

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

**Salitsülaadi ning metüülsalitsülaatide lagundamine erinevates perekonna *Pseudomonas*
liikides**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Rasmus Robert Barrow

Juhendajad PhD Merike Jõesaar

PhD Signe Viggor

TARTU 2022

INFOLEHT

Salitsülaadi ning metüülsalitsülaadide lagundamine erinevates perekonna *Pseudomonas* liikides

Salitsülaad on polütsükllilise aromaatsse ühendi, naftaleeni, lagundamise käigus tekkinud vaheühend, millel on toksiline toime isegi seda lagundavatele mikroorganismidele. *P. pseudoalcaligenes* tüvi C70 omab redundantseid salitsülaadi 1-hüdroksülaase ja redundantseid katehhooli 2,3-dioksügenaase, mis on võtmeensüümid salitsülaadi edasises lagundamises. Käesolevas töös võrreldi tüve C70 kasvuparameetreid ning geeniekspressiooni tasemeid ilma redundantsete salitsülaadi lagundamise geenideta referentstüvedega, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4. Lisaks selgitati MGE insertiooni mõju *P. putida* võimele lagundada salitsülaati ja metüülsalitsülaate. Kasutatud tingimustel ei olnud tüvel C70 eelist salitsülaadi ega metüülsalitsülaadide lagundamisel referentstüvede suhtes.

Märksõnad: Salitsülaadi 1-hüdroksülaas, katehhooli dioksügenaasid, aromaatsed ühendid, redundantsus, Na-salitsülaad, qRT-PCR

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Degradation of salicylate and methylsalicylates in different species of the family *Pseudomonas*

Salicylate is an intermediate in the degradation of naphthalene and has a toxic effect even on bacteria which are capable of degrading it. *P. pseudoalcaligenes* strain C70 possesses redundant salicylate 1-hydroxylase genes and redundant catechol 2,3-dioxygenase genes, which are key enzymes in the metabolism of salicylate. In this study, the growth parameters and gene expression levels of strain C70 were compared to those of reference strains, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4. Additionally, the effect of an MGE insertion on *P. putida* strain NCIB 9816-4's ability to degrade salicylate and methylsalicylates was studied. Under the conditions utilized in this study strain C70 did not have an advantage in degrading salicylates or methylsalicylates compared to the reference strains.

Keywords: Salicylate 1-hydroxylase, catechol dioxygenases, aromatic compounds, redundancy, Na-salicylate, qRT-PCR

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Aromaatsete ühendite aeroobne lagundamine bakterites	7
1.1.1. Aromaatse tuuma lõhustamist läbi viivad ensüümid	8
1.1.2. Ekstradioolsed dioksügenaasid	8
1.1.3. Intradioolsed dioksügenaasid	9
1.2. Naftaleeni aeroobne lagundamine	10
1.3. Na-salitsülaadi lagundamine	13
1.3.1. Katehhooli meta rajaga tüved	13
1.3.2. Katehhooli ortho rajaga tüved	17
1.3.3. Gentisaadi rajaga tüved	18
1.4. Funktsionaalsete rühmadega aromaatssete ühendite lagundamine	19
1.5. Naftaleeni ja salitsülaadi lagundamine perekonnas Pseudomonas	19
1.5.1. Pseudomonas pseudoalcaligenes C70	20
1.5.2. Pseudomonas fluorescens PC20	21
1.5.3. Pseudomonas putida NCIB 9816-4	22
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	24
2.1. TÖÖ EESMÄRGID	24
2.2. MATERJAL JA METOODIKA	25
2.2.1. Bakteritüved	25
2.2.2. Kasvatused mikrotiiterplaatidel	25
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR	25
2.2.4. Geelelektroforees	26
2.2.5. Sekveneerimine	26
2.2.6. Sekveneeritud järjestuste analüüs	27
2.2.7. qRT-PCR	27
3. TULEMUSED JA ARUTELU	28
3.1. Kasv erinevatel Na-salitsülaadi kontsentratsioonidel	28
3.2. Kasv erinevatel metüülsalitsülaatidel	33

3.3. Salitsülaadi lagundamisel osalevate geenide ekspressiooni tasemete määramine	37
3.3.1. Pseudomonas pseudoalcaligenes tüvi C70	39
3.3.2. Pseudomonas fluorescens tüvi PC20	41
3.3.3. Pseudomonas putida tüvi NCIB 9816-4	42
KOKKUVÕTE	46
RESÜMEE / SUMMARY	47
KIRJANDUSE LOETELU	49
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	54
LISAD	55
LIHTLITSENTS	57

KASUTATUD LÜHENDID

C12O - katehhooli 1,2-dioksügenaas

C23O - katehhooli 2,3-dioksügenaas

MGE - mobiilne geneetiline element

SH - salitsülaadi 1-hüdroksülaas

HMS - 2-hüdroksümukonosemialdehüüd

SAL - Na-salitsülaat

MSAL - metüülsalitsülaat

SISSEJUHATUS

Ühed levinumad ja vastupidavamad saasteained, mis tekivad kaasaegses tööstuses on erinevad aromaatsed ühendid. Aromaatsed ühendid iseloomustab benseenituumas sisaldamine, mis muudab need raskesti lagundatavateks. Neid tekib tööstuses vaheühendite, jäätmete ja lõppproduktide näol ning neid leidub ka toornaftas. Aromaatsed ühendid satuvad keskkonda suuremahuliselt näiteks pestitsiidide kasutamisel, tööstuslike heitvete vale käsitlemise käigus või ka nafta käitlemisega seotud õnnetuste tõttu. Läänemerel on suur oht reostuse tekkeks tiheda laevaliikluse ja fossiilkütuste transpordi tõttu. Laevaõnnetus on katastroofiliste tagajärgedega kohalikule ökosüsteemile, kui tekkinud reostuse kõrvaldamine on aeglane ja ebaefektiivne.

Aromaatsed ühendid sisaldava reostuse, nagu nafta, puhastamisel on keeruline kasutada füüsikalisi meetodeid, eriti kui reostus peaks tekkima veekogul. Selliste õnnetuste tagajärgede leevendamiseks on otstarbekam rakendada biotervendust ehk elusorganismide abil keskkonna puhastamist. Füüsilise keskkonnapuhastamise asemel, rakendab see meetod mikroorganisme, mis lagundavad saasteained kahjututeks ühenditeks. Biotervenduses kasutatakse aromaatsed ühendid lagundavaid keskkonnabakterid, mille kataboolset potentsiaali on põhjalikult eelnevalt uuritud. Igas keskkonnas ja iga saasteaine puhul ei sobi samad bakterid, eelteadmised võimaldavad kokku panna optimaalseid kooslusi ning stimuleerida nende kasvu õigete lisanditega.

Käesoleva töö eesmärkideks olid selgitada *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve C70 võimekust lagundada Na-salitsülaati (kirjapildi lihtsustamiseks kasutatakse edaspidi väljendit salitsülaat) ja erinevaid metüülsalitsülaate võrreldes kahe referentstüvega perekonnast *Pseudomonas* ning tuvastada *Pseudomonas putida* tüve NCIB 9816-4 naftaleeni lagundamise operoni inserteerunud mobiilse geneetilise elemendi (MGE) mõju selle võimele lagundada salitsülaati ja metüülsalitsülaate. Salitsülaadid valiti käesoleva töö substraadiks, sest need on kesksed vaheühendid mitmete aromaatsete ühendite lagundamisradades.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Aromaatsete ühendite aeroobne lagundamine bakterites

Aromaatsed ühendid on heterogeenne molekulide grupp, mille ühiseks tunnuseks on vähemalt ühe benseenituum sisaldamine. Aromaatsed ühendid esinevad looduslikult aromaatses aminohapetes, ligniinis ning tekivad ka metsapõlengutes (Freeman ja Cattell, 1990; Seo *et al.*, 2009), kuid suuremas koguses satub neid keskkonda erinevate tööstusprotsesside käigus (Lijinsky, 1991; Seo *et al.*, 2009). Benseenituum on keemiliselt inertne struktuur, mis muudab aromaatsed ühendid väga stabiilseteks.

Aromaatsed ühendid saab jaotada vastavalt struktuurile kolme gruppi: polütsükliilised, asendusrühmadega ja heterotsükliilised aromaatsed ühendid. Polütsükliilised aromaatsed ühendid lahustuvad halvasti vees ja adsorbeeruvad pinnase osakestel (Means *et al.*, 1980; Peng *et al.*, 2008), mistõttu kuhjuvad need keskkonda (Cerniglia, 1992; Giger ja Blumer, 1974; Peng *et al.*, 2008).

Aromaatseid ühendeid lagundavad peamiselt mikroorganismid, kellele need on energia- ja süsinikuallikateks (Pérez-Pantoja *et al.*, 2019). Aromaatsete ühendite aeroobne lagundamine bakterites võib toimuda erinevate ensümaatiliste radade kaudu, millede kesketeks vaheühenditeks on katehool, gentisaat ja protokatehhuat (Nogales *et al.*, 2017). Keskkonnas leiduvad aromaatsed ühendid ja ka nende lagundamise käigus tekkivad vaheühendid võivad olla mikroorganismidele toksilised. Näiteks katehoolid on reaktiivsed ja võivad kergesti oksüdeeruda, moodustades DNA-d kahjustavaid hapnikuühendeid (Li ja Trush, 1994). Katehoolid võivad häirida rakumembraani elektrontranspordiahelat, rikkudes membraanipotentsiaali (Schweigert *et al.*, 2001A). Katehoolid inaktiveerivad ka ensüümide nende sulfhüdrüülgruppidele seondumise, ensüümide ristsidumise ja ensüümide kofaktorite, näiteks metalliioonide, sidumise kaudu (Li *et al.*, 1997; Schweigert *et al.*, 2001B; Stoyanovsky *et al.*, 1995). Uurimistööd on näidanud, et kasvukeskkonda kogunev katehool on kasvu inhibeeriva toimega isegi seda lagundavatele ensüümidele, katehooli dioksügenaasidele (Muñoz *et al.*, 2007).

Üldiselt võib jaotada aromaatssete ühendite lagundamise kahte põhietappi. Esmalt toimub mono- või dioksügenaasi abil benseenituum hüdrosüleerimine, mille käigus väheneb selle inertsus. Teises põhietapis lõigatakse benseenituum lahti. Paljud lagundamiserajad koonduvad selles etapis üksikutele tsentraalsetele vaheühenditele, mis lagundatakse edasi põhiainevahetuse metaboliitideks. (Pérez-Pantoja *et al.*, 2019)

1.1.1. Aromaatse tuuma lõhustamist läbi viivad ensüümid

Aromaatse tuuma lõhustamisel on enim kasutatavad ensüümid erinevad dioksügenaasid, mis teostavad hapnik-sõltuvat benseenituuma lõikamist. Dioksügenaasid jagunevad intradioolseteks, mis on Fe^{3+} sõltuvad, ning ekstradioolseteks, mis on Fe^{2+} sõltuvad (Harayama ja Rekik, 1989). Intradioolsed ensüümid, näiteks katehhooli-1,2-dioksügenaas (C12O), lõikavad katehhooli C-C sideme katki kahe kõrvuti asetseva hüdroksüülrühma kandva süsiniku vahelt, mille tulemusel tekib cis,cis-mukoonhape. Ekstradioolsed ensüümid, sealhulgas katehhooli 2,3-dioksügenaas (C23O), lõikavad katehhooli C-C sideme katki hüdroksüülrühmaga süsiniku ja hüdroksüülrühmata süsiniku vahelt, et moodustada 2-hüdroksümukonosemialdehüüd (HMS) (Williams ja Sayers, 1994).

Intra- ja ekstradioolsed dioksügenaasid pärinevad erinevatest evolutsioonilistest liinidest ja need erinevad nii struktuuri kui ka aminohappelise järjestuse poolest, mistõttu on neil erinev substraadispetsiifilisus, vastupidavus stressile, jne (Vaillancourt *et al.*, 2006). Intradioolsete dioksügenaaside kitsam substraadispetsiifilisus tuleneb nende sõltuvusest kahest kõrvuti-paiknevast hüdroksüülrühmaga süsinikust, et läbi viia oma reaktsiooni. Ekstradioolsete dioksügenaaside puhul lagundatava molekuli struktuurile sellist tingimust ei ole ja seetõttu on nad laiemas substraadispetsiifilisusega ning on võimelised lagundama peale katehhoolid ka teisi ühendeid, nagu salitsülaat, gentisaat ja 2-aminofenool (Vaillancourt *et al.*, 2006).

1.1.2. Ekstradioolsed dioksügenaasid

Ekstradioolsed dioksügenaasid on heterogeenne ja erinevatest evolutsioonilistest liinidest põlvnev ensüümide grupp, mis on jaotatud kolmeks superperekonnaks. Esimest superperekonda ehk tüüp I ekstradioolseid dioksügenaase iseloomustab *PROSITE* konsensusjärjestus ning teist superperekonda ehk tüüp II ekstradioolseid dioksügenaase iseloomustab sama konsensusjärjestuse puudumine. Tüüp II ekstradioolseid dioksügenaase on vähem leitud ja uuritud kui tüüp I ekstradioolseid dioksügenaase. (Eltis ja Bolin, 1996) Tüüp III ekstradioolsed dioksügenaasid kuuluvad kupiinide superperekonda ning sisaldavad iseloomulikke β -lehtedest koosnevaid domääne (Dunwell *et al.*, 2001).

Ekstradioolsete dioksügenaaside hulgas on toimunud mitmekesisustumine enamasti koos bakteriaalse liigitekkega. Seda näitab ekstradioolsete dioksügenaaside alamperekondade kokkulangevus bakteriaalse 16S rRNA geenide fülogeneesiga. Samas, ei ole see kokkulangevus täielik, sest on toimunud ka kataboolsete geenide horisontaalne ülekande erinevate liikide vahel (Laurie ja Lloyd-Jones, 1999).

Katehhooli 2,3-dioksügenaasid (C23O) on grupp ekstradioolseid dioksügenaase, mida on põhjalikult uuritud nende võimalike biotehnoloogiliste ja biotervenduslike rakenduste tõttu. C23O on aromaatsete ühendite lagundamise võtmeensüümina levinud paljudes bakterite perekondades, sealhulgas *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Gordonia*, *Thauera* ja teised (Zeng *et al.*, 2020). Kõik seni leitud C23O-id on struktuurilt homotetrameerid ning üldiselt sisaldavad Fe²⁺, aga on näiteid ka C23O-idest, mis asendavad Fe²⁺ iooni Mn²⁺iooniga (Bugg, 2003).

Mitmetes bakteriliikides on kirjeldatud redundantsete C23O-ega tüvesid, mille funktsiooni rakus ei pruugita esmapilgul osata seletada (Keil *et al.*, 1985; O'Donnell ja Williams, 1991). Redundantsus tähendab, et ühes organismis on vähemalt 2 sama funktsiooniga geeni. Kuigi sellised duplikatsioonid võivad vähendada genoomi stabiilsust, on võimalik, et mitme geenikoopia olemasolu pakub siiski eelist üksiku geeniga liikide suhtes (O'Donnell ja Williams, 1991). Jiménez *et al.* (2014) leidsid, et redundantsete katehhooli dioksügenaasid võimaldasid *Pseudomonas putida* tüvel mt-2 paremini toime tulla kõrgematel bensoadi kontsentratsioonidel, sest need hoidsid rakusisese katehhooli kontsentratsiooni madalal. Eelnevalt mainitud autorid pakkusid samuti, et geenide redundanttsus soodustab geneetilist kohastumist ja uute biokeemiliste funktsioonide teket.

1.1.3. Intradioolsed dioksügenaasid

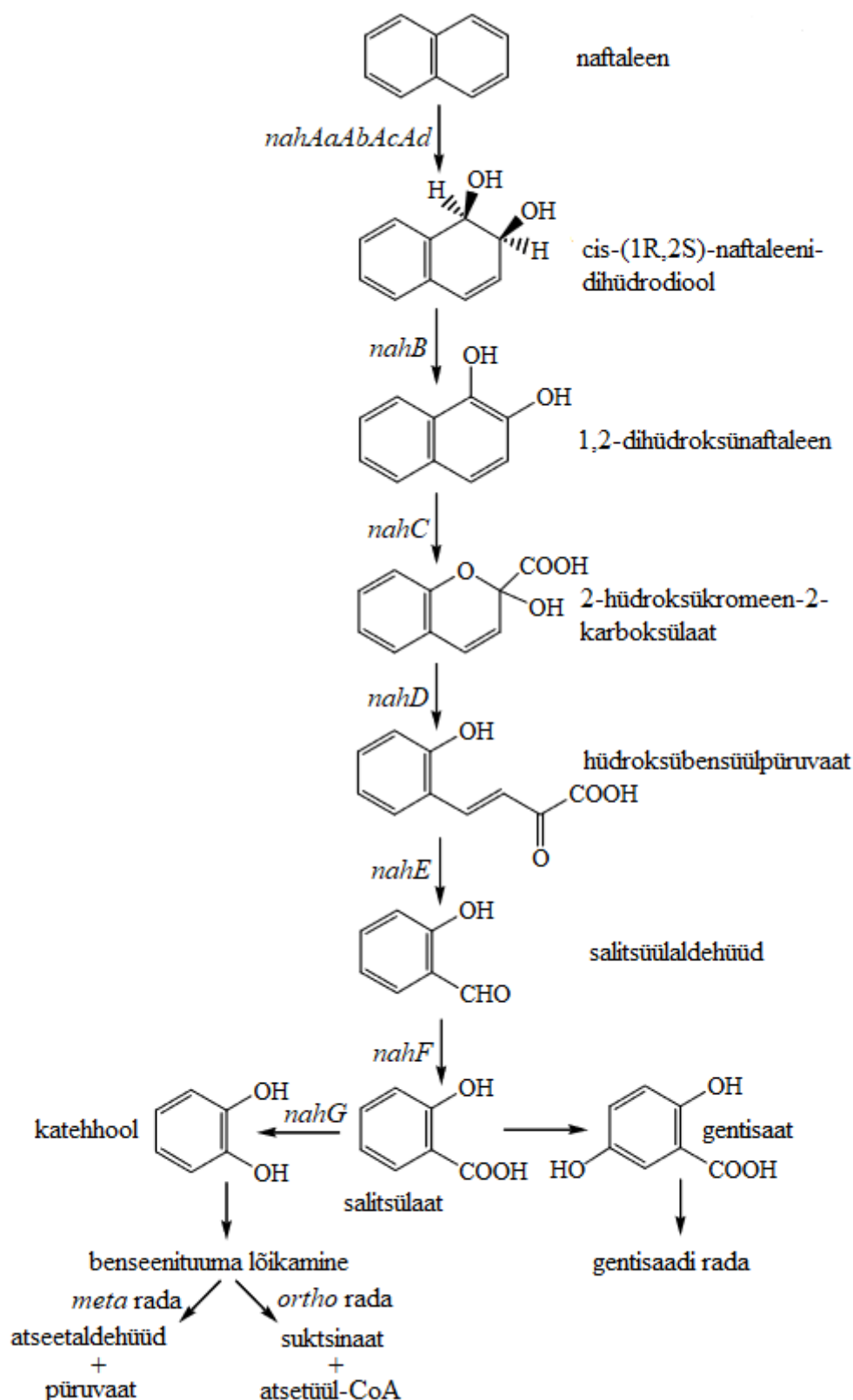
Erinevalt ekstradioolsetest dioksügenaasidest, pärinevad kõik seni kirjeldatud intradioolsed dioksügenaasid samast evolutsioonilisest liinist (Vaillancourt *et al.*, 2006). Guzik *et al.* (2013) jaotasid intradioolsed dioksügenaasid kolme klassi: katehhooli 1,2-dioksügenaasid (C12O), protokatehhuuaadi 3,4-dioksügenaasid ja hüdroksükinooli 1,2-dioksügenaasid. Üks põhjalikumalt uuritud intradioolne dioksügenaas on *Rhodococcus erythropolis* AN-13 C12O (Murakami *et al.*, 1997; Vaillancourt *et al.*, 2006).

Murakami *et al.* (1997) jaotasid C12O-id kolme alam perekonda nende substraadispetsiifilisuse järgi. Esimene perekond sisaldab klorokatehhoolidest kõrge aktiivsusega ensüüme. Teise perekonda kuuluvad ensüümid, millel on kõrge aktiivsus ainult asendusteta katehhooli või katehhooli ja 4-metüülkatehhooli suhtes. Viimane alam perekond koosneb ensüümidest, millel on kõrge aktiivsus 3- ja 4-metüülkatehhoolidest. Kuigi need C12O-id erinevad substraadispetsiifilisuse poolest, on nende struktuurid sarnased. C12O-i subühikud, mis on 29,0 - 38,6 kDa suurused, moodustavad homodimeeri, mida seob kokku helikaalse tõmbeluku motiiv (Guzik *et al.*, 2013; Vetting ja Ohlendorf, 2000). C12O-i subühikutele on iseloomulikuks kahe immobiliseeritud fosfolipiidi olemasolu, aga nende

funktsioon pole veel teada. Arvatakse, et need võivad olla regulatoorse või isegi efektor funktsiooniga. C12O-ide katalüütilised domeenid koosnevad kahest paralleelsest β -lehest, mis moodustavad võileiva struktuuri sümmeetriliselt mõlemas subühikus (Vetting ja Ohlendorf, 2000). C12O-i perekonnaliikmed on peamiselt puhastatud ja iseloomustatud gramnegatiivsetest bakteritest (Pérez-Pantoja *et al.*, 2019).

1.2. Naftaleeni aeroobne lagundamine

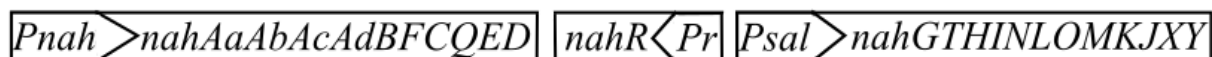
Naftaleen on lihtsaima struktuuriga polütsükline aromaatne ühend, mis koosneb kahest benseenituumast. Oma võrdlemisi lihtsa struktuuri tõttu on ta aromaatsete ühendite hulgas suurima lahustuvusega ja heaks mudeliks ka suuremate ning keerulisemate struktuuridega aromaatsete ühendite lagundamise uurimiseks. Naftaleeni tekib mitmetes naftatööstuse protsessides, fossiilkütuste põletamisel ja ka looduslikult esineva mittetäieliku põlemise puhul, näiteks metsapõlengutes. (Seo *et al.*, 2009) Naftaleeni kasutatakse keemiatööstuses põhiliselt erinevate ühendite sünteesis prekursorina ning igapäevaelus võib seda leida ka koitõrjevahendites (Preuss *et al.*, 2003). Naftaleen on inimestele ohtlik, sest võib põhjustada nii hemolüütilist aneemiat kui ka kasvajate teket (Eaton ja Chapman, 1992).



Joonis 1. Naftaleeni lagundamine salitsülaadiks koos reaktsioone läbi viivaid ensüüme kodeerivate naftaleeni ülemises operonis paiknevate geenide nimetustega *Pseudomonas putida* tüve G7 näitel (Seo *et al.*, 2009, modifitseeritud). Ensüümide täispikad nimed on leitavad Joonise 2. allkirjas.

Naftaleeni lagundamise bakteriaalseid radasid on palju uuritud ning üldistades koosnevad need kahest põhietapist, mille eest vastutavad tavaliselt kaks erinevat operoni. Esimeses etapis toimub naftaleeni molekuli ühe aromaatsse tuuma lõhkumine, mille tulemusena tekib salitsülaad (Joonis 1) (Takizawa *et al.*, 1994). Selles reaktsioonide jadas osalevaid ensüüme kodeerivad geenid paiknevad naftaleeni lagundamise raja ülemises ehk *nah* operonis (Joonis 2). Teises etapis toimub naftaleeni lagundamise raja alumiselt ehk *sal* operonilt kodeeritud ensüümide toimetel salitsülaadi lagundamine üle katehhooli, et moodustada tsitraaditsükli vaheühendid (Joonis 2) (Yen ja Gunsalus, 1985). Nii *nah* kui ka *sal* operon on reguleeritud nende vahel paikneva geeni *nahR* poolt kodeeritud salitsülaad-sõltuva regulaatoriga, mille puudumisel ei toimuks transkriptsiooni kummaltki operonilt (Joonis 2) (Yen ja Gunsalus, 1985).

Salitsülaadi lagundamise alternatiivseks teeks on lagundamine üle gentisaadi, kuid see rada on vähemlevinud ning seetõttu ka vähem uuritud kui eelnevalt kirjeldatud lagundamisrada (Zhou *et al.*, 2001). Gentisaadi raja geenide paigutus erineb arhetüüpselt naftaleeni lagundamise raja ülemise ja alumise operoni struktuurist (Xi-Hui *et al.*, 2005). Näiteks on *Ralstonia sp.* tüves U2 kirjeldatud gentisaadi rada kodeeritud ühelt operonilt, mis sisaldab nii naftaleenist salitsülaadi kui ka salitsülaadi lagundamiseks üle gentisaadi jaoks vajalikke valke kodeerivaid gene (Joonis 4 ja Joonis 6) (Zhou *et al.*, 2001).



Joonis 2. Naftaleeni lagundamise raja ülemine ja alumine operon *Pseudomonas putida* tüve G7 plasmiidis NAH7. Naftaleeni raja ülemise ehk *nah* operoni geenid: *nahA* - naftaleeni dioksügenaas; *nahB* - cis-dihüdrodiooli dioksügenaas; *nahF* - salitsüülaldehüüdi dehüdrosügenaas; *nahC* - 1,2-dihüdrosünaftaleeni dioksügenaas; *nahQ* - dibensotiofeeni oksüdatsiooni valk; *nahE* - 2-hüdrosübensüülpiruvaadi aldolaas; *nahD* - 2-hüdrosükromeen-2-karboksülaadi isomeraas. Naftaleeni raja alumise ehk *sal* operoni geenid: *nahG* - salitsülaadi 1-hüdrosülaas; *nahT* - kloroplast-tüüpi ferredoksiin; *nahH* - katehhooli 2,3-dioksügenaas; *nahI* - 2-hüdrosükonosemialdehüüdi hüdrolaas; *nahL* - 2-okso-4-pentenoaadi hüdrataas; *nahO* - atseetaldehüüdi dehüdrosügenaas; *nahM* - 4-hüdrosü-2-okso-pentanaadi aldolaas; *nahK* - 4-oksalokrotanaadi dekarboksülaas; *nahJ* - oksalokrotanaadi tautomeraas; *nahX* - teadmata funktsiooniga valk; *nahY* - naftaleeni kemotaksise valk; *nahR* - LysR tüüpi transkriptsiooni aktivaator. (Sota *et al.*, 2006, põhjal)

Pseudomonas putida tüve G7 plasmiidil NAH7 paiknevad *nah* ja *sal* operon on ühed põhjalikumalt uuritud naftaleeni lagundamisraja ensüüme kodeerivatest struktuuridest (Dunn ja Gunsalus, 1973). Ülemine operon *nahAaAbAcAdBFCQED* (Joonis 2) koosneb kümnest geenist, mis kodeerivad ensüüme naftaleeni lagundamiseks salitsülaadini (Joonis 1) (Eaton,

1994). Esmalt hüdroksüleerib multikomponentne naftaleeni dioksügenaas (*nahAaAbAcAd*) naftaleeni 1,2-positsioonis ning tekib cis-(1R, 2S)-naftaleeni dihüdrodiool, mis dehüdrogeenitakse 1,2-dihüdroksünaftaleeniks cis-dihüdrodiooli dehüdrogenaasi (*nahB*) abil. Edasi toimub 1,2-dihüdroksünaftaleeni benseenituuma lõikamine dihüdroksünaftaleeni dioksügenaasiga (*nahC*), et moodustada 2-hüdroksükromeen-2-karboksülaat. See omakorda lagundatakse hüdroksübensüülpüruvaadiks 2-hüdroksükromeen-2-karboksülaadi isomeraasi (*nahD*) poolt ning 2-hüdroksübensüülpüruvaadi aldolaasi (*nahE*) toimel moodustub salitsüülaldehyüd ja püruvaat. Ülemise operoni viimaseks reaktsiooniks on salitsüülaldehyüdi lagundamine salitsülaadiks, mida katalüüsib salitsüülaldehyüdi dehüdrogenaas (*nahF*) (Joonis 1) (Barnsley, 1976B; Davies ja Evans, 1964; Eaton ja Chapman, 1992; Habe ja Omori, 2003). *nah* operon on positiivselt reguleeritud salitsülaadist sõltuva LysR tüüpi transkriptsiooni aktivaatoriga (*nahR*) (Peng *et al.*, 2008; Yen ja Gunsalus, 1985).

1.3. Na-salitsülaadi lagundamine

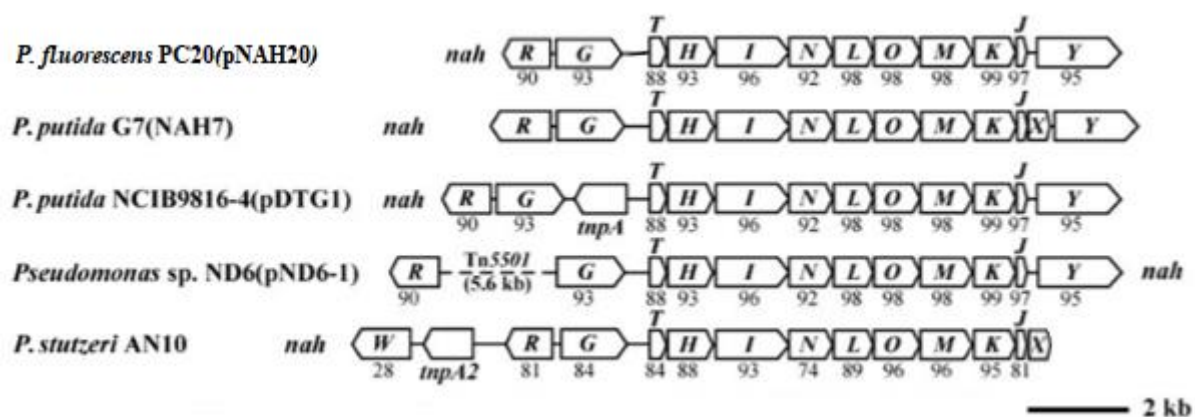
Salitsülaat ei ole ainult naftaleeni lagundamise vaheühend, vaid see on ka salitsüülhappe näol taimehormoon ja erinevate ravimite, näiteks aspiriin, sünteesis kasutatav komponent (Price *et al.*, 2000; Vlot *et al.*, 2009). Salitsülaadi lagundamine saab toimuda kolme erineva raja kaudu: katehhooli *meta* rada, katehhooli *ortho* rada ja gentisaadi rada (Joonis 4). Kõigi kolme raja lõpp-produktideks on erinevad tsitraaditsükli vaheühendid (Habe ja Omori, 2003). Katehhooli *meta* ja *ortho* raja esimene ensüüm on salitsülaadi 1-hüdroksülaas (SH), mis on ühe subühikuga flavoproteiinne monooksügenaas, mis dekarboksüleerib ja hüdroksüleerib salitsülaadi katehhooliks (Costa *et al.*, 2019). Gentisaadi rada seevastu saab alguse salitsülaadi hüdroksüleerimisest salitsülaadi 5-hüdroksülaasiga, mille tulemusena tekib üksteise suhtes *para* asendis paiknevate hüdroksüülrühmadega bensoaat ehk gentisaat. Salitsülaadi 5-hüdroksülaas on multikomponentne monooksügenaas, mis koosneb reduktaasist, ferredoksiini dimeerist ja raud-väävel valkude heksameerist (Fang ja Zhou, 2014).

1.3.1. Katehhooli *meta* rajaga tüved

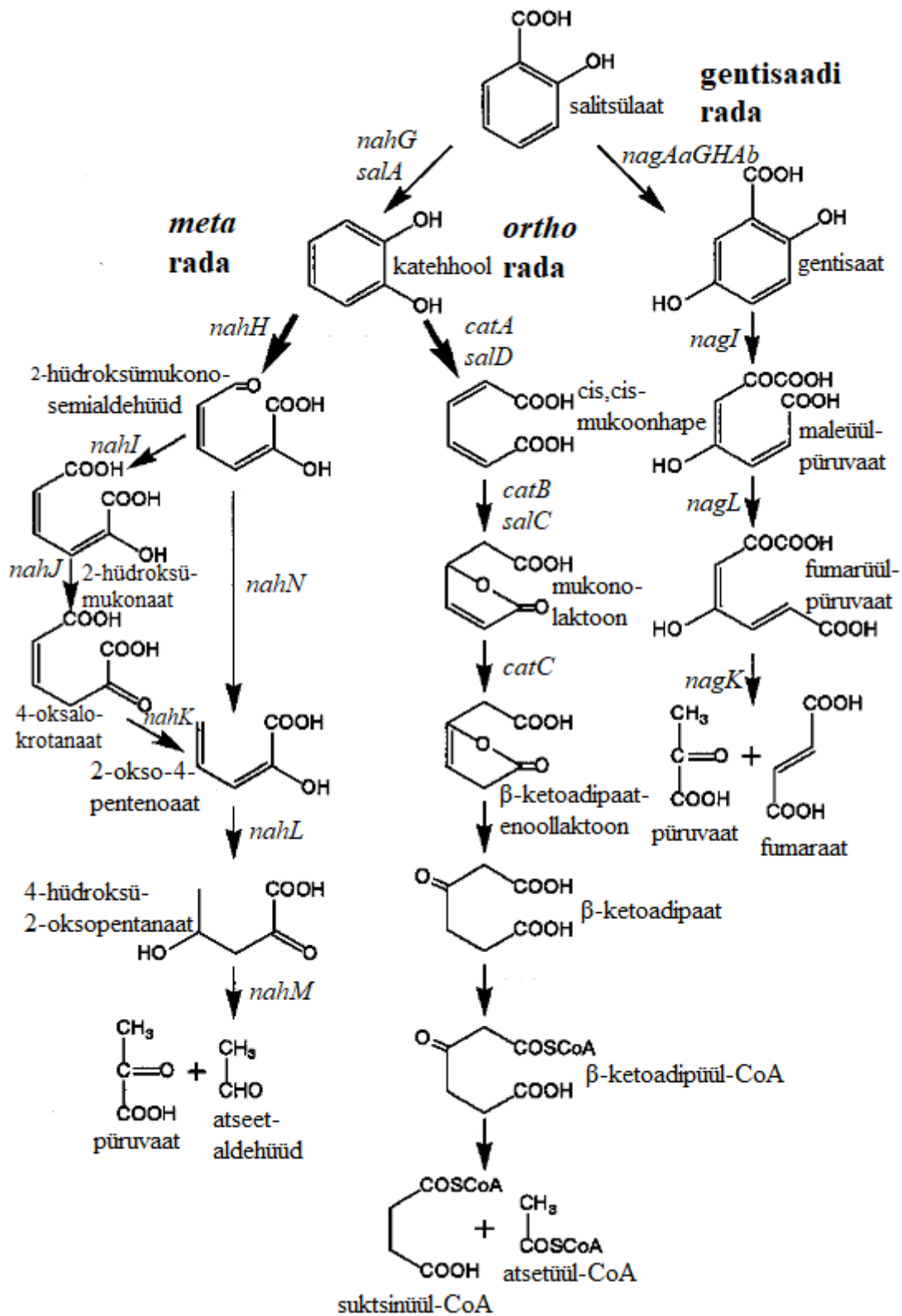
Salitsülaadi lagundamist on põhjalikult uuritud *Pseudomonas putida* tüve G7 plasmidi NAH7 põhjal. Salitsülaadi tsitraaditsükli vaheühenditeks üle viimise eest vastutab naftaleeni lagundamise alumine operon, mis koosneb kaheteistkümnest geenist (Joonis 2) *nahGTHINLOMKJXY* (Sota *et al.*, 2006). Geen *nahY* ei osale otseselt katabolismis, vaid kodeerib naftaleeni kemotaksise valku ning *nahX* funktsiooni pole veel tuvastatud (Grimm ja Harwood, 1997; Grimm ja Harwood, 1999; Sota *et al.*, 2006). Geene *nahY* ja *nahX* ei leidu

kõikides *sal* operonides, näiteks *Pseudomonas stutzeri* tüvel AN10 puudub *nahY* ning *Pseudomonas fluorescens* tüvel PC20 puudub *nahX* (Joonis 3).

Pseudomonas putida tüve G7 katehhooli *meta* rada algab salitsülaadi dekarboksüleerimisega SH-i poolt (*nahG*), et moodustada katehhool (Joonis 4). Katehhooli benseenituumaa lõikab katki katehhooli 2,3-dioksügenaas (*nahH*) ning moodustub 2-hüdrosümukonosemialdehüüd (HMS), mis lagundatakse 2-hüdrosümukonosemialdehüüdi hüdrolaasiga (*nahI*) 2-hüdrosümukonaadiks. 2-hüdrosümukonaat isomeriseeritakse 4-oksalokrotanaadi isomeraasiga (*nahJ*) 4-oksalokrotanaadiks ning dekarboksüleeritakse seejärel 4-oksalokrotanaadi dekarboksülaasiga (*nahK*) 2-okso-4-pentenoaadiks.



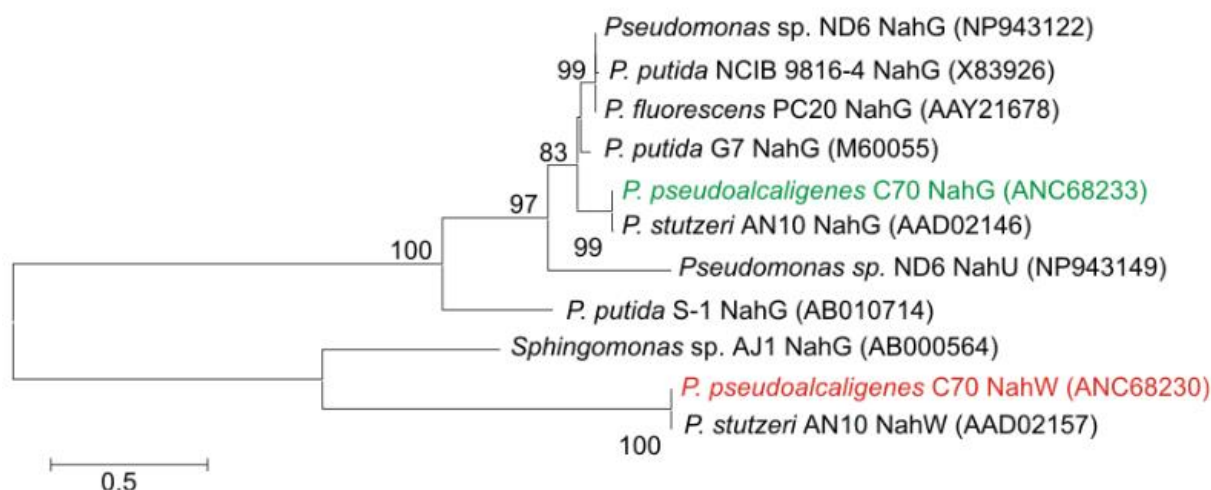
Joonis 3. Salitsülaadi lagundamise operonid perekonna *Pseudomonas* tüvedes (Sota *et al.*, 2006, modifitseeritud).



Joonis 4. Salitsülaadi lagundamise rajad koos lagundamises osalevate geenide nimetustega (Habe ja Omori, 2003, modifitseeritud). Katehhoooli meta rada on *Pseudomonas putida* tüve G7, katehhoooli ortho rada *Pseudomonas reinekei* tüve MT1 ja gentisaadi rada *Ralstonia sp.* tüve U2 näitel (Chakrabarty, 1972; Sota *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2001).

2-hüdrosümukonosemialdehüüdi lagundamine võib toimuda ka teise 2-hüdrosümukonosemialdehüüdi hüdrolaasiga (*nahN*), et saada otse 2-okso-4-pentenoaat (Joonis 4). Mõlema ensüümi moodustatud 2-okso-4-pentenoaat omakorda lagundatakse 4-hüdrosü-2-oksopentanaadiks 2-okso-4-pentenoadi hüdrataasiga (*nahL*). Saadud 4-hüdrosü-2-oksopentanaat lagundatakse 4-hüdrosü-2-oksopentanaadi aldolaasiga (*nahM*) ning tekivad püruvaat ja atsetaldehüüd, mis liituvad tsitraaditsükliga (Habe ja Omori, 2003; Yen ja Gunsalus, 1982).

Analoogset salitsülaadi lagundamise *meta* rada on kirjeldatud ka *Pseudomonas stutzeri* tüves AN10, kuid erinevalt tüvest G7 paikneb selle tüve salitsülaadi lagundamise operon kromosoomis (Bosch *et al.*, 2000). Tüvel AN10 esineb ka lisaks operonisisesele SH-i geenile, *nahG*, operonist väljas paiknev SH-i geen *nahW* (Joonis 3), mis aitab sellel tüvel toime tulla kõrgemate naftaleeni ja salitsülaadi kontsentratsioonidega. Tüve AN10 *nahW* paikneb kromosoomis IS5-laadsete DNA insertioonelementide vahel (Bosch *et al.*, 2000). NahW ja NahG kuuluvad järjestuse analüüsi põhjal erinevatesse SH-i perekondadesse (Joonis 5).



Joonis 5. Tüve C70 ja GenBank andmebaasist leitud referentstüvede salitsülaadi 1-hüdrosülaaside aminohappeliste järjestuste põhjal koostatud fülogeneesipuu. Hargnemiste juures on näidatud bootstrap analüüsi (1000 replikaati) väärtused protsentides. Mõõtsakaala pikkus näitab 0,5 asendust aminohappe kohta (Smirnova, 2019).

NahW eristub teistest SH-ideid koodonkasutuse ja N-terminaalse konserveerunud kofaktori sidumissaidi puudumise (GxGxxG) poolest (Bosch *et al.*, 1999). Tüve AN10 kahel SH-l on ka erinev substraadispetsiifika, nii on NahG aktiivsus kõrgem metüülsalitsülaatide ning NahW aktiivsus klorosalitsülaatide puhul. (Bosch *et al.*, 1999). Kuigi *nahW* paikneb väljaspool *sal* operoni on see samuti positiivselt reguleeritud geeni *nahR* kodeeritud

transkriptsiooni aktivaatoriga. Bosch *et al.* (1999) näitasid lisaks, et NahG ja NahW aktiivsused sõltusid sellest, millise asendusrühmaga salitsülaadil tüve oli kasvatatud.

Pseudomonas putida tüve ND6 plasmiidil pND6-1 leiti ka kaks SH-i, *nahG* ja *nahU*, mis erinevalt AN10 SH-i geenidest, ei paikne üksteise vahetus läheduses, vaid umbes 73 kbp kaugusel üksteisest (Joonis 3). *P. putida* tüvi ND6 rakendab salitsülaadi lagundamiseks samuti *meta* rada. Nagu ka tüves AN10 leiduv *nahW* paikneb *nahU* väljaspool klassikalist naftaleeni alumist operoni, kuid *nahU* järjestus erineb oluliselt *nahW* järjestusest (Joonis 5), sisaldades *nahW*-s puuduvat konserveerunud N-terminaalset kofaktori sidumissaiti (GxGxxG). Plasmiidil pND6-1 on ka kaks salitsüülaldehüüdi dehüdrogenaasi (*nahF* ja *nahV*) ning *nahU* lähedal paikneb katehhooli 1,2-dioksügenaasi kodeeriv geen *catA*. Tüve ND6 SH-ide võime lagundada erinevate asendusrühmadega salitsülaate on erinev, NahU aktiivsus on salitsülaati, metüülsalitsülaate kui ka klorosalitsülaate sisaldavas keskkonnas kõrgem kui NahG aktiivsus. (Li *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005)

1.3.2. Katehhooli *ortho* rajaga tüved

Pseudomonas reinekei tüves MT1 toimub salitsülaadi lagundamine katehhooliks SH-iga (*salA*). Järgmisena lõigatakse katehhooli benseenituum lahti intradioolselt C12O-iga (*catA*, *salD*), et moodustada cis,cis-mukoonhape (Joonis 4). Cis,cis-mukoonhape laktoniseeritakse cis,cis-mukonaadi tsükloisomeraasiga (*catB*, *salC*), et moodustada uus tsükline ühend mukonolaktoon, mis isomeriseeritakse β -ketoadipaatenoollaktooniks mukonolaktooni isomeraasiga (*catC*). Edasi lagundatakse β -ketoadipaatenoollaktoon β -ketodipaadi rajal (Joonis 4). (Cámara *et al.*, 2007; Chakrabarty, 1972; Habe ja Omori, 2003)

P. reinekei tüvel MT1 on nii C12O-ist kui ka cis,cis-mukonaadi tsükloisomeraasist mitu koopiat, ning neid kodeerivad geenid paiknevad eraldi klastrites. Üks C12O-i ja cis,cis-mukonaadi tsükloisomeraasi kodeerivate geenide paar paikneb klassikalises katehhooli lagundamise klastris ning on ekspresseeritud, kui tüvi kasvab salitsülaati sisaldaval söötmel. Teine paar paikneb *sal* klastris koos SH-i ja kahte regulaatorit SalR1 ja SalR2 (mis on homoloogsed tüve G7 NahR-ga) kodeerivate geenidega. *sal* klaster on samuti ekspresseeritud kui tüvi MT1 kasvab salitsülaadil ja asendustega salitsülaatidel. Selline *sal* klaster on ebatavaline, sest SH-i kodeeriv geen paikneb koos katehhooli *ortho* rada kodeerivate geenidega mitte koos katehhooli *meta* raja geenidega nagu klassikalises naftaleeni alumises *sal* operonis. Tüvel on olemas ka *meta* raja geenid, kuid need ei ole klasterdunud salitsülaadi poolt indutseeritavasse operoni, mistõttu neid ei ekspresseerita salitsülaati sisaldaval söötmel kasvades. (Cámara *et al.*, 2007, 2009)

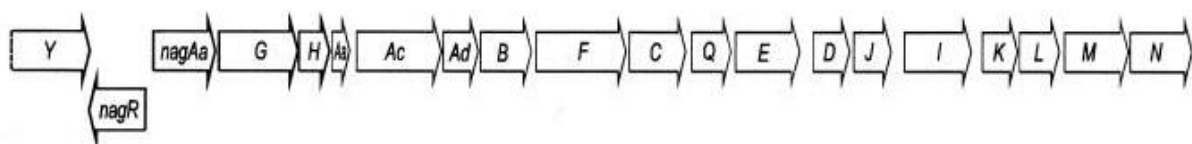
Tüve MT1 *ortho* raja ensüümid on võimelised lagundama asendusrühmadega salitsülaate nii, et ei teki nn. tupikühendeid (*dead end products*), mis on tavapärasel teistes *ortho* rada omavates tüvedes. Levinum lahendus asendustega (nt metüülrühm) salitsülaatide lagundamiseks on katehhooli *meta* rada omavate tüvede kasutamine. (Cámara *et al.*, 2007, 2009)

Pseudomonas putida tüvi BS3701 sisaldab nii plasmiidil paiknevat katehhooli *meta* rada kui ka kromosoomi erinevates osades paiknevat kolme katehhooli *ortho* rada, mille C12O-i kodeerivad geenid on *catA(0)*, *catA(2)* ja *catA(8)* (Pozdnyakova-Filatova *et al.*, 2020). *catA(0)* paikneb operonis kõrvuti bensoadi dioksügenaasi subühiku geeniga *benA*, *catA(8)* on osa klassikalisest katehhooli lagundamise operonist ja *catA(2)* paikneb SH-i geeni *nahU* vahetus läheduses. Selle tüve *meta* rada ei ole indutseeritav naftaleeni lagundamisel, aga sellel esineb madal konstitutiivne ekspressioon. Tüvi BS3701 rakendab salitsülaadi lagundamiseks *ortho* raja ensüüme. Pozdnyakova-Filatova *et al.*, (2020) leidsid, et kaks kolmest C12O-ist (*catA(2)* ja *catA(8)*) olid indutseeritavad ehk nende transkriptsioon tõusis tüve BS3701 kasvatamisel salitsülaati sisaldaval söötmel. (Pozdnyakova-Filatova *et al.*, 2020)

1.3.3. Gentisaadi rajaga tüved

Salitsülaadi lagundamist gentisaadi kaudu on kirjeldatud näiteks *Ralstonia sp.* tüves U2, kus naftaleeni lagundamise eest vastutab plasmiidne *nag* operon (Fuenmayor *et al.*, 1998), mis koosneb geenidest *nagAaGHAbAdAcBFCQEDJIKLMN* (Joonis 6). *Nag* operon on nii geenide järjestuse kui ka nende homoloogia põhjal sarnane plasmidi NAH7 *nah* operoniga, kuid eristub järgmiste oluliste aspektide poolest. Nimelt on *nag* operonis naftaleeni dioksügenaasi komponente kodeerivate geenide vahele inserteerunud salitsülaadi 5-hüdrosülaasi kodeerivad geenid *nagGH* ning on muutunud ka geenide *nagJIKLMN* järjestus operoni lõpus (Zhou *et al.*, 2001).

Geenid *nagIKL* kodeerivad ensüüme, mis vastutavad gentisaadi üleviimise eest põhiainevahetuse vaheühenditeks. *Nag* operonist ülesvoolu paiknevad geenid *nagY* ja *nagR* (Joonis 6), mis kodeerivad vastavalt kemotaksise retseptorit ja plasmiidil NAH7 paikneva geeni *nahR* produktile sarnast LysR-tüüpi transkriptsiooni aktivaatorit. (Zhou *et al.*, 2001)



Joonis 6. *Ralstonia sp.* tüve U2 *nag* operon (Zhou *et al.*, 2001).

Gentisaadi raja esimeseks protsessiks on salitsülaadi hüdroksüleerimine salitsülaadi 5-hüdroksülaasiga (*nagAaGHAb*), et moodustada gentisaat (Joonis 4) (Fuenmayor *et al.*, 1998). Gentisaadi benseenituum lõigatakse lahti gentisaadi 1,2-dioksügenaasiga (*nagI*) ning moodustub maleüülpüruvaat, mis isomeriseeritakse fumarüülpüruvaadiks maleüülpüruvaadi isomeraasiga (*nagL*). Fumarüülpüruvaat lagundatakse fumarüülpüruvaadi hüdrolaasiga (*nagK*) tsitraaditsükli vaheühenditeks fumaraadiks ja püruvaadiks (Zhou *et al.*, 2001).

1.4. Funktsionaalsete rühmadega aromaatsete ühendite lagundamine

Asendusrühmadega aromaatsete ühendite lagundamisel asendusrühmade elimineerimine (β -oksüdatsioon, dehalogeenimine, hüdroksüleerimine jne), muutmine või muutumatuna säilimine enne aromaatses tuuma lõhustamist sõltub kasutatavast bakteritüvest ning selle geneetilisest pagasist (Nogales *et al.*, 2017).

Asendusrühmadega salitsülaatide lagundamine võib toimuda katehhooli *meta/ortho* rajas või gentisaadi rajas. Näiteks *Pseudomonas putida* tüvi CSV86 on võimeline katehhooli *meta* raja kaudu lagundama nii 3- kui ka 4-metüülsalitsülaati, aga *Pseudomonas reinekei* tüvi MT1 lagundab samu ühendeid *ortho* raja kaudu (Cámara *et al.*, 2007; Mahajan *et al.*, 1994).

Sõltuvalt funktsionaalsete rühmade paigutusest võivad nendes radades tekkida vaheühenditena nn. tupikühendid, mida ei ole järgnevad ensüümid võimelised lagundama ja eritatakse selle tõttu keskkonda. Enamasti ei sobi katehhooli *ortho* rada metüleeritud aromaatsete ühendite lagundamiseks kuna tekib 4-metüülmukonolaktoon, mis on tupikühendiks ning koguneb keskkonda (Catelani *et al.*, 1971). Samas näiteks *P. reinekei* tüvi MT1 suudab 4-metüülmukonolaktooni isomeriseerida 3-metüülmukonolaktooniks ning edasi lagundada analoogselt asenduseta mukonolaktoonile (Marín *et al.*, 2010).

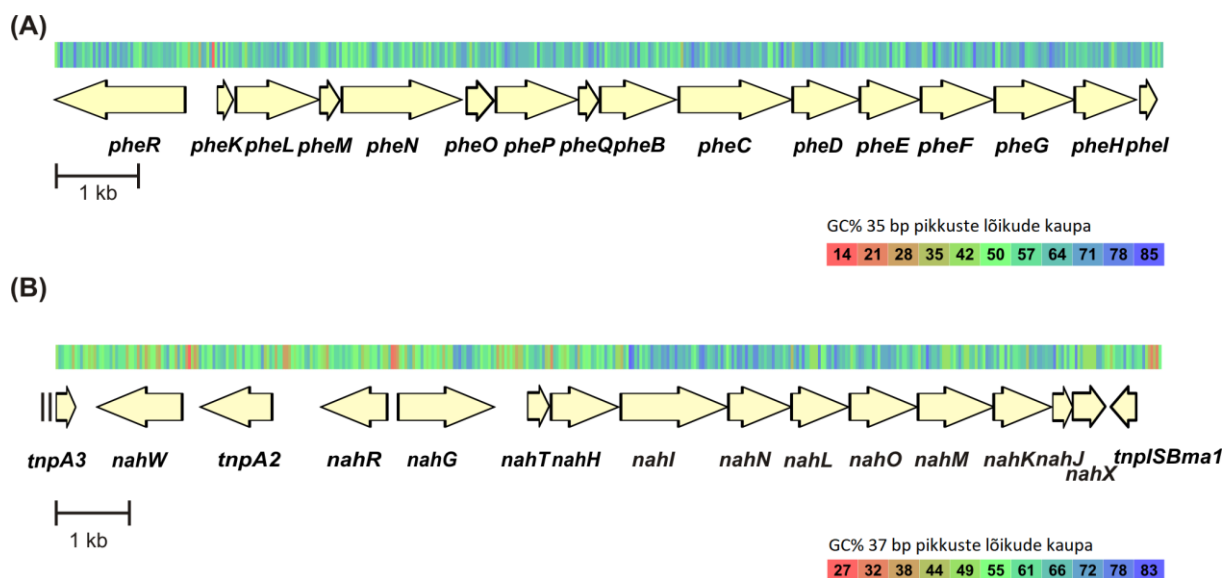
1.5. Naftaleeni ja salitsülaadi lagundamine perekonnas *Pseudomonas*

Naftaleeni lagundamist perekonnas *Pseudomonas* kirjeldasid esmalt Davies ja Evans aastal 1964. *Pseudomonase* liigid on kõige laiemalt levinud saastunud keskkondade koloniseerijaid, neid on isoleeritud nii toornafta, kivisöetõrva kui ka teiste tööstuslike saasteainetega reostatud keskkondade proovidest (Mohapatra ja Phale, 2021). *Pseudomonase* liikides paiknevad valdavalt aromaatsete ühendite lagundamisega seotud geenid klastritena operonides, mis asuvad suurtel plasmiididel (Chakrabarty, 1972; Dunn ja Gunsalus, 1973; Nogales *et al.*, 2017). Dennis ja Zylstra (2004) pakkusid, et kataboolsete geenide paiknemine plasmiididel ja ka mobiilsete geneetiliste elementide vahel soodustab nende kiiremat

muteerumist, evolutsiooni ning liikumist peremeestüvede vahel, mis annab *Pseudomonase* liikidele eelise saastunud kasvukeskkondades.

1.5.1. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70

Pseudomonas pseudoalcaligenes tüvi C70 on eraldatud Läänemerest Narva lahe pindmisest veekihi Eeva Heinaru poolt aastal 2008. Tüve genoomi sekveneerimisel tuvastati kolm erinevat 16S rRNA geeni järjestust, millest kaks olid sarnased *Pseudomonas mendocina* ning kolmas *Pseudomonas pseudoalcaligenes* järjestustega. Fenotüübiliste tunnuste ja *rpoB* geeni järjestuse analüüsi põhjal klassifitseeriti tüvi C70 liiki *pseudoalcaligenes* (Vedler *et al.*, 2013). Tüvi C70 on võimeline lagundama fenooli, naftaleeni ja salitsülaati, aga ei suuda lagundada bensoaati ega toluuaati. Tüvi sisaldab ühte suurt plasmidi, millel ei ole leitud aromaatsete ühendite lagundamisega seotud geene (Jutkina *et al.*, 2011; Jõesaar *et al.*, 2017; Vedler *et al.*, 2013).

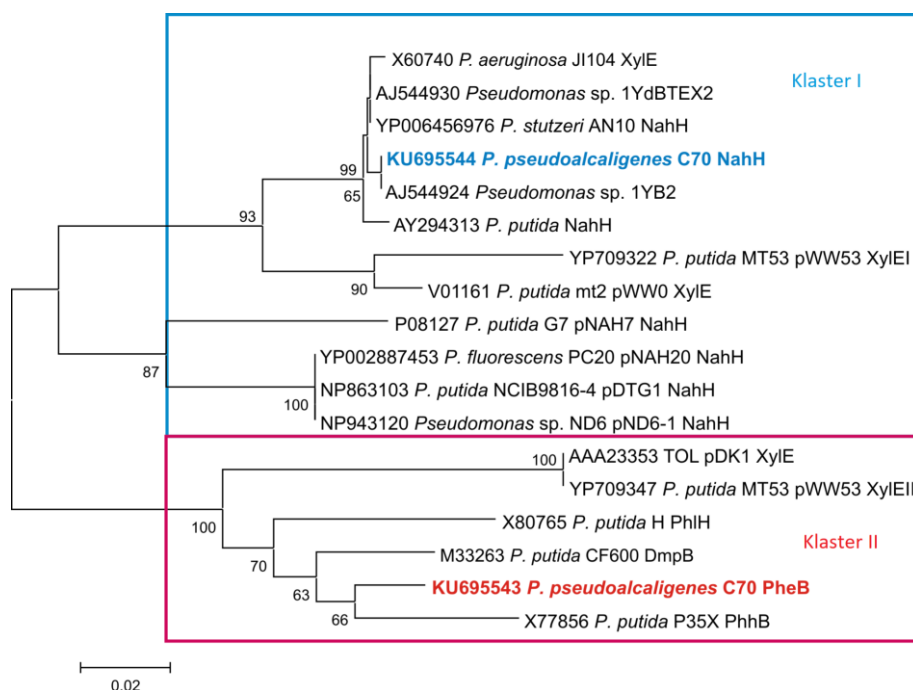


Joonis 7. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve C70 fenooli (A) ja naftaleeni lagundamise raja alumise operoni (B) struktuur (Jõesaar *et al.*, 2017, modifitseeritud).

Tüves C70 paiknevad naftaleeni lagundamiseks vajalikke valke kodeerivad geenid kromosomaalses operonis, mis on sarnane *P. stutzeri* tüves AN10 kirjeldatud kromosomaalse naftaleeni lagundamise operoniga (Merike Jõesaar, avaldamata andmed; Jõesaar *et al.*, 2017). Tüvel C70 on sarnaselt *P. stutzeri* tüvele AN10 (Joonis 3) kaks SH-i kodeerivat geeni, *nahG* ja *nahW* (Joonis 7B). Nii *sal* operoni sees paikneva geeni kodeeritud NahG kui ka operonist väljaspool insertioonelementide vahel paikneva geeni kodeeritud NahW aminohappelised järjestused on mõlemas tüves identsed. Nii geen *nahW* kui ka terve *sal* operon paiknevad

tüves C70 DNA insertioonelementide vahel ning võib oletada, et need on omandatud horisontaalse geeniülekanne teel (Jõesaar *et al.*, 2017).

Fenooli lagundamiseks mööda katehhooli *meta* rada on tüvel C70 kromosomaalne *pheRKLMNOPQBCDEFGHI* operon (Joonis 7A), mis sarnaneb *Pseudomonas sp.* CF600 *dmp* operoniga (Jõesaar *et al.*, 2017). Seega on tüvel ka kaks redundantset C23O-i, mida kodeerivad geenid *nahH* ja *pheB*, mis pärinevad erinevatest evolutsioonilistest klastritest (Joonis 8) ning paiknevad vastavalt naftaleeni lagundamise raja alumises operonis ja fenooli lagundamise operonis. Redundantsete C23O-ide omamine muudab tüve C70 väga efektiivseks fenooli ja naftaleeni lagundajaks, eriti kui tegemist on nende ainete seguga (isegi kõrgematel kontsentratsioonidel). Substraatide segul kasvamisel on indutseeritud nii fenooli kui ka naftaleeni lagundamise operonid ja kaks samaaegselt töötavat C23O-i takistavad toksilise toimega katehhooli kogunemist kasvukeskkonda. (Jõesaar *et al.*, 2017)



Joonis 8. Tüve *P. pseudoalcaligenes* C70 ja GenBank andmebaasist leitud referentstüvede katehhooli 2,3-dioksügenaaside aminohappeliste järjestuste põhjal koostatud fülogeneesipuu. Hargnemiste juures on näidatud bootstrap analüüsi (1000 replikaati) väärtused protsentides. Mõõtsakaala pikkus näitab 0,02 asendust aminohappe kohta (Jõesaar *et al.*, 2017).

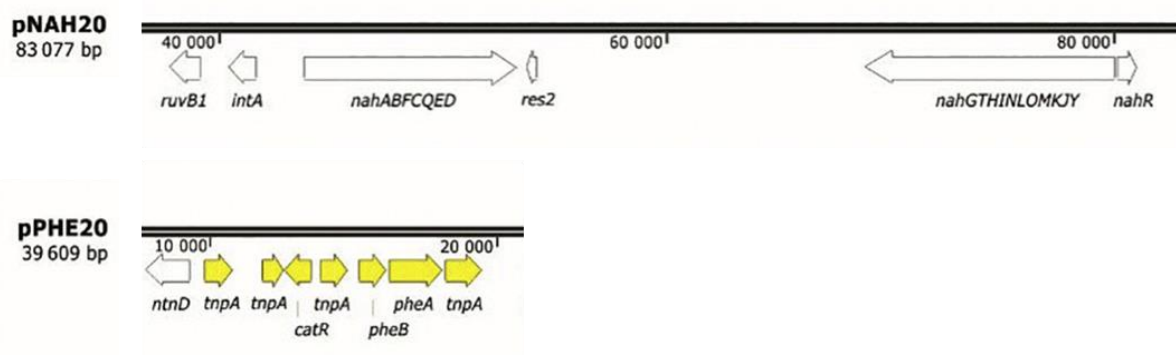
1.5.2. *Pseudomonas fluorescens* PC20

Pseudomonas fluorescens tüve PC20 eraldas Eeva Heinaru Ida-Virumaa põlevkivitööstuse piirkonnas oleva Kohtla jõe veest aastal 1994 (Heinaru *et al.*, 2000). See tüvi lagundab nii naftaleeni, salitsülaati kui ka fenooli ning sisaldab kolme suurt mobiilset plasmidi.

pNAH20 on 83 042 aluspaari (bp) pikk IncP-9 tüüpi naftaleeni lagundamiseks vajalikke gene kandev plasmiid (Joonis 9), millel on mitmeid ühiseid jooni *P. putida* tüve NCIB 9816-4 plasmiidiga pDTG1. Samas puudub pNAH20-l insertioonelement, mis muudab naftaleeni alumise operoni tüves NCIB 9816-4 mittefunktsionaalseks. Seega säilib tüves PC20 funktsionaalne naftaleeni lagundamise alumine operon ja selle sees ka C23O-i kodeeriv geen *nahH*. (Heinaru *et al.*, 2009)

Fenooli monooksügenaasi ja katehooli 1,2-dioksügenaasi kodeerivad geenid, *pheA* ja *pheB*, paiknevad tüves PC20 plasmiidis pPHE20 (39 609 bp) (Joonis 9), mis ei ole iseseisvalt konjugatsioonivõimeline, aga on mobiliseeritav pNAH20 abiga (Heinaru *et al.*, 2009). pPHE20 sisaldab ka *ttg* operoni, mis kodeerib toluueeni väljavoolupumpade-laadseid valke.

Tüve kolmandal plasmiidil, pG20 (13 3709 bp), ei ole kataboolseid gene, aga sellel paiknevad raskemetallide suhtes resistentsust tagavate väljavoolupumpasid kodeerivate operonide sarnased järjestused (Elken *et al.*, 2020).



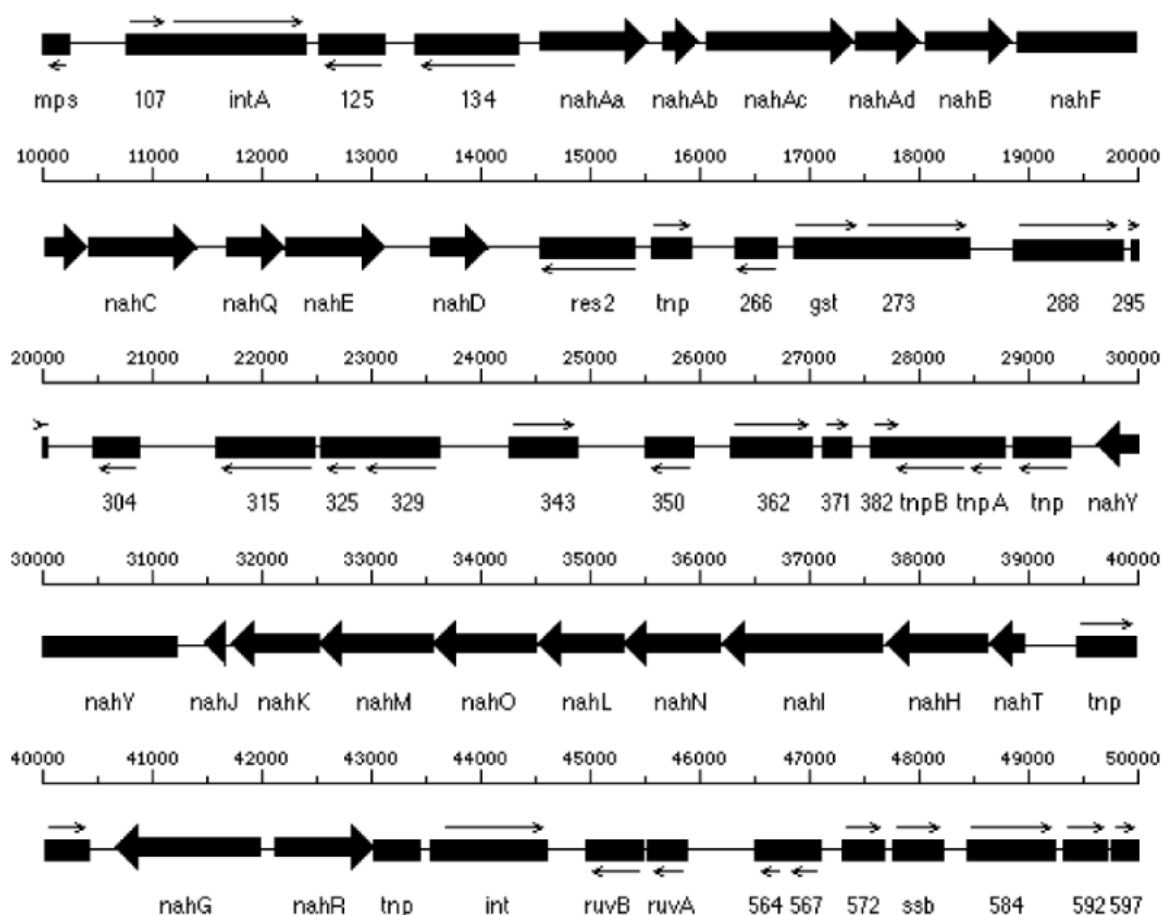
Joonis 9. *Pseudomonas fluorescens* tüve PC20 plasmiidide pNAH20 ja pPHE20 aromaatsete ühendite katabolismiga seotud lõigud (Elken *et al.*, 2020, modifitseeritud).

P. fluorescens tüvel PC20 on lisaks plasmiidil pNAH20 paiknevale C23O-ile kaks redundantset C12O-i, plasmiidil pPHE20 paiknev PheB (*pheBA* operon) ja kromosomaalne CatA (*catRBCA* operon) (Elken *et al.*, 2020; avaldamata genoomi andmed).

1.5.3. *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4

Pseudomonas putida tüve NCIB 9816-4 eraldasid aiamaailmast Davies ja Evans esialgu nime all NCIB 9816 (Davies ja Evans, 1964). Hiljem tuvastati erinevates laborites naftaleeni katabolismi regulatsiooni mehhanismide ja plasmiidide sisalduse poolest erinevad tüved, mille seast tüve NCIB 9816-4 iseloomustasid esimesena Serdar ja Gibson aastal 1989. NCIB

9816-4 lagundab nii naftaleeni kui ka salitsülaati ja sisaldab ühte 83 042 bp suurust plasmidi nimega pDTG1 (Dennis ja Zylstra, 2004).



Joonis 10. Plasmidi pDTG1 kaart (osaline), koos ennustatud avatud lugemisraamidega (ORF) ning nende transkriptsiooni suunda tähistavate nooltega (Dennis ja Zylstra, 2004).

Plasmiidil pDTG1 asuvad naftaleeni katabolismi geenid kahes operonis nagu ka tüve G7 plasmiidil NAH7, kuid tüves NCIB 9816-4 paiknevad operonid on sünteesitud eri suundades (Joonis 10). pDTG1 naftaleeni lagundamise raja alumine operon ei ole funktsionaalne, kuna *nahG* ja *nahT* geenide vahele on inserteerunud IS element (Joonis 10) ning katehhooli lagundamise eest vastutab selle asemel kromosomaalne katehhooli *ortho* rada. (Dennis ja Zylstra, 2004) Naftaleenil ja salitsülaadil kasvanud rakkudes on indutseeritud ainult C12O, aga C23O on konstitutiivselt ekspresseeritud madalal tasemel (Heinaru *et al.*, 2009; Serdar ja Gibson, 1989).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. TÖÖ EESMÄRGID

Pseudomonas pseudoalcaligenes tüvel C70 on salitsülaadi lagundamiseks kaks salitsülaadi 1-hüdroksülaasi (SH). Kirjanduses on näidatud, et tüvele C70 sarnaneva *Pseudomonas stutzeri* tüve AN10 kahe SH-i ekspressiooni tase sõltub kasvatusel kasutatud salitsülaadist. Samuti on leitud, et kahe SH-ga tüvi suudab paremini kasvada kõrgematel salitsülaatide kontsentratsioonidel ning asendusrühmadega salitsülaatidel kui ühe SH-ga tüved. Võrdluseks tüvega C70 valiti ühe SH-ga tüved *Pseudomonas fluorescens* PC20 ja *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. Töös kasutatud tüvedel on erinev arv erinevaid katehhooli dioksügenaase, millel võib samuti olla oluline roll salitsülaatide lagundamisel. Antud töö põhieesmärkideks olid kindlaks teha kui võimekas on tüvi C70 salitsülaadi ja metüülasendustega salitsülaatide lagundamisel võrreldes referentstüvedega ning selgitada tüve NCIB 9816-4 naftaleeni alumisse operoni inserteerunud MGE mõju salitsülaadi ja metüülsalitsülaatide lagundamisele.

Selleks et täita töö eesmäärke:

- määrati uuritavate tüvede kasvuparameetrid erinevatel salitsülaadi kontsentratsioonidel;
- võrreldi tüvede kasvu metüülsalitsülaate sisaldavatel söötmetel;
- määrati SH-e ja katehhooli dioksügenaase kodeerivate geenide ekspressiooni tasemed salitsülaati või metüülsalitsülaati sisaldavatel söötmetel kasvanud rakkudes.

2.2. MATERJAL JA METOODIKA

2.2.1. Bakteritüved

Töös kasutatud tüvesid säilitatakse Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis paiknevas mikroobikollektsioonis CELMS. Tüvede koodid CELMSi andmebaasis on EEUT C70 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70), EEUT PC20 (*Pseudomonas fluorescens* PC20), EEUT NCIB 9816-4 (*Pseudomonas putida* NCIB 9816-4). CELMSi andmebaas on leitav aadressil <http://eemb.ut.ee>. Kõiki tüvesid kasvatati 30 °C juures.

2.2.2. Kasvatused mikrotiiterplaatidel

Kasvuparameetrite määramiseks kasvatati tüvesid mikrotiiterplaatidel (Greiner Cellstar), mille igas kaevukeses oli 150 µl R2A söödet, kuhu oli lisatud vastavalt katsele erinevad kontsentratsioonid salitsülaati, 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati (Sigma-Aldrich). Kasvatused teostati salitsülaadi kontsentratsioonidel 0,5-7 mM ja metüülsalitsülaatide korral kontsentratsioonidel 1-3 mM. Algne sissekülv tehti nii, et söötmega lahjendatud proovi neelduvus oleks $A_{580\text{nm}}=0,03$. Kasvukõverate saamiseks asetati mikrotiiterplaadid termostaadiga (30 °C) varustatud POLARstar Omega mikrotiiterplaadi lugejasse (BMG Labtech), mis registreeris kaevukustes iga 7 minuti järel neelduvused 580 nm juures. Kasvukiirused arvutati poollogaritmilise teljestikuga graafiku logaritmilise kasvufaasi sirge tõusust ning biomassi saagised saadi kasvukõverate maksimaalsete neelduvuse väärtustest minimaalsete neelduvuse väärtuste lahutamisel.

2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR

Praimerite sobivuse kontrollimiseks rakendati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR). PCR-i reaktsioonisegu maht oli 25 µl. PCR reaktsioonisegu sisaldas: lõppkontsentratsiooniga 1x PCR puhver [75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20], 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM lõppkontsentratsiooniga dNTP-d (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), praimereid lõppkontsentratsiooniga 0,4 pmol/µl (Lisa 1), Taq DNA polümeraasi (Thermo Fisher Scientific) lõppkontsentratsiooniga 0,02 U/µl ja 2 µl DNA-d. Uuritud tüvede genoomse DNA eraldamiseks kasutati DNeasy UltraClean kitti (Qiagen) vastavalt tootja etteantud protokollile. PCR viidi läbi Eppendorf Mastercycler termotsükleris.

PCR programm:

1. DNA kaksikahelate denaturatsioon - 1 min 96 °C;

2. Praimerite seondumine matriitsjärjestusele - 45 s praimerite seondumistemperatuuril, mis on toodud tabelis Lisa 1;

3. DNA süntees - 45 s 72 °C;

Etappe 1-3 korrati 25 korda.

4. Lõpusüntees - 10 min 72 °C.

2.2.4. Geelelektroforees

PCR-i produkte ja eraldatud RNA-d kontrolliti agarosgeelelektroforeesil. Valmistati 0,8% agarosgeel TAE puhvis (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA; pH 8,2). Agarosgeelile lisati etiidiumbromiidi (0,1 µg/ml) RNA või DNA visualiseerimiseks. 5 µl proovi kanti tardunud geelile segatuna 1 µl foreesivärviga (0,04% broomfenool lahustatud 50% glütseroolis). Amplifitseeritud geenifragmentide pikkuse määramiseks lisati geelile ka 3,5 µl DNA molekulmassi markerit GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). Foreesi viidi läbi 100 V juures 1x TAE puhvis ning geel ilmutati ultraviolettlampidega varustatud valguslaual.

2.2.5. Sekveneerimine

PCR-il saadud geenifragmendid sekveneeriti, et kinnitada soovitud geenide amplifikatsiooni. PCR segu töödeldi esmalt ensüümidega eksonukleas I (ExoI; Thermo Fisher Scientific; lõppkontsentratsiooniga 0,36 U µl⁻¹) ja krevetil aluseline fosfataas (SAP; Thermo Fisher Scientific; lõppkontsentratsiooniga 0,14 U µl⁻¹), et lagundada praimerid ja vabad nukleotiidid. Eeltöötuse ajal inkubeeriti proove 37 °C juures 15 minutit ning seejärel inaktiveeriti ensüümid 80 °C juures 15 minutit.

Puhastatud produktid sekveneeriti BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitiga (Applied Biosystems) vastavalt tootja protokollile.

Sekvenerimisreaktsioon viidi läbi järgneva PCR programmiga:

1. DNA ahelate denatureerimine - 15 s 96 °C;

2. Praimerite seondumine - 10 s 58 või 61 °C vastavalt praimerite järjestusele (Lisa 1);

3. DNA süntees - 45 s 60 °C.

Kolmest etapist koosnevat tsüklit korrati 35 korda.

Sekvenerimisreaktsioon viidi läbi Eppendorf Mastercycler termotsükleris. Saadud geenifragmendid sekveneeriti täisautomaatse kapillaarsekvenaatoriga 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

2.2.6. Sekveneeritud järjestuste analüüs

Sekveneerimisel saadud järjestused analüüsiti programliga BioEdit 7.2 (Hall, 1999). Geenide järjestusi võrreldi BLAST (*Basic local alignment search tool*) otsingumootorit kasutades GenBank andmebaasis leiduvate referentsgeenidega (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990).

2.2.7. qRT-PCR

Katehhooli 1,2-dioksügenaasi (C12O), katehhooli 2,3-dioksügenaasi (C23O) ja salitsülaadi 1-hüdroksülaasi (SH) geenide ekspressiooni tasemete hindamiseks ja võrdlemiseks eraldati RNA erinevatel söötmetel kasvatatud *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4 logaritmilise ja varajase statsionaarse kasvufaasi rakkudest. Rakke kasvatati 250 ml Erlenmeyeri kolvides R2A söötmetel või R2A söötmetel, millele oli lisatud salitsülaati, 3-metüül-, 4-metüül- või 5-metüülsalitsülaati lõppkontsentratsiooniga 3 mM. RNA eraldati Nucleospin RNA II kitiga (Macherey-Nagel) vastavalt tootja etteantud protokollile. RNA proove töödeldi täiendavalt kaks korda Dnaas I-ga (Thermo Fisher Scientific), et eemaldada kogu genoomne DNA proovidest. Eraldatud RNA puhtust kontrolliti agarosgeelelektroforeesiga (punkt 2.2.4) ning kontsentratsioon määrati NanoDrop ND-2000c (Thermo Fisher Scientific) spektrofotomeetriga.

qRT-PCR-i läbiviimiseks kasutati Rotor-Gene Q termotsüklerit (Qiagen) ja SOLIScript 1-step SolisGreen qPCR kitti (Solis Biodyne). Reaktsioonisegu maht oli 10 µl ning sisaldas 10 ng RNA-d. Kasutatud praimerid on toodud tabelis Lisa 1. Referentsgeeniks oli geen *polA*, mis kodeerib DNA polümeraas I-te. Proove amplifitseeriti samadel tingimustel ja vähemalt kolmes korduses kasutades järgnevat qRT-PCR programmi:

1. 50 °C 15 min
2. 95 °C 10 min
3. 95 °C 15 s; 58 / 61 °C (vastavalt kasutatud praimeritele, (Lisa 1)). Tsükli korrati 40 korda.
4. 40 °C 1 min
5. Sulamiskõver 72 – 95 °C, 1 kraadi kaupa, 4 s ootamist enne uut etappi.

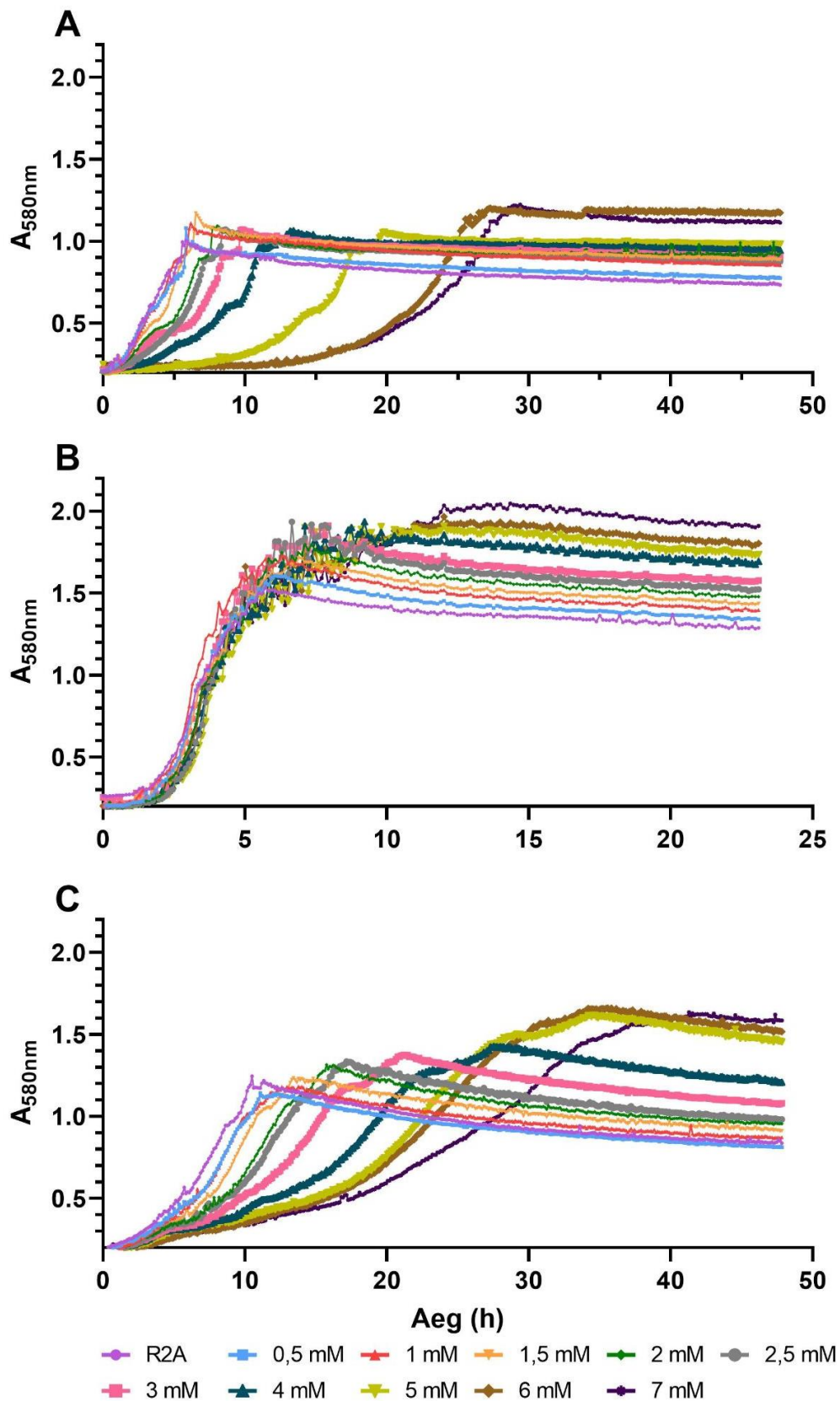
Tulemused töödeldi kasutades Rotorgene 2.02 (Qiagen) programmi ja arvutused mRNA kohta teostati LinRegPCR 2021.2 programmiga (Ruijter *et al.*, 2009).

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Kasv erinevatel Na-salitsülaadi kontsentratsioonidel

Varasemalt on näidatud, et *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüvel C70 on kromosoomis kaks katehhooli 2,3-dioksügenaasi (C23O) ja kaks salitsülaadi 1-hüdroksülaasi (SH) kodeerivat geeni ning tüvi on võimeline kasvama söötmetel, mis sisaldavad nii kõrgemaid salitsülaadi kui ka fenooli kontsentratsioone (Jõesaar *et al.*, 2017). Smirnova uuris oma töös (2019) kas kahe SH-i omamine annab tüvele C70 eelise kasvamiseks kõrgematel salitsülaadi kontsentratsioonidel võrreldes kolme referentstüvega - *P. fluorescens* PC20, *P. putida* G7 ja *P. putida* NCIB 9816-4. Nendest kõige tolerantsemaks osutus *P. putida* tüvi G7, mis suutis kasvada kiiresti isegi 25 mM salitsülaadiga minimaalsöötmel. Ka tüvi C70 suutis kasvada kuni 25 mM salitsülaadiga minimaalsöötmel, kuid alates 17 mM salitsülaadi kontsentratsioonist ei olnud kasv enam ühtlane ning söötmesse moodustusid rakkude klombid (Smirnova, 2019).

Antud uurimistöös valiti üheks referentstüveks põlevkivitööstuse piirkonnast eraldatud *P. fluorescens* tüvi PC20, millel on erinevalt tüvest C70 plasmiidne naftaleeni lagundamise operon. Teiseks tüveks valiti tüvega PC20 väga sarnast plasmiidset operoni (erinevus seisneb ainult *sal* operoni inserteerunud MGE-s) omav *P. putida* tüvi NCIB 9816-4. Mõlemal valitud referentstüvel puudub tüves C70 kirjeldatud redundantne SH-i geen *nahW* ja redundantne C23O-i kodeeriv geen *pheB^{C23O}* (Dennis ja Zylstra, 2004; Heinaru *et al.*, 2009). See-eest on tüvel PC20 lisaks plasmiidsele C23O-ile (NahH) üks plasmiidne C12O (*PheB^{C12O}*) ja üks kromosomaalne C12O (CatA). Tüve NCIB 9816-4 erinevus tüvest PC20 seisneb naftaleeni lagundamise alumisse operoni inserteerunud mobiilses geneetilises elemendis (MGE), mis inhibeerib selle operoni ekspressiooni ning põhjustab salitsülaadi lagundamise, mitte *meta* raja kaudu, vaid mööda kromosomaalset katehhooli *ortho* rada (Dennis ja Zylstra, 2004). Kokkuvõttes oli võrdluses kolm tüve, millest tüvi C70, omas redundantseid kromosomaalseid C23O-i ja SH-i geene, aga ei omanud C12O-i. Teised kaks tüve, PC20 ja NCIB 9816-4, omasid ainult ühte plasmiidset SH-i ja C23O-i ning lisaks vähemalt ühte C12O-i.



Joonis 11. *P. pseudoalcaligenes* C70 (A), *P. fluorescens* PC20 (B) ja *P. putida* NCIB 9816-4 (C) kasvukõverad R2A söötmel ja R2A söötmel, kuhu oli lisatud 0,5-7 mM salitsülaati. Joonistel on toodud esinduskasvukõverad.

Esmalt selgitati, kas redundantsed SH-id ja C23O-id annavad tüvele C70 eelise kasvuks kõrgematel salitsülaadi kontsentratsioonidel võrreldes referentstüvedega. Kasvuparameetrite uurimiseks kasvatati tüvesid mikroitiiterplaatidel R2A söötmel, kuhu oli lisatud erinevatel kontsentratsioonidel salitsülaati (0,5-7 mM).

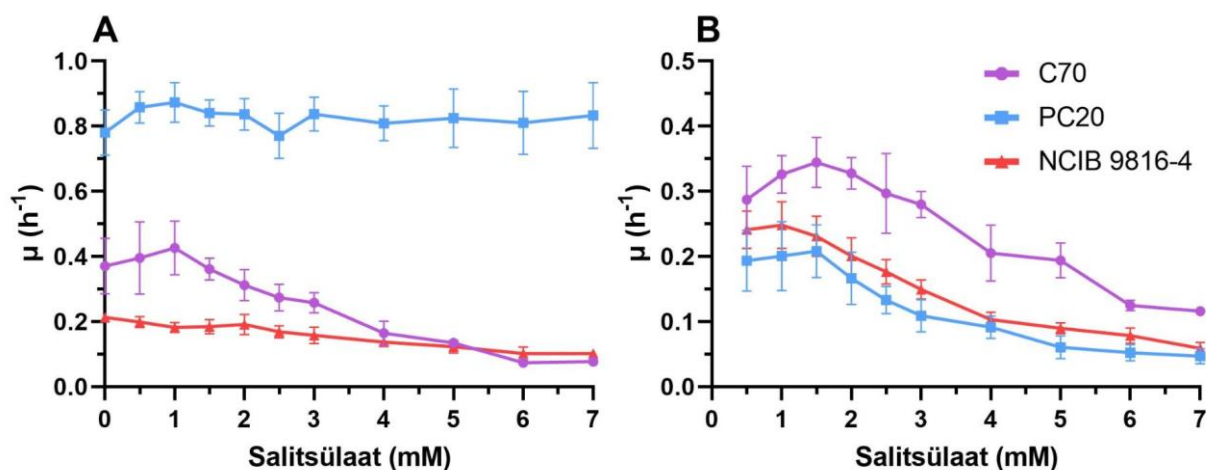
Kasvukõveratelt on näha, et salitsülaadi kontsentratsiooni tõstmisel oluliselt pikeneb tüve C70 lag faas (Joonis 11A). Lag faaside pikkused olid sarnased (~1,5 h) kuni 2 mM salitsülaadi kontsentratsioonini, edasisel kontsentratsiooni tõstmisel pikenes lag faas oluliselt (kuni ~13 h). Lanfrancioni *et al.* (2009) täheldasid samuti oma uurimistöös tüve AN10 lag faasi pikkuse muutust vastavalt salitsülaadi kontsentratsioonile söötmes ning AN10 tulemused sarnanesid käesolevas töös saadud tüve C70 tulemustega. Samas tüve PC20 kasvukõveratel ei muutunud lag faasi pikkus märkimisväärselt salitsülaadi lisamisel R2A söötmele (Joonis 11B). Tüve NCIB 9816-4 kasvukiirus vähenes salitsülaadi kontsentratsiooni tõstmisel ning selle tõttu pikenesid nii lag faas kui ka logaritmiline kasvufaas (Joonis 11C).

Kasvukiirused arvutati kahest kasvufaasist, sest aromaatsed ühendeid sisaldavatel söötmetel oli tüvede kasvukõveratel (Joonis 11) näha iseloomulik diauksiline kasv ehk kasv koos kohanemisega erinevatele süsiniku- ja energiaallikatele. Rakud kasutavad esmalt söötmest ära primaarsed süsiniku- ja energiaallikad, mis on neile lihtsamini omastatavad, näiteks glükoos. Sekundaarsete süsiniku- ja energiaallikate, nagu salitsülaat, ainevahetus on tihti primaarsete süsiniku- ja energiaallikate olemasolu puhul kasvukeskkonnas alla surutud ning aktiveeritakse alles nende ammendumisel. Selle tõttu tekivad iseloomulikud kahe logaritmilise ning kahe lag faasiga kasvukõverad. Teise lag faasi ajal lõppeb sekundaarse ainevahetuse inhibitsioon ja see saab avalduda ning algab teine logaritmiline faas. Tihti on kaks logaritmilist faasi ka erinevate kiirustega, sest ühte kahest toitainest suudetakse paremini rakendada. (Basu *et al.*, 2009; Boulineau *et al.*, 2013)

Kolmest tüvest oli tüve C70 kasvukiirus kõige rohkem mõjutatud salitsülaadi kontsentratsioonist. Esimeses kasvufaasis langes C70 kasvukiirus maksimaalselt 0,4 h⁻¹-lt umbes 0,1 h⁻¹-ni ning teises kasvufaasis 0,35 h⁻¹-lt umbes 0,1 h⁻¹-ni (Joonis 12A). Tüvel C70 oli teises kasvufaasis kiirem kasv kui teistel tüvedel kõikidel salitsülaadi kontsentratsioonidel, aga kasvukiiruse vähenemine sõltuvalt salitsülaadi kontsentratsioonist oli kolmel tüvel sarnane teises kasvufaasis (Joonis 12B).

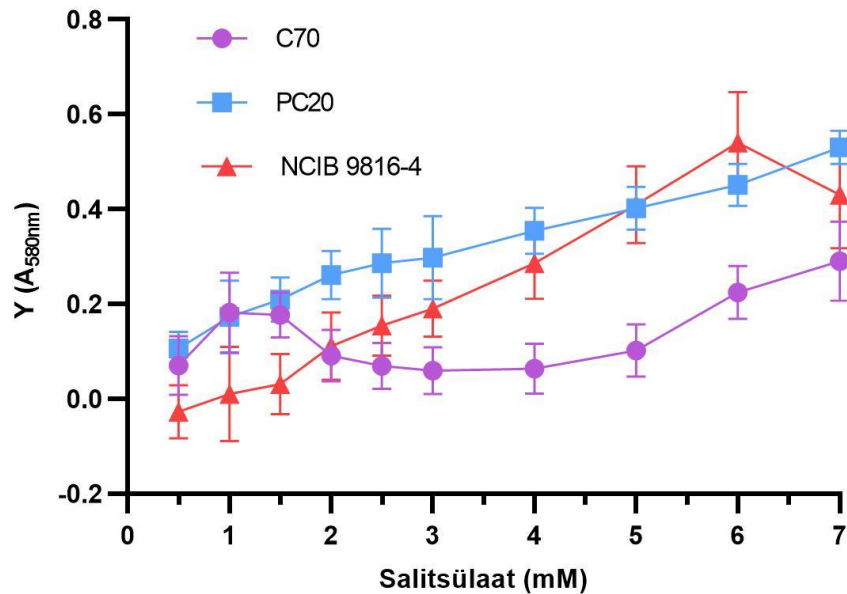
Erinevalt tüvest C70 ei vähenenud tüve PC20 kasvukiirus esimeses kasvufaasis salitsülaadi kontsentratsiooni tõstmisel ja püsis suhteliselt stabiilsena väärtuse 0,8 h⁻¹ juures (Joonis 12A). Teises kasvufaasis oli tüve PC20 kasvukiirus kolmest tüvest kõige madalam, olles oma

maksimumis $0,2 \text{ h}^{-1}$ ning langedes 7 mM salitsülaadi kontsentratsioonil alla $0,05 \text{ h}^{-1}$ (Joonis 12B). Tüve NCIB 9816-4 kasvukiirused olid esimeses kasvufaasis kõige madalamad ja väärtused vähenesid salitsülaadi kontsentratsiooni tõstmisel $0,2 \text{ h}^{-1}$ -lt $0,1 \text{ h}^{-1}$ -ni (Joonis 12A). Teises kasvufaasis oli tüve NCIB 9816-4 kasvukiirus teiste tüvedega võrreldes vahepealne ning salitsülaadi kontsentratsiooni tõstmisel vähenes $0,25 \text{ h}^{-1}$ -lt umbes $0,05 \text{ h}^{-1}$ -ni (Joonis 12B).



Joonis 12. *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4 kasvukiirused, mis on arvatatud kasvukõverate esimesest (A) ja teisest (B) kasvufaasist. Rakke kasvatati mikrotiiterplaatidel R2A söötmel või R2A söötmel, millele oli lisatud salitsülaati ($0,5\text{-}7 \text{ mM}$). Joonisel on esitatud 7 kasvutuse keskmised koos standardhälbega.

Järgmisena analüüsiti erinevate salitsülaadi kontsentratsioonide mõju biomassi saagisele. Selleks arvutati esmalt saagised nii salitsülaadi lisandiga R2A söötmel kui ka lisandita R2A söötmel ning seejärel leiti nende vahe, et eristada aromaatses ühendist saadava biomassi hulka (Joonis 13). Tüvi C70 andis kolmest tüvest kõige madalamad saagised ning need ei sõltunud oluliselt söötmel lisatud salitsülaadi kontsentratsioonist nii nagu on näidatud ka tüve AN10 puhul (Lanfranconi *et al.*, 2009). See-eest tüve PC20 saagis suurenes koos salitsülaadi kontsentratsiooni tõusuga söötmes. Ka tüve NCIB 9816-4 saagis sõltus lisatud substraadi kontsentratsioonist, kuid alates 5 mM kontsentratsioonist saagis enam oluliselt ei muutunud.



Joonis 13. *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4 saagised lisatud salitsülaadiga (0,5-7 mM) R2A söötmetel. Salitsülaati sisaldaval söötmel saadud saagisest on lahutatud lisanditeta R2A söötmel saadud saagise väärtus. Joonisel on esitatud 7 kasvatuses keskmised koos standardhälbega.

Võrreldes tüvede saagiseid, lag faase ning kasvukiiruseid, on näha, et kasutatud salitsülaadi kontsentratsioonidel ja tingimustes ei paku redundantseid kromosomaalseid SH-ide ja C230-ide eelist tüvele C70 võrreldes tüvega PC20, millel on plasmiidne SH ja C230. Samas on tüve C70 kasvukiirused suuremad kui tüvel NCIB 9816-4, mis kasutab salitsülaadi lagundamiseks plasmiidset SH-i ja kromosomaalset C120-i.

Lanfranchi *et al.*, (2009) leidsid, et redundantne salitsülaadi hüdroksülaas *nahW* võimaldab *P. stutzeri* tüvel AN10 paremini toime tulla kõrgemate salitsülaadi kontsentratsioonidega, takistades salitsülaadi kogunemist raku ja selle toksilise toime avaldumist. Oluline on siinkohal mainida, et tüvi AN10 suutis kasvada LB söötmel, kuhu oli lisatud kuni 12 mM salitsülaati, kuid lag faas oli siis 65 h (Lanfranchi *et al.*, 2009). Kuna tüve C70 naftaleeni lagundamise operonid on väga sarnased tüve AN10 omadega võiks eeldada, et *nahW* täidab sarnast rolli ka uuritavas tüves. Referentstüvedel, PC20 ja NCIB 9816-4, puudub *nahW* ning see võib olla põhjuseks, miks nende kasvukiirused teises kasvufaasis on madalamad kui tüvel C70.

Üks põhjus, miks tüve C70 redundantsete salitsülaadi lagundamise geenide mõju avaldumine võis olla takistatud, on katsetes kasutatud mikrotiiterplaadile kantud söötme piiratud

aereeritavus. Ahn *et al.* (1998) näitasid, et naftaleeni lagundavale *P. putida* tüvele G7 on hapnikupuuduses naftaleen toksiline ning selle kogunemine põhjustab rakkude surma. Kõrged salitsülaadi kontsentratsioonid on rakkudele samuti toksilised (Pomposiello *et al.*, 2001) ja salitsülaadi lagundamisel osalevad SH-id ja katehhooli dioksügenaasid vajavad oma tööks hapniku. Smirnova (2019) leidis oma töös, et tüvi C70 suutis kasvada 250 ml Erlenmeyeri kolvides kuni 17 mM ning tüved PC20 ja NCIB 9816-4 vastavalt 7 mM ning 5 mM salitsülaadiga minimaalsöötmel. Käesoleva töö alguses prooviti teha kasvatusi ka mikroitiiterplaatidel kasutades erinevate salitsülaadi kontsentratsioonidega minimaalsöödet, aga kuna kõikide tüvede korral olid lag faasid pikemad siis katse lõpuks oli aurumise tõttu söötme hulk märkimisväärselt vähenenud. Seetõttu kasutati käesolevas töös minimaalsöötmel asemel R2A söödet, mis tagas lühemad lag faasid.

Redundantsetel SH-idel võib olla ka teine roll kui ainult kõrgemate substraadi kontsentratsioonidega toimetulek. Bosch *et al.* (1999) pakkusid välja, et teine SH-geenikoopia pakub tüvele AN10 evolutsioonilise eelise, võimaldades ühes koopias mutatsioonide kogunemise ja potentsiaalselt uue funktsionaalsuse tekke, nagu asendustega salitsülaadide lagundamine, ilma geeni algse funktsiooni häirimiseta. Eelnevalt lähtudes otsustati uurida tüve C70 ja referentstüvede kasvuparameetreid metüülsalitsülaatidel.

3.2. Kasv erinevatel metüülsalitsülaatidel

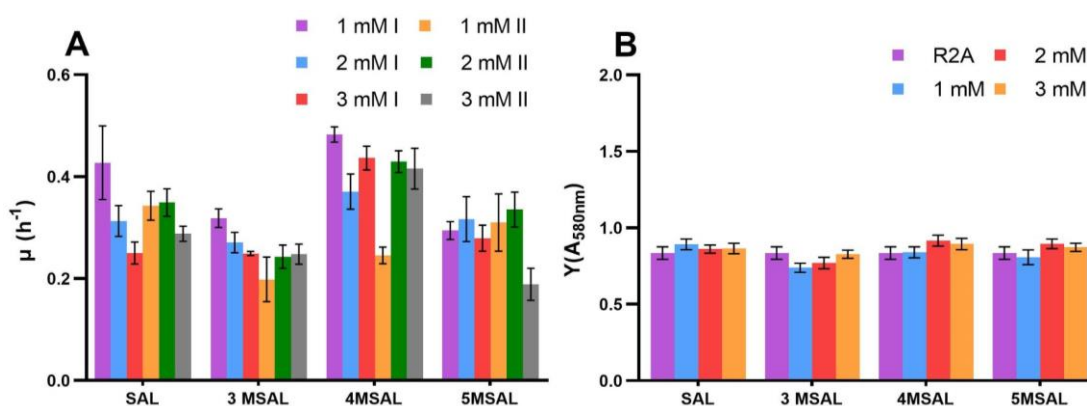
Asendusrühmadega aromaatsed ühendid on üldiselt stabiilsemad kui nende asendusteta variandid ning sellel on mitu põhjust. Esiteks, asendustega aromaatsed ühendid üldiselt lahustuvad vees halvemini, mis tähendab, et need on lagundavatele mikroorganismidele vähem kättesaadavad (Seo *et al.*, 2009). Teiseks, asendusrühm muudab ühendi struktuuri, mis võib takistada selle seondumist lagundava ensüümi aktiivtsentrisse. Kolmandaks, võivad asendusrühmadega aromaatsete ühendite lagundamisel tekkida nn. tupikühendid, mida bakterid ei ole võimelised edasi lagundama. (Marín *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2009) Eelnevalt mainitud põhjuste tõttu võib näiteks metüülsalitsülaadide lagundamine olla raskendatud isegi tüve jaoks, mis suudab efektiivselt salitsülaati lagundada.

On leitud, et asendusrühmadega aromaatsete ühendite lagundamisel võib redundantsete kataboolsete geenidega bakteritel olla eelis vaid ühte geeni omavate bakterite suhtes. Näiteks tüve AN10 puhul on täheldatud laiemat substraadispetsiifilisust, sest selle SH-id on erineva substraadispetsiifilisusega: NahG lagundab pigem metüülsalitsülaate ja NahW klorosalitsülaate (Bosch *et al.*, 1999). Kuna tüved AN10 ja C70 on sarnaste salitsülaadi

lagundamise operonidega, siis oletati, et tüve C70 redundantsed geenid võiksid täita sama ülesannet.

Eelneva hüpoteesi kinnitamiseks võrreldi tüvede C70, PC20 ja NCIB 9816-4 kasvu metüülsalitsülaadidel (Lisa 2). Kasvuparameetrite määramiseks kasvatati rakke mikrotiiterplaatidel R2A söötmel, kuhu oli lisatud salitsülaati, 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati kontsentratsioonidel 1-3 mM. Kasvukõverate saamiseks mõõdeti proovide neelduvused spektrofotomeetriselt nagu eelnevas katses ning kasvukiirused arvutati samuti kahest kasvufaasist.

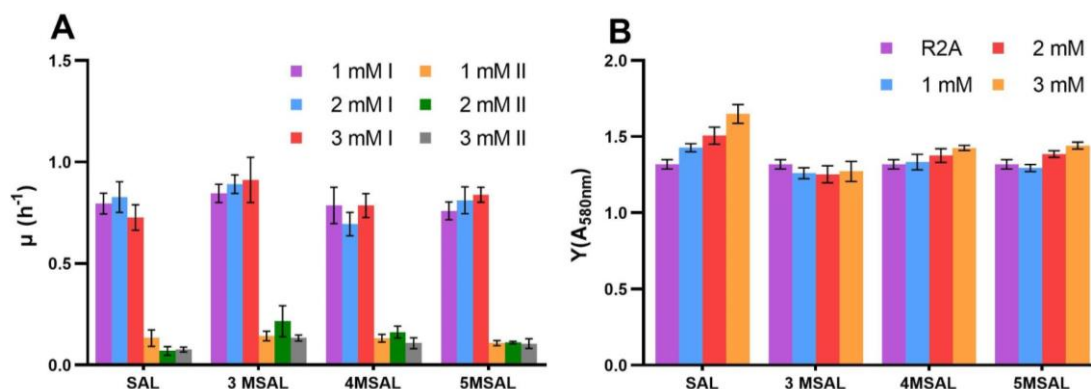
Tüvi C70 kasvas kõige kiiremini 4-metüülsalitsülaadil, mille puhul isegi 3 mM kontsentratsioonil ei olnud kasvukiirust inhibeerivat toimet ning kasv oli kõikidel kontsentratsioonidel kiirem kui kasv salitsülaadil (Joonis 14A). 3-metüülsalitsülaadil langes esimese kasvufaasi kasvukiirus kontsentratsiooni tõustes 0,32 h⁻¹-lt 0,25 h⁻¹-ni ning teises kasvufaasis ei muutunud kasvukiirus substraadi kontsentratsiooni tõstmisel, vaid oli stabiilselt 0,25 h⁻¹. 5-metüülsalitsülaadil oli nii esimeses kui ka teises kasvufaasis kasvukiirus stabiilselt väärtuse 0,3 h⁻¹ lähedal, välja arvatud teises kasvufaasis 3 mM 5-metüülsalitsülaadil, kus kasvukiirus langes 0,2 h⁻¹-ni (Joonis 14A).



Joonis 14. *P. pseudoalcaligenes* C70 kasvukiirused (A) ja saagised (B). Rakke kasvatati mikrotiiterplaatidel R2A söötmel või R2A söötmel, millele oli lisatud salitsülaati, 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati (1-3 mM). Joonisel on esitatud 7 kasvutuse keskmised koos standardhälbega. Kasvukiirused on arvatatud kasvukõverate esimesest (I) ja teisest (II) kasvufaasist. SAL - salitsülaat. MSAL - metüülsalitsülaat.

Tüve C70 saagis muutus kasutatud salitsülaadi ja metüülsalitsülaadi kontsentratsioonidel ainult väga vähesel määral (Joonis 14B), sarnane tulemus saadi ka eelnevalt kirjeldatud katses erinevate salitsülaadi kontsentratsioonidel.

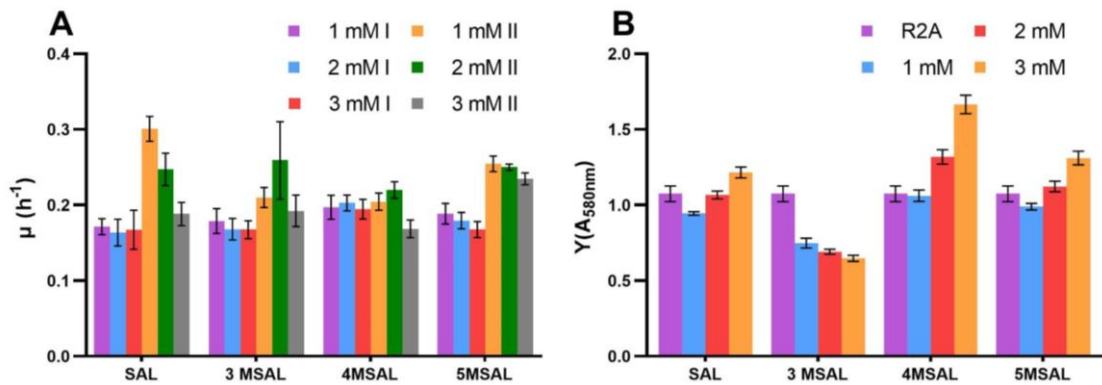
Tüve PC20 kasvukiirused metüülsalitsülaate sisaldavatel söötmetel olid kolmest uuritud tüvest kõige suuremad (Joonis 15A). Sarnaselt kasvatusel erinevatel salitsülaadi kontsentratsioonidel, oli tüve PC20 kasvukiirus palju suurem esimeses kasvufaasis (Joonis 15A) (Joonis 12). Tüve PC20 kasvukiirused olid kõikidel söötmetel sarnased - esimeses ja teises kasvufaasis vastavalt $0,8 \text{ h}^{-1}$ ja $0,12 \text{ h}^{-1}$.



Joonis 15. *P. fluorescens* PC20 kasvukiirused (A) ja saagised (B). Rakke kasvatati mikrotiiterplaatidel R2A söötmel või R2A söötmel, millele oli lisatud salitsülaati, 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati (1-3 mM). Joonisel on esitatud 7 kasvatuses keskmised koos standardhälbega. Kasvukiirused on arvatud kasvukõverate esimesest (I) ja teisest (II) kasvufaasist. SAL - salitsülaat. MSAL - metüülsalitsülaat.

Tüve PC20 saagis sõltus salitsülaadi, 4-metüülsalitsülaadi või 5-metüülsalitsülaadi kontsentratsioonist söötmes (Joonis 15B). 3-metüülsalitsülaadi lisamine ei muutnud tüve PC20 saagist võrreldes ainult R2A söötmel kasvanud rakkudega. Saagis tõusis kõige rohkem salitsülaadi lisamisel ning selle katse maksimaalne saagis 1,65 ühikut saadi 3 mM salitsülaadil kasvatamisel. 4- ja 5-metüülsalitsülaadil kasvades olid saagise tõusud sarnased ja maksimaalsed saagised umbes 1,45 ühikut.

Tüve NCIB 9816-4 puhul sõltus esimese kasvufaasi kasvukiirus vähesel määral lisatud salitsülaadi või metüülsalitsülaadi kontsentratsioonist (Joonis 16A). Kõikidel kasutatud söötmetel oli tüve kasvukiirus esimeses kasvufaasis umbes $0,18 \text{ h}^{-1}$. Teises kasvufaasis olid kasvukiirused reeglina kõrgemad kui esimeses kasvufaasis ning need sõltusid lisatud substraadi kontsentratsioonist.



Joonis 16. *P. putida* NCIB 9816-4 kasvukiirused (A) ja saagised (B). Rakke kasvatati mikrotiiterplaatidel R2A söötmel või R2A söötmel, millele oli lisatud salitsülaati, 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati (1-3 mM). Joonisel on esitatud 7 kasvutuse keskmised koos standardhälbega. Kasvukiirused on arvatud kasvukõverate esimesest (I) ja teisest (II) kasvufaasist. SAL - salitsülaat. MSAL - metüülsalitsülaat.

Töös kasutatud tüvedest oli tüvi NCIB 9816-4 ainuke, mille puhul täheldati 1 mM 3-metüülsalitsülaadi lisamisel olulist saagise vähenemist võrreldes saagisega, mis saadi ilma lisanditeta R2A söötmel kasvanud rakkudega (umbes 0,3 ühiku võrra), lisaks vähenes saagis veelgi 3-metüülsalitsülaadi kontsentratsiooni tõstmisel (Joonis 16B). See-eest salitsülaadil ning 4- ja 5-metüülsalitsülaadil kasvanud rakkude saagis tõusis substraadi kontsentratsiooni tõstmisel. Tüvi andis 4-metüülsalitsülaadil maksimaalse saagise, mis oli umbes 1,6 ühikut.

Tüve NCIB 9816-4 kasvatamisel 4- ja 5-metüülsalitsülaati sisaldavatel söötmel täheldati punaste ja oranžide vaheühendite moodustumist kasvukeskkonda (Joonis 17F). Neid vaheühendeid käesoleva töö raames ei identifitseeritud, kuid on võimalik, et tüve NCIB 9816-4 inaktiveeritud C230-i tõttu koguneb kasvukeskkonda katehool, mis oksüdeerumisel moodustabokinooneid vaheühendeid. Asendusteta katehoolide puhul on näidatud, etokinoonide spontaansel polümeriseerumisel moodustuvad tumedavärvilised ühendid (Jiménez *et al.*, 2014). Metüülkatehoolide puhul toimuvad ilmselt sarnased reaktsioonid, aga metüülasenduste tõttu on moodustunud vaheühendid eri värvusega.

Varasemates töedes on näidatud, et naftaleeni sisaldaval söötmel kasvava NCIB 9816-4 rakud eritavad keskkonda katehooli, mis oksüdeerub ning sööde värvub pruuniks (Park *et al.*, 2004). Katehooli maksimaalse kontsentratsiooni saavutamise järel rakkude arvukus vähenes, kuid samal ajal söötme neelduvus tõusis. Park *et al.* (2004) oletasid, et kogunev katehool on tüvele NCIB 9816-4 toksiline ning neelduvuse tõus on seotudokinoonide tekkega. Kuna käesolevas töös arvatati kasvukiiruse ning saagise väärtused kasvukõveratelt, mis saadi neelduvuse mõõtmisel, siis on võimalik, et 4- ja 5-metüülsalitsülaadist tekkinud värvilised

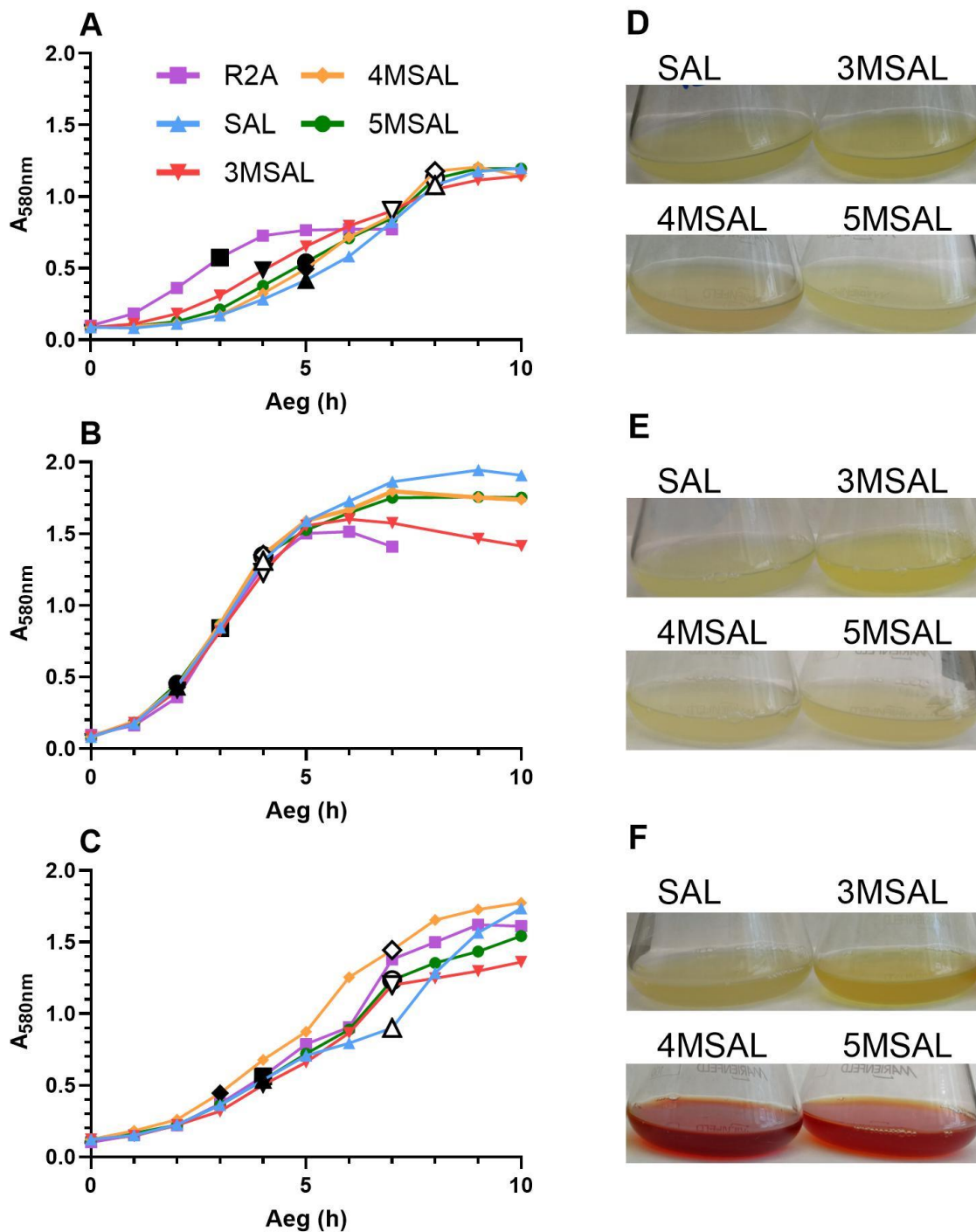
vaheühendid mõjutasid saadud tulemusi. Järgnevates töödes tuleks tuvastada värviliste vaheühendite täpne struktuur ja selgitada nende kogunemise põhjused.

Kokkuvõttes saab tüvede kasvuparameetrite võrdlemisel väita, et antud tingimustel ei ole tüvel C70 eelist metüülsalitsülaatide lagundamisel võrreldes tüvega PC20, mis oli katsetes kõige suuremaid kasvukiiruseid ja kõrgeimaid saagiseid andnud tüvi. Tüve C70 kasvukiirus oli suurem kui tüve NCIB 9816-4 kasvukiirus, aga C70 saagised olid kolmest tüvest madalaimad.

Olles analüüsinud tüvede kasvuparameetreid erinevatel salitsülaadi ja metüülsalitsülaadi kontsentratsioonidel, määrati järgmisena tüvede salitsülaadi lagundamise võtmeensüüme kodeerivate geenide ekspressiooni tasemed, et paremini selgitada tüvede erinevuste olemust.

3.3. Salitsülaadi lagundamisel osalevate geenide ekspressiooni tasemete määramine

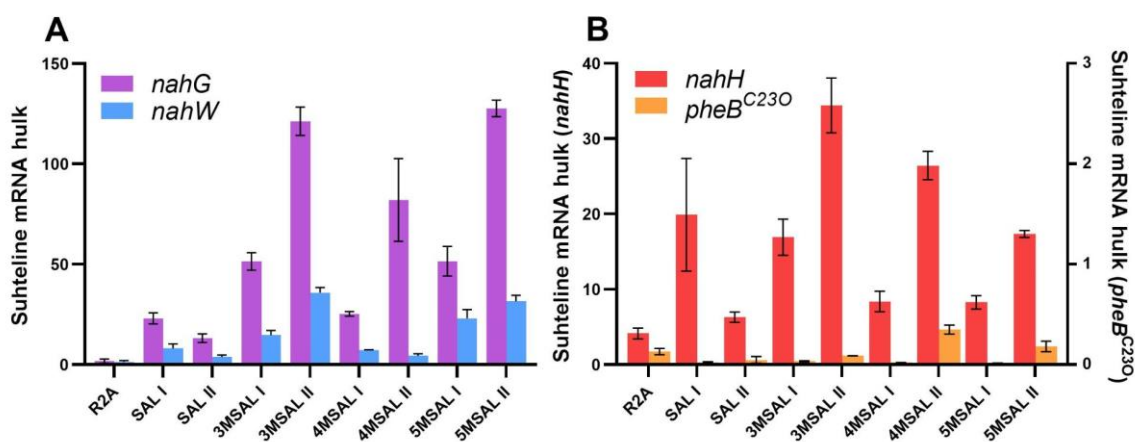
Töös uuritud tüvede kasvuparameetrite geneetilisest taustast arusaamiseks uuriti qRT-PCR meetodikat kasutades salitsülaadi 1-hüdroksülaase ja katehhooli dioksügenaase kodeerivate geenide ekspressiooni tasemeid erinevatel salitsülaatidel kasvanud tüvede C70, PC20 ja NCIB 9816-4 rakkudes. RNA eraldati logaritmilisest (I) ja varajasest statsionaarsest (II) kasvufaasist võetud rakkudest, mida kasvatati R2A söötmel või R2A söötmel kuhu oli lisatud salitsülaati, 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati (lõppkontsentratsiooniga 3 mM) (Joonis 17).



Joonis 17. *P. pseudoalcaligenes* C70 (A), *P. fluorescens* PC20 (B) ja *P. putida* NCIB 9816-4 (C) esinduskasvukõverad R2A söötmel ja R2A söötmetel, kuhu oli lisatud salitsülaati (SAL), 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati (MSAL) (3 mM). Rakke kasvatati 250 ml kolbides loksutis (180 rpm) temperatuuril 30 °C. RNA eraldamiseks võeti proove logaritmilisest kasvufaasist (mustad sümbolid) ning statsionaarse kasvufaasi algusest (valged sümbolid musta piirjoonega). Pildid salitsülaadi ja metüülsalitsülaadi kasvatuse kolvidest *P. pseudoalcaligenes* C70 (D), *P. fluorescens* PC20 (E), *P. putida* NCIB 9816-4 (F). SAL - salitsülaat. MSAL - metüülsalitsülaat.

3.3.1. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüvi C70

Tüve C70 salitsülaadi hüdroksülaase kodeerivate geenide ekspressiooni tasemed olid reeglina kõrgemad statsionaarse kasvufaasi rakkudes ning geeni *nahG* suhteline mRNA hulk oli keskmiselt 3,8 korda suurem kui *nahW* geeni suhteline mRNA hulk (Joonis 18A). Geeni *nahG* ekspressiooni tasemed olid kõige kõrgemad 3- ja 5- metüülsalitsülaadil kasvanud statsionaarse kasvufaasi rakkudes, vastavalt 69 ja 73 korda kõrgemad kui R2A söötmel kasvanud rakkudes. Ka geeni *nahW* ekspressiooni tasemed olid kõige kõrgemad samadel substraatidel, kuid muutus võrreldes R2A söötmel kasvanud rakkudega oli väiksem (vastavalt 24 ja 21 korda). Samas salitsülaadil kasvanud C70 rakkudes olid statsionaarses kasvufaasis geenide *nahG* ja *nahW* ekspressiooni tasemed umbes kaks korda madalamad kui logaritmilise kasvufaasi rakkudes. 4-metüülsalitsülaadiga söötmel kasvades langes samuti *nahW* ekspressiooni tase statsionaarses faasis umbes kaks korda võrreldes logaritmilise faasiga, aga *nahG* ekspressioon suurenes statsionaarses faasis umbes 46 korda võrreldes kasvuga R2A söötmel.



Joonis 18. *P. pseudoalcaligenes* C70 salitsülaadi 1-hüdroksülaase (A), NahG ja NahW, ning katehhooli 2,3-dioksügenaase (B), NahH ja PheB^{C230}, kodeerivate geenide mRNA transkriptide analüüs kasutades qRT-PCR-i. Rakke kasvatati R2A söötmel või R2A söötmel, millele oli lisatud salitsülaati, 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati lõppkontsentratsiooniga 3 mM. RNA eraldati logaritmilisest kasvufaasist (I) ning statsionaarse kasvufaasi algusest (II) võetud rakkudest (Joonis 17A). Suhtelised mRNA hulgid arvutati referentsgeeni, *polA*, ekspressiooni tasemete suhtes. SAL - salitsülaat. MSAL - metüülsalitsülaat.

Käesolevas töös uuritud tüve C70 SH-e kodeerivate geenide ekspressiooni tasemed ja varem kirjanduses kirjeldatud redundantsete SH-idega tüve AN10 aktiivsused erinevate salitsülaatidega indutseerimisel ei ole sarnased. Bosch *et al.* (1999) näitasid, et *P. stutzeri* tüve AN10 NahG aktiivsused olid kõrged nii salitsülaadil kui ka metüülsalitsülaadidel (eriti 4-

metüülsalitsülaadil) kasvatades, NahW aktiivused olid NahG väärtustega samas suurusjärgus vaid salitsülaadi ja 4-metüülsalitsülaadi juuresolekul. Samas tüvel C70 olid geenide *nahG* ja *nahW* ekspressiooni tasemed madalad salitsülaadi ning *nahW* puhul ka 4-metüülsalitsülaadi sisaldavatel söötmetel kasvanud rakkudes (Joonis 18). Mis põhjustab omavahel väga sarnaseid salitsülaadi lagundamise operone omavate tüvede SH-ide ekspressioonide erinevuse metüülsalitsülaadidel on käesolevas töös teostatud katsete põhjal raske öelda. Üheks mõjuriks võib olla tüvede C23O-ide fülogeneetiline erinevus (Joonis 8) ning sellest tingitud erinev võime lagundada metüülkatehhoole. Teiseks mõjuriks võib olla tüvede päritolu eri liikidest, mille tõttu nende ainevahetus ja selle regulatsioon ilmselt erineb.

Teiseks kirjanduses kirjeldatud redundantsete SH-idega tüveks on *Pseudomonas sp.* tüvi ND6, mille salitsülaadi lagundamise operon ja operoniväline SH-i geen (*nahU*) paiknevad plasmiidil (pND6) (Zhao *et al.*, 2005). Kui tüve AN10 SH-ide aktiivused olid salitsülaadil sarnased (Bosch *et al.*, 1999), siis tüve ND6 puhul olid operonivälise SH-i, NahU, aktiivused 7 korda kõrgemad kui operonisisesel SH-il (NahG). 3- ja 5-metüülsalitsülaadil kasvanud rakkudes olid NahU aktiivused $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{3}$ võrra madalamad ning NahG aktiivused $\frac{1}{4}$ võrra kõrgemad kui salitsülaadiga indutseerides (Zhao *et al.*, 2005). Erinevaid SH-ide aktiivsusi tüves ND6 võrreldes tüvedega AN10 ja C70 võivad põhjustada neid kodeerivate geenide paiknemine plasmiidiselt, mitte kromosomaalselt, ja NahU struktuursed erinevused NahW-st. Erinevalt tüvedest C70 ja AN10 on tüvel ND6 ka lisaks C23O-ile ka C12O-id katehhooli lagundamiseks. Lisaks võib mängida rolli *nahU* geeni palju kaugem paiknemine naftaleeni lagundamise alumisest operonist võrreldes selle vahetus läheduses paikneva *nahW* geeniga (Joonis 3).

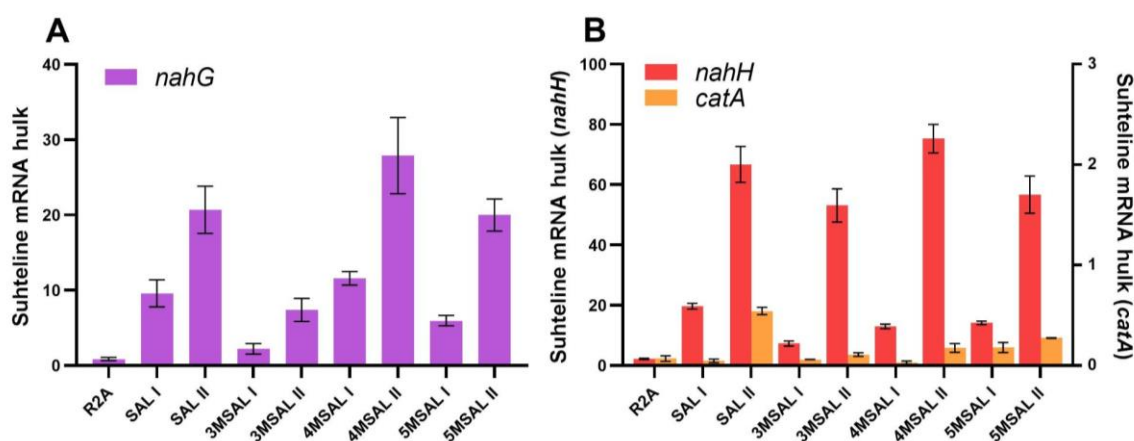
Katehhooli 2,3-dioksügenaasi kodeeriva geeni *nahH* ekspressiooni tase oli salitsülaate sisaldavatel söötmetel kasvanud tüve C70 mõlema kasvufaasi rakkudes kõrgem kui R2A söötmetel kasvanud rakkudes (Joonis 18B). Samas geeni *pheB^{C23O}* ekspressioon oli kasutatud söötmetel väga madal, *nahH* suhteline mRNA hulk oli keskmiselt 160 korda kõrgem kui *pheB^{C23O}* suhteline mRNA hulk. *pheB^{C23O}* ei ekspresseeru salitsülaadil kasvanud C70 rakkudes, sest see paikneb fenooli lagundamise operonis, mille ekspressiooni indutseerib fenool (Jõesaar *et al.*, 2017). Erinevate induktoritega indutseeritavate redundantsete geenidega tüved on otstarbekad looduses leiduvate reostatud keskkondade puhastamiseks, sest üldiselt esinevad saasteained heterogeensete segudena, nagu toornafta, mitte üksikute isoleeritud ühendite kogumitena (Jõesaar *et al.*, 2017).

Tüve C70 kasvamisel salitsülaate sisaldavatel R2A söötmetel on näha kollast värvi vaheühendi kogunemist (Jooni 17D). Kirjanduse andmetel on tegemist 2-hüdrosümukonosemialdehüüdi (HMS) või vastavate metüüldervaatidega, mis näitab, et SH-ide poolt tekitatud katehhoool on substraadiks tüve C70 NahH-le ning rakkudele toksilise vaheühendi kogunemist ei toimu. Samas on näidatud kirjanduses, et HMS kogunemine võib olla inhibeeriva toimega NahH-le, mis omakorda põhjustab katehhooli või selle derivaatide kogunemist keskkonda (Jõesaar *et al.*, 2017).

3.3.2. *Pseudomonas fluorescens* tüvi PC20

Tüve PC20 puhul oli SH-i kodeeriva geeni *nahG* ekspressiooni tase statsionaarses kasvufaasis salitsülaadil 24, 4-metüülsalitsülaadil 32, 5-metüülsalitsülaadil 23 ja 3-metüülsalitsülaadil ainult 8 korda kõrgem kui R2A söötmel (Joonis 19A). Logaritmilises kasvufaasis oli geeni *nahG* ekspressioon umbes 3 korda madalam kui statsionaarse kasvufaasi rakkudes.

Katehhooli lagundamiseks on tüvel PC20 naftaleeni operonis *nahH* poolt kodeeritud C23O, mille ekspressioon tõusis 25-35 korda salitsülaadi ja metüülsalitsülaatidega indutseerimisel (Joonis 19B). Lisaks on tüvel üks plasmiidne ja üks kromosomaalne C12O, mis on vastavalt kodeeritud geenide *pheB^{C12O}* ja *catA* poolt (Elken *et al.*, 2020; avaldamata genoomi andmed). Mõlema C12O-i ekspressioon salitsülaatidel oli väga madal, *catA* suhteline mRNA hulk oli 183 (Joonis 19B) ja *pheB^{C12O}* hulk 100 000 (andmeid ei ole näidatud) korda väiksem kui *nahH* suhteline mRNA hulk .



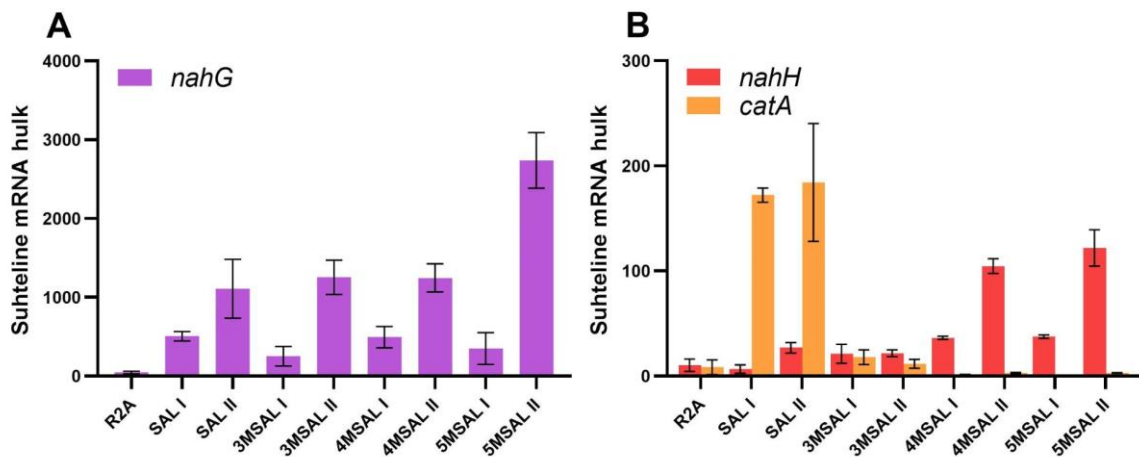
Joonis 19. *P. fluorescens* PC20 salitsülaadi 1-hüdrosülaasi (A), NahG, katehhooli 1,2-dioksügenaasi, CatA, ning katehhooli 2,3-dioksügenaasi (B), NahH, kodeerivate geenide mRNA transkriptide analüüs kasutades qRT-PCR-i. Rakke kasvatati R2A söötmel või R2A söötmel, millele oli lisatud salitsülaati, 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati lõppkontsentratsiooniga 3 mM. RNA eraldati logaritmilisest kasvufaasist (I) ning statsionaarse kasvufaasi algusest (II) võetud rakkudest (Joonis 17B). Suhtelised mRNA hulgad arvutati referentsgeeni, *polA*, ekspressiooni tasemetega suhtes. SAL - salitsülaat. MSAL - metüülsalitsülaat.

Eelnevalt on kirjanduses juba tõestatud tüve PC20 võimekust efektiivselt lagundada nii naftaleeni, salitsülaati kui ka fenooli (Heinaru *et al.*, 2009) ning käesolevas töös teostatud katsed näitasid selle tüve efektiivsust ka metüülsalitsülaatide lagundajana. Tüvi PC20 on eriti tähelepanuväärne biotervenduse vaatevinklist, sest selle aromaatsete ühendite lagundamise geenid paiknevad mobiilsetel plasmiididel, mis võivad looduslikes tingimustes levida ka teistesse mikroorganismidesse ning veelgi suurendada lagundamise kiirust ja efektiivsust (Heinaru *et al.*, 2009). Tüve PC20 puhul on eelnevalt näidatud ka selle vastupidavust välikatsetes, nimelt detekteeriti tüvi rohkem kui aasta peale inokulatsiooni põlevkivitööstuse jäätmetega reostatud piirkonnas teostatud katsetest võetud proovides (Juhanson *et al.*, 2009).

3.3.3. *Pseudomonas putida* tüvi NCIB 9816-4

Kõige kõrgemad SH-i ekspressiooni tasemete absoluutväärtused käesolevas töös saadi tüve NCIB 9816-4 induktsioonil 5-metüülsalitsülaadiga. Selle lisamisel tõusis ekspressiooni tase 60 korda võrreldes ekspressiooni tasemega R2A söötmel kasvanud rakkudes (Joonis 20A). Induktorita söötmel kasvanud NCIB 9816-4 rakkudega võrreldes tõusis ekspressiooni tase salitsülaadi lisamisel 24 ning 3- ja 4-metüülsalitsülaatide korra 26 korda. Referentstüvedega (PC20 ja G7) võrreldes kõrged SH-i aktiivsused määrasid salitsülaadiga indutseeritud tüve NCIB 9816-4 rakkudes ka Heinaru *et al.* (2009). Võib oletada, et kõrge SH-i aktiivsus on oluline rakkudele toksilise salitsülaadi kontsentratsiooni kiireks vähendamiseks, kuid terve raja toimimise seisukohalt võib see häirida kõikide ensüümide tasakaalustatud tööd.

Käesolevas töös tuvastati, et tüve NCIB 9816-4 kasvamisel kõrgemate salitsülaadi kontsentratsioonidega söötmel värvuvad need pruuniks (mikroitiiterplaatidel; andmeid pole näidatud) katehooli kogunemise ja kinoonide moodustumise tõttu, madalamatel kontsentratsioonidel värvuvad söötmed aga kollaseks (Joonis 17F) 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi (HMS) kogunemise tõttu.



Joonis 20. *P. putida* NCIB 9816-4 salitsülaadi 1-hüdroksülaasi (A), NahG, katehhooli 1,2-dioksügenaasi, CatA ning katehhooli 2,3-dioksügenaasi (B), NahH, kodeerivate geenide mRNA transkriptide analüüs kasutades qRT-PCR-i. Rakke kasvatati R2A söötmel või R2A söötmel, millele oli lisatud salitsülaati, 3-, 4- või 5-metüülsalitsülaati lõppkontsentratsiooniga 3 mM. RNA eraldati logaritmilisest kasvufaasist (I) ning statsionaarse kasvufaasi algusest (II) võetud rakkudest (Joonis 17C). Suhtelised mRNA hulgid arvutati referentsgeeni, *polA*, ekspressiooni tasemete suhtes. SAL - salitsülaat. MSAL - metüülsalitsülaat.

Katehhool ja teised vaheühendid võivad olla rakkudele kahjulikumad kui salitsülaat, sest need lahustuvad paremini vees, põhjustavad hapniku radikaalide teket või seonduvad raku DNA ja valkudega (Schweigert *et al.*, 2001B). Seega on tüve NCIB 9816-4 salitsülaadi tundlikkus ilmselt seotud C23O-i ja sellele järgnevate ensüümide madala aktiivsusega, mis on põhjustatud naftaleeni alumisse operoni inserteerunud MGE-st (Dennis ja Zylstra, 2004). qRT-PCR andmed näitasid, et tüve NCIB 9816-4 *nahH* ekspressiooni tase 3 mM salitsülaadil kasvanud rakkudes tõuseb ainult 2 korda võrreldes R2A söötmel kasvanud rakkudega (Joonis 20B). Katehhooli kogunemist ning madalat C23O aktiivsust tüvel NCIB 9816-4 naftaleeni sisaldaval söötmel on näidanud ka Park *et al.* (2004). Tüve PC20 (naftaleeni alumises operonis ei ole MGE-d) kasvatamisel samades tingimustes tuvastati ainult kollast värvi HMS kogunemist (Joonis 17E) ning C23O kodeeriva *nahH* ekspressiooni tasemed tõusid induktori juuresolekul ca 30 korda (Joonis 19B).

Kas katehhooli lagundamine võib toimuda operonivälise katehhooli dioksügenaasiga? Lisaks C23O-le on tüve NCIB 9816-4 kromosoomis ka C12O-i kodeeriv *catA*, mille induksiooni salitsülaadil kasvanud rakkudes on näidanud varem Barnsley (1976A) ja Heinaru *et al.* (2009). Ka käesolevas töös teostatud katsed kinnitasid C12O ekspressiooni taseme 30-kordset tõusu salitsülaati sisaldaval söötmel võrreldes induktorita kasvanud rakkudega (Joonis 20B). See-eest tüves PC20 oli *catA* ekspressioon salitsülaatidega indutseerimisel madal (Joonis 19B).

qRT-PCR andmed näitasid, et 4- ja 5-metüülsalitsülaadid indutseerivad erinevalt salitsülaadist tüves NCIB 9816-4 geeni *nahH* ekspressiooni. 3-metüülsalitsülaadi lisamisel on *nahH* ja *catA* ekspressiooni tasemed võrdselt madalad, ligikaudu 2 korda kõrgemad induktorita kasvanud rakkudest (Joonis 20B). Lisaks värvuvad 4- ja 5-metüülsalitsülaati sisaldavad söötmed punakaks, mis viitab jällegi metüleeritud katehooli kuhjumisele ning kinoonide tekkele (Joonis 17F).

Kokkuvõtteks võib öelda, et kuigi tüvede PC20 ja NCIB 9816-4 plasmiidset salitsülaadi lagundamise operonid on väga sarnased (Heinaru *et al.*, 2009) on nende kasvuparameetrid (Joonis 11 ja 17) ja geeniekspressioon (Joonis 11 ja 20) täiesti erinevad ning NCIB 9816-4 ei suuda metüülsalitsülaatidel hästi kasvada, mis on põhjustatud MGE inserteerumisest NCIB 9816-4 naftaleeni lagundamise alumisse operoni. Edaspidi oleks vaja uurida MGE insertsiooni tekitatud muutuste täpseid mehhanisme.

Kuigi käesolevas töös teostatud katsetes ei olnud redundantsete salitsülaadi lagundamise geenidega tüvi C70 efektiivsem salitsülaatide lagundaja kui ühe SH-ga tüvi PC20 on eelnevalt tõestatud tüve võimekus kasvada nii kõrgematel salitsülaadi kontsentratsioonidel (Smirnova, 2019) kui ka erinevate aromaatsete ühendite segul (Mehike, 2016). Edasi tuleks määrata tüvede kasvuparameetrid klorosalitsülaatidel, sest erakordselt stabiilseid kloreeritud aromaatsed ühendeid kasutatakse palju tööstuses ning neid lagundavate tüvede uurimine on seepärast eriti oluline (Pieper *et al.*, 2010). Lisaks peaks võrdlema tüvede kasvu aromaatsete ühendite segudel, sest saasteained esinevad üldiselt segudena, nagu toornafta või tööstuslikud heitveed. Tüve C70 kasvu on juba uuritud salitsülaadi ja fenooli segul (Jõesaar *et al.*, 2017).

Biotehnoloogiliste rakenduste tarbeks on oluline peale üksikkultuuride aromaatsete ühendite lagundamise geneetilise potentsiaali selgitamise uurida ka tüvede võimekust segakultuurides ehk kooslustes. Tüved C70 ja PC20 võiksid tänu laiemale substraadispetsiifilisusele ja suuremale vastupidavusele aromaatsete ühendite kõrgematele kontsentratsioonidele olla efektiivsed ka kooslustes. Tüvi NCIB 9816-4 kasvab aga salitsülaadil aeglaselt, lagundamise käigus kuhjuvad vaheühendid ning ta ei talu kõrgeid aromaatsete ühendite kontsentratsioone, mistõttu ei ole tüve kasutamine biotervenduse jaoks loodud kooslustes ilmselt otstarbekas. Samas on tüve SH väga kõrge aktiivsusega ning kuna kooslused võimaldavad ära kasutada erinevate tüvede tugevusi ning samal ajal tasakaalustada nende nõrkusi teiste tüvedega võiks siiski kaaluda ka selle tüve kaasamist koosluste efektiivsuste uurimisse. Kompleksemate saasteainete ja nende segude puhul ei pruugi üksiktüved olla võimelised ühendit täielikult

lagundama, aga mitme tüve koostööl assambleeritakse terve lagundamise rada. (Li *et al.*, 2021)

Keskkonna seisukohalt oleks äärmiselt kasulik, kui õnnestuks koostada kooslus, mis oleks võimeline lagundama alifaatsete ja aromaatssete ühendite segu - toornaftat. Naftareostused maismaal või veekogudel on sealsetele elusorganismidele väga ohtlikud ning reostuse likvideerimine sageli keeruline. Biotervenduse meetodeid on edukalt kasutatud soojemas kliimas, misõttu oleks vaja välja töötada kooslusi, mis suudavad reostust kõrvaldada ka madalamatel temperatuuridel.

KOKKUVÕTE

Mikrobioloogiline biotervendus on suure potentsiaaliga tehnoloogia looduse puhastamiseks toksilistest saasteainetest, aga selle rakendamine nõuab põhjalikke teadmisi kasutatavate organismide kohta. Käesolevas töös võrreldi *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4 võimekust lagundada salitsülaati ja erinevaid metüülsalitsülaate.

Töö tulemused ja järeldused saab kokku võtta järgnevalt:

1. Kasutatud salitsülaadi ja metüülsalitsülaadi kontsentratsioonidel ning tingimustes andis tüvi C70 kõige madalamad biomassi saagised ning jäi üldise kasvukiiruse poolest kahe referentstüve vahepealseks;
2. kasutatud salitsülaadi ja metüülsalitsülaatide kontsentratsioonidel ning tingimustel oli kõige suuremate kasvukiiruste ja saagistega tüvi PC20;
3. tüve NCIB 9816-4 kasv metüülsalitsülaatidel on pärsitud ning 4- ja 5-metüülsalitsülaati sisaldavatel söötmetel kuhjuvad keskkonda punast värvi vaheühendid, mis on ilmselt metüülkatehhoolidest tekkinud kinoonid;
4. tüves NCIB 9816-4 indutseeritakse SH-i ja C23O-i kodeerivad geenid salitsülaatide lisamisel söötmele, kuid *sal* operoni inserteerunud MGE tõttu on C23O-i ekspressiooni tasemed madalad ning ilmselt ka järgnevate ensüümide avaldumine takistatud;
5. mikrotiiterplaatidel teostatud kasvatustes tekib tüvedel hapnikupuudus, millel on negatiivne mõju kõigi kolme tüve kasvule salitsülaadil ja metüülsalitsülaatidel.

Kokkuvõttes saab väita, et kasutatud tingimustel ei pakkunud tüve C70 redundantsed salitsülaadi 1-hüdroksülaasi ja katehhooli 2,3-dioksügenaasi geenid tüvele eelist salitsülaadi või metüülsalitsülaatide lagundamisel teiste uuritud tüvede suhtes.

Degradation of salicylate and methylsalicylates in different species of the family

Pseudomonas

Rasmus Robert Barrow

Resümee / Summary

Some of the most ubiquitous and recalcitrant pollutants formed in the processes of modern industry are aromatic compounds. These aromatic compounds are often dangerous, having cytotoxic or carcinogenic properties, while also being highly resistant to degradation due to their structure. Due to their exceptional stability one of the only practical approaches for the degradation of these compounds is microbial biodegradation, also known as bioremediation. However, bioremediation requires extensive knowledge of utilized bacterial strains to ensure their survival in the field and effective degradation of pollutants.

Salicylate is a monocyclic aromatic hydrocarbon formed during the degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbon naphthalene, a component of crude oil and additionally a toxic pollutant. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain C70 is a naphthalene and salicylate degrading strain and an interesting model for the degradation of salicylate, specifically because it contains redundant genes for both salicylate 1-hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase, which are key enzymes in the degradation salicylate.

In this study, strain C70 was compared to two strains without redundant genes for salicylate degradation, *P. fluorescens* PC20 and *P. putida* NCIB 9816-4, to determine whether the redundant genes provided an advantage for the degradation of salicylate and methylsalicylates by strain C70. Additionally, the influence of an MGE inserted into the *sal* operon of *P. putida* NCIB 9816-4 on the degradation of salicylate and methylsalicylates by the strain was also determined. To accomplish the aforementioned goals, the growth parameters and expression levels of genes participating in salicylate degradation of strain C70 and the two reference strains were determined on salicylate and methylsalicylate containing R2A media.

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

1. Under conditions and concentrations of salicylate and methylsalicylates used in this study, strain C70 produced the lowest biomass of the three strains and had an overall growth rate between the values of the other two strains;
2. under conditions and concentrations of salicylate and methylsalicylates used in this study, strain PC20 produced the highest biomass of the three strains and also had the fastest growth rate of the three;

3. the growth of strain NCIB 9816-4 is inhibited in the presence of methylsalicylates and when the strain degrades 4- and 5-methylsalicylate red intermediates are formed, which are most likely quinones formed from methylcatechols;
4. the salicylate 1-hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes of strain NCIB 9816-4 are induced in the presence of salicylates, but due to the insertion of a MGE into the *sal* operon the expression of catechol 2,3-dioxygenase is low and the expression of downstream genes is likely also inhibited;
5. growth on microtiter plates causes oxygen limitation which has a negative effect on the degradation of salicylate and methylsalicylate in all three strains.

In conclusion, under utilized conditions the redundant salicylate 1-hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes of strain C70 did not provide it with an advantage for the degradation of salicylate or methylsalicylates compared to strains PC20 and NCIB 9816-4.

KIRJANDUSE LOETELU

- Ahn, I.-S., Ghiorse, W. C., Lion, L. W., & Shuler, M. L. (1998). Growth kinetics of *Pseudomonas putida* G7 on naphthalene and occurrence of naphthalene toxicity during nutrient deprivation. *Biotechnology and Bioengineering*, 59(5), 587–594.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- Barnsley E A. (1976A). Role and regulation of the ortho and meta pathways of catechol metabolism in pseudomonads metabolizing naphthalene and salicylate. *Journal of Bacteriology*, 125(2), 404–408.
- Barnsley, E. A. (1976B). Naphthalene metabolism by pseudomonads: The oxidation of 1,2-dihydroxynaphthalene to 2-hydroxychromene-2-carboxylic acid and the formation of 2'-hydroxybenzalpyruvate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 72(3), 1116–1121.
- Basu, A., Das, D., Bapat, P., Wangikar, P. P., & Phale, P. S. (2009). Sequential utilization of substrates by *Pseudomonas putida* CSV86: Signatures of intermediate metabolites and online measurements. *Microbiological Research*, 164(4), 429–437.
- Bosch, R., García-Valdés, E., & Moore, E. R. B. (2000). Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 245(1), 65–74.
- Bosch, R., Moore, E. R. B., García-Valdés, E., & Pieper, D. H. (1999). NahW, a Novel, Inducible Salicylate Hydroxylase Involved in Mineralization of Naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2315–2322.
- Boulineau, S., Tostevin, F., Kiviet, D. J., Wolde, P. R. ten, Nghe, P., & Tans, S. J. (2013). Single-Cell Dynamics Reveals Sustained Growth during Diauxic Shifts. *PLOS ONE*, 8(4), e61686.
- Bugg, T. D. H. (2003). Dioxygenase enzymes: Catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*, 59(36), 7075–7101.
- Cámara Beatriz, Bielecki Piotr, Kaminski Filip, dos Santos Vitor Martins, Plumeier Iris, Nikodem Patricia, & Pieper Dietmar H. (2007). A Gene Cluster Involved in Degradation of Substituted Salicylates via ortho Cleavage in *Pseudomonas* sp. Strain MT1 Encodes Enzymes Specifically Adapted for Transformation of 4-Methylcatechol and 3-Methylmuconate. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1664–1674.
- Cámara Beatriz, Nikodem Patricia, Bielecki Piotr, Bobadilla Roberto, Junca Howard, & Pieper Dietmar H. (2009). Characterization of a Gene Cluster Involved in 4-Chlorocatechol Degradation by *Pseudomonas reinekei* MT1. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4905–4915.
- Catelani, D., Fiecchi, A., & Galli, E. (1971). (+)- γ -Carboxymethyl- γ -methyl- $\Delta\alpha$ -butenolide. A 1,2 ring-fission product of 4-methylcatechol by *Pseudomonas desmolyticum*. *Biochemical Journal*, 121(1), 89–92.
- Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3(2–3), 351–368.
- Chakrabarty A. M. (1972). Genetic Basis of the Biodegradation of Salicylate in *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, 112(2), 815–823.
- Costa, D. M. A., Gómez, S. V., de Araújo, S. S., Pereira, M. S., Alves, R. B., Favaro, D. C., Hengge, A. C., Nagem, R. A. P., & Brandão, T. A. S. (2019). Catalytic mechanism for the conversion of salicylate into catechol by the flavin-dependent monooxygenase salicylate hydroxylase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 588–600.
- Davies, J. I., & Evans, W. C. (1964). Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. *Biochemical Journal*, 91(2), 251–261.
- Dennis, J. J., & Zylstra, G. J. (2004). Complete Sequence and Genetic Organization of

- pDTG1, the 83 Kilobase Naphthalene Degradation Plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *Journal of Molecular Biology*, 341(3), 753–768.
- Dunn, N. W., & Gunsalus, I. C. (1973). Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 114(3), 974–979.
- Dunwell, J. M., Culham, A., Carter, C. E., Sosa-Aguirre, C. R., & Goodenough, P. W. (2001). Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(12), 740–746.
- Eaton R W. (1994). Organization and evolution of naphthalene catabolic pathways: Sequence of the DNA encoding 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase and trans-o-hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase from the NAH7 plasmid. *Journal of Bacteriology*, 176(24), 7757–7762.
- Eaton, R. W., & Chapman, P. J. (1992). Bacterial metabolism of naphthalene: Construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *Journal of Bacteriology*, 174(23), 7542–7554.
- Elken, E., Heinaru, E., Jõesaar, M., & Heinaru, A. (2020). Formation of new PHE plasmids in pseudomonads in a phenol-polluted environment. *Plasmid*, 110, 102504.
- Eltis L D & Bolin J T. (1996). Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, 178(20), 5930–5937.
- Fang, T., & Zhou, N.-Y. (2014). Purification and characterization of salicylate 5-hydroxylase, a three-component monooxygenase from *Ralstonia sp.* Strain U2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 671–679.
- Freeman, D. J., & Cattell, F. C. R. (1990). Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, 24(10), 1581–1585.
- Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L., & Williams, P. A. (1998). A Gene Cluster Encoding Steps in Conversion of Naphthalene to Gentisate in *Pseudomonas sp.* Strain U2. *Journal of Bacteriology*, 180(9), 2522–2530.
- Giger, Walter., & Blumer, Max. (1974). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. Isolation and characterization by chromatography, visible, ultraviolet, and mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 46(12), 1663–1671.
- Grimm A C & Harwood C S. (1997). Chemotaxis of *Pseudomonas spp.* To the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 4111–4115.
- Grimm Ann C. & Harwood Caroline S. (1999). NahY, a Catabolic Plasmid-Encoded Receptor Required for Chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the Aromatic Hydrocarbon Naphthalene. *Journal of Bacteriology*, 181(10), 3310–3316.
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., & Wojcieszynska, D. (2013). Intradiol Dioxygenases—The Key Enzymes in Xenobiotics Degradation. *Biodegradation of Hazardous and Special Products* (129–153).
- Habe, H., & Omori, T. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(2), 225–243.
- Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, 95–98.
- Harayama, S., & Rekik, M. (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *Journal of Biological Chemistry*, 264(26), 15328–15333.
- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U., & Heinaru, A. (2000). Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 195–205.
- Heinaru, E., Vedler, E., Jutkina, J., Aava, M., & Heinaru, A. (2009). Conjugal transfer and mobilization capacity of the completely sequenced naphthalene plasmid pNAH20 from multiplasmid strain *Pseudomonas fluorescens* PC20. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(3), 563–574.

- Jiménez, J. I., Pérez-Pantoja, D., Chavarría, M., Díaz, E., & de Lorenzo, V. (2014). A second chromosomal copy of the *catA* gene endows *Pseudomonas putida* mt-2 with an enzymatic safety valve for excess of catechol. *Environmental Microbiology*, *16*(6), 1767–1778.
- Juhanson, J., Truu, J., Heinaru, E., & Heinaru, A. (2009). Survival and catabolic performance of introduced *Pseudomonas* strains during phytoremediation and bioaugmentation field experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, *70*(3), 446–455.
- Jutkina, J., Heinaru, E., Vedler, E., Juhanson, J., & Heinaru, A. (2011). Occurrence of Plasmids in the Aromatic Degrading Bacterioplankton of the Baltic Sea. *Genes*, *2*(4), 853–868.
- Jõesaar, M., Viggor, S., Heinaru, E., Naanuri, E., Mehike, M., Leito, I., & Heinaru, A. (2017). Strategy of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 for effective degradation of phenol and salicylate. *PLoS ONE*, *12*(3), e0173180.
- Keil, H., Lebens, M. R., & Williams, P. A. (1985). TOL plasmid pWW15 contains two nonhomologous, independently regulated catechol 2,3-oxygenase genes. *Journal of Bacteriology*, *163*(1), 248–255.
- Lanfranconi, M. P., Christie-Oleza, J. A., Martín-Cardona, C., Suárez-Suárez, L. Y., Lalucat, J., Nogales, B., & Bosch, R. (2009). Physiological role of NahW, the additional salicylate hydroxylase found in *Pseudomonas stutzeri* AN10. *FEMS Microbiology Letters*, *300*(2), 265–272.
- Laurie, A. D., & Lloyd-Jones, G. (1999). Conserved and Hybrid meta-Cleavage Operons from PAH-degrading Burkholderia RP007. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *262*(1), 308–314.
- Li, Q., Aubrey, M. T., Christian, T., & Freed, B. M. (1997). Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology*, *38*(2), 158–165.
- Li, W., Shi, J., Wang, X., Han, Y., Tong, W., Ma, L., Liu, B., & Cai, B. (2004). Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. Strain ND6. *Gene*, *336*(2), 231–240.
- Li, X., Wu, S., Dong, Y., Fan, H., Bai, Z., & Zhuang, X. (2021). Engineering Microbial Consortia towards Bioremediation. *Water*, *13*(20), 2928.
- Li, Y., & Trush, M. A. (1994). Reactive Oxygen-dependent DNA Damage Resulting from the Oxidation of Phenolic Compounds by a Copper-Redox Cycle Mechanism1. *Cancer Research*, *54*(7_Supplement), 1895s–1898s.
- Lijinsky, W. (1991). The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, *259*(3–4), 251–261.
- Mahajan, M. C., Phale, P. S., & Vaidyanathan, C. S. (1994). Evidence for the involvement of multiple pathways in the biodegradation of 1- and 2-methylnaphthalene by *Pseudomonas putida* CSV86. *Archives of Microbiology*, *161*(5), 425–433.
- Marín, M., Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Wray, V., González, B., & Pieper, D. H. (2010). Modified 3-Oxoadipate Pathway for the Biodegradation of Methylaromatics in *Pseudomonas reinekei* MT1. *Journal of Bacteriology*, *192*(6), 1543–1552.
- Means, J. C., Wood, S. G., Hassett, J. J., & Banwart, W. L. (1980). Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environmental Science & Technology*, *14*(12), 1524–1528.
- Mehike, M. (2016). Redundantsed katehhooli 2,3-dioksügenaasid *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüves C70 [Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool]. <https://dspace.ut.ee/handle/10062/52102>
- Mohapatra, B., & Phale, P. S. (2021). Microbial Degradation of Naphthalene and Substituted Naphthalenes: Metabolic Diversity and Genomic Insight for Bioremediation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*.

- Muñoz, R., Díaz, L. F., Bordel, S., & Villaverde, S. (2007). Inhibitory effects of catechol accumulation on benzene biodegradation in *Pseudomonas putida* F1 cultures. *Chemosphere*, 68(2), 244–252.
- Murakami, S., Kodama, N., Shinke, R., & Aoki, K. (1997). Classification of catechol 1,2-dioxygenase family: Sequence analysis of a gene for the catechol 1,2-dioxygenase showing high specificity for methylcatechols from Gram+ aniline-assimilating *Rhodococcus erythropolis* AN-13. *Gene*, 185(1), 49–54.
- Nogales, J., García, J. L., & Díaz, E. (2017). Degradation of Aromatic Compounds in *Pseudomonas*: A Systems Biology View. F. Rojo (Toim), *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids* (1k 1–49). Springer International Publishing.
- O'Donnell, K. J., & Williams, P. A. Y. 1991. (s.a.). Duplication of both xyl catabolic operons on TOL plasmid pWW15. *Microbiology*, 137(12), 2831–2838.
- Park, W., Jeon, C. O., Cadillo, H., DeRito, C., & Madsen, E. L. (2004). Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 in naphthalene-amended soils: Toxicity of naphthalene and its metabolites. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 64(3), 429–435. Academic Search Complete.
- Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S., & Yao, Q.-H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 927–955.
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Junca, H., González, B., & Pieper, D. H. (2019). Phylogenomics of Aerobic Bacterial Degradation of Aromatics. F. Rojo (Toim), *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids* (1k 689–736). Springer International Publishing.
- Pieper, D. H., González, B., Cámara, B., Pérez-Pantoja, D., & Reineke, W. (2010). Aerobic Degradation of Chloroaromatics. K. N. Timmis (Toim), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (1k 839–864). Springer.
- Pomposiello, P. J., Bennik, M. H. J., & Demple, B. (2001). Genome-Wide Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Responses to Superoxide Stress and Sodium Salicylate. *Journal of Bacteriology*, 183(13), 3890–3902.
- Pozdnyakova-Filatova, I., Petrikov, K., Vetrova, A., Frolova, A., Streletskii, R., & Zakharova, M. (2020). The Naphthalene Catabolic Genes of *Pseudomonas putida* BS3701: Additional Regulatory Control. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Preuss, R., Angerer, J., & Drexler, H. (2003). Naphthalene—An environmental and occupational toxicant. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 76(8), 556–576.
- Price, C. T. D., Lee, I. R., & Gustafson, J. E. (2000). The effects of salicylate on bacteria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(10), 1029–1043.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6), e45–e45.
- Schweigert, N., Hunziker, R. W., Escher, B. I., & Eggen, R. I. L. (2001A). Acute toxicity of (chloro-)catechols and (chloro-)catechol-copper combinations in *Escherichia coli* corresponds to their membrane toxicity in vitro. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2), 239–247.
- Schweigert, N., Zehnder, A. J. B., & Eggen, R. I. L. (2001B). Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. Minireview. *Environmental Microbiology*, 3(2), 81–91.
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(1), 278–309.
- Serdar, C. M., & Gibson, D. T. (1989). Studies of nucleotide sequence homology between naphthalene-utilizing strains of bacteria. *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications*, 164(2), 772–779.
- Shen Xi-Hui, Jiang Cheng-Ying, Huang Yan, Liu Zhi-Pei, & Liu Shuang-Jiang. (2005). Functional Identification of Novel Genes Involved in the Glutathione-Independent Gentisate Pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3442–3452.
- Sidorenko, J., Jatsenko, T., Saumaa, S., Teras, R., Tark-Dame, M., Hõrak, R., & Kivisaar, M. (2011). Involvement of specialized DNA polymerases Pol II, Pol IV and DnaE2 in DNA replication in the absence of Pol I in *Pseudomonas putida*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 714(1), 63–77.
- Smirnova, K. (2019). Redundant salicylate 1-hydroxylase genes of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 [Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool]. <https://dspace.ut.ee/handle/10062/63953>
- Sota, M., Yano, H., Ono, A., Miyazaki, R., Ishii, H., Genka, H., Top, E. M., & Tsuda, M. (2006). Genomic and Functional Analysis of the IncP-9 Naphthalene-Catabolic Plasmid NAH7 and Its Transposon Tn 4655 Suggests Catabolic Gene Spread by a Tyrosine Recombinase. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4057–4067.
- Stoyanovsky, D. A., Goldman, R., Claycamp, H. G., & Kagan, V. E. (1995). Phenoxy Radical-Induced Thiol-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species: Implications for Benzene Toxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317(2), 315–323.
- Zeng, X.-H., Du, H., Zhao, H.-M., Xiang, L., Feng, N.-X., Li, H., Li, Y.-W., Cai, Q.-Y., Mo, C.-H., Wong, M.-H., & He, Z.-L. (2020). Insights into the binding interaction of substrate with catechol 2,3-dioxygenase from biophysics point of view. *Journal of Hazardous Materials*, 391, 122211.
- Zhao, H., Chen, D., Li, Y., & Cai, B. (2005). Overexpression, purification and characterization of a new salicylate hydroxylase from naphthalene-degrading *Pseudomonas sp.* Strain ND6. *Microbiological Research*, 160(3), 307–313.
- Zhou, N. Y., Fuenmayor, S. L., & Williams, P. A. (2001). nag genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) *sp.* Strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 700–708.
- Takizawa N, Kaida N, Torigoe S, Moritani T, Sawada T, Satoh S, & Kiyohara H. (1994). Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2444–2449.
- Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T., & Eltis, L. D. (2006). The Ins and Outs of Ring-Cleaving Dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4), 241–267.
- Vedler, E., Heinaru, E., Jutkina, J., Viggor, S., Koressaar, T., Remm, M., & 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(8), 525–532.
- Vetting, M., & Ohlendorf, D. (2000). The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. *Structure (London, England : 1993)*, 8(4), 429–440.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 177–206.
- Williams, P. A., & Sayers, J. R. (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation*, 5(3–4), 195–217.
- Yen K M & Gunsalus I C. (1982). Plasmid gene organization: Naphthalene/salicylate oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(3), 874–878.
- Yen K M & Gunsalus I C. (1985). Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *Journal of Bacteriology*, 162(3), 1008–1013.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, kasutatud 04.04.2022.

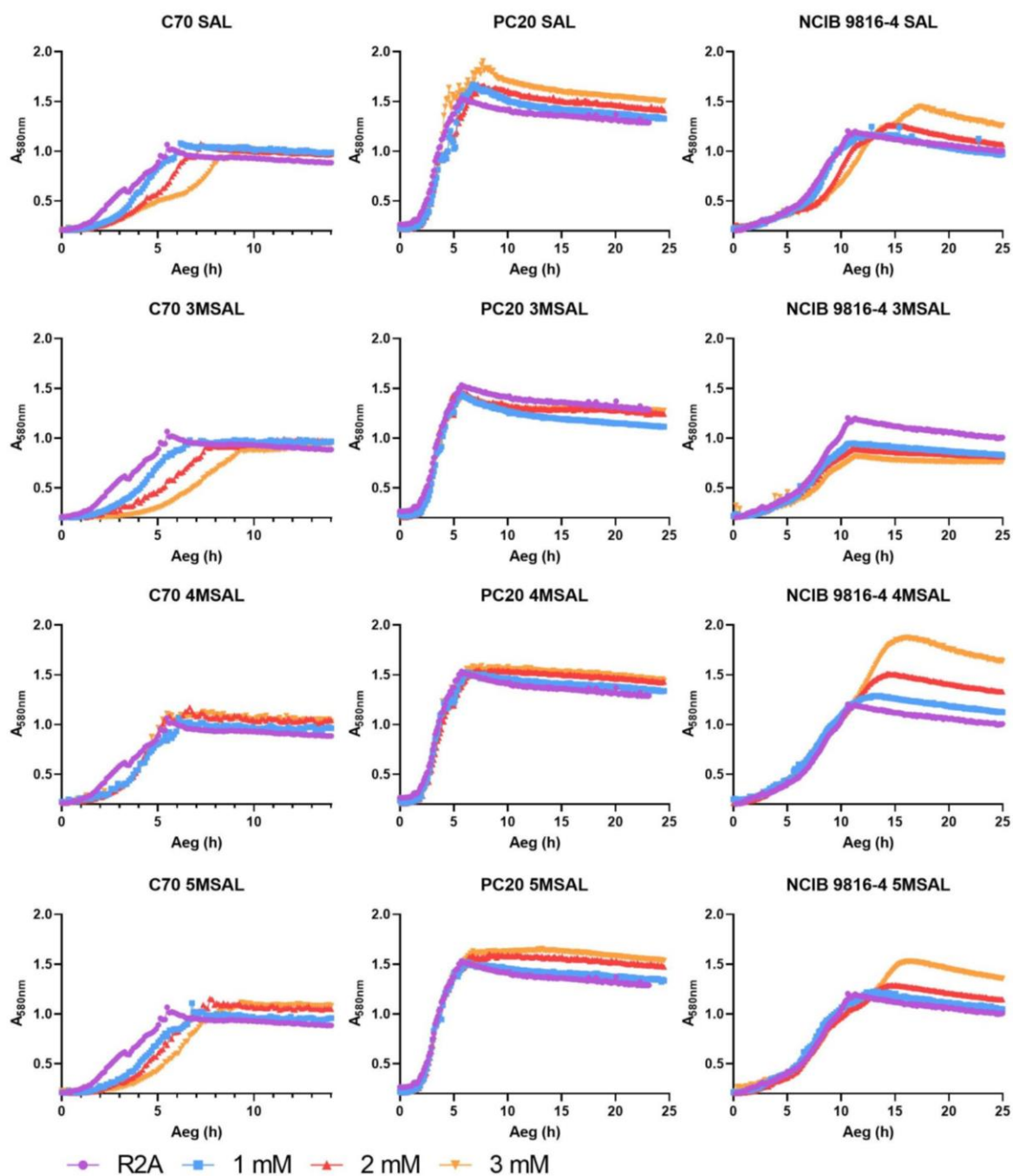
http://eemb.ut.ee/celms/main_list.php, kasutatud 23.05.2022.

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud praimerid koos nukleotiidsete järjestustega, seandumistemperatuuridega, amplifitseeritavate geenide ja ensüümi tüüpide nimetustega. C23O - katehhooli 2,3-dioksügenaas. C12O - katehhooli 1,2-dioksügenaas. SH - salitsülaadi hüdroksülaas. DNA pol I - DNA polümeraas I.

Ensüüm/Geen/Tüvi	Praimeri nimi	Nukleotiidne järjestus (5'→3')	Seandumis-temperatuur	Viide
C23O / <i>nahH</i> / C70 ja NCIB9816-4	C70aF C70aR	TGGAGCGGGATCTGACGGCA CGGGATTGACCTCATTACA	58 °C	Mehike, 2016
C23O / <i>pheB</i> / C70	C70bF C70bR	TCACCGAGGACCTGCTCAAC CCGGGTTGACCTCGGCCAAG	58 °C	
SH / <i>nahG</i> / C70	nahGF7 nahGR3u	CTGCAACTGCGGAAGCCTT GCTTCCCGTACCCAGGGAG	61 °C	Smirnova, 2019
SH / <i>nahG</i> / PC20 ja NCIB9816-4	nahGF3 nahGR2	GGGCTTGAGGACGCCTATTTT GTTGCACACGACAGGCATGAG	61 °C	
SH / <i>nahW</i> / C70	nahWF nahWR	CGATGACACTGGCGAACAGC CGTACGGTGGAAACGCATCC	61 °C	
C12O / <i>catA</i> / PC20	catAF_1 catAR_1	CGTACTTCGACTCGACCCAG GCAAAGTCGTCCCACAGGTA	61 °C	Käesolev töö
C12O / <i>catA</i> / NCIB9816-4	catA4F catA4R	TCGGAATTCAACCTGCGTCG GGTGGTCAGGTGACGATGG	58 °C	
C12O / <i>pheB</i> / PC20	pheB20_F pheB20_R	CACCCGGCCTAGGTTTTGAT ACATGGTTTTCGCCATCCGTA	61 °C	
C23O / <i>nahH</i> / PC20	nahHRT694f nahHRT822r	ATCAGCATGACCGACACCTC ATAGTTGTAGTTCCCGCCGC	61 °C	Pozdnyakova-Filatova <i>et al.</i> , 2020
DNA pol I / <i>polA</i> / C70, PC20 ja NCIB9816-4	polAXhoylev polAXhoall	GGGGCAGAACGCCAAGTACG TCTGCGCCAGGCTGTCCAT	61/58 °C	Sidorenko <i>et al.</i> , 2011

Lisa 2. *P. pseudoalcaligenes* C70, *P. fluorescens* PC20 ja *P. putida* NCIB 9816-4 kasvukõverad R2A söötmetel, kuhu oli lisatud 1-3 mM lõppkontsentratsiooniga salitsülaati (SAL), 3- (3MSAL), 4- (4MSAL) või 5-metüülsalitsülaati (5MSAL). Joonistel on toodud esinduskasvukõverad.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rasmus Robert Barrow,

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

Salitsülaadi ning metüülsalitsülaatide lagundamine erinevates perekonna *Pseudomonas* liikides,

mille juhendajateks on Merike Jõesaar ja Signe Viggor,

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

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

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

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

Rasmus Robert Barrow

26.05.2022