al.*, 2025; Divari *et al.*, 2003).

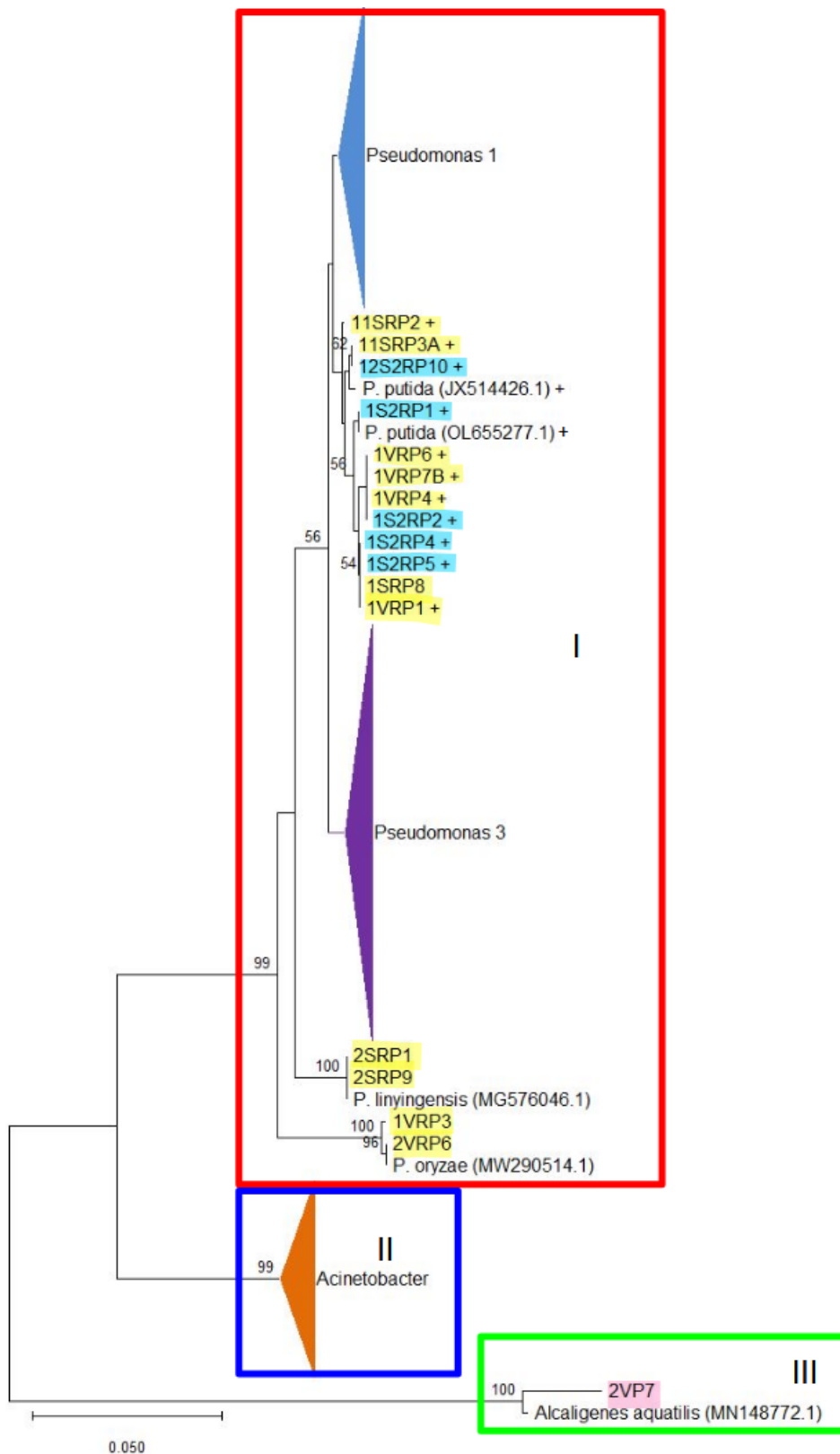
Saastumata keskkonna sedimendi- ja veeproovidest on eraldatud perekondade *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcu*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Escherichia* ja *Bacillus* esindajaid (Ulfat *et al.*, 2024). Kõigis neis perekondades ei leitud fenooli lagundada suutvaid tüvesid. Fenooli sisaldavast keskkonnast on varasemalt isoleeritud fenooli minimaalsöötme tüvesid perekondadest *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus* (Kafilzadeh ja Mokhtari, 2013; Shebl *et al.*, 2024) ja *Alcaligenes* (Manafi *et al.*, 2011).

Käesolevas töös ei kirjeldata tüvedesid, milles *LmPH* ei detekteeritud, kuid töögrupis analüüsiti ka nende 16S rRNA geenijärjestusi. Analüüsist selgus, et tüved kuulusid perekondadesse *Serratia*, *Raoultella* ja *Klebsiella* (selts *Enterobacterales*), *Stenotrophomonas* (klass *Lysobacterales*), *Comamonas* (klass *Betaproteobacteria*), *Chryseobacterium* (hõimkond *Bacteroidota*), *Pseudarthrobacter*, *Microbacterium*, *Acinomycetota* ja *Rhodococcus* (riik *Baccillati*). Neid tüvesid oleks huvitav edasi uurida, et selgitada nende rolli fenooli lagundavas koosluses.

Fülogeneetilist puud uurides (Joonis 11.1 ja 11.2) on näha puu harudel otsekülvide ja eri rikastuskatsetest tehtud tüvede koondumist. Sellest võib järeldada, et proovide rikastamisel muutub seal eri tüvede elujõulisus. Otsekülvidest isoleeritud tüvedel esineb *LmPH* geeni harvem, kuid rikastuskatsetes saadud tüvedel sagedamini, mis näitab, et *LmPH*-ga tüved on elujõulised fenooli lagundamisel. Sellest võib omakorda järeldada, et väiksema fenoolisisaldusega keskkonnas on teistel tüvedel mingi eelis ja oleks huvitav edasi uurida, kas selleks eeliseks on uuritava *LmPH* geeni puudumine. Siis peaks välja selgitama kuidas uuritavat *LmPH* geeni mitte omavad tüved lagundavad fenooli ning mis keskkonna tingimused nende fenooli lagundamist mõjutavad. Nendest teadmistest tulenevalt saaks valida fenooli sisaldava keskkonna bioaugmentatsiooni jaoks teisi tüvesid.

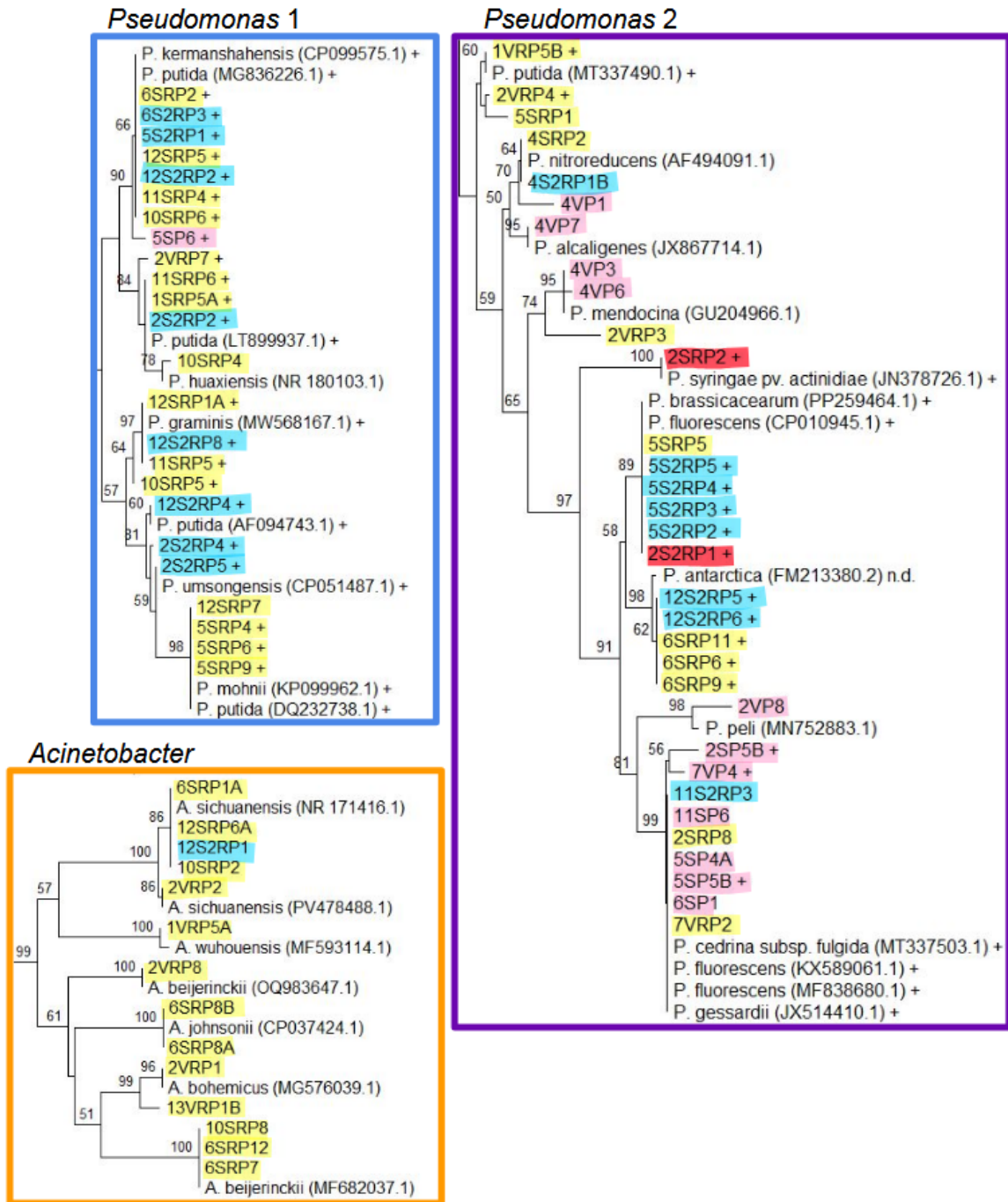
Käesolevas töös 16S rRNA geenijärjestuse analüüsi põhjal on selles töös *LmPH* geeni sisaldavate bakterite hulgas suures ülekaalus klassi *Gammaproteobacteria* esindajad ning nendest enim perekonna *Pseudomonas* esindajad (Joonis 11.1 ja 11.2).

Bakterite paremaks iseloomustamiseks uuriti ka nende mPH suure subühiku geeni.



Joonis 11.1. 16S rRNA geenijärjestusel põhinev naabrite ühendamise meetodiga arvatud juurimata fülogeneetiline puu 121 taksoniga. Bootstrapi väärtused on 1000 kordused ja nende väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,05 asenduse ühe aluspaari kohta. Sulgudes toodud GenBank ID. Fluorestseeruvate siderofooride tootvatele tüvedele märgitud

“+”, mitte tootvatele tüvedele ei ole midagi märgitud ja informatsiooni puudumisel “n.d.”. Roosaga märgitud otsekülvist, kollasega märgitud rikastuskülvist ja sinisega märgitud kahekordsest rikastuskülvist saadud tüved. I– *Pseudomonas* perekond, II– *Acinetobacter* perekond, III– *Alcaligenes* perekond.



Joonis 11.2. 16S rRNA fülogeneetilise puu harupuud. Bootstrapi väärtused on 1000 kordused ja nende väärtused on märgitud alates 50%. Sulgudes toodud GenBank ID. Fluorestseeruvate siderofooride tootvatele tüvedele märgitud “+”, mitte tootvatele tüvedele ei ole midagi märgitud ja informatsiooni puudumisel “n.d.”. Roosaga märgitud otsekülvist, kollasega märgitud rikastuskülvist ja sinisega märgitud teisest rikastuskülvist saadud tüved ning punasega näidatud *pheBA* operoniga tüved.

2.3.3. *mPH* geenide analüüs

Fenooli süsiniku- ja energiaallikana kasutamiseks on vaja bakteritel vastavaid kataboolseid ensüüme. Üks nendest ensüümidest on multikomponentne fenooli hüdroksülaas. *mPH* koosneb kuuest subühikust ja üheks subühikuks on *LmPH*, mida ka selles töös analüüsiti. Siinses töös kasutati *LmPH* geeni tuvastamiseks praimereid *pheUf/pheUr*, kuid paraku seonduvad need praimerid vaid klassi *Betaproteobacteria* ja *Gammaproteobacteria* kuuluvate tüvede *LmPH* geenile (Futamata *et al.*, 2001).

Kokku sekveneeriti 87 tüvel *LmPH* geen. 70 tüve sekveneeritud *LmPH* pärineb perekonna *Pseudomonas* esindajatelt, 14 tüvel *Acinetobacter* esindajatelt, ühel tüvel *Alcaligenes* perekonna esindajalt ning kahe tüve puhul (1VRP3, 2SRP9) ei ole kindel (Joonis 12.1 ja 12.2). *LmPH* geeni järgi kuulub perekonda *Acinetobacter* üks tüvi rohkem kui 16S rRNA geeni järgi. Selle põhjuseks võib olla *Acinetobacter* ja *Pseudomonas* perekonna *LmPH* valgujärjestuse sarnasus.

LmPH ennustatavate aminohappeliste järjestuste fülogeneetilisel puul saab eristada nelja klastrit (Joonis 12.1). Esimesse klastrisse (I) on koondunud enamus perekonna *Pseudomonas* esindajaid. Teise klastrisse (II) on koondunud enamus (12-14-st) *Acinetobacter* perekonna esindajaid ja üks *Alcaligenes* perekonna esindaja. Kolmandasse klastrisse (III) on koondunud ülejäänud kaks *Acinetobacter* perekonna esindajat ning neljandasse klastrisse (IV) on koondunud ülejäänud neli perekonna *Pseudomonas* esindajat.

Anomaalne on IV klatri paiknemine fülogeneetilisel puul – referentstüve järgi pärinevad need perekonnast *Pseudomonas*, aga fülogeneetilise puul jäävad nad teistest *Pseudomonas* perekonna esindajatest kaugemale. Seda võiks lähemalt uurida, esmalt määrares nende liigi mikrobioloogiliste meetoditega ja seejärel sekveneerides nende *LmPH* geeni uuesti ja seekord täies pikkuses.

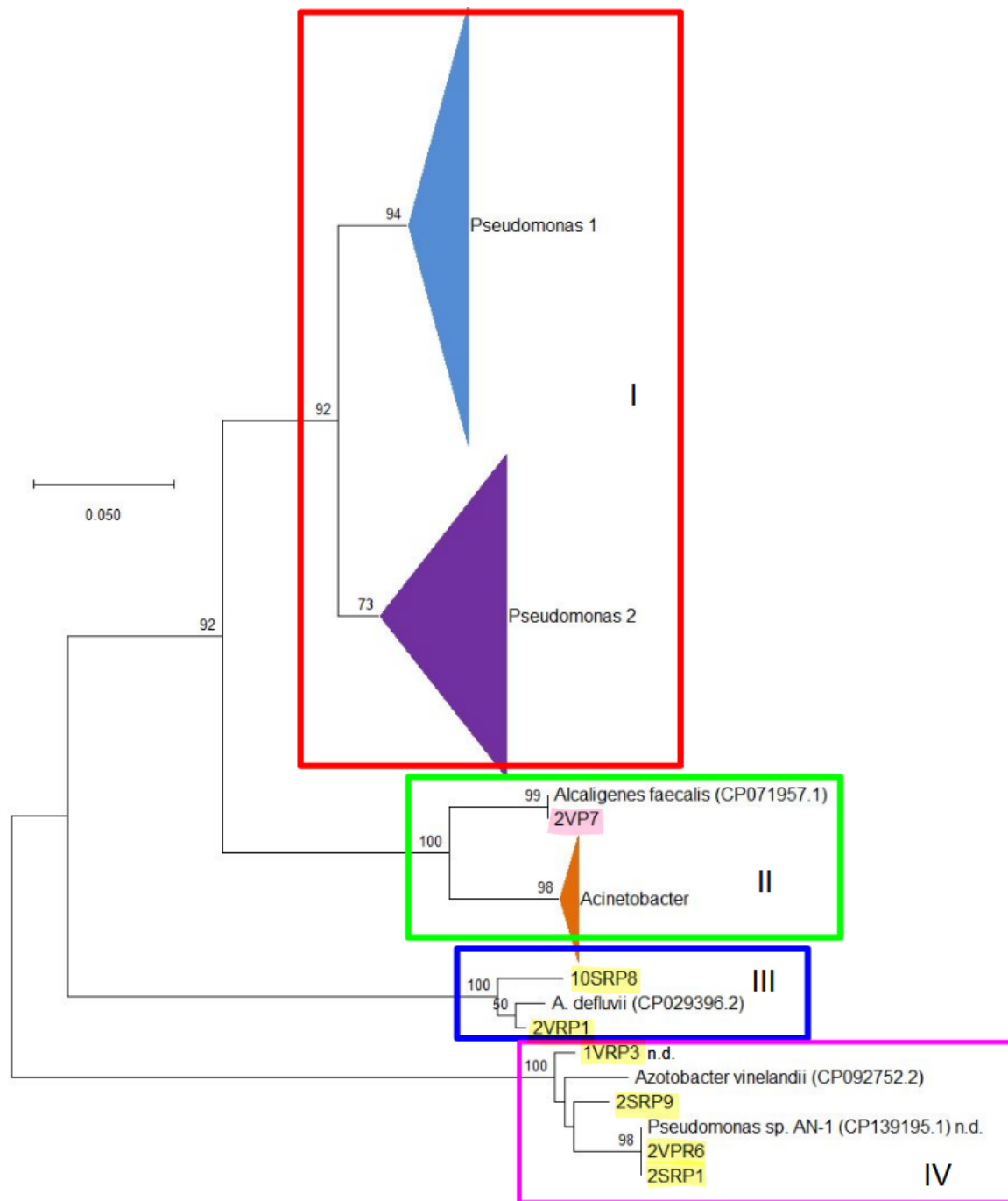
GenBank ID-ga AY8757xx.1 referentstüvede *LmPH* geen on sekveneeritud Heinaru ja teiste (2000) töö raames. *LmPH* fülogeneetilisel puu pealt (Joonis 12.2) on näha, et need geenid on endiselt keskkonnas alles kuigi vaadeldes nende tüvede 16S rRNA geenide vasteid (Joonis 12.1, Lisa 2) on seal liigiline lahknevus. Liigilisest lahknevusest võib järeldada, et perekonna *Pseudomonas* eri liikide vahel on toimunud horisontaalne geeniülekanne.

Üldiselt jaotusid tüvede 16S rRNA geenijärjestused ja *LmPH* ennustatavad aminohappelised järjestused samadesse klastritesse, kuid esines ka tüvesid, mis puude peal eri harudesse jaotusid. Näiteks tüvede 10SRP4 ja 10SRP5 *LmPH* ennustatav aminohappeline järjestus on sarnane

(Joonis 12.2), aga 16S rRNA geeni nukleotiidne järjestus mitte (Joonis 11.2). Selline valgu- ja nukleotiidijärjestuse lahknemine kinnitab horisontaalset geeniülekannt ja ka näitab, et geenijärjestus võib kanduda paljude perekonna *Pseudomonas* liikide vahel. Horisontaalse geeniülekannte kinnitamiseks oleks vajalik *Pseudomonase* perekonda kuuluvate isoleeritud tüvede täpsem identifitseerimine. Identifitseerimisel saaks teha ka skeemi geeni(de) kandumisest liikide vahel.

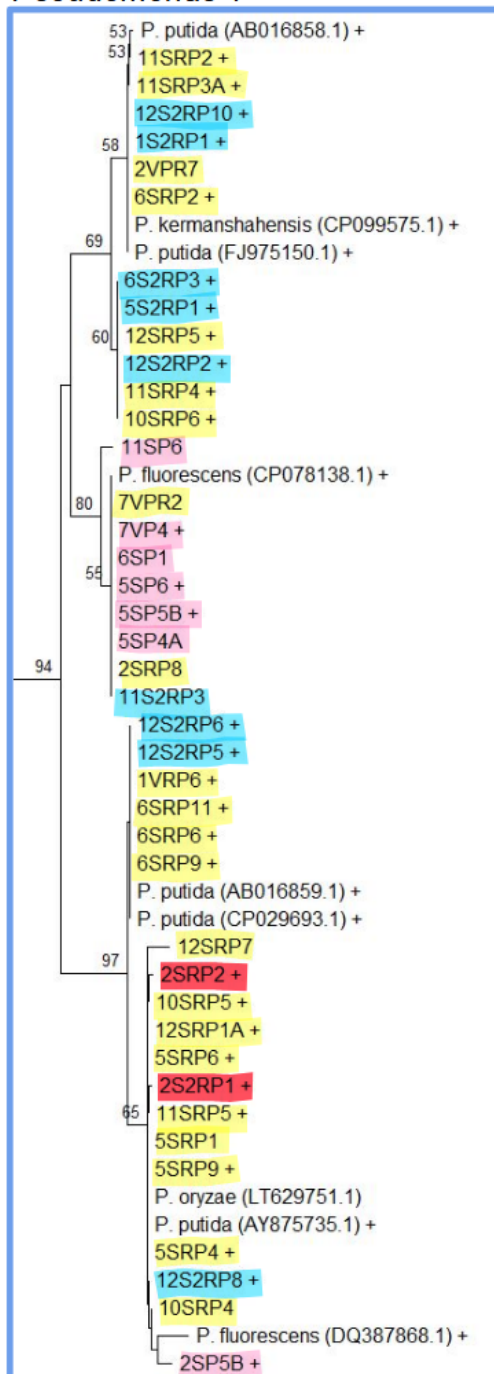
Nii 16S rRNA geeni kui ka LmPH järjestuse analüüsil oli perekonna *Pseudomonas* esindajad suures ülekaalus (70 87-st).

LmPH ennustatavate aminohappeliste järjestuste fülogeneetilisel puul (Joonis 12.1) ei koondunud tüved perekondade järgi, sellest võib järeldada, et *LmPH* geenid on tüvedesse sattunud horisontaalse geeniülekannte tulemusena, mitte eraldi evolutsioneerunud. Järelduse kinnitamiseks oleks jällegi vajalik geenide täies pikkuses sekveneerimine ja analüüsimine.

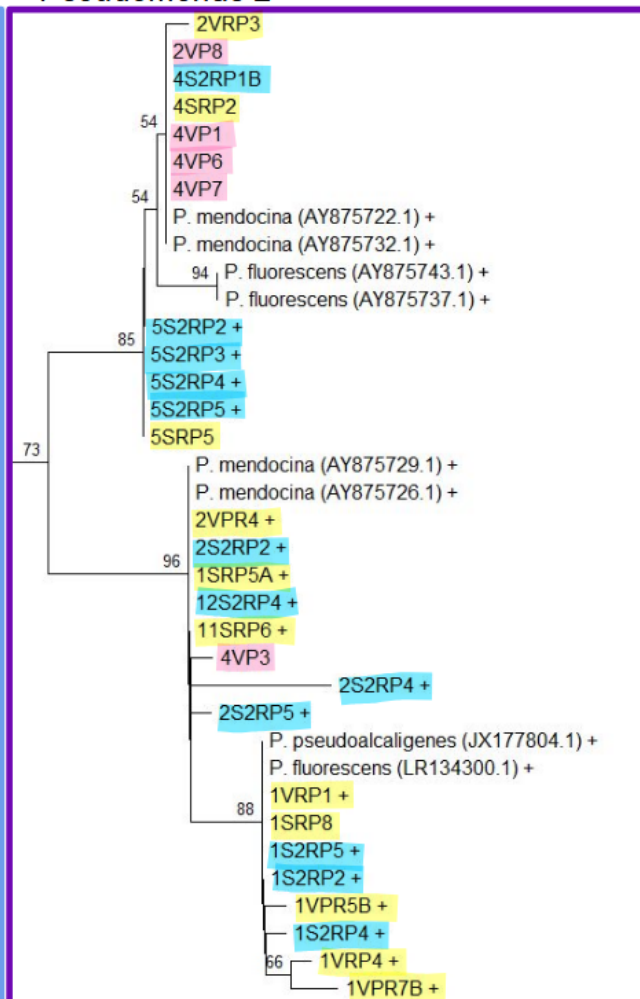


Joonis 12.1. LmPH ennustatavatel aminohappelistel järjestustel põhinev naabrite ühendamise meetodiga arvutatud juurimata fülogeneetiline puu 109 taksoniga. Bootstrapi väärtused on 1000 kordused ja nende väärtused on märgitud alates 50%. Mõõtkava vastab 0,05 aminohappe asendusele ühe aminohappe kohta. Sulgudes toodud GenBank ID. Fluorestseeruvate siderofooride tootvatele tüvedele märgitud “+”, mitte tootvatele tüvedele ei ole midagi märgitud ja informatsiooni puudumisel “n.d.”. Roosaga märgitud otsekülvist, kollasega märgitud rikastuskülvist ja sinisega märgitud kahekordselt rikastuskülvist saadud tüved. I– *Pseudomonas* tüved, II– muud *Pseudomonadota* klassi tüved, III– *Acinetobacteria* tüved, IV– *Pseudomonas* sp. tüved.

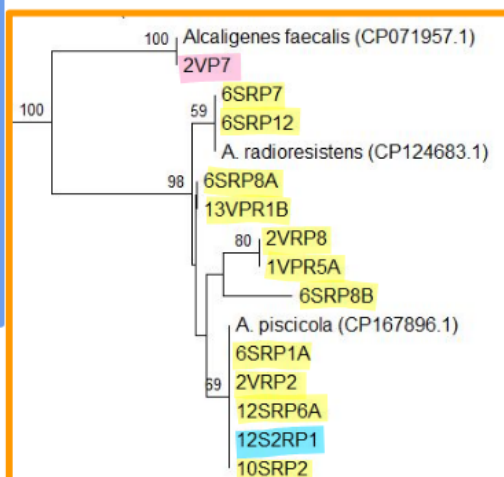
Pseudomonas 1



Pseudomonas 2



Acinetobacter



Joonis 12.2. LmPH ennustatavatel aminohappelistel järjestustel põhinev fülogeneetiline puu harupuud. Sulgudes toodud GenBank ID. Fluorestseerivate siderofooride tootvatele tüvedele märgitud “+”, mitte tootvatele tüvedele ei ole midagi märgitud ja informatsiooni puudumisel “n.d.”. Roosaga märgitud otsekülvist, kollasega märgitud rikastuskülvist ja sinisega märgitud kahekordsest rikastuskülvist saadud tüved ning punasega näidatud pheBA operoniga tüved.

KOKKUVÕTE

Põlevkivitööstus saastab ümbritsevat keskkonda ja selle pärast esineb Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonna veekogudes fenooli lagundavaid baktereid.

Käesoleva töö eesmärkideks oli saada ülevaade Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonna veekogudes leiduvatest bakteritest ja nende multikomponentse fenooli hüdroksülaase kodeerivate geenide (*mPH*) mitmekesisusest. Taheti ka teada, kas 1989. aastal Estonia kaevanduse kustutusvette viidud *pheBA* operon on looduses säilinud. Töö tulemused saab kokku võtta järgnevalt:

1. Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonnas esinevatest kultiveeritavatest fenooli lagundavatest bakteritest umbes pooltel on võimalik detekteerida *LmPH* geen;
2. *pheBA* operon detekteeriti kahes tüves;
3. *mPH* esinemissagedust bakterites kasvab proovi rikastuskatsetega;
4. kõik analüüsitud bakterid kuuluvad *Pseudomonadota* hõimkonda ja valdav enamus *Gammaproteobacteria* klassi;
5. analüüsitud bakteritest enamus kuuluvad perekonda *Pseudomonas* ja paljud kuuluvad perekonda *Acinetobacter*.

Siinses töös saadud tulemuste põhjal on põlevkivitööstuse reostuse mõju all olevates veekogudes palju fenooli lagundavaid baktereid ning nende multikomponentse fenooli hüdroksülaasi mitmekesisus on suur.

Multicomponent phenol hydroxylase diversity from bacteria isolated from Kohtla-Järve oil shale industry region

Triinuliis Sillakivi

Summary

Oil shale industry contaminates its surrounding areas. Oil shale thermal treatment has toxic by-products such as semi-coke and tar. In Estonia until the year 1970, tar was deposited mixed with semi-coke in the semi-coke mountains and because of this to this day the mountains leachate toxic compounds like phenol to its surrounding areas. In 1988 there was a big fire in the mine “Estonia” and a lot of water was pumped to the shafts to extinguish it. The water was polluted with phenols and to clean the water in 1989 *Pseudomonas putida* PaW85 with the phenol degrading catabolic *pheBA* operon was introduced into the water. One of the proteins the *pheBA* operon codes for is a monocomponent phenol hydroxylase, but a lot of phenol hydroxylases are multicomponent (mPH). Because of the constant pollution in the surrounding area the *pheBA* gene cluster can remain in the environment.

This paper started because there was interest if the *pheBA* operon was still present in the ecosystem. It was decided to also study the diversity of multicomponent phenol hydroxylases in bodies of water surrounding the Kohtla-Järve’s oil shale industry

The goal of this paper is to learn about the diversity of the bacteria carrying the genes for multicomponent phenol hydroxylase, more precisely the large subunit of multicomponent phenol hydroxylase (*LmPH*).

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

1. about a third of the cultivable bacteria isolated from bodies of water surrounding Kohtla-Järve’s oil shale industry, there is possible to detect the *LmPH* gene;
2. the *pheBA* operon was detected in two isolates;
3. enriching the environmental sample with phenol increases the bacteria present with mPH;
4. all of the analyzed bacteria belongs to the *Pseudomonadota* phylum and most of them belong to the *Gammaproteobacteria* class;
5. most of the bacteria analyzed in this study belong to the *Pseudomonas* genus and a lot of the analyzed bacteria belong to the *Acinetobacter* genus.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aarna, A., Kask, K., Reier, A. and Öpik, I. 1954. p. 32-34. *Põlevkivi*. Eesti Riiklik Kirjastus, Tallinn.
- Adams, M. H. 1959. Bacteriophages, p. 446. Interscience Publishers, New York.
- Bauchop, T. and Elsdén, S. R. (1960). The Growth of Micro-organisms in Relation to their Energy Supply. *Microbiology*, 23(3): 457–469. <https://doi.org/10.1099/00221287-23-3-457>
- Buchanan, D. V., Tate, P. S. and Moring, J. R. (1976). Acute Toxicities of Spruce and Hemlock Bark Extracts to some Estuarine Organisms in Southeastern Alaska. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33(5): 1188–1192. <https://doi.org/10.1139/f76-149>
- Carey, F.A. and Giuliano, R. A. 2014. Fenoolid, p. 988-1019. *Orgaaniline keemia* 8th ed. Tallinna Trükikoda, Tallinn.
- Chemla, Y., Sweeney, C.J., Wozniak, C.A. and Voigt, C.A. (2025). Design and regulation of engineered bacteria for environmental release. *Nat. Microbiol.* 10: 281–300. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01918-0>
- Chenprakhon, P., Pimviriyakul, P., Tongsook, C. and Chaiyen, P. (2020). Phenolic hydroxylases. *The Enzymes*, 47: 283–326. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2020.05.008>
- Dagley, S. (1971). Catabolism of Aromatic Compounds by Micro-Organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 6: 1–46. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60066-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60066-1)
- Divari, S., Valetti, F., Caposio, P., Pessione, E., Cavaletto, M., Griva, E., Gribaudo, G., Gilardi, G. and Giunta, C. (2003). The oxygenase component of phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Eur. J. Biochem.* 270(10): 2244–2253. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03592.x>
- Gillespie, I. M. M. and Philp, J. C. (2013). Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy. *Trends. Biotechnol.* 31(6): 329–332. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.015>
- Eesti Keemiatööstuse Liit and ÅF-Consulting AS. (2013). Eesti Põlevkiviõli tootmise parim võimalik tehnika. Tallinn.
- Evans, S. J. (1952). Acute Phenol Poisoning. *Occup. Environ. Med.* 9(3): 227–229. <https://doi.org/10.1136/oem.9.3.227>
- Futamata, H., Harayama, S. and Watanabe, K. (2001). Group-Specific Monitoring of Phenol Hydroxylase Genes for a Functional Assessment of Phenol-Stimulated Trichloroethylene

- Bioremediation. Appl. Environ. Microb. 67(10): 4671–4677.
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4671-4677.2001>
- Gross, M. and Šmeljova, J. (2002). Kohtla-Järve tootmisjäätmete prügilas asuva fusside ladestuspaiga sulgemisprojekt. Tartu.
- Harwood, C. S. and Parales, R. E. (1996). THE β -KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF-IDENTITY. Annu. Rev. Microbiol. 50(1): 553–590.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.553>
- Heinaru, A., Frey, T., Tenno, T., Simisker, J. and Kukk, E. (1991). Põlevkivikaevanduste heitvete mõju Kirde-Eesti veekogudele. Tartu.
- Heinaru, E., Talpsep, E. and Linnas, A. (1997). METABOLIC AND GENETIC DIVERSITY OF PHENOL-UTILIZING BACTERIA AS AN ENHANCER OF NATURAL BIODEGRADATION IN POLLUTED WATERS. Oil Shale, 14(4S): 454.
<https://doi.org/10.3176/oil.1997.4S.03>
- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U. and 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 Microbiol. Ecol. 31(3): 195–205.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00684.x>
- Ideon, T. and Butsenko, J. (2010). VKG Energia Põhja soojuselektrijaama tuhaväljaku vastavusse viimise eelprojekt, keskkonnamõju hindamise aruanne. Tallinn.
- Juhanson, J., Truu, J., Heinaru, E. and Heinaru, A. (2007). Temporal dynamics of microbial community in soil during phytoremediation field experiment. J. Environ. Eng. Landsc. Manag. 15(4): 213–220. <https://doi.org/10.1080/16486897.2007.9636933>
- Kafilzadeh F and Mokhtari S. (2013). Isolation and Identification of Phenol Degrading Bacteria from Mangrove Sediments in the Persian Gulf (Asaluyeh) and their Growth Kinetics Assay. Biomed. Pharmacol. J. 6(2). <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/402>
- Kafle, A., Timilsina, A., Gautam, A., Adhikari, K., Bhattarai, A. and Aryal, N. (2022). Phytoremediation: Mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents. Environmental Advances, 8: 100203. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100203>
- Kattai, V. 2003. Põlevkivi-õlikivi: levik, koostis, omadused, ressursid, kasutamine. Eesti Geoloogiakeskus, Tallinn.
- Kivimägi, E. (1974). Eesti senikasutamata maavara. Eesti Loodus, 4: 9-12.

- Kivisaar, M., Habicht, J. K. and Heinaru, A. L. (1989). Degradation of Phenol and m-Toluate in *Pseudomonas* sp. Strain EST1001 and Its *Pseudomonas putida* Transconjugants Is Determined by a Multiplasmid System. *J. Bacteriol.* 171: 5111-5116. <https://doi.org/10.1128/jb.171.9.5111-5116.1989>
- Kivisaar, M., Hõrak, R., Kasak, L., Heinaru, A. and Habicht, J. (1990). Selection of Independent Plasmids Determining Phenol Degradation in *Pseudomonas putida* and the Cloning and Expression of Genes Encoding Phenol Monooxygenase and Catechol 1,2-Dioxygenase. *Plasmid*, 24: 25-36. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(90\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0147-619X(90)90022-5)
- Kokk, M. (1988A). Tulekahju on kustutatud küll, aga.... *Rahva Hääl*, 294: 4.
- Kokk, M. (1988B). Miks tekkis kaevanduses tulekahju?. *Rahva Hääl*, 296: 3.
- Kokk, M. (1989). Pressikonverents “Estonia” kaevanduses. *Rahva Hääl*, 19: 1.
- Manafi, M., Mehrnia, M. R. and Sarrafzadeh, M. H. (2011). Phenol removal from synthetic wastewater by *Alcaligenes Faecalis*: Online monitoring. *Int. J.* 2(2): 103-107.
- McConnell, W. J. and Adams, G. F. (1973). Emory Oak (*Quercus emoryi*) Litter Phenolics as Environmental Hazards for Aquatic Animals in Southeastern Arizona. *Journal of the Arizona Academy of Science*, 8(3), 111. <https://doi.org/10.2307/40021773>
- Mikson, V., Vaher, E. and Viil, A. 2008. Estonia kaevandus, p. 326-347. *90 aastat põlevkivi kaevandamist Eestis*. OÜ GeoTrail KS, Eesti.
- Mitrovic, V. V., Brown, V. M., Shurben, D. G. and Berryman, M. H. (1968). Some pathological effects of sub-acute and acute poisoning of rainbow trout by phenol in hard water. *Water Res.* 2(4): 249–254. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(68\)90017-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(68)90017-1)
- Nurk, A., Kasak, L. and Kivisaar, M. (1991). Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: Expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene*, 102(1): 13–18. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90531-F](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90531-F)
- Olajire, A.A and Essien, J. P. (2014). Aerobic Degradation of Petroleum Components by Microbial Consortia. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 05(05). <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000195>
- Omokhagbor Adams, G., Tawari Fufeyin, P., Eruke Okoro, S. and Ehinomen, I. (2020). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1): 28–39. <https://doi.org/10.12691/ijebb-3-1-5>

- Ots, A. 2004. Põlevkivi kaevandamine ja kaevanduste toodang, p. 41-43. *Põlevkivi põletustehnika*. Tallinna Raamatutrükikoda, Tallinn.
- Paller, G., Hommel, R.K. and Kleber, H.-P. (1995). Phenol degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250. *J. Basic Microbiol.* 35: 325-335. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620350508>
- Parahhonski, E. (1991). "Estonia" kaevanduse allmaapõleng ja selle järelmõjud. *Eesti loodus*, 3: 144-150.
- Parakhonsky, E. (1995). ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ, ТУШЕНИЯ И ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ ПОДЗЕМНЫХ ПОЖАРОВ НА СЛАНЦЕВЫХ ШАХТАХ. *Oil Shale*, 12(1): 63. <https://doi.org/10.3176/oil.1995.1.06>
- Patrick, R., Scheier, A. and Cairns, J. (1968). The Relative Sensitivity of Diatoms, Snails, and Fish to Twenty Common Constituents of Industrial Wastes. *The Progressive Fish-Culturist*, 30(3): 137–140. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1968\)30\[137:TRSODS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1968)30[137:TRSODS]2.0.CO;2)
- Pepper, I. L., Gentry, T. J., Newby, D. T., Roane, T. M. and Josephson, K. L. (2002). The Role of Cell Bioaugmentation and Gene Bioaugmentation in the Remediation of Co-Contaminated Soils. *Environ. Health Persp.* 110: 943–946. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s6943>
- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E. and Nurk, A. (1995). Diversity of phenol hydroxylases from natural strains in the phenol-contaminated North-East area of Estonia. *Proceedings of the Latvian academy of sciences.* 5/6:B:A0-A54.
- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A. and Nurk, A. (1997). Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microb.* 63(12): 4899–4906. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4899-4906.1997>
- Powlowski, J. and Shingler, V. (1994). Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation*, 5(3–4): 219–236. <https://doi.org/10.1007/BF00696461>
- Ramírez-García, R., Gohil, N. and Singh, V. 2019. Chapter 21—Recent Advances, Challenges, and Opportunities in Bioremediation of Hazardous Materials, p. 517–568. *In* Pandey, V. C. and Baudhdh, K. (ed), *Phytomanagement of Polluted Sites*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813912-7.00021-1>
- Sabri, I., Ng, K. X., Ku Mohammad Soffi, N., Mohd Yusoff, M. Z., Nor Muhammad, N. A., Ho, L. S., Maeda, T. and Ramli, N. (2025). Novel insights into indigenous phenol-degrading

- bacteria from palm oil mill effluent and their potential mechanisms for efficient phenol degradation. *Environmental Technology & Innovation*, 37, 103983. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103983>
- Salu, M., Metsur, M., Eller, E. and Kais, P. (2002). Kohtla-Järve tootmisjäätmete prügilas asuva fuusside ladestuspaiga sulgemise kava ja maksumuse hinnang. Tallinn.
- Sazinsky, M. H. and Lippard, S. J. (2006). Correlating Structure with Function in Bacterial Multicomponent Monooxygenases and Related Diiron Proteins. *Accounts Chem. Res.* 39(8): 558–566. <https://doi.org/10.1021/ar030204v>
- Sharma, I. (2021). Bioremediation Techniques for Polluted Environment: Concept, Advantages, Limitations, and Prospects. Alfonso Murillo-Tovar, M., Saldarriaga-Noreña, H. and Saeid, A. (Toim), *Trace Metals in the Environment—New Approaches and Recent Advances*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90453>
- Shebl, S., Ghareeb, D. A., Ali, S. M., Ghanem, N. B. E. D. and Olama, Z. A. (2024). Aerobic phenol degradation using native bacterial consortium via ortho–and meta–cleavage pathways. *Front. Microbiol.* 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1400033>
- Tamm, I. (2007). Fenoolide seire VKG AS-i poolkoksi ning lend- ja koldetuha ladestu ümbruse piirdekraavides ning Kiviõli Keemiatööstuse OÜ poolkoksiladestu ümbruses. Tallinn.
- Tang, H., Kõrgmaa, V., Lavrentjev, S. and Margus, G. (2015). Endiste militaar- ja industriaalalade jääreostuskollete ohutuks muutmise meetodika väljatöötamine ulatuslikku keskkonnakahju põhjustavate hädaolukordade tarbeks, II etapp. Tallinn.
- Ulfat, M., Abad, Z., Ali, N. M., Sarwar, S., Jabeen, K. and Abrar, A. (2024). Screening, biochemical characterization and antibiotics resistance/susceptibility of bacteria isolated from native soil and water samples. *Braz. J. Biol.* 84. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.254016>
- Vedler, E., Kõiv, V. and Heinaru, A. (2000). Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pEST4011 of *Achromobacter xylosoxidans subsp. Denitrificans* strain EST4002. *Gene*, 255(2): 281–288. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00329-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00329-2)
- Ventura, F. F., Mendes, L. F., Oliveira, A. G., Bazito, R. C., Bechara, E. J. H., Freire, R. S. and Stevani, C. V. (2020). Evaluation of Phenolic Compound Toxicity Using a Bioluminescent Assay with the Fungus *Gerronema viridilucens*. *Environ. Toxicol. Chem.* 39(8): 1558–1565. <https://doi.org/10.1002/etc.4740>
- Viiding, H. 1984. p. 220. *Eesti mineraalid ja kivimid*. Valgus, Tallinn.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173(2): 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

Williams, P. A. and Worsey, M. J. (1976). Ubiquity of plasmids encoding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: Evidence for the existence of new TOL plasmids. *J. Bacteriol.* 125: 818-828. <https://doi.org/10.1128/jb.125.3.818-828.1976>

Õispuu, E. (2013). *pheBA* OPERONI ESINEMINE IDA-VIRUMAA JÕGEDEST ERALDATUD MIKROOBIKOOSLUSE DNAs. Tartu.

Yefimov, V., Doilov, S. and Pulemyotov, I. (1995) Research and experimental processing of high-sulphur oil shales. *Oil Shale.* 12(4): 317-340.

Yu, H., Kim, B.J. and Rittmann, B.E. (2001). The roles of intermediates in biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by *Pseudomonas putida* F1. *Biodegradation* 12: 455–463. <https://doi.org/10.1023/A:1015008627732>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

- EEMB electronic database CELMS. Külastatud aadressil
https://eemb.ut.ee/celms/main_list.php 26.05.2025
- Energiatalgud. (2021). Mõju veekvaliteedile. Külastatud aadressil
https://energiatalgud.ee/M%C3%B5ju_veekvaliteedile#fn19 16.05.2025.
- Gamzejev, E. (2008). Estonia põlengu põhjus on ka 20 aastat hiljem mõistatus. *Põhjarannik*.
Külastatud aadressil
<https://web.archive.org/web/20160827072556/http://www.pohjarannik.ee/modules.php?name=News&file=article&sid=8947> 16.05.2025.
- Google Earth. Külastatud aadressil <https://earth.google.com/web/> 14.05.2025.
- Keskkonnaportaal. (2017). Fenoolisoo. Külastatud aadressil
<https://register.keskkonnaportaal.ee/register/residual-pollution/9177474> 06.05.2025.
- Kliimaministeerium. (2025). Eesti maavarad. Külastatud aadressil
<https://kliimaministeerium.ee/energeetika-maavarad/maavarad> 13.05.2025.
- Kundla, R. (2025). Põlevkivi kaevemaht langes rekordmadalale. err. Külastatud aadressil
<https://www.err.ee/1609676078/polevkivi-kaevemaht-langes-rekordmadalale> 10.05.2025.
- Kundla, R. (2023). Ida-Virumaal lõppesid esimesed sammud jõgede tööstusjääkidest puhastamiseks. err. Külastatud aadressil <https://novaator.err.ee/1609154650/ida-virumaal-loppesid-esimesed-sammud-jogede-toostusjaakidest-puhastamiseks> 16.05.2025.
- National Library of Medicine. *Basic Local Alignment Search Tool*. Külastatud aadressil
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 26.05.2025.
- PubChem. (n.d.). Flavanone. Külastatud aadressil
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flavanone> 16.05.2025.
- PubChem. (n.d.). Vanillin. Külastatud aadressil
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1183> 16.05.2025.
- Riigi teataja. (2017). Reovee puhastamise ning heit- ja sademevee suublasse juhtimise kohta esitatavad nõuded, heit- ja sademevee reostusnäitajate piirmäärad ning nende nõuete täitmise kontrollimise meetmed. Külastatud aadressil <https://www.riigiteataja.ee/akt/116122016006> 16.05.2025.
- Riigi teataja. (2021). Jäätmete liigitamise kord ja jäätmenimistu. Külastatud aadressil
<https://www.riigiteataja.ee/akt/118122015014> 16.05.2025.

LISA 1.

Proovivõtu kohad täiendavate kommentaaridega ja koordinaatidega.

Kood	Kirjeldus	Koordinaadid	pH	Rikastus	Saadud tüvesid	LmPH +	pheA +
1V	Puhasti aerotank	59°24'14.1"N 27°14'48.4"E	7,15		20	8	0
1S	Aktiivmuda	59°24'15.1"N 27°14'37.3"E		5 g	25	10	0
2V	VKG uus kanal vesi	59°23'26.4"N 27°11'58.6"E	7,75		17	10	0
2S	VKG uus kanal sediment			2,5	24	16	2
3V	Bassein kõige kaugem, vesi	59°23'30.5"N 27°11'59.5"E	8,84		9	1	0
3S	Bassein kõige kaugem, sediment			2,5	5	0	0
4V	Poolkoksi mäe jalamilt kraav, vesi, oranžikas, lõhnab aromaatika järele	59°24'06.4"N 27°13'48.6"E	10,9		6	6	0
4S	Poolkoksi mäe jalamilt kraav, sediment			5	8	4	0

5S	Fenoolisoo (raudtee lähedalt), sediment	59°23'19.2"N 27°11'07.1"E		5	24	17	0
5V					0	0	0
6V	Kohtla jõgi, Roodu; vesi	59°22'06.9"N 27°11'07.7"E	8,18		5	0	0
6S	Kohtla jõgi, Roodu; sediment				23	11	0
7V	Kraav konveieri juurest, vesi	59°21'46.9"N 27°09'57.0"E	8,06		10	3	0
8V	Purtse jõgi, Lüganuse kirik	59°22'42.7"N 27°02'23.5"E	8,3		2	1	0
9V	Kohtla jõgi, Lüganuse kirik	59°22'49.8"N 27°02'26.9"E	8,05		4	1	0
10V	Kraav, Püssi alajaama, vesi	59°21'39.1"N 27°04'15.7"E	7,95		9	1	0
10S	Kraav, Püssi alajaama, sediment			5	16	13	2
11V	Kohtla jõgi, Püssi alajaama (truubi lähedalt)		8,03		2	0	0
11S	Kohtla jõgi, Püssi alajaama (truubi lähedalt),	59°21'46.5"N 27°04'27.7"E		4	28	11	0

	sediment kivide pealt						
12S	Kohtla jõgi, Püssi alajaama (truubi lähedalt), sediment ülesvoolu			5	22	13	0
13V	Rannapungerja jõgi (Järuska sild)	59°00'44.8"N 27°08'16.6"E	8,4		9	2	0
Kokku					268	128	3

LISA 2.

Sekveneritud tüvede *LmPH* ja 16S rRNA referentsid koos identsusprotsentidega. Tulbas “F1” on märgitud fluorestseeruvate siderofooride tootmine.

Tüvekood	BLAST otsingumootoriga leitud <i>LmPH</i> geeni lähim vaste	Identsusprotsent	BLAST otsingumootoriga leitud 16S rRNA geeni lähim vaste	Identsusprotsent	F1
VP					
2VP7	<i>Alcaligenes faecalis</i> JLAF9	96,39%	<i>Alcaligenes aquatilis</i> 05-101	97,65%	–
2VP8	<i>P. mendocina</i> PC2	100%	<i>P. peli</i> KR2-15	98,30%	–
4VP1	<i>P. mendocina</i> PC12	99,80%	<i>P. alcaliphila</i> Akg2	97,65%	–
4VP3	<i>P. mendocina</i> PC9	99,59%	<i>P. mendocina</i> Lma2	99,78%	–
4VP6	<i>P. mendocina</i> PC12	100%	<i>P. mendocina</i> Lma2	99,57%	–
4VP7	<i>P. mendocina</i> PC2	98,71%	<i>P. alcaligenes</i> NCIMB 9867	99,36%	–
7VP4	<i>P. fluorescens</i> MYb115	95,37%	<i>P. fluorescens</i> Cr2	99,34%	+
SP					
2SP5B	<i>P. silesiensis</i> G3	95,33%	<i>P. gessardii</i> BHU1	98,71%	+
5SP4A	<i>P. fluorescens</i> MYb115	98,92%	<i>P. cedrina</i> subsp. <i>fulgida</i> NTCC12	100%	–
5SP5B	<i>P. fluorescens</i> MYb115	98,21%	<i>P. fluorescens</i> PF53	99,78%	+
5SP6	<i>P. fluorescens</i> MYb115	98,75%	<i>P. kermanshahensis</i> F8	98,72%	+
6SP1	<i>P. fluorescens</i> MYb115	98,39%	<i>P. gessardii</i> BHU1	100%	–
11SP6	<i>P. fluorescens</i> MYb115	96,26%	<i>P. cedrina</i> subsp. <i>fulgida</i> NTCC12	100%	–
VRP					
1VRP1	<i>P. putida</i> PP27	99,30%	<i>P. putida</i> BKP_CB24	99,36%	+
1VRP3	<i>P. oryzae</i> KCTC 32247	97,36%	<i>P. oryzae</i> KCTC 32247	97,64%	n.d.

1VRP4	<i>P. pseudoalcaligenes</i> C70	96,25%	<i>P. monteilii</i> BGRI_EBC_SK23-T4	99,36%	+
1VRP5A	<i>A. wuhouensis</i> WCHA60	92,78%	<i>A. wuhouensis</i> WCHA60	99,79%	-
1VRP5B	<i>P. fluorescens</i> NCTC10783	99,64%	<i>P. putida</i> NTM22	99,79%	+
1VRP6	<i>P. aeruginosa</i> LmPHAT2	99,74%	<i>P. monteilii</i> BGRI_EBC_SK23-T4	99,57%	+
1VRP7B	<i>P. aeruginosa</i> LmPHAT2	98,40%	<i>P. monteilii</i> BGRI_EBC_SK23-T4	99,78%	+
2VRP1	<i>A. defluvii</i> WCHA30	99,18%	<i>A. bohemicus</i> OX0601	99,79%	-
2VRP2	<i>A. piscicola</i> p38	94,05%	<i>A. sichuanensis</i> ZHX-1	99,79%	-
2VRP3	<i>P. mendocina</i> PC2	89,62%	<i>P. mendocina</i> Lma2	99,31%	-
2VRP4	<i>P. mendocina</i> PC6	99,28%	<i>P. putida</i> NTM22	99,79%	+
2VRP6	<i>P. oryzae</i> KCTC 32247	93,96%	<i>P. oryzae</i> ISEM05	99,32%	-
Tüvekood	BLAST otsingumootoriga leitud LmPH geeni lähim vaste	Identsus- protsent	BLAST otsingumootoriga leitud 16S rRNA geeni lähim vaste	Identsus- protsent	Fl
VRP					
2VRP7	<i>P. putida</i> PP112420	94,61%	<i>P. putida</i> ATCC 11172	99,15%	+
2VRP8	<i>A. defluvii</i> WCHA30	92,53%	<i>A. beijerinckii</i> XA-2	99,78%	-
7VRP2	<i>P. fluorescens</i> MYb115	99,30%	<i>P. cedrina</i> subsp. <i>fulgida</i> NTCC12	100%	-
13VRP1B	<i>A. radioresistens</i> DSSKY-A-001	91,22%	<i>A. bohemicus</i> OX0601	99,79%	-
SRP					
1SRP5A	<i>P. mendocina</i> PC9	100%	<i>P. putida</i> HAMB1 6	100%	+
1SRP8	<i>P. aeruginosa</i> LmPHAT2	99,41%	<i>P. plecoglossicida</i> IN88	99,58%	-
2SRP1	<i>Pseudomonas</i> sp. AN-1	99,40%	<i>P. linyingensis</i> OX0613	99,79%	-

2SRP2	<i>P. fluorescens</i> PC17	98%	<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> PSA835	98,98%	+
2SRP8	<i>P. fluorescens</i> MYb115	99,61%	<i>P. cedrina</i> subsp. <i>fulgida</i> NTCC12	100%	-
2SRP9	<i>P. oryzae</i> KCTC 32247	97,24%	<i>P. linyingensis</i> OX0613	99,57%	-
4SRP2	<i>P. mendocina</i> PC12	100%	<i>P. nitroreducens</i> 0802	99,57%	-
5SRP1	<i>P. arsenicoxydans</i> ACM1	91,65%	<i>P. synxantha</i> VMSES25B	99,79%	-
5SRP4	<i>P. putida</i> P-8	92,64%	<i>P. putida</i> JH10	99,79%	+
5SRP5	<i>P. fluorescens</i> PC22	93,00%	<i>P. brassicacearum</i> 33O	99,79%	-
5SRP6	<i>P. putida</i> P-8	92,64%	<i>P. mohnii</i> HMF2783	99,57%	+
5SRP9	<i>P. putida</i> P-8	93,06%	<i>P. putida</i> JH10	99,79%	+
6SRP1A	<i>A. piscicola</i> p38	94,16%	<i>A. sichuanensis</i> WCHAc060041	99,79%	-
6SRP2	<i>P. kermanshahensis</i> F8	97,78%	<i>P. putida</i> ORM603-1	99,57%	+
6SRP6	<i>P. putida</i> PC16	91,57%	<i>P. antarctica</i> KJPB54	99,36%	+
6SRP7	<i>A. radioresistens</i> Sample9_3	90,99%	<i>A. beijerinckii</i> F68	99,77%	-
6SRP8A	<i>A. radioresistens</i> Sample9_3	91,01%	<i>A. johnsonii</i> M19	99,79%	-
6SRP8B	<i>A. radioresistens</i> Sample9_3	90,32%	<i>A. johnsonii</i> M19	99,79%	-
6SRP9	<i>P. putida</i> JBC17	90,69%	<i>P. antarctica</i> KJPB54	99,36%	+
6SRP11	<i>P. putida</i> JBC17	90,84%	<i>P. antarctica</i> KJPB54	99,36%	+
6SRP12	<i>A. radioresistens</i> Sample9_3	92,01%	<i>A. beijerinckii</i> F68	99,77%	-
10SRP2	<i>A. piscicola</i> p38	94,67%	<i>A. sichuanensis</i> WCHAc060041	99,79%	-

10SRP4	P. putida PC16	88,38%	P. huaxiensis WCHPs060044	99,57%	–
Tüvekood	BLAST otsingumootoriga leitud LmPH geeni lähim vaste	Identsus- protsent	BLAST otsingumootoriga leitud 16S rRNA geeni lähim vaste	Identsus- protsent	Fl
SRP					
10SRP5	P. putida JBC17	92,89%	P. graminis DSM 11363	99,55%	+
10SRP6	P. putida SEHO1	98,81%	P. kermanshahensis F8	99,57%	+
10SRP8	A. defluvii WCHA30	86,18%	A. tibetensis YL-1	99,58%	–
11SRP2	P. putida MHF 7109	95,81%	P. plecoglossicida CS0GLB587	99,78%	+
11SRP3A	P. putida MHF 7109	95,88%	P. putida S1(6)	99,57%	+
11SRP4	P. putida P-6	93,04%	P. putida ORM603-1	99,58%	+
11SRP5	P. putida JBC17	92,89%	P. graminis AFS095146	100%	+
11SRP6	P. mendocina PC9	100%	P. putida HAMBI 6	100%	+
12SRP1A	P. putida JBC17	93,31%	P. graminis P_N7	99,78%	+
12SRP5	P. putida P-6	92,77%	P. putida ORM603-1	99,57%	+
12SRP6A	A. piscicola p38	93,31%	A. sichuanensis WCHAc060041	99,79%	–
12SRP7	P. putida P-6	98,82%	P. putida JH10	99,57%	–
S2RP					
1S2RP1	P. monteilii NMI10873_11	99,12%	P. putida BGRI_EBC_SD23-T2	99,58%	+
1S2RP2	P. aeruginosa LmPHAT2	99,47%	P. putida BGRI_EBC_SD23-T2	99,36%	+
1S2RP4	P. putida PP27	98,95%	P. putida BKP_CB24	99,36%	+
1S2RP5	P. fluorescens NCTC10783	99,82%	P. plecoglossicida CS0GLB587	99,78%	+

2S2RP1	<i>P. fluorescens</i> P69	99,20%	<i>P. brassicacearum</i> 33O	99,59%	+
2S2RP2	<i>P. mendocina</i> PC9	100%	<i>P. putida</i> ATCC 11172	99,78%	+
2S2RP4	<i>P. mendocina</i> PC6	92,58%	<i>P. umsongensis</i> CY-1	99,15%	+
2S2RP5	<i>P. mendocina</i> PC9	98,75%	<i>P. umsongensis</i> CY-1	99,57%	+
4S2RP1B	<i>P. fluorescens</i> PC12	100%	<i>P. nitroreducens</i> 0802	99,79%	-
5S2RP1	<i>P. kermanshahensis</i> F8	92,58%	<i>P. kermanshahensis</i> F8	99,57%	+
5S2RP2	<i>P. fluorescens</i> PC18	93,19%	<i>P. brassicacearum</i> 33O	99,78%	+
5S2RP3	<i>P. fluorescens</i> PC18	93,00%	<i>P. brassicacearum</i> 33O	100%	+
5S2RP4	<i>P. fluorescens</i> PC32	92,77%	<i>P. alliivorans</i> K16	100%	+
5S2RP5	<i>P. fluorescens</i> PC18	93,42%	<i>P. brassicacearum</i> 33O	99,79%	+
6S2RP3	<i>P. putida</i> SEH01	98,76%	<i>P. putida</i> SEH01	99,57%	+
11S2RP3	<i>P. fluorescens</i> MYb115	99,46%	<i>P. gessardii</i> BHU1	99,79%	-
12S2RP1	<i>A. piscicola</i> p38	94,63%	<i>A. sichuanensis</i> WCHAc060041	99,79%	-
Tüvekood	BLAST otsingumootoriga leitud <i>LmPH</i> geeni lähim vaste	Identsus- protsent	BLAST otsingumootoriga leitud 16S rRNA geeni lähim vaste	Identsus- protsent	Fl
S2RP					
12S2RP2	<i>P. kermanshahensis</i> Mr36	92,88%	<i>P. kermanshahensis</i> F8	99,78%	+
12S2RP4	<i>P. mendocina</i> PC9	94,08%	<i>P. putida</i> ATCC 17527	99,78%	+
12S2RP5	<i>P. putida</i> JBC17	91,73%	<i>P. antarctica</i> KJPB54	99,36%	+
12S2RP6	<i>P. putida</i> JBC17	91,80%	<i>P. antarctica</i> KJPB54	99,36%	+
12S2RP8	<i>P. putida</i> JBC17	92,63%	<i>P. graminis</i> P_N7	99,79%	+
12S2RP10	<i>P. putida</i> MHF 7109	94,04%	<i>P. putida</i> S1(6)	99,57%	+

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Triinuliis Sillakivi,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose Kohtla-Järve põlevkivitööstuse piirkonnast isoleeritud bakteritüvede multikomponentse fenooli hüdroksülaasi mitmekesisus, mille juhendajad on Signe Viggor ja Merike Jõesaar, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative 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.

Triinuliis Sillakivi

26.05.2025