

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

**Kirde-Eesti tööstuspiirkonna isolaatide naftaleeni ja fenooli lagundamise  
võimekus**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Adeele Must

Juhendajad PhD Signe Viggor ja Merike Jõesaar

Tartu 2025

## Infoleht

### **Kirde-Eesti tööstuspiirkonna isolaatide naftaleeni ja fenooli isolaatide lagundamise võimekus**

Eesti põlevkivitööstuse piirkonnas on pikaajalise reostuse tõttu kujunenud unikaalsed mikroobikooslused, kus baktereid on kohastunud lagundama toksilisi aromaatsed ühendeid, nagu naftaleen ja fenool. 1988. aastal “Estonia” kaevanduse põlengu kustutamise järel viidi loodusesse laboris konstrueeritud bakteritüved, mis kandis fenooli lagundavat operoni pheBA. Antud töös uuriti, kas see operon on aastakümneid hiljem looduses säilinud. 2023. aastal Kirde-Eestist kogutud proovidest isoleeriti 89 naftaleeni lagundavat bakteritüve ning leiti, kirjeldati samadest proovipunktidest erinevalt eraldades saadud tüve 2S2RP1, mis kannab endiselt pheBA operoni plasmiidilisel kujul. See näitab, et biopuhastuses kasutatud tehislik operon võib looduses püsida ja levida, pakkudes väärtuslikku teavet tulevaste biotervenduse lahenduste jaoks.

Märksõnad: biotervendus, fenool, naftaleen, pheBA operon, põlevkivitööstus

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Naphthalene and phenol degrading capabilities of isolates from North-East of Estonia**

Long-term pollution in the industrial region of Estonia has led to development of unique microbial communities, where the bacteria have adapted to degrading toxic aromatic compounds such as naphthalene and phenol. Strains of bacteria constructed in a lab, carrying the pheBA operon for phenol degradation were released into the environment, after the extinction of fire in the mine “Estonia” in 1988. This study investigated whether the operon has persisted in nature for decades. From samples collected in Northeastern Estonia in 2023, 89 naphthalene-degrading bacterial strains were isolated. Among them, strain 2S2RP1—isolated from the same sample points using a different approach—was found to carry the pheBA operon on a plasmid. Evidence that manmade operon can persist and spread in nature offers valuable for future bioremediation solutions.

Keywords: bioremediation, phenol, naphthalene, pheBA operon, oil shale industry

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# Sisukord

<b>Kasutatud lühendid</b>	<b>5</b>
<b>1 Kirjanduse ülevaade</b>	<b>8</b>
1.1 Põlevkivitööstus ja sellest tingitud reostus	8
1.1.1 Põlevkivi	8
1.1.2 Põlevkivi kaevandamine ja töötlemine	9
1.1.3 Mõju keskkonnale	11
1.2 Estonia kaevanduse põleng	12
1.3 Aromaatsed ühendid	14
1.3.1 Naftaleen	14
1.3.2 Fenool	15
1.4 Biotervendus, bioaugmentatsioon	17
1.4.1 Operoni <i>pheBA</i> päritolu ja tüve PC20 iseloomustus	18
<b>2 Eksperimentaalne osa</b>	<b>22</b>
2.1 Töö eesmärgid	22
2.2 Materjal ja meetodika	22
2.2.1 Proovide kogumine ja tüvede isoleerimine	22
2.2.2 Füsioloogilised testid	24
2.2.3 PCR ja geelelektroforees	24
2.2.4 Sekveneerimine	26
2.2.5 Järjestuste bioinformaatiline analüüs	26
2.2.6 Operoni <i>pheBA</i> kandev tüvi	27
2.3 Tulemused ja arutelu	28
2.3.1 Isoleeritud tüvede fülogeneetiline mitmekesisus	28

<b>3 Naphthalene and phenol degrading capabilities of isolates from North-East of Es-</b>	
<b>tonia</b>	<b>31</b>
<b>Kasutatud kirjandus</b>	<b>33</b>
<b>LISA</b>	<b>39</b>
<b>Lihtlitsents</b>	<b>45</b>

# Kasutatud lühendid

**VKG** Viru Keemia Grupp.

# Sissejuhatus

Põlevkivi on energiarikas maavara, mille maardlad Eestis on koondunud Kirde-Eestisse. Põlevkivi hakati kasutama tema energeetiliste omaduste tõttu 1916. aastast, kui sõja tõttu oli puudus kütustest. Järgneva sajandi jooksul on põlevkivi taganud Eestile energiajulgeoleku, kuid see on tulnud kohaliku looduskeskkonna arvelt. Põlevkivi kaevanduste loomisel hävivad elupaigad ja töötlemisel tekib hulgaliselt ohtlike jäätmeid. Alates põlevkivitööstuse rajamisest Eestis on olnud tööstuse koormus loodusele pidev, see on kujundanud kiire kohanemisvõimega mikroorganismide koosluseid järjepideva selektiivse surve kaudu.

Põlevkivitööstuse reostusele iseloomulikuks on fenoolsed ained ja polütsüklilised aroomaatsed süsivesinikud (PAHid), millel on nii tsütotoksilised kui kantserogeensed omadused. Fenoolsed ained tekivad peamiselt utmise protsessis, kus hapniku ligipääsuta põlevkivi pürolüütilisel lagunemisel eralduvad väiksemad süsinikku, vesinikku ja hapnikku sisaldavad ühendid. PAHid leiduvad peamiselt põlevkivi utmisel tekkivas tahkes jäägis, poolkooksis. Poolkoksi ladestamisel uhuvad nõrg- ja vihmavesi PAHid looduskeskkonda, kus need akumuleeruvad stabiilse keemilise struktuuri tõttu.

Pidevalt reostatud elukeskkonnas saavad eelise organismid, kellel on võime kasutada reostust lisa süsinikuallikana, selle käigus vähendades reostust. Kuid see protsess on aeglane ja ebausaldusväärne, sest selektiivne surve soodustab juba kooslustes olemas olnud organismide edukust, kuid ei tekita uusi geene keskkonda. Samuti ohustavad selliseid kooslusi järsud muutused reostuse tasemes, sest ohtlikud jäätmed on suurtes kontsentratsioonides surmavad ka organismidele, kes kasutavad neid substraadina. Bioaugmentatsioon on biotehnoloogiline meetod, mis viitab uute geenide või geenmuundatud organismide kasutamisele reostuse kõrvaldamiseks. Kui 1988. aastal puhkenud "Estonia" kaevanduse põlengu kustutustööde käigus selgus, et õnnetuse tagajärjel tõuseb fenoolse reostuse koormus järsult, otsustati kasutada tehnikult konstrueeritud *Pseudomonas putida* PaW85 tüve reostuse leevendamiseks. See tüvi kandis pheBA operoni, mis võimaldab fenooli kasutamist substraadina.

Bioremediatsioon kui biotehnoloogiline meetod on pälvinud viimastel aastakümnetel suurt tähelepanu just selle paindlikkuse ja madala kulukuse tõttu võrreldes füüsikaliste ja keemiliste reostuse eemaldamise meetoditega. Bioaugmentatsiooni valdkonnas on tehtud suuri edusamme, kuid tehnoloogia suhtelise uudsuse tõttu on tehtud vähe pikaajalisi uurimistöid, mis näitaksid tehisorganismide ja geenide ellujäämise võimalusi looduslikes mikroobikooslustes. Uurimistööd on läbi viidud laboratoorsetes tingimustes ja tihti vaid ühe organismi näitel.

Antud töö eesmärk on määrata Kirde-Eestis isoleeritud bakteritüvede võimekus lagundada naftaleeni ja fenooli ning kirjeldada keskkonda viidud operoni püsivust ja muutumist.

# 1 Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Põlevkivitööstus ja sellest tingitud reostus

### 1.1.1 Põlevkivi

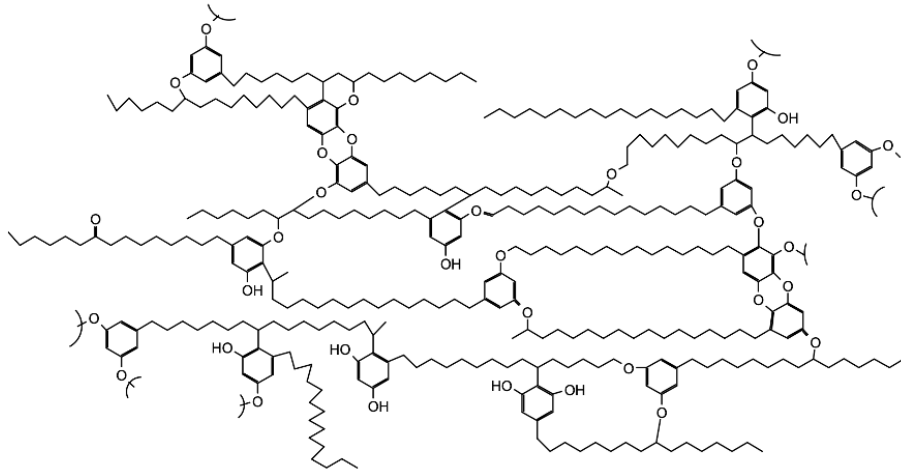
Põlevkiviks nimetatakse kivimit, millest on võimalik termilisel töötlemisel ehk utmisel toota õli ja seda reeglina rohkem kui 20% ulatuses algsest orgaanilisest aineist. Põlevkivitööstuses on kasutusel kukersiit, kuid Eestis esineb ka graptoliitargilliit. Kukersiit koosneb orgaanilisest osast – kerogeen ja anorgaanilisest osast, mida omakorda jaotatakse terrigeenseks materjaliks – savimineraalid ja karbonaatseks aineks ehk lubimineraalid. (Aaloe & Soesoo, 2006; Reinsalu, 2011)

Eesti kukersiit on tekkinud Ordoviitsiumi ajastul 450 - 480 miljonit aastat tagasi, kui Eesti alal asus madal meri. Põlevkivi anorgaaniline osa pärineb mere põhja settinud mineraalainetest ja orgaaniline osa tuleneb valdavalt *Gloeocapsamorpha prisca* biomassist, mis Eesti aladel massiliselt esines. Kerogeenile iseloomuliku struktuuri annavad kaks protsessi, orgaanilise aine lagunemine ning re-kondenseerumine amorfseteks orgaanilisteks molekulideks ja vastupidavate polümeeride selektiivne säilimine. Nende protsesside tasakaal annab erinevate lademetete põlevkividele erineva iseloomu. Kukersiidis on ülekaalus olnud polümeeride selektiivne säilimine, tõenäoliselt *G. prisca* rakukesta tugevuse ja stabiilsuse tõttu. (Lille, 2002)

Nime *Gloeocapsamorpha prisca* andis kukersiidis leidunud jälgedele vene botaanik Mihhail Zalesski aastal 1917, kes leidis, et kivistised on kujult sarnased tänapäevase tsüanobakterite perekaga *Gloeocapsa*. Aastate jooksul on korduvalt kaheldud, kas põlevkivis leiduvad struktuurid on tõepoolest fossiilid, kuna peeti ebatõenäoliseks, et rakuline struktuur võiks säilida geoloogiliselt nii pika aja vältel. Tänapäevaks on kujunenud konsensus, et tegemist on ürgsete rakukestade fossiilidega. (Aaloe & Soesoo, 2006; Lille, 2002)

*G. prisca* rakukesta peamiseks struktuurielemendiks peetakse n-alküülresortsinooli (joonis

1) (Blokker *et al.*, 2001), Lille (2003) on täpsustanud, et tegemist on 5-alküül-1,3-benseendiooliga. See seletab ka, miks kukersiidi termilisel töötlemisel eraldub märkimisväärne kogus fenooli. Fenoolsed ühendeid võisid kaitsta organismi UV kiirguse eest (Lille, 2003). Kuigi *G. prisca* morfoloogia sarnaneb tugevalt tsüanobakteritega, viitab n-alküülresortsinooli olemasolu pigem taimsele päritolule, mistõttu on esitatud hüpotees, et organism võis kuuluda rohevetikate hulka. *G. prisca* suurt morfoloogilist varieeruvust on võrreldud rohevetikaga *Botryococcus braunii*, kelle kuju sõltub vee soolsusest (Blokker *et al.*, 2001).

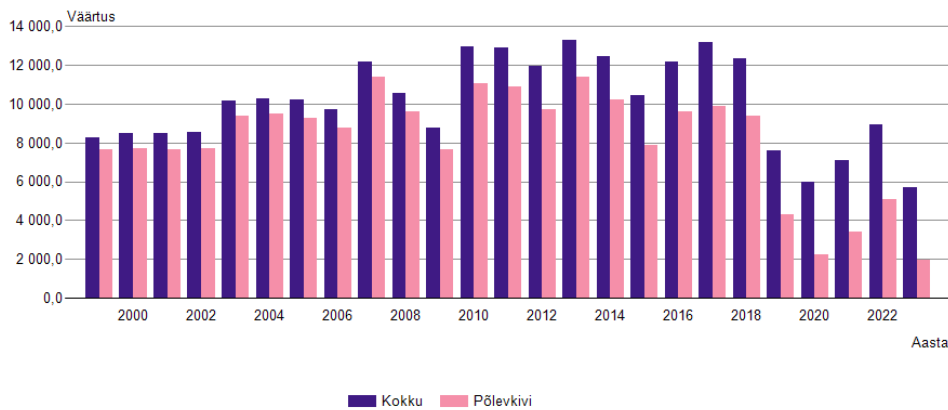


Joonis 1: Lihtsustatud rekonstruktsioon *G prisca* mikrofossiili polümeerist (Blokker *et al.*, 2001) põhjal

### 1.1.2 Põlevkivi kaevandamine ja töötlemine

Põlevkivi on olnud Eestis ajalooliselt kõige olulisem energiatööstuse toormaterjal ja on olulisel kohal tänapäevalgi, kuid viimastel aastatel on selle osakaal vähenenud taastuvenergia kasutuselevõtu arvelt (joonis 2). Põlevkivi on Eestile taganud pikalt energiajulgeoleku, kuid põlevkivi kasutust püütakse vähendada, sest põlevkivi kaevandamine ja töötlemine on loodusele koormav.

Eesti alal on kaks põlevkivimaardlat: Eesti ja Tapa leiupaik. Põlevkivi kaevandatakse neist vaid Eesti leiupaigast, sest Tapa maardla on liiga sügaval, 60 - 170 m, ning kaevandamine ei ole seal majanduslikult kasulik. Eestis kaevandatakse põlevkivi kahel viisil: avakaevandustes ehk karjäärides ja allmaakaevandustes. Karjäärid asuvad maardla põhjapoolsetel aladel, näiteks Narva karjäär, kus põlevkivi kihid on maapinnale lähemal. Maardla kesk- ja lõunaosas on allmaakaevandused, nagu "Estonia" kaevandus, sest põlevkivi kihtide sügavus kasvab lõuna suunas Eesti aluspinna omapära tõttu. (Aaloe & Soesoo, 2006; Reinsalu, 2011; Sikk & Rebane, 2017)



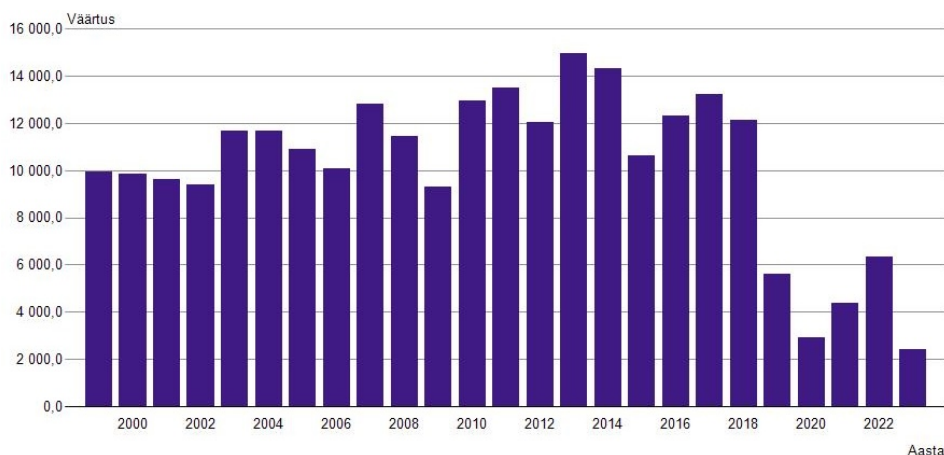
Joonis 2: Eestis toodetud elektrienergia hulk kilovatt tundides perioodil 1999 - 2023. Võrdluseks on toodud kogutoodang ja põlevkivist toodetud elektrienergia mahud. (Statistikaamet, 2024)

Eestis võeti põlevkivi kasutusele aastal 1916, mille ajendiks oli sõjast tingitud kütuse puudus. Esimene õlitehas, asukohaga Kohtla-Järvel, saavutas planeeritud võimsuse 1924. aastal (Reinsalu, 2011). Algusaastatel kasutati tööstuses nii graptoliitargilliiti kui kukersiiti, hiljem vaid energeetiliselt efektiivsemat kukersiiti (Varb *et al.*, 2008).

Eesti suurimad soojuselektrijaamad on Enefit Powerile kuuluvad Eesti soojuselektrijaam, mis asub Narva lähisel Auveres ja Balti soojuselektrijaam, mis paikneb Narva linna lähedal. Eesti Energia alustas elektri tootmist juba 1949. aastal Kohtla-Järve elektrijaamas. Eesti õlitehased kuuluvad ettevõtetele Enefit Industry, mille tehased on Enefit 280 ja Enefit 140, asukohaga Auveres („Enefit Power AS jaguneb aprillist kaheks ettevõtteks: Enefit Industry AS ja Enefit Power OÜ“, 2025) ja Viru Keemia Grupp (VKG), millel on viis tehas Kohtla-Järve tööstusterritooriumil („Tehnoloogia“, 2018).

Eesti põlevkivitööstus kasvas ja 1980. aastaks ületas suurima kaevanduse, „Estonia“, rikastatud põlevkivi toodang 6 miljoni tonni piiri (Varb *et al.*, 2008). Aastatel 1999 – 2023 kasutati elektrienergia tootmiseks keskmiselt 10,2 miljonit tonni põlevkivi aastas (joonis 3) (Statistikaamet, 2024).

Eestis toodetakse põlevkivist peamiselt soojus- ja elektrienergiat, keemia- ja õlitööstus kasutab toodetud põlevkivist ligikaudu 20% (Liive, 2007). Põlevkivi termilist lagundamist hapniku ligipääsuta nimetatakse utmiseks (Reinsalu, 2011; Sikk & Rebane, 2017). Utmise saadusteks on õli ja uttegaas, mille eraldumine algab 325 – 350 °C juures. Temperatuuril 450 – 500 °C tekib tahke jääk ehk poolkoks. Temperatuuri tõusmisel lagunevad kerogeenis leiduvad polümeerid ja kergemad hapnikku ja vesinikku sisaldavad süsiniku ühendid aurustuvad ning moodustub gaas ja õli, mille kondenseerimisel tekivad õlifraktsioon ja uttevesi (Sikk & Rebane, 2017). Kui



Joonis 3: Elektrienergia tootmiseks tarbitud põlevkivi kogused (tuhat tonni) aastatel 1999 - 2023

hapnik ja vesinik on põlevkivist ammendunud, jäävad alles lendumatud süsinikuühendid, mis moodustavad poolkoksi orgaanilise osa (Jürs & Reinsalu, 2015).

### 1.1.3 Mõju keskkonnale

Keskkonnale avaldab märkimisväärset mõju nii põlevkivi kaevandamine, kui töötlemine. Ava-kaevandamine muudab drastiliselt maastikku, põhjustab mullakatte ja looduslike ökosüsteemide hävimist ning tekitab tolmu- ja mürasaastet. Allmaakaevandamine, kuigi maapinnalt vähem märgatav, põhjustab sageli maapinna vajumist (subsidentsi) ja mõjutab põhjaveerežiimi, muutes vee liikumist ja keemilist koostist. (Reinsalu, 2011)

Põlevkivi töötlemisel tekivad jäätmed igas etapis, mis kõik kujutavad looduskeskkonnale erineval määral ohtu. Jäätmed võivad olla tahked (joonis 4), vedelad, kui ka õhku paiskuvad. Põlevkivi põlemise tahke jääk on põlevkivituhk, mis on valdavalt anorgaaniline materjal. Põlevkivituhka iseloomustab madal orgaaniliste ainete sisaldus, sest orgaaniline materjal on põletatud. Kõrgetel temperatuuridel hakkab lagunema ka põlevkivi anorgaaniline osa, mille tulemusel tekivad aluselised oksiidid, peamiselt kaltsiumoksiid ja kaaliumoksiid, mis muudavad tuha transpordi- ja nõrgvee leeliseliseks (pH 11 - 13) (Sikk & Rebane, 2017). Alates 2019. aastast ei klassifitseerita Eestis põlevkivituhka enam ohtlikuks jäätmeks. See otsus tugineb asjaolule, et põlevkivituhk sarnaneb oma omadustelt kivisöetuhaga, mida enamikus maailma riikides ohtlikuks ei peeta. Samuti on kaasaegsetes põletuskateldes vähenenud tuha orgaaniline jääksisaldus, mistõttu on oht keskkonnale väiksem (Kliimaministeerium, 2019).

Põlevkivi utmisel tekiv tahke jääk on poolkoks, mis erinevalt tuhast on ohtlik jääde, kuna sisaldab suurel määral orgaanilist ainet, sõltuvalt tehnoloogiast 7 - 16% (Jürs & Reinsalu, 2015);

Kattai, 2003). Kattai (2003) märgib, et poolkoksi saab küll põletada, muutes selle ohutumaks, kuid selline käitlus pole majanduslikult tasuv. Võrreldes värskelt ladestatud ja kaua seisnud poolkoksi nõrgvett, on tuvastatud, et PAHide kontsentratsioonid ei vähene märkimisväärselt ajas. See viitab sellele, et saasteained ei immobiliseeru poolkoksis, vaid jätkavad keskkonna reostamist pikaajaliselt (Jefimova *et al.*, 2014).

Utmisel tekib vedel jääk - uttevesi ehk fenoolvesi. See sisaldab suurt kontsentratsiooni fenoolide, sõltuvalt tootmisprotsessist võib tekkiva vee fenoolide sisaldus varieeruda 4–22 g/l. Uttevesi sisaldab lisaks ka orgaanilisi happeid (nt sipelghape), aluseid (nt ammoniaak) ja keetonühendeid (Jürs & Reinsalu, 2015). Uttevee fenoolid tuleb enne veekeskonda juhtimist eemaldada – see protsess ehk defenoleerimine toimub tavaliselt keemilise ekstraheerimise abil, kus kasutatakse näiteks butüülatsetaati või muid sobivaid estreid. Uttevee keskkonnale kahjuks tegemiseks seda ka põletatakse, kui puuduvad ressursid defenoleerimiseks või soov fenooli edasi töödelda (Aivar Pau, 2019).

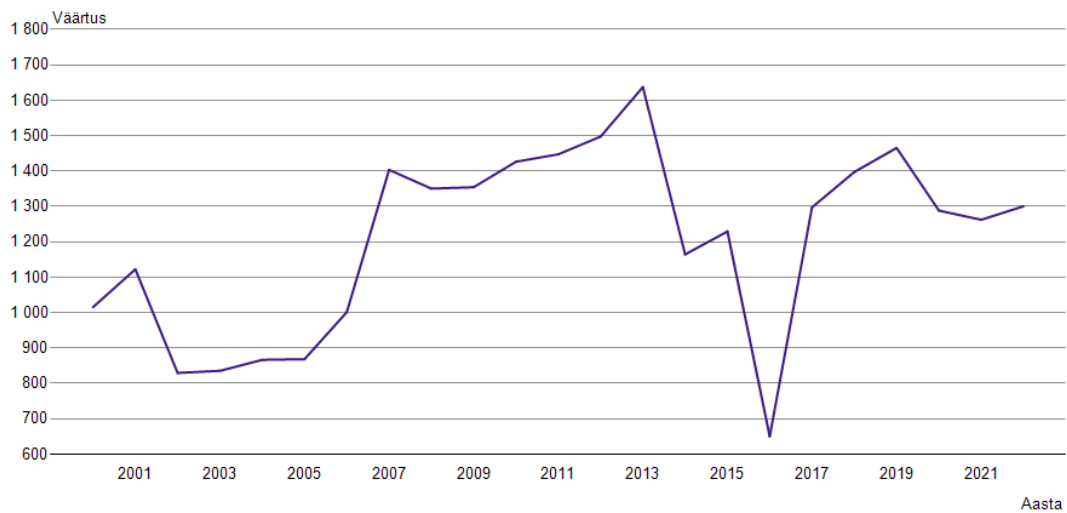
Fuuss on põlevkivi töötlemisel tekkinud pigi-laadne jääde, mis koguneb õlimahutite põhja vee ja mehaaniliste lisade settimisel (Jürs & Reinsalu, 2015). Fuussid on ohtlikud jäätmed, sest sisaldavad suures hulgas PAHe ja fenoolseid aineid (Kattai, 2003). Fuusse ladestati poolkoksi mägedel basseinides, kust ohtlikud ained said levida filtratsiooni teel ümbritsevasse keskkonda (Kattai, 2003).

Põlevkivi termilisel töötlemisel tekib ka õhusaaste, mille hulka kuuluvad peen (particulate matter PM<sub>5</sub>, läbimõõt  $\geq 5 \mu\text{m}$ ) ja eriti peenosakesed (PM<sub>2,5</sub>, läbimõõt  $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ), lämmastikoksiidid (lämmastikoksiid ja lämmastikdioksiid), vääveldioksiid (78% Eesti vääveldioksiidi heitest tuleneb energiatööstusest) ja vesiniksulfiid – mis tekib peamiselt õli tootmisel, (Keskkonnaagentuur 2021). Ajalooliselt on dokumenteeritud tolmuheitmed ja suures hulgas raskemetalle, aastas paiskus tolmuõhku 400 kg kaadiumi, 32 700 kg pliid, 1160 kg uraani ja 9026 kg arseeni (Parahhonski, 1991; Turbas, 1991).

Riskid keskkonnale on ka õnnetused ja põlengud, ühte sellist juhtumit on kirjeldatud järgnevas lõigus.

## 1.2 Estonia kaevanduse põleng

1988. aastal 3. novembril puhkes Estonia kaevanduses ligikaudu 65 meetri sügavusel 4. paneelstrekis põleng (Parahhonski, 1991; Varb *et al.*, 2008). Tulekahju süttimise põhjuseks nimetati ametlikult lintkonveieri süttimist, kuid tollaegne “Eesti Põlevkivi” tootmiskoondise peadirek-



Joonis 4: Põlevkivi utmisel tekkinud jäätmete hulk (tuhandetes tonnides) aastatel 1999 - 2023 (Statistikaamet, 2024)

tor O. Sullakatko tõdeb, et tegelik põhjus pole teada, sest puuduvad faktid ja süttimise põhjus oli tuletatud loogika ja kogemuse alusel (Sullakatko, 2018).

Tulekahju kustutati ligikaudu kahe kuuga, mille sisse mahtusid edutud kustutustööd maa all, maapealse infrastruktuuri ehitamine ja lõpuks kolde piiramine ja lämmatamine. Tulekahjuga võitlemine maa all muutus tule levides võimatuks suure temperatuuri, paksu suitsu ja veeauru tõttu, mis muutis kaevanduse lae varisemisohtlikuks. Kustutustööd jätkusid maa pealt, kus ühenduse loomiseks kaevandusega puuriti üle kahesaja 120 mm puuraugu. Läbi puuraukude juhiti kaevandusse inertgaasi ja veeauru segu. Puurakukude kaudu rajati ka kolde ümber betoontõkked ja kolle uputati veega, kuni veepiir oli 3,3 m kõrgusel ning ülejäänud ruum täideti lämmastikuga. (Parahhonski, 1991)

Betoontõketegega isoleeritud ala uputanud vees lahustused põlevkivi termilisel lagunemisel tekkinud fenoolid. Lippmaa ja Pihlak (1988) hindasid, et lahustunud võis olla 60 - 70 kg fenooli. Suurema looduskatastroofi ennetamiseks kasutati vee bioloogilist puhastamist laboratoorselt konstrueeritud *Pseudomonas putida* PaW85 fenooli lagundavaid tüvesid (Peters *et al.*, 1998). Tüved töötati välja 1989. aasta jaanuari lõpuks ja esimene suuremahuline katse viidi läbi veebruaris, kus rikastusvabriku rõngasbasseini (15 tonni vett) viidi 200 l biomassi. Katsetus oli edukas ja rõngasbasseinis langes fenoolide sisaldus 24-lt µg/l 6-le µg/l. 21. märtsiks 1989 oli kustutusvesi jahtunud piisavalt, et sinna lasta bakterid. Läbi puurangu lasti kaevandusse 400 l biomassi (A. Heinaru, 1991).

## 1.3 Aromaatsed ühendid

Aromaatsed ühendid on looduses laialt levinud ja need on suure mitmekesisusega, varieerudes aromaatsete tuumade arvu, ehituse ja kõrvalahelate poolest. Aromaatne ühend on orgaaniline ühend, mis sisaldab aromaatset tuuma. Aromaatne tuum on tsükkel, mis allub Hückeli reeglitele, mis ennustavad tsükli pi-orbitaalide kattumist ja elektronide delokalisatsiooni. Elektronide delokaliseerumise omadus annab tuumale suure keemilise stabiilsuse ja võib mõjutada asendusrühmade omadusi, näiteks fenool on sarnaste alifaatsete alkoholidega võrreldes happelise-mate omadustega. Samuti mõjutab aromaatsete tuumade suur stabiilsus keemilisi reaktsioone, andes pigem asendusreaktsiooni tsükli katkemise asemel. (Viht, 2018)

Aromaatseid ühendeid on iga organismi koostises. Näiteks sisaldavad aromaatset tuuma aminohapped histidiin, fenüülalaniin, türosiin ja trüptofaan. Samuti sisaldavad kõik nukleosiidid heterotsükliilist aromaatset tuuma. Lisaks on aromaatsus iseloomulik ka teatud looduslikele polümeeridele, nagu ligniin, mis on taimedes oluline struktuurne komponent. (Viht, 2018)

Polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud (PAH) on kahest või enamast kondenseerunud aromaatsesest tuumast koosnevad ühendid. Kõige lihtsam PAH on kahest benseenituumast koosnev naftaleen, seetõttu kasutatakse seda tihti mudelühendina PAHide lagundamisradade uurimisel bakterites (Seo *et al.*, 2009). PAHid tekivad mittetäieliku põlemise tagajärjel ja nende kontsentratsioon suureneb loodusikult peale metsatulekahjusi (Rao & Parsai, 2023). Kuigi PAHed tekivad ka looduslike protsesside tagajärjel, on nende sisaldus keskkonnas märgatavalt kasvanud inimtegevuse tagajärjel, eriti tööstusliku põletamise ja transpordi tõttu, mis on kaasa toonud laialdase reostuse ökosüsteemides (Preuss *et al.*, 2003). Samuti esinevad fenoolsed ühendid looduslikult, tekkides näiteks aromaatsete aminohapete lagundamisel, kuid inimtegevuse tõttu vabaneb neid keskkonda kiiremas tempos, kui neid laguneb, põhjustades fenoolset koormust keskkonnale (Schie & Young, 2000).

### 1.3.1 Naftaleen

Naftaleen on polütsükliiline aromaadne süsivesinik, mis koosneb kümnest süsiniku aatomist ja kaheksast vesiniku aatomist. See on kristallilise struktuuriga tahke aine, mille sulamispunkt on 80 °C ja keemispunkt 218 °C. Naftaleeni teeb ohtlikuks selle kantserogeensed omadused, naftaleeni aurudega kokku puutunud rottidel tekkis võrreldes kontrollgrupiga sagedamini epiteelkudede kasvaja (Preuss *et al.*, 2003). Rakkudesse sattudes sünteesivad keha omased mitte-

spetsiifilised ensüümid naftaleenist mürgisemad metaboliidid (Travkin & Solyanikova, 2021). Kokel *et al.* (2006) katsed varbussidega näitasid, et naftaleeni kantserogeensuse põhjuseks on selle mõju apoptoosi efektiivsusele.

Naftaleeni, nagu ka teisi PAHe, loetakse kriitiliseks keskkonna reostajaks, sest aromaatus tagab suure keemilise stabiilsuse, mille tõttu ühend akumuleerub keskkonda (Travkin & Solyanikova, 2021). PAHidest lahustub vees kõige paremini naftaleen (31,7 mg/l) (Preuss *et al.*, 2003), seega saab naftaleen kergesti levida saasteallikast kaugemale.

Naftaleeni lagundavat aktiivsust on leitud mitmete bakteri perekondade seas, eeskätt Gram-negatiivsete bakterite hulgas, kellel on suur metaboolne mitmekesisus aromaatsete ühendite lagundamisel. Aeroobsetes tingimustes algab naftaleeni katabolism naftaleendioksügenaasi vahendusel, mis lisab kaks hüdroksüülrühma naftaleeni 1 ja 2 positsiooni ning moodustab *cis*-naftaleen-1,2-dihüdrodioli (joonis 6, joonis 5). Selle ühendi dehüdrogeenib *cis*-dihüdrodiol dehüdrogenaas 1,2-dihüdroksünaftaleeniks, mis laguneb järjestikuste reaktsioonide kaudu salitsülaadiks. Tüüpiliselt dekarboksüleeritakse salitsülaat katehooliks, mille edasine lagundamine toimub *ortho*- või *meta*-lõhustamise raja kaudu, tekkivad lõpp-produktid sisenevad lõpuks tsitraaditsükklisse. Osa mikroorganisme lagundab salitsülaati hoopiski gentisaadi rajaj (Travkin & Solyanikova, 2021).

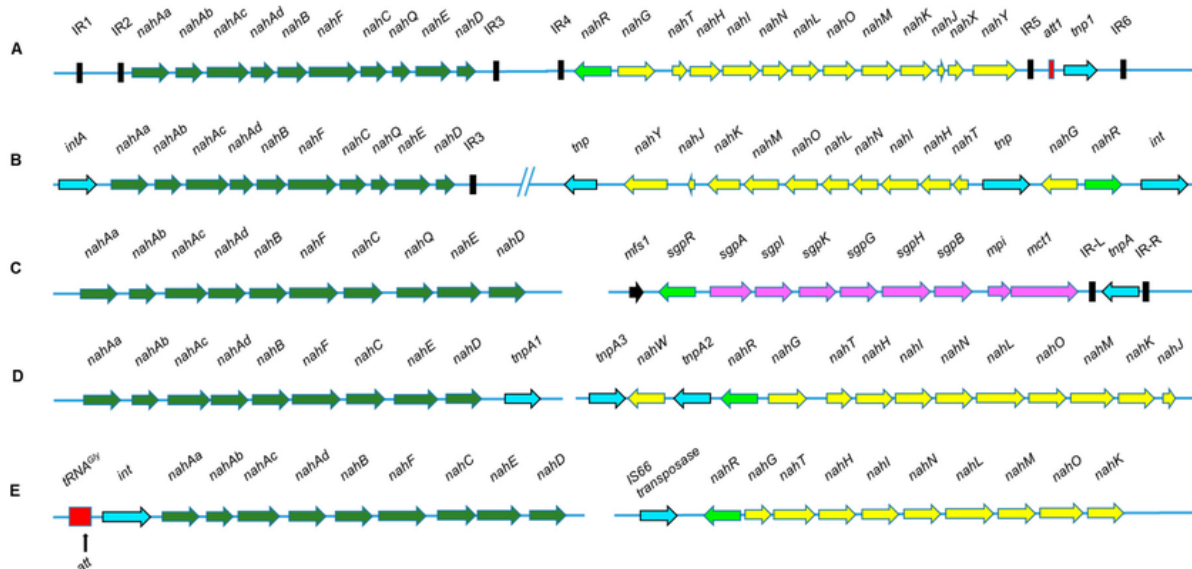
Põhjalikult on kirjeldatud naftaleeni degradatsiooni plasmiidil NAH7 (*Pseudomonas putida* G7), kus on kaks operoni, *nah* operon vastutab naftaleeni salitsülaadiks muundamise ja *sal* operon - salitsülaadi edasise lagundamise eest (Seo *et al.*, 2009) (joonis 5).

Anaeroobsetes tingimustes on naftaleeni lagundamine oluliselt aeglasem. Peamiselt on tegemist nitraati ja sulfaati redutseerivate bakteritega. Naftaleeni lagundamise võimet omasid näiteks *Deltaproteobacteria* puhaskultuur ja *Peptococcaceae* koosluse osana. (Chen *et al.*, 2022)

### 1.3.2 Fenool

Fenool ehk hüdroksübenseen on tahke, värvitu või valge kristallilise struktuuriga aine. Fenooli sulamistemperatuur on 41 °C ja keemistemperatuur 182 °C. Vees lahustumine on mõõdukas või madal (84 g/l 20 °C), fenool lahustub paremini orgaanilistes lahustites (Borealis AG, 2021). Fenoolsed ained on Eesti riigis seadusega reguleeritud, ühealuseliste fenoolide piirnorm reovees, sealhulgas kaevandus- ja karjääriveele, on 0,1 mg/l (Teataja, 2019).

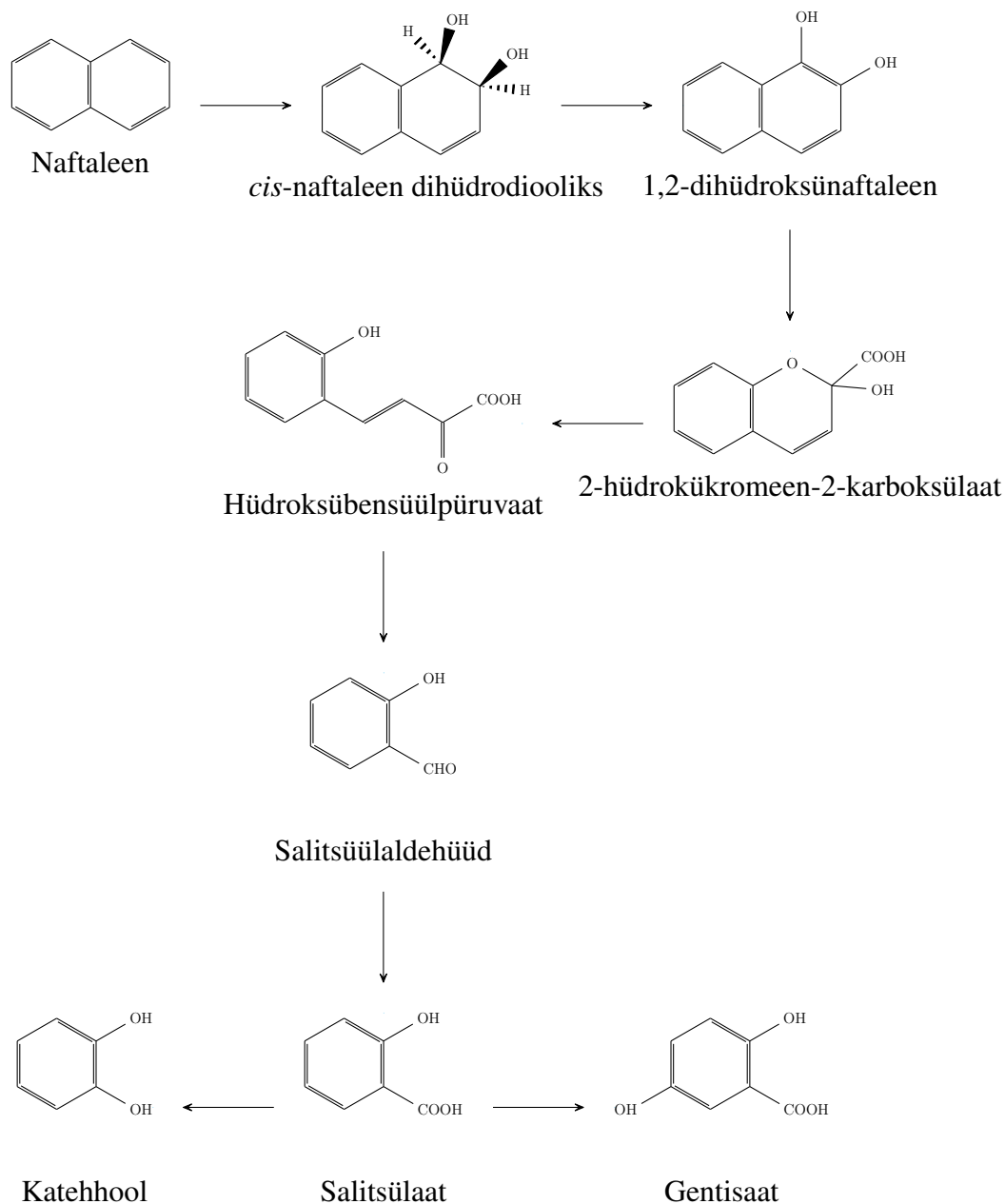
Fenooli mürgisus tuleneb selle võimest häirida rakumembraani struktuuri ja funktsiooni. Fenool interakteerub membraanilipiididega, põhjustades membraani läbilaskvuse suurenemist



Joonis 5: Naftaleeni lagundamises osalevate geenide paiknemise ja organiseerituse mitmekehisus erinevates *Pseudomonas* liikides ((A) *Pseudomonas putida* G7, (B) *Pseudomonas putida* tüvi NCIB9816-4, (C) *Pseudomonas putida* AK5, (D) *Pseudomonas stutzeri* AN10, (E) *Pseudomonas putida* CSV86). Geenid paiknevad kas plasmiididel, kromosoomil või transponeeruvatel elementidel. Rohelisega on tähistatud ülemise raja geenid (nah operon), kollasega alumise raja geenid (sal operon), roosaga gentisaathappe rada (sgp/gen operon). Helesinisega on tähistatud transposaadid ja integraasid, mustade kastidega IR-elementid, punase kastiga tRNA geen koos att-sõlmpunktiga, heleroheline näitab operonide regulaatoreid ning must nool membraantransport valku. (Phale 2019)

ning läbi selle raku surma. Rakusurma vältimiseks on fenooli resistentsetel tüvedel rakumembraani lipiidide struktuuri stabiliseerimise mehhanismid, näiteks rasvhapete *cis*-konfiguratsioonist *trans*-konfiguratsiooni muutmine või küllastumata rasvhapete küllastamine, et tagada membraani jäikus (Schie & Young, 2000).

Aeroobsel fenooli lagundamisel esimene ja määrav etapp on fenooli hüdroksüülrühma suhtes *ortho* asendisse teise hüdroksüülrühma lisamine, mille tulemuseks on katehooli teke. Seda reaktsiooni katalüüsivad fenooli hüdroksülaasid, mis võivad olla ühe komponentsed (näiteks fenooli 2-monooksügenaas PheA) või multikomponentsed (näiteks *DmpKLMNOP*) (Joonis 7). Multikomponentsed fenooli oksügenaasid on laiemalt levinud ja funktsionaalselt paindlikumad. Need koosnevad mitmest alühikust, millest suurim (*LmPH*) sisaldab katalüütilist tsentrit. Futamata *et al.* (2001) jagasid *LmPH*d fülogeneetiliste ja kineetiliste omaduste põhjal kolme gruppi. Praimeritega pheU1 ja pheUf saab Futamata sõnul peamiselt amplifitseerida I ja III grupi *LmPH* gene.

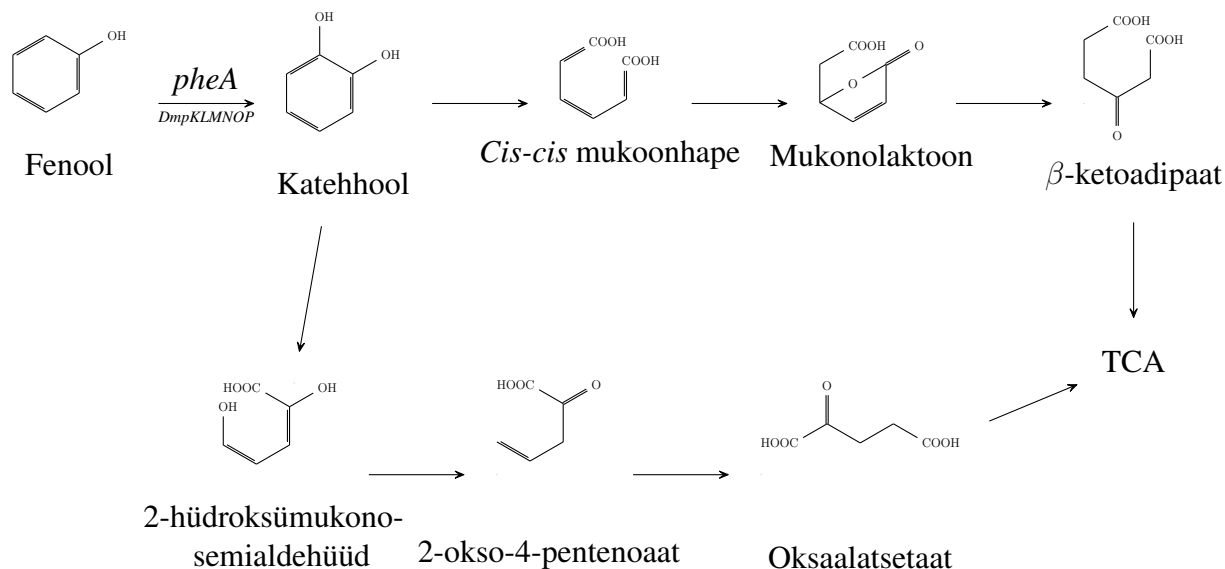


Joonis 6: Naftaleeni aeroobse lagundamisraja skeem (Seo *et al.*, 2009) põhjal

## 1.4 Biotervendus, bioaugmentatsioon

Bioremediatsioon on protsess, kus elusorganismide, enamasti mikroorganismide abil, leevendatakse või eemaldatakse keskkonnast reostus. See tehnoloogia on pälvinud märkimisväärset tähelepanu tänu oma tõhususele ja keskkonnasõbralikkusele võrreldes traditsiooniliste keemiliste meetoditega. Bioremediatsiooni oluline suund on bioaugmentatsioon, mis hõlmab spetsiifiliste mikroorganismide tüvede lisamist saastunud keskkonda, et tõhustada saasteainete lagunemist (Mokrani *et al.*, 2024).

Kirde-Eesti tööstuspiirkonnas on reostuse vähendamiseks kasutatud biotervendust mitmel



Joonis 7: Fenooli aeroobse lagundamisraja skeem Zhou *et al.* (2016) ja Mahiuddin *et al.* (2012) põhjal

korral väga positiivsete tulemustega. 1988 põlengu tagajärjel reostunud vee biopuhastamiseks kasutati bioaugmentatsiooni (A. Heinaru, 1991). Hiljem on samas piirkonnas läbi viidud pikaajalised biotervenduse katsed, mida on kirjeldanud Juhanson *et al.* (2009). Uuriti fenooli lagundavate *Pseudomonas* tüvede, sealhulgas *Pseudomonas fluorescence* tüve PC20, ellujäämist ja kataboolset aktiivsust bioaugmentatsiooni ja fütopuhastuse kombinatsioonis poolkoksimägedel. Tüve PC20 oli võimalik tagasi testida enam kui 40 kuud peale loodusesse viimist.

### 1.4.1 Operoni *pheBA* päritolu ja tüve PC20 iseloomustus

Operon *pheBA* pärineb *Pseudomonas sp.* tüvest EST1001, mida esmakordselt kirjeldasid Kivisaar, Habicht ja Heinaru 1989. aastal ilmunud artiklis. EST1001 on spontaanse mutatsiooni tagajärjel m-ksüleeni kasutamise võime kaotanud *Pseudomonas sp.* S13 tüve derivaat. Tüve S13 eraldas pinnaseproovist P. A. Williams aastal 1976. (Kivisaar *et al.*, 1989)

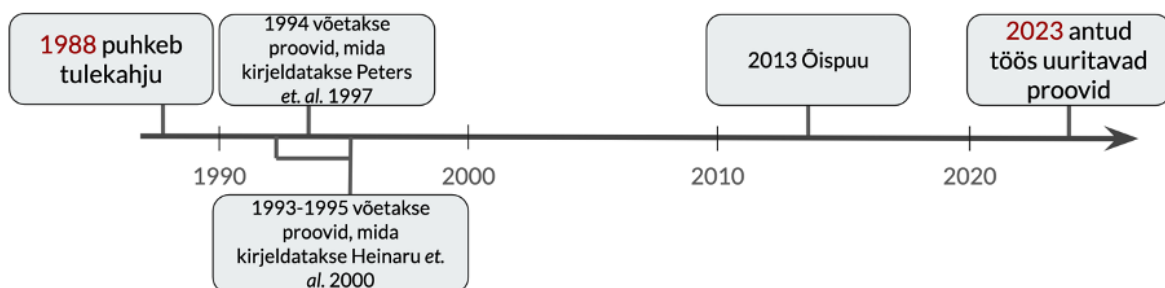
Operon *pheBA* koosneb geenidest *pheB*, mis kodeerib 1,2-dioksügenaasi (C120, EC:1.13.11.1) ja *pheA*, mis kodeerib fenooli 2-monooksügenaasi (PMO, EC:1.14.13.7). *pheB* ja *pheA* geenid asuvad kahe IS elemendi vahel, *IS1472* ülesvoolu ja *IS1411* allavoolu (joonis 8). IS elemendid ja IS-laadsed elemendid (ARMphe) võimaldavad kataboolsete geenide horisontaalset ülekannet (Peters *et al.*, 1998). *pheBA* transkriptsioonil osaleb LysR perekonna transkriptsiooniregulaator *catR*, mis paikneb kromosoomis ning osaleb ka *catBCA* regulatsioonis (Kasak *et al.*, 1994).

Fenooli lagundamise raja esimest kahte ensüümi kodeeritakse *pheBA* operonilt. “Estonia” kaevanduse põlengu järgsel biopuhastamisel kasutati fenoolide rikka vee puhastamiseks *pheBA*



Joonis 8: *Pseudomonas putida* EST1001 *pheBA* operoni skemaatiline ülevaade (Peters *et al.*, 2004).

operoniga bakteritüve. Kuna *pheBA* geenid pärinevad Rootsist isoleeritud tüvest S13 ning lisa laborikatsetega tekkinud *pheBA* operoni (*pheBA* geenid koos IS elementidega) mujalt maailmast ei ole sellise järjestusega tüvesid isoleeritud, võib *pheBA* operoni pidada unikaalseks/kunstlikuks järjestuseks. Kuigi enne põlengut ei uuritud, kas Eesti looduses leidub sellist operoni kandvaid tüvesid võib siiski oletada, et kõik tüved, millel on hiljem tuvastatud *pheBA* operon on selle omandanud horisontaalse geeniülekanne käigus (Peters *et al.*, 1998). See on andnud ainulaadse võimaluse uurida kooslusesse viidud tehisliku geeni püsimist ja või muutumist looduses. Operoni *pheBA* tuvastamist looduses on kirjeldanud mitmed teadustööd, loetelu töödest skemaatilisel ajajoonel kujutatud joonisel 9.



Joonis 9: Ajajoon alates 1988 tulekahjust “Estonia” kaevanduses kuni käesolevas töös kirjeldatud proovide kogumiseni aastal 2023. Joonisele on märgitud proovivõtu ajad ning teadustööd, kus kirjeldatakse *pheBA* operoniga tüvede või järjestuste tuvastamist.

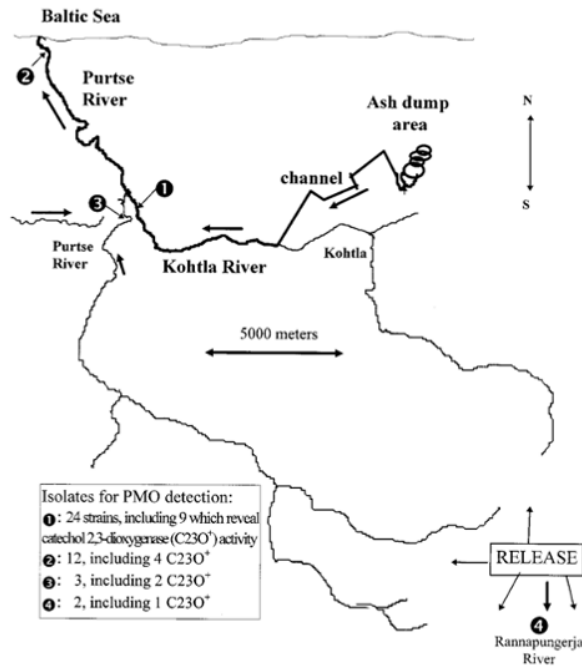
Kuus aastat pärast “Estonia” kaevanduse põlengujärgset biotervendust, 1994. aastal põlevkivitööstuse piirkonnas veekogudest võetud proovidest isoleeriti 41 tüve, mis kasvasid fenoolil. Katabolismi radade uurimiseks kasutati hübriidiseerimisel *pheA*, *dmpKLMNOP* ja *tbuD* proove. Kõige enam, 18 tüve, hübriidiseerusid *dmpKLMNOP* prooviga. Nendest neljal oli ka madalal tasemel hübriidisatsioon *tbuD*-ga. *pheA* prooviga hübriidiseerusid 13 tüve, mis kõik olid pärit poolkõksimägedest allavoolu jäävatest proovipunktidest (Joonis 10a) 1 (7 tüve) ja 2 (6 tüve). 10 tüve ei näidanud hübriidisatsiooni ühegi uuritud prooviga. Täpsemalt kirjeldati üheksat (9) *pheA* proo-

viga hübridiseerunud tüve, nendest kaheksal oli üks või mõlemad IS elemendid säilinud samas järjestuses, nagu biotervendamisel kasutatud PaW85 baasil konstrueeritud tüvel. Andmed ei kinnita algse PaW85 tüve ellu jäämist. (Peters *et al.*, 1998)

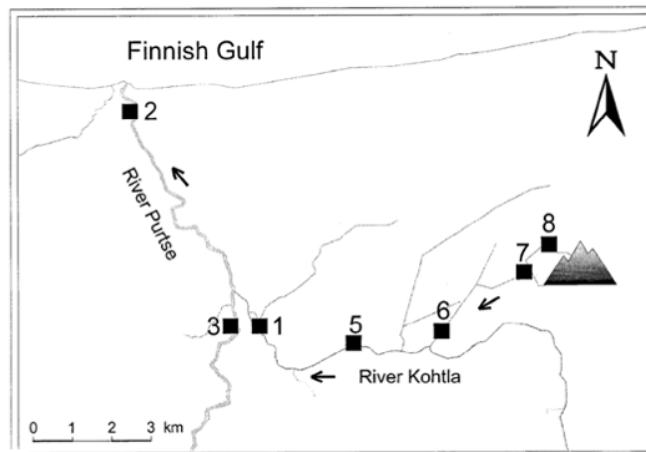
Ka E. Heinaru *et al.* (2000) avaldatud artiklis kirjeldatakse aastatel 1993-1995 võetud proovidest eraldatud 39 fenooli ja p-kresooli lagundavat tüve, millest üheteistkümmel tehti kindlaks *pheA* olemasolu. Nendest proovidest isoleeriti *Pseudomonas fluorescence* tüvi PC20 proovipunktist 1 (joonis 10b). Tüvi PC20 kannab kolme plasmidi: pPHE20, pNAH20 ja pG20 ( kõik on IncP-9 mittesobivusgrupi plasmiidid). Mobiliseeritav pPHE20 sisaldab *pheBA* operoni ja tolueni transporterit kodeerivat ala, ülekandumiseks vajab plasmiidil pNAH20 paiknevaid geene. Plasmiidilt pG20 ei kodeerita metaboolseid geene, aga kodeeritakse raskemetallide transportereid. Seda kinnitas ka pG20 kandvate tüvede kasv kõrgematel vase ja tsingi ionide kontsentratsioonidel. pG20 on tõenäoliselt ise edasikanduv, sellel on olemas *tra* geenid. Konjugatsiooni katsetes siiski pG20 edasi ei kandunud, samal ajal kui pPHE20 ja pNAH20 kandusid retsipienti. Seega ei osale pG20 teiste plasmiidide konjugatsioonil. pPHE20 oli ainus samas artiklis uuritud *pheBA* operoni kandvatest plasmiididest, millel oli säilinud katkestamata *IS1411*, samuti leidub PC20 kromosoomis *IS1411* element kahes koopias. ((Elken *et al.*, 2020)

23 aastat hiljem ehk 2012. aastal kogutud proovidest (joonis 10c) isoleeritud DNAlt tuvastati *pheBA* operon. Neljast analüüsitud proovist ühes (nr 3, joonis 10c) saadi *pheA* spetsiifiliste praimeritega amplifitseerides geenifragment, mis oli identne tüve PC20 vastava järjestusega. Lisaks tehti kindlaks, et kolmandast proovipunktist isoleeritud DNA sisaldab *pheBA* kandva plasmidi pPHE20 järjestust, millest järeldati, et operon on säilinud ja üle kandunud plasmiidisel kujul. (Õispuu, 2013)

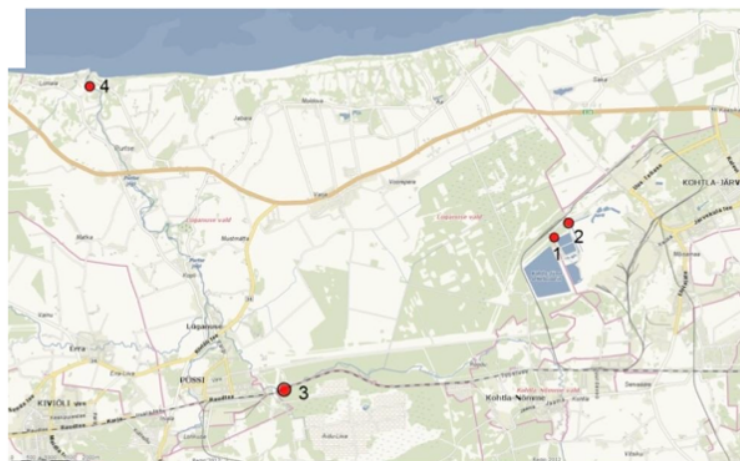
a)



b)



c)



Joonis 10: Peters (1997) töös kirjeldati isolaate punktides märgitud kaardil a., Heinaru (2000) töös kirjeldatud tüved olid pärit punktides märgitud kaardil b.Õispuu (2013) töös kirjeldatud proovivõtu kohad on märgitud kaardil c.

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1 Töö eesmärgid

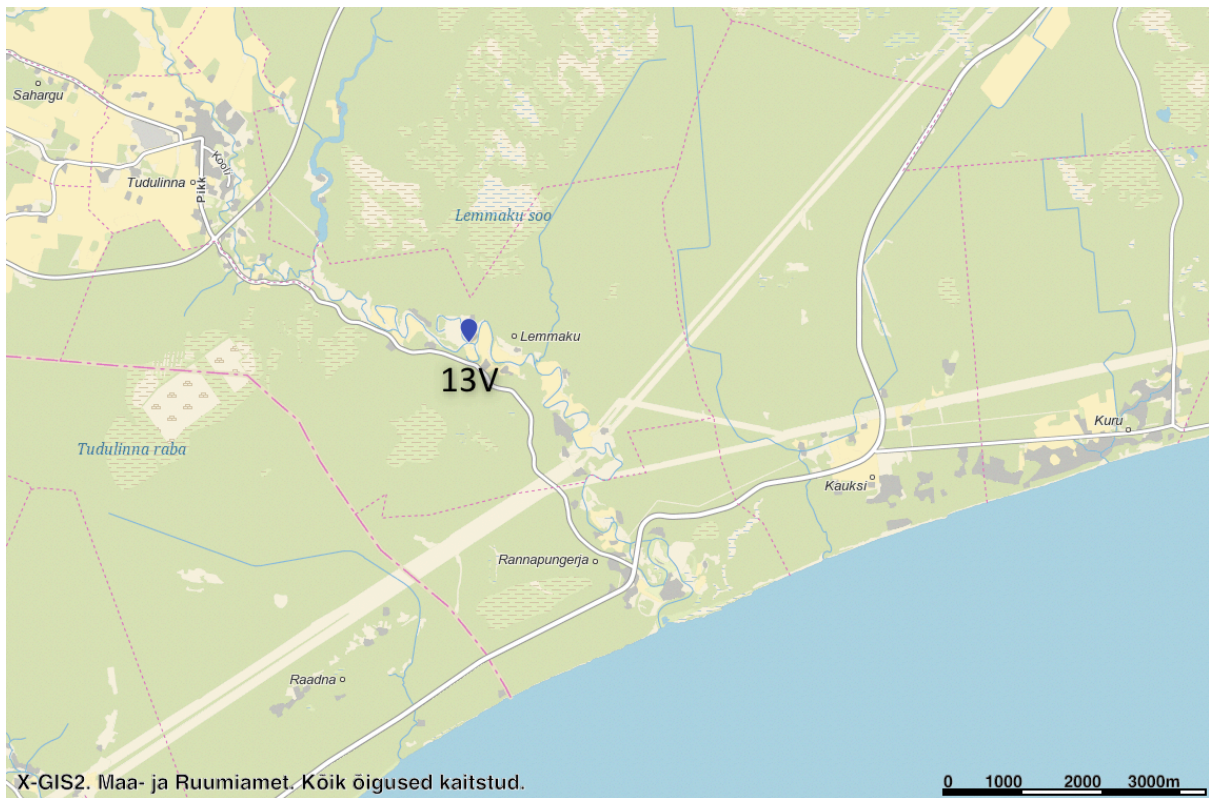
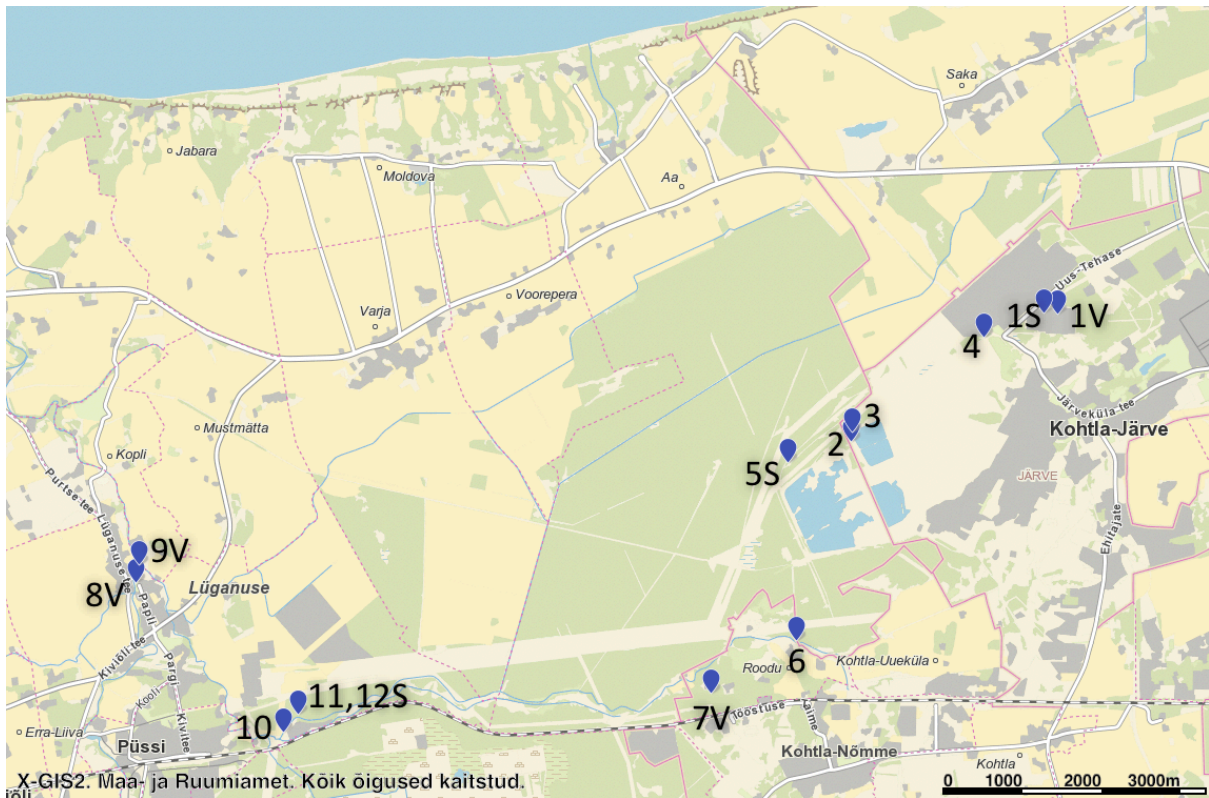
2023. aastal toodi erinevatest Ida-Virumaa põlevkivitööstusega seotud aladelt ning ümbritsevatest jõgedest keskkonnaproovid, et isoleerida aromaatsiid ühendeid lagundavaid bakteritüvesid, kasutamaks neid tulevikus reostunud alade bioremediatsioonis. Lisaks sooviti leida *pheBA* operoni. 1988. aastal Ida-Virumaal puhkenud "Estonia" kaevanduse põlengu kustutustööde käigus saastunud kustutusvee puhastamiseks kasutati just seda operoni kandvat tüve. Sellest tulenevalt on antud uurimistöö eesmärgid järgmised:

- kirjeldada põlevkivitööstuse piirkonna vee- ja setteproovidest isoleeritud naftaleeni minimaalsöötmeel kasvavate tüvede fülogeneetilist mitmekesisust;
- määrata naftaleeni ja fenooli lagundamisradade võtmeensüüme kodeerivate geenide järjestused;
- kirjeldada käesoleva töö raames isoleeritud tüve 2S2RP1 *pheBA* operoni kandvat plasmidi.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Proovide kogumine ja tüvede isoleerimine

Antud töös kirjeldatud bakterid eraldati 13 proovipunktist (joonis 9, lisa 1) 15. septembril 2023. Kolm proovi võeti VKG lähistelt (punktid 1, 2, 3), üks poolkoksi mägede lähistelt (punkt 4) ja kaheksa proovi veeteedega ühendatud paikadest tööstuse mõjualalt allavoolu (punktid 5 - 12). Proovipunktide paiknemine on toodud joonisel 10. Proovipunkt 13 asus Rannapungerja jõel ning on kaugemal põlevkivitööstuse piirkonnast.



Joonis 10. proovipunktid on tähistatud hallide nooltega ja märgitud 1 - 13.

Proovid säilitati 4 °C juures kuni väljakülvideni, mis teostati 18.09. Väljakülvideks lisati 1 g sedimendi proovi kohta 9 ml 0,9% NaCl lahust või tehti veeproovidest lahjendused. Proovid kanti 2,5 mM fenooli, 2,5 mM naftaleeni ja 2,5 mM m-toluaadi minimaalsöötmetele ((1xM9 (10xM9: 70 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g l<sup>-1</sup> NaCl, 10 g l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, pH 6,8; Adams, 1959), 1x mikroelementide segu ME (400xME: 10,75 g l<sup>-1</sup> MgO, 2 g l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, 51,3 ml l<sup>-1</sup> HCl, 4,5 g l<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O, 1,44 g l<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O, 1,12 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> \* 4H<sub>2</sub>O, 0,25 g l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O, 0,28 g l<sup>-1</sup> CoSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O, 0,06 g l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; Bauchop ja Elsdén, 1960); 1,5% agar) ning R2A söötmele. Käesolevas töös käsitletakse naftaleeni söötmel kasvama läinud tüvesid, mis märgistati koodidega VN või SN, vastavalt vee- või sedimendiproovist saadud isolaadid.

*pheBA* operoni kandvate tüvede isoleerimiseks teostati rikastuskülvid fenooli minimaalsöötmetel (hallitusseente kasvu pärssimiseks lisati söötmele 50 ug/ml tsükloheksimiid (Acros Organics)). Võeti 250 ml kolvid 50 ml veeprooviga ning lisati fenooli lõppkontsentratsioonini 2,5 mM. Samuti võeti 5 g sedimendiproovi, millele lisati 45 ml 2,5 mM fenooli minimaalsööde. Mõlemad proovid pandi loksutile (25 °C; 100 rpm; Infors HT Multitron). Seitsme päeva möödumisel tehti kolbidest ümberkülvid uude fenooli minimaalsöötmesse (5 ml suspensiooni +45 ml 2,5 mM fenooli söödet). Tüvede isoleerimiseks tehti külvid 2,5 mM fenooli söötmeplaatidele. Esimesest ja teisest rikastusest pärinevate tüvede koodid sisaldavad vastavalt tähiseid R ja 2R.

Otsekülvide tassidelt külvati 2,5 mM fenool + 50 ug/ml tsükloheksimiid (Acros Organics) ja kingB tassidele sektoritesse erinevad kolooniad, mis said tähised VP, SP fenooli otsekülvid vee ja sedimendi proovist, VT, ST tolueeni otsekülvid vee ja sedimendi proovist või VN, SN naftaleeni otsekülvid vee ja sedimendiproovist.

Vee rikastusprooviks lisati 50 ml proovile fenooli 2,5 mM kontsentratsioonini ja sedimendi rikastusprooviks lisati 5 g (punktidel 1, 4, 5, 10, 12), 4g (punkt 11) või 2,5 g (punktidel 2, 3) sedimenti vastavalt 50 ml, 40 ml või 25 ml M9+ME+2,5 mM fenooli söötmesse, mida hoiti 250 ml kolvides 25 °C juures 100 rpm loksutis.

Teiseks rikastuseks tõsteti 5 ml esimest rikastust 45 ml M9+ME+2,5 mM fenooli + seenemürgi söötmesse.

Rikastuskülvidest tehti väljakülvid 2,5 mM + 50 ug/ml tsükloheksimiid tassidele. Erinevad kolooniad külvati 2,5 mM fenool + 50 ug/ml tsükloheksimiid ja kingB tassidele sektoritesse ja sedimendi rikastused tähistati SPR ja vee rikastused tähistati VPR.

Puhaskultuuride saamiseks tehti naftaleeni minimaalsöötmel välja kasvanud visuaalselt erinevatest kolooniatest lahjenduskülvid R2A söötmele (0,5 g l<sup>-1</sup> pärmiekstrakt, 0,5 g l<sup>-1</sup> pepton, 0,5 g l<sup>-1</sup> CAA, 0,5 g l<sup>-1</sup> glükoos, 0,5 g l<sup>-1</sup> lahustuv tärklis, 0,3 g l<sup>-1</sup> Na-püruvaat, 0,3 g l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 15 g l<sup>-1</sup> agar). Pikaajaliseks säilitamiseks kasvatati isoleeritud ja tuvastatud tüved üleöö R2A vedelsöötmes 30 °C, 180 rpm juures. Tüved säilitati -80 °C kraadi juures R2A ja glütserooli 1:1 segus CELMS kollektsioonis. ([https://eemb.ut.ee/celms/main\\_list.php](https://eemb.ut.ee/celms/main_list.php)).

### 2.2.2 Füsioloogilised testid

Uuritud tüvedel määrati tsütokroom c oksüdaasi olemasolu oksüdaastesti ribadega (Sigma-Aldrich) ja fluorestseeruvate siderofooride tootmist KingB söötmele (20 g<sup>-1</sup> pepton, 10 g<sup>-1</sup> glütserool, 1,5 g<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O, 1,5 g<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g<sup>-1</sup> agar, pH 7,2; Millipore). Tüved kanti 2,5 mM fenooli ja 2,5 mM salitsülaadi minimaalsöötmetele, et määrata nende võime kasutada fenooli ja salitsülaati süsinikuallikana. Katehhooli 2,3-dioksügenaasi olemasolu tuvastamiseks kanti fenooli ja salitsülaadi minimaalsöötmele kasvavale bakterimassile 5 µl 0,5% katehhooli lahust, positiivse tulemuse korral värvus biomass kollaseks.

### 2.2.3 PCR ja geelelektroforees

DNA eraldamiseks suspendeeriti väike kogus üleöö kasvatatud rakke (R2A sööde, 30 °C juures) 25 µl mQ vees. Rakud lüüsi 15 minuti jooksul 96 °C juures PCRi masinaga (Eppendorf Mastercycler). Lüsaat tseentrifuugiti 1 min 13 000 rpm juures (Heraeus Biofuge Pico). DNA amplifitseerimiseks kasutati PCRi. Reaktsioonisegu lõppmahuga 25 µl sisaldas lõppkonsentratsioonidega puhver 2,5 mM (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-MgCl<sub>2</sub>; 0,01% Tween20), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 µM primereid F ja R (Tabel Y), 0,2 mM nukleotiide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 U Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). 16S rRNA geenifragmendi amplifitseerimiseks lisati PCR segusse raku lüsaadi supernatanti 0,5 µl ja *nahG*, *LmPH* ning *pheA* amplifitseerimiseks lüsaadi supernatanti 3 µl.

PCR programm geenifragmentide amplifitseerimiseks algas ühekordse denaturatsiooni etapiga 95 °C juures 180 s. Järgnes kolme etapiline tsükkel 35 korduses, mille esimene etapp, denaturatsioon, kestis 45 s 94 °C juures, teine etapp, praimerite seondumine kestis 45 sekundit, praimeritele vastaval temperatuuril (16S rDNA, *nahG* ja *pheA* konstantsel temperatuuril vastavalt tabelile 1, *LmPH* korral 5 tsükli 58 °C juures, 5 tsükli 57 °C juures ja 25 tsükli 56 °C juures), ning kolmas etapp elongatsioon kestis 90 s 72 °C juures. Viimane etapp oli elongatsioon temperatuuril 72 °C 480 s.

Tabel 1. Töös kasutatud praimerid

Märklaud	Praimeri nimetus	järjestus 5'-3'	t °C	produkti pikkus, ap	viide
16S rDNA	PCR I SEQ1	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GTATTACCGCGGCTGCTGG	53	~480	Weisburg et al., 1991 Vedler et al., 2000
<i>nahG</i>	nahGF3 nahGR2	GGGCTTGAGGACGCCTATTTTC GTTGCACACGACAGGCA TGAG	61		Barrow 2022
<i>LmPH</i>	pheUf pheUr	CCAGG(C/G)(C/G/T)GA(G/A)AA(A/G)G AGA(A/G)GAA(G/A)CT CGG(A/T)A(G/A)CCGCGCCAGAACCA	58→56	~580	Futamata et al 2001
<i>pheA</i>	PheA1 PheA2	CAGGATCGAATATCGGTGGCCTCG CTTCACGCTGGCGTAACCAATCGC	61	947	Heinaru et al., 1997

Eeldatud suurusega geeniproduktide tuvastamiseks PCR-i segust kasutati geelelektroforeesi. Selleks valmistati 1% agarosgeel TAE puhvriga (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2), millele lisati DNA visualiseerimiseks 0,5 µg/ml etiidiumbromiidi. 6 µl PCR produkti segati 1 µl laadimispuhvriga, produktide suuruste hindamiseks kasutati 3 µl GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) suurusmarkerit. Forees viidi läbi TAE puhvril 17 minutit 100 voldi juures. Tulemused visualiseeriti UV valguslual.

Antud töös kasutati multikomponentse fenooli hüdroksülaasi tuvastamisel referentsina *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve C70, mis eraldati 2008. aastal Soome lahe pindmisest veekihist Narva lähistelt. Sellel on multikomponentne fenooli hüdroksülaas ja kaks

fülogeneetiliselt erinevat C23O geeni. (Jõesaar, 2017; Velder 2013) *nahG* ja *pheA* positiivseks kontrolliks kasutati tüve PC20.

#### 2.2.4 Sekvenerimine

Amplifitseeritud 16S rRNA ja *LmPH* geenifragmendid sekveneriti kasutades Sangeri meetodikat. PCR produktid töödeldi 0,36 U  $\mu\text{l}^{-1}$  Exo I (Thermo Scientific, Leedu) ja 0,14 U  $\mu\text{l}^{-1}$  SAPiga (Thermo Scientific, Leedu) 15 minutit 37 °C juures ja ensüümid inaktiveeri 15 minuti jooksul 80 °C juures (Eppendorf Mastercycler).

Reaktsioonisegu lõppmahuga 10  $\mu\text{l}$  koostati vastavalt BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Leedu) kiti juhendile. Sekvenerimisreaktsioon teostati PCR-i masinas, esimeses etapis 15 sekundi jooksul DNA ahelad denatureeriti 95 °C juures, teises etapis toimus praimerite seondumine 10 sekundi jooksul (vastavalt Tabelis Y toodule) ja kolmandas etapis toimus 45 sekundit DNA sünteesi 60 °C juures. Tsüklit korrati 35 korda.

Reaktsioonisegust DNA sadestamiseks lisati 10  $\mu\text{l}$  proovile 2  $\mu\text{l}$  dekstraani, 30  $\mu\text{l}$  külma 96% etanooli ja pandi 15 minutiks -20 °C juurde külmkappi. Peale 15 minuti möödumist proovid tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge 5418 R; 15 minutit 14 000 rpm; 4 °C). Supernatant eemaldati veejoa pumbaga. DNA sade pesti 200  $\mu\text{l}$  70% etanooliga. Peale proovide segamist tsentrifuugiti DNA 4 minutit 4 °C juures. Supernatant eemaldati taas veejoa pumbaga ja proovidel lasti lahtise korgiga kuivada, kuni kogu etanool oli ära auranud. Sademele lisati 10  $\mu\text{l}$  100% formamiidi. Geenifragmentide nukleotiidne järjestus määrati täisautomaatse kapillaarsekvenaatoriga 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) Genoomika instituudi tuumiklaboris.

#### 2.2.5 Järjestuste bioinformaatiline analüüs

Sekveneritud 16S rRNA ja *LmPH* geenifragmentide järjestustele leiti vasted blastn programmiga NCBI veebirakenduse abil (*Basic Local Alignment Search Tool*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Vasteid otsiti *nucore* ehk *core nucleotide* andmebaasist (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>), kust on välja filtreeritud keskkonna proovide ja tundmatute tüvede andmed, ja RefSeq andmebaasist (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). Andmete visualiseerimiseks puu kujul joondati nukleotiidsed järjestused MEGA 11 programmiga MUSCLE algoritmiga (Edgar, 2004). Fülogeneetilise puu koostamiseks kasutati programmi MEGA 11 ja naabrite ühendamise meetodit (Saitou & Nei 1987). Puu

usaldusväärseuse hindamiseks teostati *bootstrap* analüüs 1000 korduses. Puu visualiseeriti veebirakendusega iTOL v7 (<https://itol.embl.de/>).

### 2.2.6 Operoni *pheBA* kandev tüvi

Tüvi 2S2RP1 genoomne DNA eraldati Wizard genomic DNA purification (Promega, A1120) kitiga ning sekveeriti Prof. Christopher Voigt laboris (Massachusetts Institute of Technology, USA). Genoomi annotatsioon viidi läbi tarkvaraga Bakta v1.6.1 (<https://www.github.com/oschwengers/bakta>), kasutades andmebaasi versioon 4.0. Kasutatud meetod põhineb Oschwengersi jt (2021) kirjeldatud töövool. Genoomi võrreldi tüüp tüvedega TYGS programmi abil (<https://tygs.dsmz.de/>).

Genoomi ja plasmidi visualiseerimiseks kasutati programmi Proksee veebirakendust (<https://proksee.ca/>). Genoomis spetsiifiliste järjestuste tuvastamiseks viidi läbi järjestuse võrdlus blastn programmiga Proksee keskkonnas.

## 2.3 Tulemused ja arutelu

Kirde-Eesti on põlevkivi kaevandamise ja töötlemise piirkond. Põlevkivi töötlemine saastab ümbritsevat keskkonda ning pideva reostusega aladel on välja kujunenud spetsiifilised mikroobikooslused. 1989. aastal kasutati piirkonnas biotervendusel tüve, millesse oli viidud plasmiid laboris konstrueeritud *pheBA* operoniga (Peters *et.al.*, 1997). Looduslike mikroobikoosluste uurimine on oluline, et tuvastada reostust lagundavaid tüvesid, millel on potentsiaali tulevikus biotervenduseks kasutamisel, ning jälgida varasema biotervenduse mõju kooslusele.

### 2.1 Isoleeritud tüvede fülogeneetiline mitmekesisus

2023. aastal võeti kolmeteistkümnest proovipunktist (joonis 10) vee- ja sedimendiproovid ning tehti väljakülvid naftaleeni minimaalsöötmele. Morfoloogiliselt erinevatest kolooniatest tehti lahjenduskülvid ning puhaskultuuridel määrati tsütokroom c olemasolu, siderofooride tootmine, võime kasvada fenoolil ja salitsülaadil, katehhooli 2,3-dioksügenaasi olemasolu ning fülogeneetiline kuuluvus 16S rRNA geenifragmendi alusel (Lisa 2 ja 3). Töö käigus kirjeldati 89 naftaleeni lagundavat tüve, millest 57 eraldati sedimendiproovidest ja 32 tüve veeproovidest.

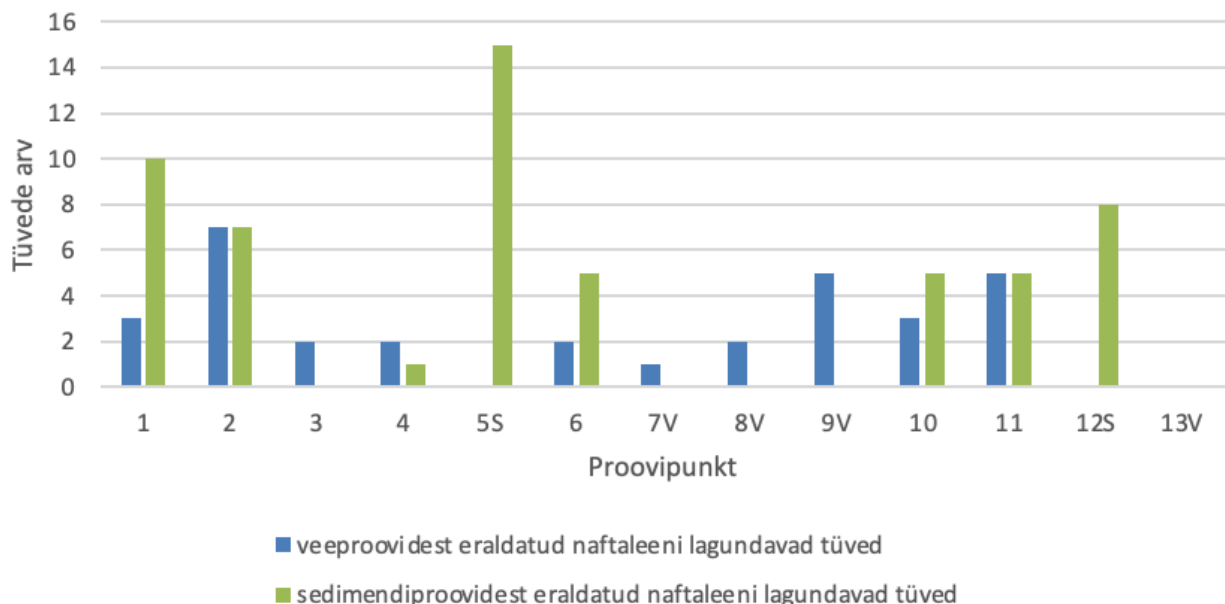
Tüvede jaotumist proovipunktide vahel näitab joonis 11. Kõige enam erinevaid puhaskultuure proovitüüpide peale kokku isoleeriti proovipunktist 5, kust võeti vaid sedimendiproov ning saadi 15 tüve. Proovipunkt 5 asus tugeva jääkreostusega alal, niinimetatud “fenoolisoos”, mis võib olla ka seletus suurele naftaleeni lagundavate tüvede arvukusele. Kõige enam tüvesid veeproovide lõikes, seitse tüve, eraldati proovipunktist 2. Antud proov võeti VKG uuest kanalist, mis asub poolkoksi prügila lähedal, kus reostuskoormus võib olla suur.

Kõige vähem arv tüvesid, üks, eraldati proovipunktist 7. Selles proovipunktis võeti proov kraaviveest, mis oli ligikaudu 300 m eemal Kohtla jõest, mille valgjalal asub VKG õlitehas ja poolkoksi prügila. Tõenäoliselt on kontakt jõega määrav naftaleeni lagundavate tüvede arvukusele, mida tõestab ka see, et proovipunktist 6, mis asub punktist 7 vaid 1,3 km kaugusel Kohtla jõel, on tüvede summaarne arv 7. Proovipunktidest, kus võeti nii vee- kui sedimendiproov, leiti kõige väiksem arv tüvesid punktist 3, kust eraldati veest kaks tüve ja sedimendist tüvesid ei saadud. Proovipunktist 3 võeti proovid biotiigist poolkoksi prügila kõrvalt ja tüvede vähesust võib seletada fakt, et tegu on seisuveekoguga ja võrreldes jõgedest

võetud proovidega on vesi liiga hapnikuvaene naftaleeni aeroobsetele lagundajatele. Naftaleeni lagundavaid tüvesid ei tuvastatud proovipunktist 13, mis võeti Rannapungerja jõest Järuska silla juurest, ligikaudu 43 km kauguselt poolkoksi prügilast, eeldatavalt selle mõjualast väljas. Rannapungerja jõkke ei suubu poolkoksi prügilaga ühenduses olevaid vooluveekogusi, seega on eeldatavalt madal PAHide sisaldus ja puudub selektiivne surve naftaleeni lagundamisele.

Veeproovidel mõõdeti ka pH ja kõigil peale ühe jäid väärtused vahemikku 7,15 - 8,87. Selles vahemikus võib leida nii neutrofiile kui alkalifiile. Kõige erandlikum oli poolkoksimäe jalamilt, punktist 4, võetud proovi pH, kus selle väärtus oli 10,9, mida taluvad vaid alkalifiilid (Heinaru *et.al.* 2022). Andmetest ei tule välja seost saadud tüvede arvu ja pH vahel. Proovipunktist 11, kus saadi kõige enam tüvesid veeproovist oli vee pH 8,03 ja punktis 7, kus saadi kõige vähem vee tüvesi oli pH väärtus 8,06 (Lisa 1).

Proovides ei määratud naftaleenilagundajate üldarvukust, kuid proovipunktist eraldatud erinevate tüvede arvu põhjal saab hinnata naftaleeni lagundavate bakterite mitmekesisust. Naftaleeni lagundavate bakterite mitmekesisus oli suurim jääkreostusega alal (punkt 5). Väikseim reostus oli piirkondades (punkt 7, 13), mis asusid kaugemal jõest, mille valgalal asub õlitehas ja poolkoksi prügilala.



Joonis 11. Naftaleeni minimaalsõõtmelt isoleeritud tüvede arv proovipunktide kaupa, välja on toodud vee- ja sedimentiproovidest isoleeritud tüvede arvud.

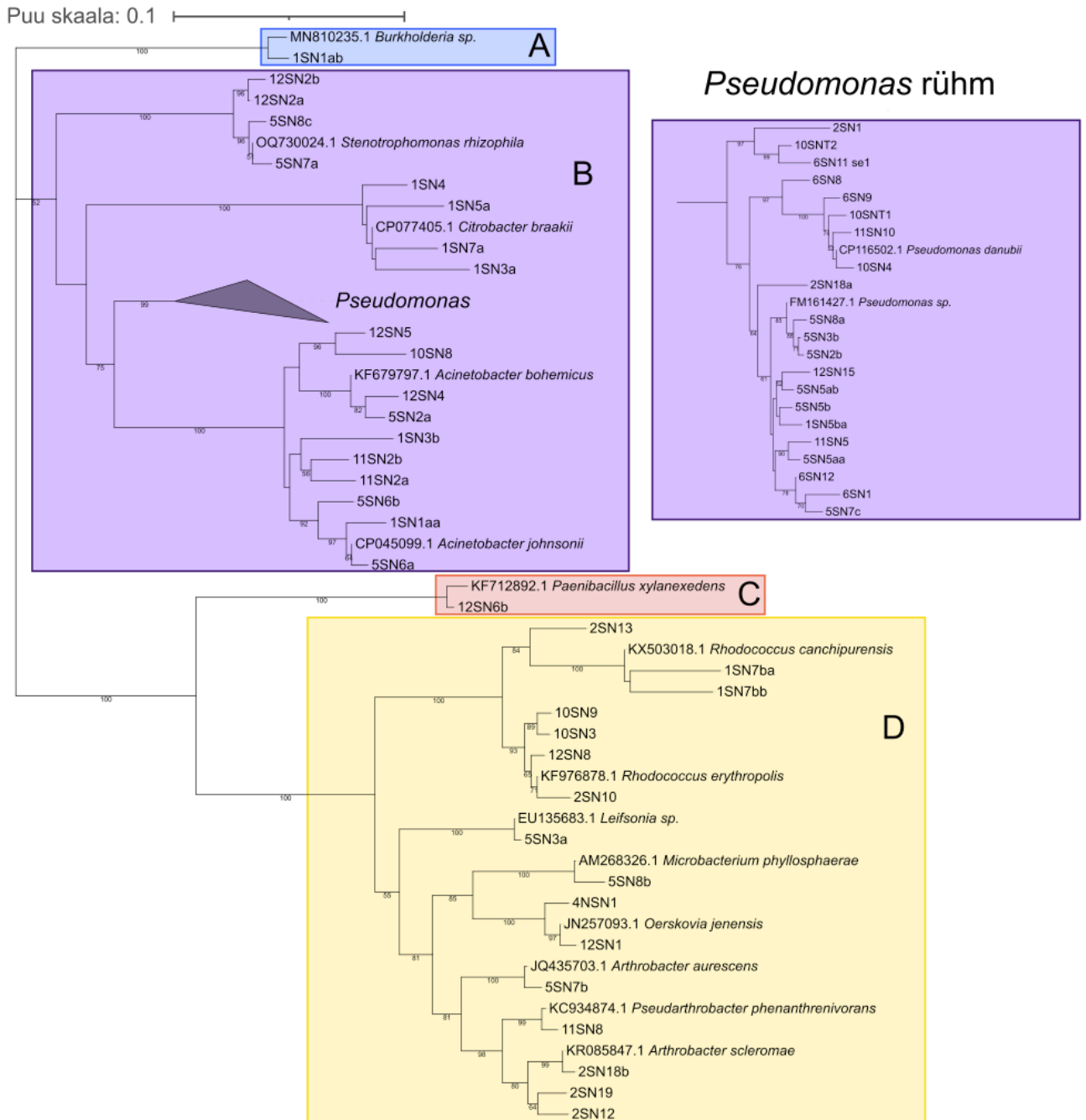
Isoleeritud tüvedel sekveneeriti 16S rRNA geenifragmendi järjestus, mida võrreldi BLAST programmi abil *nucore* andmebaasis olevate järjestustega (Lisa 2 ja 3). Eraldatud tüved kuulusid kahte riiki, *Pseudomonadati* (64) ja *Bacillati* (23) jagunedes vastavalt Gram negatiivseteks ja Gram positiivseteks bakteriteks.

*Pseudomonadati* riigist olid esindatud hõimkonnad *Bacteroidota* ja *Pseudomonadota*. *Bacteroidota* hõimkonda esindab vaid üks tüvi. *Pseudomonadota* hõimkond jagunes *Gammaproteobacteria* ja *Betaproteobacteria* klassideks, millest oli suures ülekaalus *Gammaproteobacteria* (98 %) (Lisa 1). Ka teistes töodes on PAHidega saastunud looduslikes kooslustes peamine hõimkond *Pseudomonadota*. Erinevalt antud töös saadud tulemustest on seevastu sageli *Gammaproteobacteria* klassi kõrval tugevalt esindatud ka *Alphaproteobacteria* klass, millest tihti on välja toodud perekond *Sphingomonas* (AITKELDIYEVA, 2020; Alquati, 2005, Bastiaens 2000).

Riik *Baccillati* oli esindatud hõimkondadega *Actinomycetota* ja *Bacilli*, millest viimane oli esindatud vaid ühe tüvega. Erinevalt antud ja eelmainitud tööst on leitud ka kooslusi, kus domineerivad hoopis Gram positiivsed bakterid, näiteks Alquati (2005) poolt kirjeldatud Itaalia reostunud pinnase proovid, kus arvukaimad perekonnad olid hõimkonna *Actinomycetota* esindajad *Rhodococcus* ja *Arthrobacter*, kes on mõlemad esindatud ka käesolevas töös uuritud proovides.

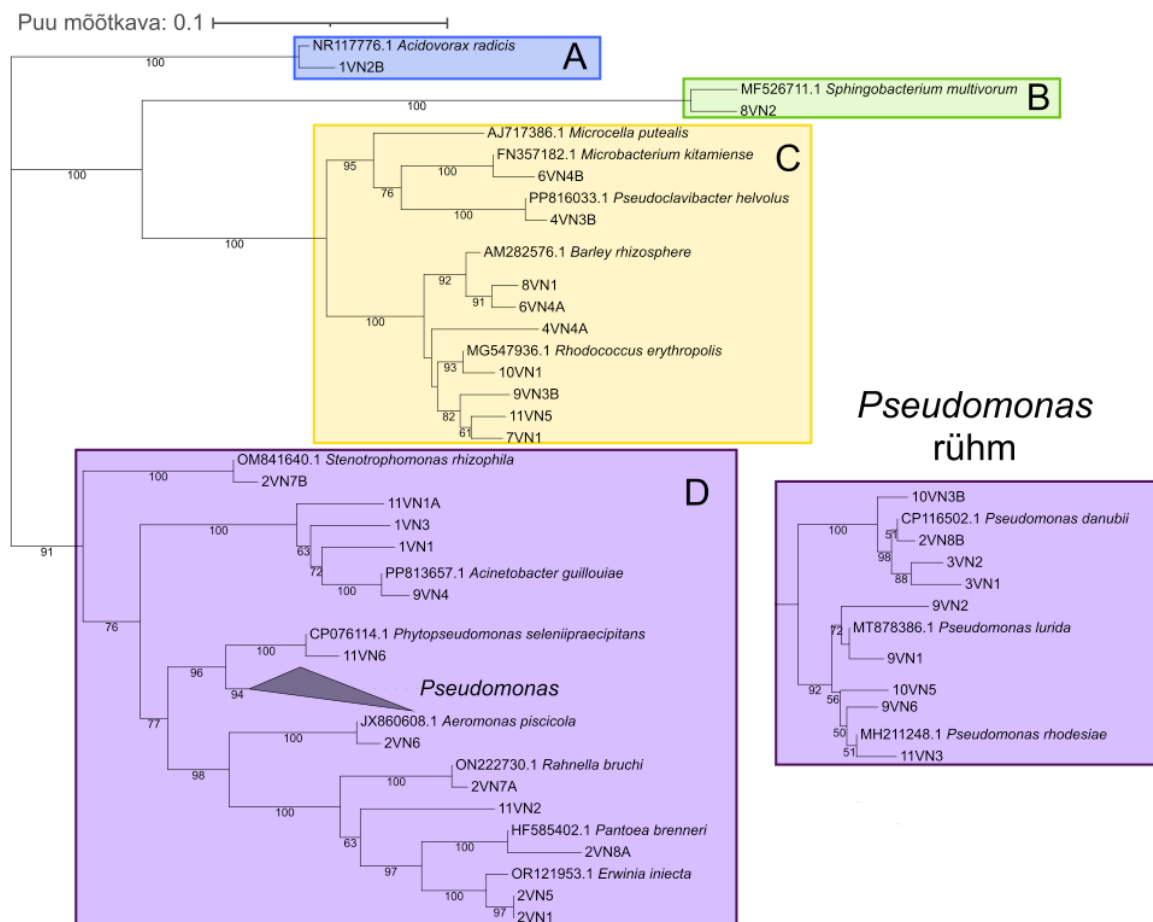
16S rRNA geenijärjestuse järgi kuulusid tüved 20 erinevasse perekonda (Lisa 2 ja 3). Kõige arvukamalt oli esindatud perekond *Pseudomonas*, kuhu määrati 30 tüve 89-st, millest 21 eraldati sedimendiproovidest ja 9 veeproovidest. Mõlemas proovitüübis olid veel esindatud 14 tüvega *Acinetobacter*, millest 10 eraldati sedimendiproovidest ja 4 veeproovidest ning *Rhodococcus*, mida eraldati 7 kummastki proovitüübist. Vee- ja sedimendiproovides kattusid veel perekonnad *Stenostreptomonas* ja *Microbacterium* kuue ning kahe tüvega vastavalt. Ainult sedimendiproovides olid esindatud ühe kuni nelja tüvega perekonnad *Citrobacter*, *Arthrobacter*, *Oerskovia*, *Pseudarthrobacter*, *Burkholderia*, *Leifsonia*, ja *Paenibacillus*. Ainult veeproovides olid esindatud ühe või kahe tüvega perekonnad *Erwinia*, *Serratia*, *Phytoseudomonas*, *Aeromonas*, *Rahella*, *Pantoea*, *Pseudoclavibacter*, *Acidovorax* ja *Sphingobacterium*.

Naftaleeni lagundavad tüved kuulusid üksikutesse klassidesse, kuid tüvede perekondade mitmekesisus oli suur. Kusjuures oli erinevate perekondade arv suurem veeproovidest pärit tüvede seas.



Joonis 12. Sedimentiproovidest eraldatud tüvede fülogeneetiline puu 16S rRNA geenifragmendi põhjal. Puul on toodud referentstüved liigi nime ja GenBank ID numbriga. Puu on jaotatud klasside alusel nelja klastrisse: A *Betaproteobacteria*; B *Gammaproteobacteria*; C *Bacilli*; D *Actinomycetes*. Klastris B kolmnurgaga märgitud *Pseudomonas* rühm on toodud joonise kõrval välja. Puu koostati naabrite ühendamise meetodil. Mõõtkava vastab 0,1 ap vahetusele 1 ap kohta. Puule on märgitud *bootstrap* väärtused alates 50.

Sekveneeritud 16S rRNA geenijärjestuse põhjal koostati kaks fülogeneetilist puud, üks sedimendiproovidest saadud tüvedele (joonis 12) ja üks veeproovidest saadud tüvedele (joonis 13). Mõlemal puul jaotusid tüved klasside põhjal nelja klastrisse. Sedimendiproovidest eraldatud tüvede puul olid need (A) *Betaproteobacteria*, (B) *Gammaproteobacteria* (C) *Bacilli*, (D) *Actinomycetes*. Veeproovidest eraldatud tüved puul olid need (A) *Betaproteobacteria*, (B) *Sphingobacteria*, (C) *Actinomycetes*, (D) *Gammaproteobacteria*.



Joonis 13. Veeproovidest eraldatud tüvede fülogeneetiline puu 16S rRNA geenifragmendi põhjal. Puul on toodud referents tüved liigi nime ja GenBank ID numbriga. Puu on jaotatud klasside alusel nelja klastrisse: A *Betaproteobacteria*; B *Sphingobacteria*; C *Actinomycetes*; D *Gammaproteobacteria*. Klastris D kolmnurgaga märgitud *Pseudomonas* rühm on toodud joonise kõrval välja. Puu koostati naabrite ühendamise meetodil. Mõõtkava vastab 0,1 ap vahetusele 1 ap kohta. Puule on märgitud *bootstrap* väärtused alates 50.

## 2.2 Naftaleeni ja fenooli lagundamise võtmeensüümide tuvastamine ja iseloomustamine

Saastunud veest ja sedimendist eraldatud naftaleeni lagundavatel tüvedel uuriti naftaleeni ja fenooli lagundamisradade võtmeensüümide olemasolu vastavate geenide amplifitseerimise abil. Tüvedest otsiti naftaleeni lagundamisraja alumise *sal* operoni salitsülaadi 1-hüdroksülaasi kodeerivat geeni *nahG*, fenooli multikomponentse hüdroksülaasi suurimat subühikut kodeerivat geeni *LmPH* ja monokomponentse fenooli hüdroksülaasi kodeerivat geeni *pheA*. Samuti kirjeldatakse antud töös lähemalt eraldatud tüvede füsioloogilisi näitajaid (tsütokroom c olemasolu, siderofooride tootmist, võimet kasvada fenoolil ja salitsülaadil, katehhooli 2,3-dioksügenaasi olemasolu; lisa 2, 3) ja nende seoseid tuvastatud kataboolsete geenidega.

Tsütokroom c oksüdaas oli 24 sedimendiproovidest eraldatud tüvel ja 11 veeproovidest eraldatud tüvel (lisa 2, 3). Üldiselt on perekonda *Pseudomonas* kuuluvatel tüvedel olemas tsütokroom c oksüdaas. Fluorestseeruvaid siderofoore (samuti iseloomulik tunnus pseudomonaadidele) tootsid 16 sedimendiproovidest eraldatud tüve ja 9 veeproovidest eraldatud tüve (lisa 2, 3).

Salitsülaadi minimaalsöötmel kasvasid 30 sedimendiproovist ja 14 veeproovist eraldatud tüve (lisa 2, 3). Salitsülaat on naftaleeni lagundamise raja vaheprodukt, seega võib järeldada, et need tüved kasutavad naftaleeni lagundamiseks vaheproduktina salitsülaati. Teised 45 tüve kasutavad tõenäoliselt naftaleeni lagundamiseks mõnda teist vaheühendit, näiteks 3,4-dihüdroksübensoehapet, või vajavad salitsülaadi lagundamise ensüümide transkribeerimiseks naftaleeni lagundamise rajas varem tekkivaid vaheühendeid (Travkin 2021).

Naftaleeni lagundamisraja alumise *sal* operoni geeni *nahG* ei tuvastatud esimesel kolmandikul testitud tüvedest ja seetõttu otsustati lõpetada *nahG* geeni tuvastamine. Põhjused, miks *nahG* ei õnnestunud tuvastada, esiteks tüved kasutavad salitsülaadi lagundamiseks gentisaadi rada, või lagundamisrada, mida pole veel hästi kirjeldatud. Teiseks, geeni tuvastamine võis osutuda võimatuks ka tehnilistel põhjustel, praimeripaar *nahGF3* ja *nahGR2* oli disainitud kindlate tüvede (*P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* F PC20, *P. putida* tüved G7 ja NCBI 98 16-4) *nahG* geeni määramiseks (Smirnova, 2019).

Fenooli minimaalsöötmel kasvas 26 sedimendiproovidest ja 12 veeproovidest eraldatud tüve

(Lisa 2 ja 3) . Sedimendiproovidest eraldatud tüvede puhul tuli esile proovipunkt 2, kust eraldatud tüvedest 71% suutsid kasutada fenooli süsinikuallikana. Kõrge fenooli lagundavate tüvede osakaal on ootuspärane, kuna proov võeti VKG uue kanali juurest, mis asub poolkoksi prügila lähedal, kus fenoolne reostus võib olla suur. Ootuspärane on ka fenooli lagundavate tüvede suur osakaal, 60%, proovipunktis 5, mis võeti “fenoolisoost”. Kolme tüve, 5SN3b, 5SN8a ja 6SN8, fenooli minimaalsöötmel kasvanud biomassid värvusid kollaseks katehhooli lahuse lisamisel, mis näitab, et fenool lagundatakse katehhooli meta rajas katehhooli 2,3-dioksügenaasi abil. Veeproovidest eraldatud tüvedest kõige enam leidis fenooli lagundajaid proovipunktis 1, Kohtla-Järve reoveepuhasti, kus puhastatakse ka põlevkivitööstuse reovett..

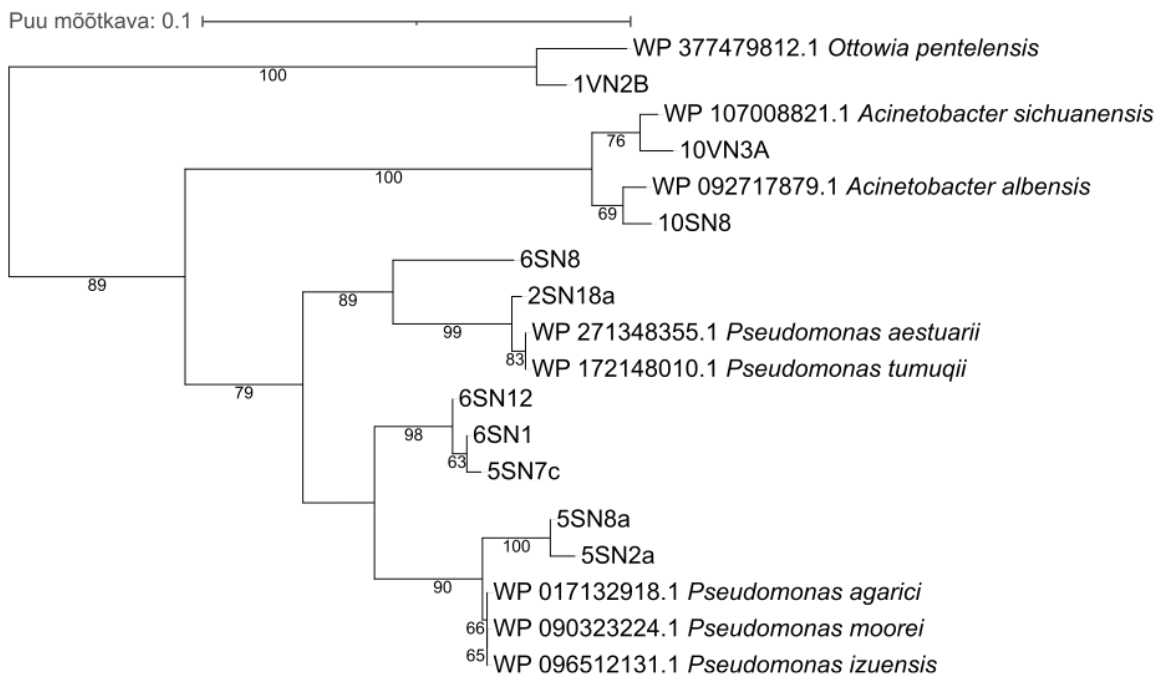
Naftaleeni minimaalsöötmetelt isoleeritud tüvede seast ei leitud ühtegi monokomponentse fenooli hüdroksülaasi kodeerivat geeni *pheA* (mis kuulub *pheBA* operoni) kandvat tüve (lisa 2, 3). *pheBA* operon on loodusesse viidud laboris konstrueeritud operon, mida looduses ei esine ning mis eeldatavalt kandub üle horisontaalse geeniülekanne kaudu fluorestseerivate pseudomonaadide vahel. Seetõttu oli oluline testida ka isoleeritud tüvedel tsütokroom c oksüdaasi ja siderofooride olemasolu. Multikomponentse fenooli hüdroksülaasi suurt subühikut kodeeriva geeni järjestuse (edaspidi *LmPH*) amplifitseerimisel andsid oodatava suurusega PCR produkti kaheksa sedimendist ja kaks veeproovist eraldatud tüve. Kõik ennustatava aminohappeliste järjestustele lähimad vasted kuulusid hõimkonda *Pseudomonadota* kuuluvatele tüvedele. 1VN2B ennustatav valgujärjestus oli lähim *Betaproteobacteria* klassi esindajale, ülejäänutel oli lähim vaste *Gammaproteobacteria* klassi esindajate seas. Aminohappeliste järjestuste põhjal koostati fülogeneetiline puu (joonis 14), kus jagunevad mainitud klassid selgelt erinevatesse klastritesse. Võrreldes 16S rRNA geenifragmendi ja *LmPH* ennustatava aminohappelise järjestuse põhjal määratud liike, selgub, et uuritud tüvedel langevad kokku neljal tüvel perekonnad ja kuuel tüvel sugukonnad. Sellest võib järeldada, et määratud *LmPH* fragmendid on omased nendele perekondadele või sugukondadele.

Üheksal fenooli minimaalsöötmel kasvanud tüvel tuvastati *LmPH* geen, kuid 17 tüve ei andnud *LmPH* geeni amplifitseerimisel positiivset vastust (lisa 2, 3). Selle põhjuseks võib olla, et tüvi ei kasuta fenooli hüdroksüleerimiseks multikomponentset fenooli hüdroksülaasi vaid monooksügenaasi, või samuti ei pruugi töös kasutatud praimerid paar, *pheUF/pheUR*, olla piisavalt universaalne, et amplifitseerida kõiki esineda võivaid *LmPH* geene. Samuti tasub

märkida, et ka minimaalsöötmel on osad tüved võimelised kasvatama märgatava koguse biomassi hoolimata sellest, et nad ei kasuta süsinikuallikana minimaalsöötmesse lisatud ühendit.

Tabel x. Isoleeritud tüvede *LmPH* ennustatava aminohappelise järjestuse võrdlemisel RefSeq andmebaasiga saadud lähimad vasted koos GenBank ID ja identsusprotsendiga

Tüvi	Identsus- protsent	Lähim vaste	GenBank ID
2SN18a	99.4	<i>Pseudomonas aestuarii</i>	WP_271348355.1
5SN2a	97.8	<i>Pseudomonas moorei</i>	WP_090323224.1
5SN7c	96.3	<i>Metapseudomonas resinovorans</i>	WP_028629172.1
5SN8a	99.4	<i>Pseudomonas moorei</i>	WP_090323224.1
6SN1	97.04	<i>Metapseudomonas resinovorans</i>	WP_028629172.1
6SN8	95.7	<i>Halopseudomonas laoshanensis</i>	WP_149331175.1
6SN12	97.0	<i>Metapseudomonas resinovorans</i>	WP_028629172.1
10SN8	98.8	<i>Acinetobacter albensis</i>	WP_092717879.1
1VN2B	97.2	<i>Ottowia pentelensis</i>	WP_377479812.1
10VN3A	98.8	<i>Acinetobacter sichuanensis</i>	WP_107008821.1



Joonis 14. Isoleeritud tüvede LmPH ennustatavate aminohappeliste järjestuste põhjal koostatud fülogeneetiline puu. RefSeq andmebaasist on võetud referentsjärjestused on puul toodud RefSeq ID numbriga ja liigi nimega. Mõõtkava vastab 0,1 ah vahetusele 1 ah kohta. Puule on märgitud *bootstrap* väärtused alates 50. Puu genereeritud naabriteühendamise meetodil programmiga MEGA11. Puule on märgitud *bootstrap* väärtused alates 50.

Varasemalt jõuti järeldusele, et erinevatest proovipunktidest saadud tüvede arv sõltus punkti asukohast. Samuti sõltus proovipunkti asukohast naftaleeni lagundavate tüvede võimekus fenooli lagundada. Fenool oksüdeerub hapnikuga kokkupuutel, seega allika läheduses on lahustunud fenooli kontsentratsioon suurem (proovipunkt 2). Seevastu on fenool püsiv orgaanilistes lahustites ja võib ajapikku välja lahustades saastada jääkreostuse näol keskkonda pikalt (proovipunkt 5). Käesolevas uurimistöös kirjeldati tüvesid, mis kasvasid salitsülaadi minimaalsöötmele ja neid, mis ei kasvanud, seega on naftaleeni lagundamisrajad mitmekesised ja võivad erineda vaheühendite või transkriptsiooni mehhanismide poolest. Fenooli hüdroksülaasi transleeritud aminohappelised järjestused sarnanesid mitmete liikide esindajate LmPH valgu järjestusega, mis sarnanesid omakorda 16S rRNA geeni järgi määratud perekondade või sugukondadega.

### 2.3 Tüve 2S2RP1 plasmiid ja *pheBA* operon

Bioaugmentatsiooni pikaajaliste tagajärgede hindamiseks otsiti kõigist 2023. aastal Kirde-Eestis eraldatud tüvedest *pheA* geeni. *pheA* geen on iseloomulik operonile *pheBA* ning seda kandvat tüve kasutati 1988. aastal puhkenud “Estonia” kaevanduse põlengu järgsel fenooliderikka kustutusvee biopuhastamisel. *pheBA* operoni kandvaid tüvesid ei leitud naftaleeni minimaalsöötmetelt isoleeritud tüvedel. Samal ajal käesoleva tööga isoleeriti tööruhmas tüvesid ka fenooli minimaalsöötmetelt ja tehti ka rikastuskatsed fenooliga (peatükk 2.2.1). Esimesest rikastuskatses eraldatud tüvedest ühel, 2SRP2, ja teisest rikastuskatsesühel, 2S2RP1, tüvel tuvastati *pheBA* operon. Mõlemad tüved eraldati proovipunktist 2, VKG uuest kanalist, mis asub poolkoksi prügila jalamil. Varasematel kordadel, kui loodusest on tuvastatud *pheBA* operoni, on seda leitud Kohtla jõe lähedalt enne selle suubumist Purtse jõkke, Heinaru (2000) punkt 1 (joonis 9b) ja Õispuu punkt 3 (joonis 9c). Nendele punktidele on käesolevas töös uuritud proovidest kõige lähemal punktid 10-12 (joonis 10), kuid nendest proovidest ei saadud ühtegi *pheBA* operoni kandvat tüve. Heinaru (2000) töös leiti *pheBA* operon veel punktist 8 (joonis 9b), mis asus poolkoksi prügila jalamil, nagu ka punkt, millest eraldati antud töös kirjeldatud tüvi.

Käesolevas töös kirjeldatakse järgnevalt täpsemalt tüve 2S2RP1 ning *pheBA* operoni. Tüvel 2S2RP1 sekveneeriti täisgenoom ja assambleeriti nelja kontiigi koostööpartneri poolt Massachusettsi Tehnoloogia Instituudis. Tüve 2S2RP1 assambleerimisel saadud kontiigid olid järgmiste suurustega: kontiig 1: 7,1 Mbp, kontiig 2: 14,6 kbp, kontiig 3: 93,8 kbp ja kontiig 4: 39,6 kbp, mis on Inc-9 grupi plasmiid.

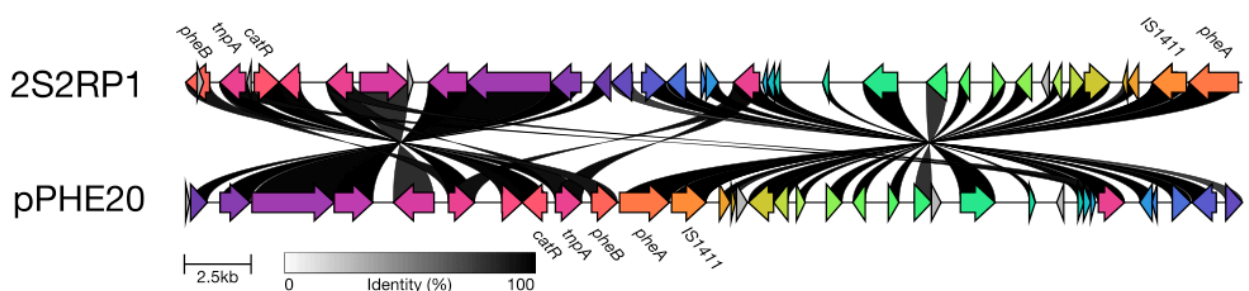
TYGS platvormi abil viidi läbi kogu genoomi põhine taksonoomiline analüüs bakteritüvele 2S2RP1 kontiigi 1 põhjal. Genoomi võrreldi TYGS andmebaasis olevate tüüp-tüvedega MASH algoritmi ja 16S rRNA geenijärjestuse alusel. Edasi hinnati digitaalse DNA-DNA hübriidatsiooni (dDDH) väärtusi. Tüvi näitas kõrgeimat dDDH väärtust (52%) liigi *Pseudomonas silesiensis* suhtes, jäädes siiski alla liigilise piiri (70%). Analüüsi tulemusel järeldati, et tüvi 2S2RP1 võib esindada potentsiaalselt uut liiki.

16S rRNA geeni täispika järjestuse blastn 100% identsusega vaste oli tüvi *Pseudomonas sp.* ALK-5 (CP185906.1), mis eraldati Antarktikas 2021. Samuti oli 100% identsus *Pseudomonas sp.* MPC-6 (CP034783.1), mis eraldati 2016 ka Antarktikast. MPC-6 tüvel on kolm plasmidi, millel ei olnud sarnasust 2S2RP1 kontiig 4-ga. 99,93% identsus saadi ka *P. fluorescence* tüve PC20 16S rRNA geeni (AY538264.1) järjestusega, lisaks oli kontiig 4 väga sarnase suurusega kui PC20 plasmiid pPHE20 (KY503036.1).

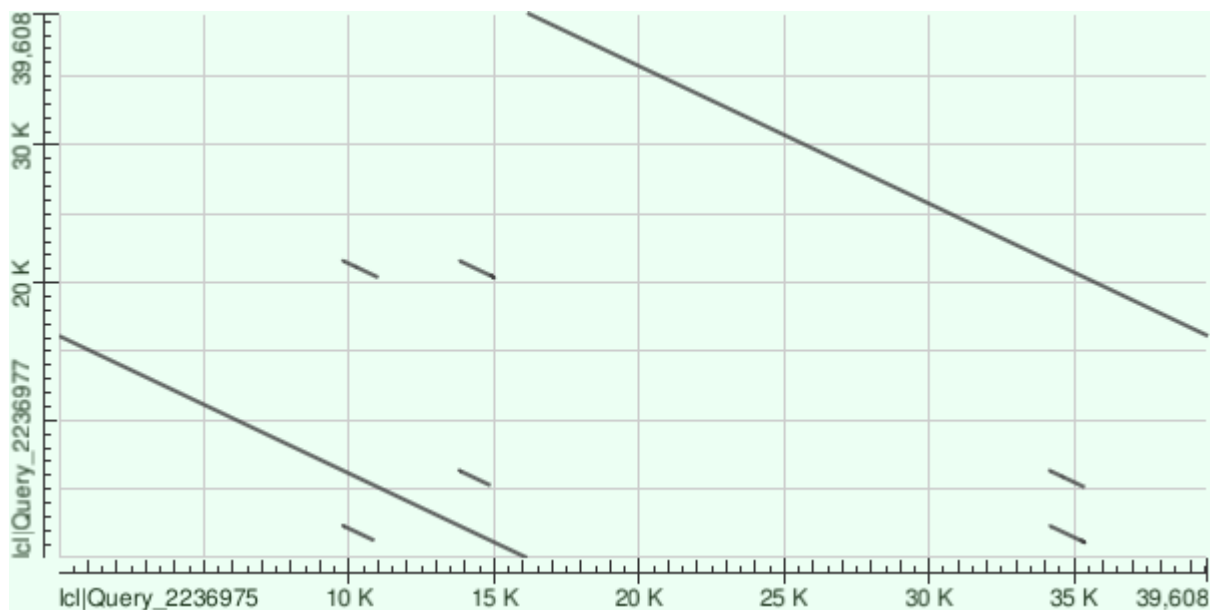
*Pseudomonas fluorescence* tüvi PC20 eraldati 1994. aastal Kirde-Eesti põlevkivitööstuse piirkonnast ja sellel on võime lagundada fenooli ja naftaleeni. Fenooli ja naftaleeni kataboolsed geenid on mõlemad plasmidsed, fenooli kataboolsed geenid paiknevad plasmiidil pPHE20 ja naftaleeni kataboolsed geenid plasmiidil pNAH20. Tüvel PC20 on ka kolmas plasmid, pG20, millel ei ole kataboolse funktsiooniga geene (Elken, 2020).

Tüve 2S2RP1 kontiig 4 sarnaneb struktuurilt ja geenide järjestuselt plasmiidiga pPHE20 (100% identsus 100% kattuvus), hinnates visuaalselt geeniklastreid joonis 15t x. Järjestusi analüüsid selgus, et *pheBA* operon paikneb uuritava tüve plasmiidil samas järjestuses (joonis 15). Järjestuste joonduse visualiseerimiseks on kasutatud dotploti (joonisel 16), kus parimat joondust tähistav joon on kahes osas pidev ja katkemine tuleneb alguspunktide erinemisest (Cabanettes, 2018).

Konjugatsiooni katsetes kandus tüvest PC20 konjuganti üle pPHE20 koos pNAH20, mille põhjal Elken *et.al* (2020) püstitasid hüpoteesi, et pPHE20 vajab pNAH20 geene horisontaalseks geeni ülekandeks. Huvitaval kombel kannab 2S2RP1 tüvi üksnes pPHE20-sarnast plasmidi. Tulenevalt 2S2RP1 kontiigi 4 sarnasusest plasmiidiga pPHE20 võib eeldada, et ka see on mobiliseeritav plasmid, mis vajab horisontaalseks geeniülekaneks konjugatiivset plasmidi või kromosomaalseid *tra*-geene (Frost 2005). 2S2RP1 kontiigil 3 on mitu ennustatavat *tra*-geeni: *traC, D, E, F, G, I, K, L, M, N* ning *trbA, B, C, D, I, J*. Lisaks on *traJ-II* RNA tuvastatud kontiigidel 2 ja 3. Need leiud viitavad võimalusele, et 2S2RP1 genoomis kodeeritud *tra*-geenid võivad täita pNAH20 rolli ja võimaldada pPHE20-laadse plasmidi iseseisvat mobiliseerimist ilma teise plasmiidide konjugatsiooni mehhanismideta.



Joonis 15. 2S2RP1 kontiig 4 ja pPHE20 geenide paiknemise võrdlus, tumedam joon tähendab suuremat identsust ja heledam väiksemat. Joonis tehtud Clinker tarkvaraga ([github.com/gamcil/clinker](https://github.com/gamcil/clinker))



Joonis 16. Dotplot 2S2RP1 kontiig 4 ja pPHE20 suhtest. X-teljel asub 2S2RP1 kontiig 4 ja y-teljel pPHE20. Täpid, mis moodustavad joone vastavad parimate järjestuste kattuvatele nukleotiididele. Joonis tehtud blastn veebirakendusega.

Käesolevas töös uuritud proovipunktide ala kattub Peters et al (1997), Heinaru et al (2000) ja Õispuu (2013) töödes kirjeldatud proovipunktide aladega. Aastakümneid põlevkivitööstusest pärineva reostuse surve all olnud piirkonnast on nii kultiveerimis- kui ka DNA-põhiste meetodikatega tuvastatud *pheBA* operoni kandvaid tüvesid või järjestusi. Õispuu näitas oma bakalaureuse töös (Õispuu, 2013), et koosluse DNAlt oli võimalik amplifitseerida vaid pPHE20 *repA* geeni järjestus, kuid mitte pG20 ja pNAH20 omasid. Võib oletada, et kaks viimast plasmidi ei ole põlevkivitööstusest lähtuva reostusega piirkonnas elavatele bakteritele eluliselt nii olulised kui *pheBA* operoni kandev pPHE20.

Juhanson et al., (2009) kirjeldatud poolkoksi prügilas läbi viidud bioaugmentatsiooni eksperimendis oli kolme aasta möödudes võimalik uuritud *Pseudomonas* tüvedest tagasi testida vaid tüve PC20.

Võimatu on määrata plasmidi päritolu, kas plasmid on säilinud ajast, mil PC20 esimest korda eraldati Heinaru et al., (2000) töö raames aastal 1994, või plasmid on ülekandunud Juhanson et al., (2009) katse raames 2004 - 2006 taas loodusesse viidud PC20 tüvelt, kuid mõlemal juhul tähendab plasmidi tuvastamine, et see on looduses püsinud üle kümne aasta. Seega on 2S2RP1 tüve plasmid Kirde-Eesti looduses äärmiselt vastupidav ja eeldatavalt on tüvel konjugatsioonivõimekus, mis on tõestatud, et tõstab biotervenduse efektiivsust (Bathe 2005). Nendel põhjustel on tüvi 2S2RP1 väga hea kandidaat bioaugmentatsiooniks tulevikus.

## Kokkuvõte

Kirde-Eestis on asunud tööstuspiirkond juba natuke alla saja aasta, mille käigus on see mõjutanud keskkonda reostus survega ja selle tagajärjel mõjutanud koosluseid. Mikroorganismid reostunud piirkondades kohastuvad tingimustele ja orgaanilise reostuse korral lagundavad seda energia ja süsinikuallikaks. Nende koosluste mõistmine aitab leida viise, kuidas veelgi efektiivsemalt rakendada mikroorganisme saastuse eemaldamisel.

Antud bakalaureusetöö eesmärk oli Antud töö eesmärgiks oli isoleerida bakteritüvesid, mis suudavad lagundada aromaatsid ühendeid (eriti naftaleeni ja fenooli), ning tuvastada *pheBA* operoni olemasolu. 2023. aasta sügisel koguti vee- ja seteteproove 13 erinevast Ida-Virumaa punktist, millest eraldatud 89 isolaati suutsid kasutada naftaleeni ainsa süsinikuallikana. Nende hulgas määrati tüvede taksonoomia 16S rRNA geenifragmeni põhjal, füsioloogilised tunnused ning võime lagundada fenooli ja salitsülaati. S Amplifitseeritud *pheA*, *nahG* ja *LmPH* järjestused sekveneeriti ja analüüsiti.

Töö tulemusena leiti, et kõige suurem aromaatsid ühendeid lagundavate bakterite mitmekesisus esines “fenoolisoos” nime kandvas piirkonnas. Kõikidest 2023. aastal võetud proovidest leiti kaks *pheBA* operoni kandvat tüve, millest 2S2RP1 kirjeldatakse põhjalikumalt antud töös. Tüve genoom sekveneeriti ja *pheBA* operon tuvastati plasmiidil, mille ülesehitus sarnaneb 1994. aastal eraldatud *P. fluorescens* PC20 plasmiidiga pPHE20, kuid tüve 2S2RP1 *pheBA* operon samas järjestuses. Operon ise sarnaneb 1988. aastal Estonia kaevanduse põlengu järgselt biopuhastusel kasutatud tüve omaga. See viitab, et *pheBA* operon on säilinud looduses üle 30 aasta ning tõenäoliselt levinud horisontaalse geeniülekanne kaudu erinevatesse fluorestseeruvatesse perekonna *Pseudomonas* liikidesse.

Kokkuvõttes näitab uurimistöö, et põlevkivitööstuse mõjualadel on kujunenud spetsialiseerunud mikroobikooslused, mis suudavad lagundada reostusaineid, ning et tehnilikult keskkonda viidud kataboolsed geenid võivad püsida looduses pikaajaliselt. Uuringu tulemused loovad eeldused edasiseks bioremediatsiooni arenguks ja looduslike puhastusprotsesside tõhustamiseks.

# Naphthalene and phenol degrading capabilities of isolates from North-East of Estonia

Adeele Must

## Summary

The oil shale industry has significantly shaped the environmental landscape of northeastern Estonia through long-term pollution with aromatic hydrocarbons, such as phenol and naphthalene. These pollutants have led to the emergence of unique microbial communities capable of degrading toxic compounds. In 1988, following a fire in the Estonia mine, a laboratory-engineered *Pseudomonas putida* strain carrying the synthetic *pheBA* operon was released into the environment to remediate phenol-contaminated water. This study, conducted in 2023, investigates the persistence and distribution of such catabolic capacities in bacteria currently inhabiting the oil shale-affected environment.

1. To describe the phylogenetic diversity of strains capable of growing on minimal medium with naphthalene:

Sediment and water samples were collected from 13 locations in northeastern Estonia. From these, 89 bacterial strains capable of utilizing naphthalene as a sole carbon source were isolated. Based on 16S rRNA gene sequencing, the strains represented diverse taxa, primarily within the *Pseudomonadota* phylum, with *Pseudomonas* being the most abundant genus. The highest diversity was observed in heavily contaminated areas, such as a so-called "phenol swamp," suggesting a strong selective pressure for hydrocarbon degraders.

2. To identify the key genes involved in naphthalene and phenol degradation:

Isolated strains were tested for the presence of functional genes associated with aromatic compound catabolism. PCR and sequencing analyses confirmed the presence of genes such as *nahG* (involved in naphthalene degradation) and *pheA/LmPH* (linked to phenol degradation). These findings demonstrate that natural microbial communities in the region maintain diverse metabolic pathways for breaking down environmental pollutants.

3. To characterize the plasmid carrying the *pheBA* operon in strain 2S2RP1:

A strain designated 2S2RP1 was found to carry the *pheBA* operon on a plasmid. Genome sequencing and annotation revealed that the operon's structure is consistent with the synthetic

construct introduced during the 1989 bioremediation effort. This confirms that the engineered operon has persisted in the environment for over three decades and may have been horizontally transferred between bacterial hosts.

The results of this study demonstrate that the artificial *pheBA* operon introduced in 1989 has not only persisted in northeastern Estonia's polluted ecosystems but remains functionally intact in at least two bacterial hosts. This supports the idea that genetically engineered elements used in bioaugmentation can be stable in the long term and may contribute to natural pollutant degradation processes. These findings are valuable for the future development of sustainable bioremediation strategies.

# Kasutatud kirjandus

- Aaloe, A., ja Soesoo, A. (2006). *Kukersiit - Eesti põlevkivi*. GeoGuide Baltoscandia.
- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers. Vaadatud 27. mai 2025 <http://archive.org/details/bacteriophages00adam>
- Aivar Pau. (2019, september). Eesti Energia põletab kateldes tapjavett [Section: Tehnika]. Vaadatud 27. mai 2025 <https://tehnika.postimees.ee/6778310/eesti-energia-poletab-katelde-s-tapjavett>
- Bauchop, T., ja Elsdén, S. R. (1960). The Growth of Micro-organisms in Relation to their Energy Supply. *Microbiology*, 23(3), 457–469. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-23-3-457>
- Blokker, P., van Bergen, P., Pancost, R., Collinson, M. E., de Leeuw, J. W., ja Sinninghe Damste, J. S. (2001). The chemical structure of Gloeocapsomorpha prisca microfossils: implications for their origin. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(6), 885–900. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00582-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00582-2)
- Borealis AG. (2021). *OHUTUSKAART vastavalt EL määrusele nr 1907/2006 Fenool*. <https://www.borealisgroup.com/storage/Datasheets/PHENOL-MSDS-EE-ET-V18-SDS-EE-5110-10024775.pdf>
- Chen, W., Teng, Y., Ren, W., LUO, Y., ja YU, Y. (2022). A highly effective polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium, *Paracoccus* sp. HPD-2, shows opposite remediation potential in two soil types. *Pedosphere*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2022.06.012>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

- Elken, E., Heinaru, E., Jõesaar, M., ja Heinaru, A. (2020). Formation of new PHE plasmids in pseudomonads in a phenol-polluted environment. *Plasmid*, 110, 102504. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2020.102504>
- Enefit Power AS jaguneb aprillist kaheks ettevõtteks: Enefit Industry AS ja Enefit Power OÜ [Õppematerjal TÜ teaduskooli õpilastele]. (2025, 1. aprill). Vaadatud 23. mai 2025 <https://www.vkg.ee/tehnoloogia/>
- Futamata, H., Harayama, S., ja Watanabe, K. (2001). Group-Specific Monitoring of Phenol Hydroxylase Genes for a Functional Assessment of Phenol-Stimulated Trichloroethylene Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4671–4677. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4671-4677.2001>
- Heinaru, A. (1991). *Põlevkivikaevanduste heitvete mõju Kirde-Eesti veekogudele*. Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Kateeder-Instituut.
- Heinaru, E., Elken, E., Jõesaar, M., Viggor, S., ja Teras, R. (2022). *Praktilisi töid mikrobioloogias ja viroloogias*. TARTU RAKU- JA MOLEKULAARBIOLOOGIA INSTITUUT.
- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U., ja 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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00684.x>
- Jefimova, J., Irha, N., Reinik, J., Kirso, U., ja Steinnes, E. (2014). Leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons from oil shale processing waste deposit: A long-term field study. *Science of The Total Environment*, 481, 605–610. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.105>
- Juhanson, J., Truu, J., Heinaru, E., ja Heinaru, A. (2009). Survival and catabolic performance of introduced *Pseudomonas* strains during phytoremediation and bioaugmentation field experiment. *FEMS microbiology ecology*, 70(3), 446–455. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00754.x>
- Jõesaar, M., Viggor, S., Heinaru, E., Naanuri, E., Mehike, M., Leito, I., ja Heinaru, A. (2017). Strategy of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 for effective degradation of phenol and salicylate. *PLoS ONE*, 12(3), ? <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173180>
- Jürs, E., ja Reinsalu, E. (2015, veebruar). *Eesti põlevkivi töötlemine / Estonian oil shale processing*. Tallinn - Kiviõli: TTÜ Mäeinstituut. <https://doi.org/10.13140/2.1.3041.3600>

- Kasak, L., Hõrak, R., Nurk, A., Talvik, K., ja Kivisaar, M. (1994). Regulation of the catechol 1,2-dioxygenase- and phenol monooxygenase-encoding pheBA operon in *Pseudomonas putida* PaW85. *Journal of bacteriology*, 175, 8038–42. <https://doi.org/10.1128/jb.175.2.8038-8042.1993>
- Kattai, V. (2003). *Põlevkivi - õlikivi*. Eesti Geoloogiakeskus. [https://www.ester.ee/record=b1821093\\*est](https://www.ester.ee/record=b1821093*est)
- Kivisaar, M. A., Habicht, J. K., ja Heinaru, A. L. (1989). Degradation of phenol and m-toluat in *Pseudomonas* sp. strain EST1001 and its *Pseudomonas putida* transconjugants is determined by a multiplasmid system. *Journal of Bacteriology*, 171(9), 5111–5116. <https://doi.org/10.1128/jb.171.9.5111-5116.1989>
- Kliimaministeerium. (2019). Põlevkivituhad arvatakse ohtlike jäätmete hulgast välja. Vaadatud 27. mai 2025 <https://kliimaministeerium.ee/uudised/polevkivituhad-arvatakse-ohtlike-jaatmete-hulgast-valja>
- Kokel, D., Li, Y., Qin, J., ja Xue, D. (2006). The nongenotoxic carcinogens naphthalene and para-dichlorobenzene suppress apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature chemical biology*, 2(6), 338–345. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nchembio791>
- Liive, S. (2007). OIL SHALE ENERGETICS IN ESTONIA. *Oil Shale*, 24(1), 1–4. <https://doi.org/10.3176/oil.2007.1.01>
- Lille, Ü. (2002). CURRENT VIEWS ON THE ORIGIN OF ESTONIAN KUKERSITE KEROGEN. *Oil Shale*, 19(1), 3–18. <https://doi.org/10.3176/oil.2002.1.01>
- Lille, Ü. (2003). CURRENT KNOWLEDGE ON THE ORIGIN AND STRUCTURE OF ESTONIAN KUKERSITE KEROGEN. *Oil Shale*, 20(3), 253–263. <https://doi.org/10.3176/oil.2003.3.03>
- Lippmaa, E., ja Pihlak, A. (1988). «Estonia» põlengu tagajärgedest. *Leninlik Lipp*, (250). <https://dea.digar.ee/article/leninliklipp/1988/12/31/8>
- Mahiuddin, M., Fakhruddin, A. N. M., ja Mahin, A.-A. (2012). Degradation of Phenol via Meta Cleavage Pathway by *Pseudomonas fluorescens* PU1. *ISRN microbiology*, 2012, 741820. <https://doi.org/10.5402/2012/741820>
- Mokrani, S., Houali, K., Yadav, K., Amir, I., Arabi, Bashier, L., Awjantalreshidi, M., Benguerba, Y., Cabral Pinto, M., ja Nabti, E. (2024). Bioremediation techniques for soil organic pollution: Mechanisms, microorganisms, and technologies -A comprehensive review. *Ecological Engineering*, 207, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2024.107338>

- Parahhonski, E. (1991). «Estonia» kaevanduse allmaapõleng ja selle järelmõjud. *Eesti Loodus*, (3), 144–150.
- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A., ja Nurk, A. (1998). Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, pheBA, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Applied and environmental microbiology*, 63, 4899–906. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.12.4899-4906.1997>
- Peters, M., Tomikas, A., ja Nurk, A. (2004). Organization of the horizontally transferred pheBA operon and its adjacent genes in the genomes of eight indigenous *Pseudomonas* strains. *Plasmid*, 52, 230–6. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.07.003>
- Preuss, R., Angerer, J., ja Drexler, H. (2003). Naphthalene - An environmental and occupational toxicant. *International archives of occupational and environmental health*, 76, 556–576. <https://doi.org/10.1007/s00420-003-0458-1>
- Rao, J. N., ja Parsai, T. (2023). Trends and patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in forest fire-affected soils and water mediums with implications on human health risk assessment. *Science of The Total Environment*, 905, 166682. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166682>
- Reinsalu, E. (2011). *Eesti mäendus : maapõueinseneri õpik*. Tallinna Tehnikaülikool.
- Saitou, N., ja Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Schie, P., ja Young, L. (2000). Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications. *Bio-remediation Journal - BIOREMEDIAT J*, 4, 1–18. <https://doi.org/10.1080/10588330008951128>
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., ja Goesmann, A. (2021). Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, 7(11), Artikkel 000685. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., ja Li, Q. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International journal of environmental research and public health*, 6, 278–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>
- Sikk, A., ja Rebane, R. (2017). Põlevkivitööstusest tulevate veekeskkonnale ohtlike ainete mõju uuring. <https://kliimaministeerium.ee/sites/default/files/documents/2021-07/P%C3>

[%B5levkivit%C3%B6%C3%B6stusest%20tulevate%20veekeskkonnale%20ohtlike%20ainete%20m%C3%B5ju%20uuring.pdf](#)

Smirnova, K. (2019). *Redundant salicylate 1-hydroxylase genes of the Pseudomonas pseudoalcaligenes C70* [Magistritöö, UNIVERSITY OF TARTU].

Statistikaamet. (2024). KE033: ELEKTRIAAMADE TOODANG JA ENERGIA TOOTMISEKS TARBITUD KÜTUS. Vaadatud 27. mai 2025 [https://andmed.stat.ee:443/pxweb/et/stat/stat\\_\\_majandus\\_\\_energeetika\\_\\_energia-tarbimine-ja-tootmine\\_\\_aastastatistika/KE033.pxl](https://andmed.stat.ee:443/pxweb/et/stat/stat__majandus__energeetika__energia-tarbimine-ja-tootmine__aastastatistika/KE033.pxl)

Sullakatko, O. (2018). *Eesti Põlevkivi aastatel 1986-1991: peadirektori märkmed; Jutustus*. O. Sullakatko. <http://www.digar.ee/id/nlib-digar:366910>

Zhou, W., Guo, W., Zhou, H., ja Chen, X. (2016). Phenol degradation by *Sulfobacillus acidophilus* TPY via the meta-pathway. *Microbiological Research*, 190, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.005>

Teataja, R. (2019). Nõuded reovee puhastamise ning heit-, sademe-, kaevandus-, karjääri- ja jahutusvee suublasse juhtimise kohta, nõuetele vastavuse hindamise meetmed ning saasteainesisalduse piirväärtused. Vaadatud 27. mai 2025 <https://www.riigiteataja.ee/akt/126112024004>

*Tehnoloogia* [Õppematerjal TÜ teaduskooli õpilastele]. (2018). Vaadatud 23. mai 2025 <https://www.vkg.ee/tehnoloogia/>

Travkin, V., ja Solyanikova, I. (2021). Salicylate or Phthalate: The Main Intermediates in the Bacterial Degradation of Naphthalene. *Processes*, 9, 1862. <https://doi.org/10.3390/pr9111862>

Turbas, E. (1991). See ohtlik tolmusaaste. *Eesti Loodus*, (3), 142–144.

Varb, N., Tambet, Ü., Reinsalu, E., Suuroja, K., ja Kall, R. (2008). *90 aastat põlevkivi kaevandamist Eestis : tehnoloogia ja inimesed*. GeoTrail KS.

Vedler, E., Heinaru, E., Jutkina, J., Viggor, S., Koressaar, T., Remm, M., ja Heinaru, A. (2013). *Limnobacter* spp. as newly detected phenol-degraders among Baltic Sea surface water bacteria characterised by comparative analysis of catabolic genes. *Systematic and applied microbiology*, 36. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.07.004>

Viht, K. (2018). *Aromaatsus* [Õppematerjal TÜ teaduskooli õpilastele]. Vaadatud 20. mai 2025 [https://teaduskool.ut.ee/sites/default/files/teaduskool/oppetoo/aromaatika\\_2018\\_2019.pdf](https://teaduskool.ut.ee/sites/default/files/teaduskool/oppetoo/aromaatika_2018_2019.pdf)

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

Õispuu, E. (2013). pheBA operoni esinemine Ida-Virumaa jõgedest eraldatud mikroobikoosluse DNAs. Vaadatud 27. mai 2025 <http://hdl.handle.net/10062/31011>

# LISA

Lisa 1. Proovipunktid, sõnaline kirjeldus, veeproovide puhul on märgitud vee pH.

<b>Proovipunkt</b>	<b>Proovid võetud</b>	<b>Kirjeldus</b>	<b>pH</b>
1	vee- ja sedimendiproov	Puhasti aerotank/aktiivmuda	7,15
2	vee- ja sedimendiproov	VKG uus kanal vesi/sediment	7,75
3	vee- ja sedimendiproov	Kõige kaugem bassein vesi/sediment	8,84
4	vee- ja sedimendiproov	Poolkoksi mäe jalamilt kraav vesi/sediment	10,9
5	sedimendiproov	Fenoolisoo	
6	vee- ja sedimendiproov	Kohtla jõgi, Roodu; vesi/sediment	8,18
7	veeproov	Kraav konveieri juurest	8,06
8	veeproov	Purtse jõgi, Lüganuse kirik	8,3
9	veeproov	Kohtla jõgi, Lüganuse kirik	8,05
10	vee- ja sedimendiproov	Kraav Püssi alajaama vesi/sediment	7,95
11	vee- ja sedimendiproov	Kohtla jõgi, Püssi alajaama turbiini lähedalt	8,03
12	sedimendiproov	Kohtla jõgi, Püssi alajaama turbiinist ülesvoolu sediment	
13	veeproov	Rannapungerja jõgi, Järsuka sild	8,4

Lisa 3 Sedimendiproovidest eraldatud tüvede fenotüüpilised näitajad. Tabelis on toodud tüvele antud kood, lähimad GenBank andmebaasist leitud organismid 16S rRNA geenifragmenti ja *LmPH* geenifragmenti põhjal, mõlemad koos GenBank ID numbriga ja identsusprotsendiga. Välja on toodud ka oksüdaas testi, KingB, fenooli ja salitsülaadi minimaal söötmel saadud tulemused ning PCR-i tulemused. ò = õrn bänd või vähe biomassi

tüvi	16 rRNA järjestusele GenBank andmebaasist leitud lähim vaste koos NCIB koodi ja identsusprotsendiga	16 rRNA järjestusele GenBank andmebaasist leitud lähim vaste koos NCIB koodi ja identsusprotsendiga	fluoretsents KingB söötmel	PCR			Kasv minimaalsöötmel 2.5 mM fenool
				phcA	ImpH	nhcG	
1VN1	<i>Acinetobacter sichuanensis</i>	PQ047750.1 99.779	-	-	-	+	
1VN2B	<i>Acidovorax radicans</i>	NR117776.1 98.06	-	+	-	+	
1VN3	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	HE608678.1 99.77	-	-	-	+	
2VN5	<i>Erwinia intracta</i>	OR121953.1 99.323	-	-	-	-	
2VN6	<i>Aeromonas piscicola</i>	JX860608.1 99.585	-	+	-	-	
2VN7A	<i>Rahnella bruchi</i>	ON222730.1 99.789	-	-	-	-	
2VN7B	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	OM841640.1 99.584	-	-	-	-	
2VN8A	<i>Pantoea brenneri</i>	HFS85402.1 97.899	-	-	-	-	
2VN8B	<i>Pseudomonas damibii</i>	CP116502.1 99.588	-	+	+	-	
3VN1	<i>Pseudomonas protegens</i>	CP013184.1 98.925	-	+	+	-	
3VN2	<i>Pseudomonas damibii</i>	CP116502.1 98.16	-	+	+	-	
4VN3B	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	PP816033.1 100	-	-	-	-	
4VN4A	<i>Rhodococcus jostii</i>	OP776849.1 99.336	-	-	-	-	
6VN4A	<i>Rhodococcus fascians</i>	AB180236.2 99.78	-	-	-	ò	
6VN4B	<i>Microbacterium aurantiacum</i>	PV533842.1 100	-	-	-	ò	
7VN1	<i>Rhodococcus sp.</i>	KM274066.1 99.559	-	-	-	+	
8VN1	<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	ON209528.1 99.115	-	-	-	ò	
8VN2	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	MF526711.1 98.337	-	-	-	-	
9VN1	<i>Pseudomonas lurida</i>	MT878386.1 99.575	-	+	-	+	
9VN2	<i>Pseudomonas sp.</i>	FM161425.1 99.156	-	+	-	+	
9VN3B	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JN051486.1 99.362	-	-	-	+	
9VN4	<i>Acinetobacter guilloniae</i>	PP813657.1 99.372	-	-	-	+	
9VN6	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	OM250440.1 99.18	-	-	-	-	
10VN1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	MGS47936.1 99.784	-	-	-	+	
10VN3B	<i>Pseudomonas protegens</i>	MH119663.1 99.581	-	+	-	-	
10VN5	<i>Pseudomonas sp.</i>	FM161538.1 99.583	-	+	-	-	
11VN1A	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	AB859672.1 99.367	-	-	-	+	
11VN2	<i>Serratia inhibens</i>	CP136016.1 100.0	-	-	-	-	
11VN3	<i>Pseudomonas rhodastae</i>	MH211248.1 99.16	-	+	-	-	
11VN5	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KE976878.1 100	-	-	-	+	
11VN6	<i>Phytopseudomonas selenitipraecipitans</i>	CP076114.1 98.952	-	-	-	v	

Lisa 2

Sedimentiproovidest eraldatud tüvede feno- ja genotüüpilised näitajad. Tabelis on toodud tüvele antud kood, lähimad GenBank andmebaasist leitud organismid 16S rRNA geenifragmendi ja *LmPH* geenifragmendi põhjal, mõlemad koos GenBank ID numbriga ja identsusprotsendiga. Välja on toodud ka oksüdaas testi, KingB, fenooli ja salitsülaadi minimaal söötmel saadud tulemused ning PCR-i tulemused.

tüvi	16 rRNA järjestusele GenBank andmebaasist leitud lähim vaste koos NCIB koodi ja identsusprotsendiga		<i>LmPH</i> järjestusele GenBank andmebaasist leitud lähim vaste koos NCIB koodi ja identsusprotsendiga		oküdaas-test	fluorescents KingB söötmel	PCR		Kasv minimaalkõhmetel 2,5 mM fenool	C230 tuvastamine
	GenBank ID	identsusprotsent	GenBank ID	identsusprotsent			pheA	hmpH		
ISN1aa	<i>Acetivibrio johnsonii</i>	CP068195.1	99,2		-	-	-	-	-	-
ISN1ab	<i>Burkholderia</i> sp.	MN810235.1	99,6		+	-	-	-	+	V
ISN3a	<i>Citrobacter Feumidii</i>	CP162975.1	98,9		-	-	-	-	-	-
ISN3b	<i>Acetivibrio</i> sp.	MW492371.1	97,7		+	-	-	-	+	-
ISN4	<i>Citrobacter</i> sp.	CP070240.1	99,8		-	-	-	-	-	-
ISN5a	<i>Citrobacter</i> sp.	CP070240.1	99,8		-	-	-	-	-	-
ISN5ba	<i>Pseudomonas veronii</i>	LT599583.1	98,6	CP018420.1	+	+	+	-	-	-
ISN7a	<i>Citrobacter braakii</i>	CP077405.1	99,1		-	-	-	-	-	-
ISN7ba	<i>Rhodococcus candeljarumensis</i>	KX503018.1	99,8		-	-	-	-	-	-
ISN7bb	<i>Rhodococcus candeljarumensis</i>	KX503018.1	99,5		-	-	-	-	-	-
2SN1	<i>Pseudomonas atacamensis</i>	CP149965.1	98,1		+	-	-	-	-	-
2SN10	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KF976878.1	99,6		-	-	-	-	+	-
2SN12	<i>Pseudarthrobacter</i> sp.	MW546176.1	99,6		-	-	-	-	-	-
2SN13	<i>Rhodococcus opacus</i>	AF095715.1	99,4		-	-	-	-	+	-
2SN18a	<i>Pseudomonas</i> sp.	AM110075.2	99,4	CP019947.1	+	-	+	-	+	-
2SN18b	<i>Arthrobacter sclerotumae</i>	KR085847.1	99,4		-	-	-	-	+	-
2SN19	<i>Arthrobacter oryzae</i>	OL851749.1	99,8		-	-	-	-	+	-
4NSN1	<i>Oerskovia</i> sp.	MW546109.1	99,6		-	-	-	-	+	-
5SN2a	<i>Acetivibrio boltonicus</i>	KF679797.1	99,8		-	-	-	-	+	-
5SN2b	<i>Pseudomonas</i> sp.	KR673340.1	99,6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	+	+	-
5SN3a	<i>Leifsonia</i> sp.	HU135683.1	99,8	DQ387668.1	-	-	-	-	+	-
5SN3b	<i>Pseudomonas</i> sp.	FMI161427.1	99,8		+	+	+	+	+	-
5SN5aa	<i>Pseudomonas veronii</i>	MN560131.1	99,6	<i>Pseudomonas veronii</i>	+	+	+	+	+	-
5SN5ab	<i>Pseudomonas</i> sp.	FMI161538.1	99,6	CP018420.1	+	+	+	-	+	-
5SN5b	<i>Pseudomonas</i> sp.	FMI161538.1	99,8	<i>Pseudomonas veronii</i>	+	+	+	-	+	-

tüvi	16 rRNA järjestusele GenBank andmebaasist leitud lähim vaste koos NCIB koodi ja identsusprotsendiga		LmpPH järjestusele GenBank andmebaasist leitud lähim vaste koos NCIB koodi ja identsusprotsendiga		oksidatsioonitesti	fluorescents KingB 400nm	PCR			Kasv minimaalskoortmetel		C230 tuvastamine
	16 rRNA järjestusele GenBank andmebaasist leitud lähim vaste koos NCIB koodi ja identsusprotsendiga	16 rRNA järjestusele GenBank andmebaasist leitud lähim vaste koos NCIB koodi ja identsusprotsendiga	LmpPH järjestusele GenBank andmebaasist leitud lähim vaste koos NCIB koodi ja identsusprotsendiga	LmpPH järjestusele GenBank andmebaasist leitud lähim vaste koos NCIB koodi ja identsusprotsendiga			pheA	lmpH	nahG	2.5 mM fenool	2.5 mM salifilaat	
SSN6a	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	CP045099.1	99,4		-	-	-	-	nd	+	+	-
SSN6b	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	CP045099.1	99,6		-	-	-	-	nd	+	+	-
SSN7a	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	GU586312.1	99,4		+	-	-	-	nd	-	-	-
SSN7b	<i>Arrobacter aureus</i>	JQ435703.1	99,1		-	-	-	-	nd	-	-	-
SSN7c	<i>Pseudomonas gessardii</i>	MT337493.1	99,8	99,5	+	-	-	+	nd	+	+	-
SSN8a	<i>Pseudomonas sp.</i>	FM161427.1	99,8	99,1	+	-	-	+	nd	+	+	+
SSN8b	<i>Microbacterium phylophaerae</i>	AM268326.1	99,6		-	-	-	-	nd	-	-	-
SSN8c	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	OQ730024.1	100,0		v	-	-	-	nd	-	-	-
6SN1	<i>Pseudomonas gessardii</i>	JX514410.1	99,8	99,3	+	-	-	+	nd	+	+	-
6SN8	<i>Pseudomonas avellanae</i>	CP091143.1	99,4	99,3	+	-	-	+	nd	+	+	+
6SN9	<i>Pseudomonas danubii</i>	CP116502.1	99,6	92,3	+	-	-	+	nd	-	-	-
6SN11	<i>Pseudomonas putida</i>	CP109603.1	99,6		+	-	-	+	nd	-	-	-
6SN12	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	CP027749.1	99,6	99,1	-	-	-	+	nd	-	-	-
10SNT1	<i>Pseudomonas danubii</i>	CP116502.1	100,0	96,3	+	-	-	+	nd	-	-	-
10SNT2	<i>Pseudomonas capiferrum</i>	CP116669.1	99,8		+	-	-	+	nd	-	-	-
10SN3	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KF976878.1	99,1		-	-	-	-	nd	+	+	-
10SN4	<i>Pseudomonas danubii</i>	CP116502.1	98,8	97,9	+	-	-	+	nd	-	-	-
10SN8	<i>Acinetobacter chinensis</i>	CP032134.1	99,3	92,6	-	-	-	+	nd	+	+	-
10SN9	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KF976878.1	100,0		-	-	-	-	nd	+	+	-
11SN2a	<i>Acinetobacter sp.</i>	CP101115.1	99,6		-	-	-	-	nd	-	+	-
11SN2b	<i>Acinetobacter sp.</i>	CP101115.1	99,8		-	-	-	-	nd	-	+	-
11SN5	<i>Pseudomonas sp.</i>	FM161563.1	99,8		+	-	-	-	nd	-	-	-
11SN8	<i>Pseudarthrobacter phananthronivorus</i>	KC934874.1	99,4		-	-	-	-	nd	+	+	-
11SN10	<i>Pseudomonas sp.</i>	AF521651.1	99,4	99,1	+	-	-	v	nd	v	v	-
12SN1	<i>Oerskovia jenensis</i>	JN257093.1	99,6		-	-	-	-	nd	-	-	-
12SN2a	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	MN810222.1	99,8		-	-	-	-	nd	-	-	-
12SN2b	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	MN810222.1	99,4		-	-	-	-	nd	-	-	-
12SN4	<i>Acinetobacter baibionis</i>	KF679797.1	100,0		-	-	-	-	nd	+	+	-
12SN5	<i>Acinetobacter sp.</i>	CP178606.1	99,2		-	-	-	-	nd	-	-	-
12SN6b	<i>Paenibacillus sylvanensis</i>	KF712892.1	99,4		-	-	-	-	nd	-	-	-
12SN8	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KF976878.1	100,0		-	-	-	-	nd	+	+	-
12SN15	<i>Pseudomonas sp.</i>	FM161450.1	100,0		+	-	-	+	nd	-	-	-

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

Mina, Adeele Must

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

Kirde-Eesti tööstuspiirkonna isolaatide naftaleeni ja fenooli lagundamise võimekus

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.

*Adeele Must*

**27.05.2025**