

TARTU JAAN POSKA GÜMNAASIUM

ANDRES REINTAM

12.C KLASS

NAFTA TÖÖTLEMISTEHASEST ERALDATUD BAKTERITÜVEDE LAGUNDAMISVÕIME UURIMINE

JUHENDAJAD MERIKE JÕESAAR JA LAURI MÄLLO

SISSEJUHATUS

Naftareostuse risk on tänapäeval meredes ja ookeanides üha tõusnud suurenenud laevaliikluse, naftatranspordi ja naftapuurtorvide tõttu. Naftasaaduste lekkimine veekeskkonda avaldab mõju kogu selle kooslusele, bakterist imetajani.

Läänemerele on suur ohuallikas toornafta ja seda suurenenud laevaliikluse tõttu. Igal ajahetkel on merel umbes 2000 laeva ja ligikaudu 20% nendest on naftatankerid, mille lastiks on hinnanguliselt umbes 166 miljonit tonni naftasaadusi (HELCOM, 2010).

Väga oluline on operatiivne reageerimine naftareostusele vähendamaks tundlike rannaalade saastumist. Toornafta on üks komplekssemaid orgaaniliste ühendite segusid Maal, mille põhikomponendid on lineaarsed, hargnenud või tsüklilised alkaanid, aromaatsed ühendid, kõrgmolekulaarsed ühendid, asfalteenid, jt (Lenskaja, 2014; Head *et al.*, 2006). Aromaatsed ühendid on ühe- või enamatsüklilisest benseenituumast ehk aromaatses tuumast moodustunud süsivesinikud. Need moodustuvad orgaaniliste ainete mittetäielikul põlemisel, nafta tekkimisel või tööstustootmisel (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 2017). Tsüklilise tuuma olemasolu tõttu ei suuda paljud bakterid neid lagundada, mis muudavad aromaatsed ühendid saasteaineteks, millel on ka kantserogeenne toime.

Bioremediatsioon on tehnoloogia, mida on kasutatud naftalekete puhul alates 1970ndatest ning selle meetodi abil puhastatakse keskkonda sinna sattunud reostusest mikroorganismide abil, taastades sellega endise loodusliku seisundi. Seda tehnoloogiat peetakse parimaks taastamiseks mere ökoloogilist keskkonda tänu soodsale hinnale, keskkonnasäästlikkusele ja sekundaarse reostuse puudumisele (Chen *et al.*, 2017). Bioremediatsiooni efektiivsust tõstab võimekate toornaftat lagundavate looduslikust keskkonnast pärit mikroorganismide kaasamine. Seetõttu on oluline leida ja iseloomustada baktereid, kes oleksid võimelised kiiresti ja efektiivselt lagundama toornaftat. Tartu Ülikooli geneetika õppetoolis on isoleeritud kaks bakteritüve, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüvi ICTN13 ja *Acinetobacter venetianus* tüvi ICP1, kes on võimelised lagundama toornaftat. Uuritavad tüved on eraldatud nafta

rafineerimistehase puhastusjaamast Indias (URAN FTP). Siinse töö eesmärk oli iseloomustada eespool nimetatud bakteritüvesid ning teha mikrokosm-katseid fenooli ja toornaftaga, selgitamaks välja nende tüvede efektiivsus toornafta lagundamisel. Positiivsete tulemuste korral saaks antud tüvesid kasutada naftareostuse eemaldamisel.

Uurimistöö teema valimisel sai määravaks üldine huvi mikrobioloogia vastu, soov teada rohkem mikrobioloogiliste tööde olemusest, praktiliste kogemuste saamine ja probleemi aktuaalsus tänapäeval ja tulevikus.

Uurimistöö tegemiseks esitati taotlus Eesti Teadusagentuuri väljastatava Noore uurija stipendiumi konkursile (vt lisa 1), mis võimaldab korvata uurimistöö tegemisel tekkinud kulutused ja Tartu Ülikoolis töötava juhendaja töötasu ja ajakulu.

Täna Lauri Mällot ja Merike Jõesaart juhendamise, soovitude ja nõu eest ning Eesti Teadusagentuuri stipendiumi eest.

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	1
MÕISTED JA LÜHENDID	4
1. TEOORIA.....	5
1.1. Toornafta	5
1.1.2. Alkaanid ja nende aeroobne lagundamine	5
1.1.3. Aromaatsed ühendid	6
1.2. Bioremediatsioon.....	9
1.3. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ICTN13 ja <i>Acinetobacter venetianus</i> ICP1	9
2. METOODIKA	11
2.1. Töös kasutatud bakteritüved, plasmiidid ja nende säilitamine	11
2.2. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> tüve ICTN13 märgistamine fluorestseeruva märgisega	12
2.2.1. <i>Escherichia coli</i> CC118λpir rakkude kompetentseteks muutmine ja elektroporatsioon.....	12
2.2.2. Konjugatsioon	12
2.3. Bakteritüvede kasvuparameetrite määramine.....	14
2.4. Tüvede ICTN13 ja ICP1 suhtelise osakaalu leidmine tüvede segus	14
2.5. Uuritavate üksiktüvede ja tüvede segu kasvatamine toornafta mikrokosmis	15
3. TULEMUSED JA NENDE ANALÜÜS.....	16
3.1. Mikrokosm-katsed fenooliga	16
3.2. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> tüve ICTN13 märgistamine fluorestseeruva märgisega ning tüve ICTN13 suhteline arvukus tüvede segus.....	18
3.3. Toornafta mikrokosm-katse	19
KOKKUVÕTE	22
ABSTRACT.....	23
KASUTATUD KIRJANDUS	24
LISA 1 Avaldus	28

MÕISTED JA LÜHENDID

alifaatsed ühendid – orgaanilised ühendid, mis ei sisalda benseenituumaga

alkaan – sirge ehk lineaarse ahelaga küllastunud süsivesinik, mis koosneb ainult süsinikust ja vesinikust ning millel on aatomite vahel ainult üksiksidemed

AlkB – alkaani hüdroksülaas

aromaatne ühend – ühe või enama aromaatses (benseeni)tuumaga ühend

biodegradatsioon – bioloogiline lagunemine, orgaaniliste ainete muundumine lihtsateks anorgaanilisteks aineteks

C_6H_5OH – fenooli ehk hüdroksübenseeni summaarne valem

elektroporatsioon – meetod, mis suurendab elektrivooluga rakumembraani läbilaskevõimet, mida kasutatakse DNA rakku viimiseks

generatsiooniaeg – aeg, mis kulub ühest rakust kahe raku tekkimiseks ehk bakteriraku pooldumiseks

Gm – antibiootikum gentamütsiin

IPTG – isopropüül-1- β -D-tiogalaktopüranosiid, molekulaarbioloogiline reagent, mis siinses töös indutseerib GFP ekspressiooni.

kasvukiirus – generatsioonide arv ajaühikus

mikrokosm-katsed – katsed, kus simuleeritakse ökosüsteemis olevaid tingimusi.

PAH – polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud

PH – fenooli hüdroksülaasid

plasmiid – rõngas-DNA

GFP – *Orange Fluorescence Protein*, oranžilt fluorestseeruv valk

transposoon – DNA lõik, mis suudab genoomi piires ümber paikneda

1. TEOORIA

1.1. Toornafta

Toornafta, tuntud ka kui maaõli, on kollasest musta toonini varieeruv heterogeenne viskoosne ning veest kergem vedelik, mis moodustub maa all suure rõhu ja temperatuuriga mõjutatud orgaanilisest massist. Toornafta on tekkinud biomassi settimise, kõrge rõhu ja temperatuuri, mineraalide ja mikroorganismide koosmõjul. Suured naftavarud on Lähis-Idas, Venezuelas, Põhja-Ameerikas ja Siberis. See on üks komplekssemaid orgaaniliste ühendite segusid Maal, mille põhikomponendid võib jagada neljaks: alkaanid, aromaatsed ühendid, asfalteenid ja tõrv (Lenskaja, 2014; Head *et al.*, 2006). Lisaks sisaldab toornafta veel vesinikku, väiksemates kogustes hapnikku, väävlit, lämmastikku ja väheses koguses teisi metallorgaanilisi ühendeid (Viggor *et al.*, 2013). Polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (PAH) on kõige levinum orgaaniliste ühendite rühm ning need on kõige toksilisem osa toornaftast (Adbel-Shafy, Mansour, 2016).

Kahjuks satuvad erinevad naftasaadused loodusesse kas juhuslikest naftaleketest, naftatankerite õnnetustest, nafta puurimisel nende leiukohtadest ning ümberlaadimise terminalidest (Das, Chandran, 2011).

1.1.2. Alkaanid ja nende aeroobne lagundamine

Süsivesinikud võivad moodustada pikki süsinikahelaid, luues sellega erineva keemilise sisaldustega aineid. Süsivesinikud jagunevad järgnevalt: küllastunud (ainult üksiksidemed süsinike vahel) ja küllastumata (leidub kaksik ja/või kolmiksidemeid).

Alkaanid on küllastunud süsivesinikud ja võivad olla kas lineaarse (*n*-alkaanid), tsüklilise (tsüklo-alkaanid) või hargnenud (iso-alkaanid) ahelaga. Alkaanide ahelad on ka erineva pikkusega: lühikese ahelaga alkaanid (C₂-C₄) on gaasilised, keskmise ahelapikkusega alkaanid (C₅-C₁₆) on vedelad ning pikema ahelaga alkaanid (> C₁₆) on tahked (Ayala, Torres, 2004).

Alkaanid võivad sõltuvalt toornafta allikast moodustada 50% toornaftast. Alkaane toodavad samuti taimed, rohelised vetikad, bakterid ja loomad ning väikeses kontsentratsioonis leidub neid kõikjal (Rojo, 2009). Alkaanid on ka parafiinid: vees väga halvasti lahustuvad, keemiliselt suhteliselt inertsed ning enne lagundamist tuleb nad esmalt aktiveerida. Mitmed mikroorganismid on võimelised lagundama alkaane nii anaeroobselt kui ka aeroobselt (van Beilen *et al.*, 2003). Alkaanide lagundamise lõppsaadused on süsinikdioksiid või metaan ja teised lihtsamad elemendid. Kiiremaks lagunemiseks on vaja aeroobset keskkonda, temperatuurivahemikku 20–35°C ning füüsilist ja/või keemilist dispersiooni (Olajire, Essien, 2014).

Aeroobsetes tingimustes alkaane lagundavad bakterid kasutavad elektronaktseptorina hapnikku. Alkaanid tavaliselt aktiveeritakse otsmise süsiniku oksüdatsiooniga primaarseks alkoholiks, mida hiljem oksüdeerivad alkoholi ja aldehüüdi dehüdrogenaasid. Tekkinud rasvhapped sisenevad β -oksüdatsiooni ratta, kus moodustub rasvhappeatsetüülCoA (Watkinson, Morgan, 1990). Lühikese ahelaga alkaanid lagundatakse nii terminaalsel oksüdatsiooni, kus tekib dikarboksüülhape, mis siseneb nii β -oksüdatsiooni ratta (Watkinson, Morgan, 1990) kui ka subterminaalse oksüdatsiooni käigus. Subterminaalse oksüdatsiooni korral tekib esmalt sekundaarne alkohol, mis muudetakse järgnevas etapis ketooniks. Ketoon oksüdeeritakse omakorda Baeyer-Villiger monooksügenaasiga estriks, millest moodustub alkohol ja rasvhape (Ashraf *et al.*, 1994). Bakteritel on erineva pikkusega ahelatega alkaanide lagundamiseks erinevaid spetsiifilisi ensüüme. Üks tuntumaid on alkaani hürdoksülaas (AlkB) keskmise ja pika ahelaga alkaanide lagundamiseks. Alkaanide lagundamise uurimistöodes on enim kasutatavaks mudelühendiks heksadekaan, mille ahel koosneb 16 süsinikust, ja see on diisli üks põhikomponente (Schoefs *et al.*, 2004).

1.1.3. Aromaatsed ühendid

Aromaatsed ühendid, nagu näiteks fenoolid, kresoolid, kloro- ja nitroaromaatsed ühendid, on ühe või enama tsükliisest benseenituumast ehk aromaatses tuumast moodustunud süsivesinikud. Benseenituum on tsükiline ühend, mis koosneb kuuest süsinikust ja vesinikust. Need ühendid võivad moodustuda orgaaniliste ainete mittetäielikul põlemisel, nafta tekkimisel või tööstustootmisel (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons 2017). Tsükliise tuuma olemasolu tõttu ei suuda paljud elusorganismid neid lagundada, mis muudavad aromaatsed ühendid saasteaineteks, millel on lisaks kantserogeenne toime. Aromaatsed ühendid on ühed püsivaimad ning laialt levinuimad saasteained, mis põhjustavad ulatusliku ja/või püsiva kahjustuse ökosüsteemile (Chandra *et al.*, 2013). Süsivesinik-tüüpi reoained satuvad keskkonda enamasti nafta transportimisel tekkivate leketega, mis põhjustavad pinnase, põhjavee ja ookeani reostumist (Saeki *et al.*, 2009; Janbandhu, Fulekar, 2011; Prince *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2014). Lisaks reostavale efektile on molekulid loomadele, sealhulgas ka inimestele, kahjuliku mõjuga, mis väljendub võimalikus vähitekkes, nekroosis ja kõngu jäänud kasvus (Conney, 1982; Hoffman, Gay, 1981; Kampa, Castanas, 2008; Kriek *et al.*, 1998).

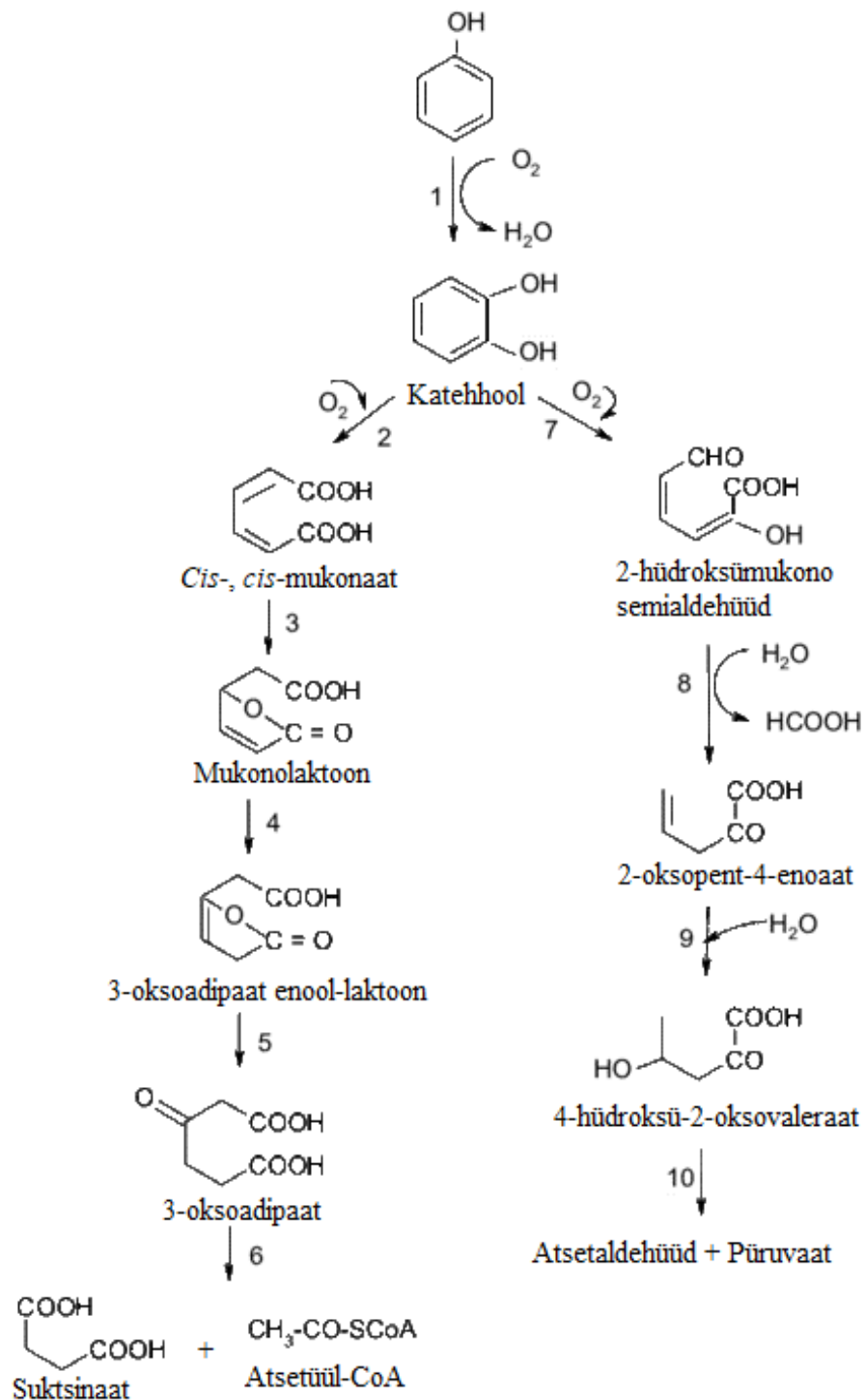
Mõned bakterid ning seened on võimelised paljusid aromaatsed ühendeid lagundama. Aromaatses tuumaga ainete lagundamiseks kasutavad bakterid erinevaid katabolismiradu ning ühendid lagundatakse kas osaliselt või täielikult. Kuigi erinevates katabolismiradades kasutatakse erinevaid ensüüme, muudetakse need ühendid enamasti (asendustega) katehooliks või protokatehuaadiks. Edasi lagundatakse tekkinud ühendid kas mööda *meta*- või *ortho*-rada Krebsi tsükli vaheühenditeni (Chakraborty, Coates, 2005). Aromaatsed ühendeid lagundavaid ensüüme saab liigitada dioksügenaasideks (lisab kaks hapniku aatomit

substraadile) ja monooksügenaasideks (lisab substraadile ühe hapniku aatomi) (Harayama, Rekik, 1989) (vt joonis 1).

1.1.3.1. Fenool ja fenooli aeroobne lagundamine

Fenool on ühend, mille benseenituumale küljes paikneb ühe vesiniku asemel OH-rühm, ja mis on mürgine, toatemperatuuril kristalsel kujul ning on vees halvasti lahustuv. Nii mõnedki bakteriperekonnad nagu näiteks perekond *Pseudomonas*'e esindajad, *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. ja *Achromobacter* sp., on võimelised fenooli lagundama (Nair *et al.*, 2008).

Fenooli benseenituumale aeroobseks lagundamiseks on oluline molekulaarse hapniku olemasolu. Fenooli lagundamisel (vt joonis 1) kõigepealt benseenituumale hüdroksüülitakse fenooli hüdroksülaasi poolt, mille käigus lisatakse teine hüdroksüülrühm benseenituumale ning tekib katehhool. Fenooli hüdroksülaasid (PH-d) jagunevad oma ehituse poolest kas ühekomponentseteks või mitmekomponentseteks ning looduses on enamlevinud mitmekomponentsed PH-d (Watanabe *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1997). Ensüümid katehhooli-1,2-dioskügenaas ja katehhooli-2,3-dioskügenaas suunavad katehhooli lagundamise vastavalt kas *ortho*- või *meta*-ratta (vt joonis 1) (Olajire, Essien, 2014). Katehhooli *ortho*-ratta lõpp-produktid on suksinaat ja atsetüül-CoA ning *meta*-ratta lõpp-produktid püruvaat ja atsetaldehyd (vt joonis 1) (van Schie, Young, 2000).



Joonis 1. Kaks võimalikku fenooli aeroobset lagunemisarada: *ortho*- ja *meta*-rada. Lagundavad ensüümid: 1, fenooli hüdroksülaas; 2, katehhooli 1,2-dioksügenaas; 3, mukonaadi tsükloisomeraas; 4, mukonolaktoon delta-isomeraas; 5, 3-oksoadipaadi enool-laktonaas; 6, 3-oksoadipaadi CoA-transferaas; 7, katehhooli 2,3-dioksügenaas; 8, 2-hüdroksümukono semialdehüüdi dehüdrogenaas; 9, 2-okso-pent-4-enoaadi hüdrataas; 10, 4-hüdroksü-2-oksovaleraadi aldolaas (Olajire, Essien, 2014).

1.2. Bioremediatsioon

Bioremediatsioon on keskkonnatehnoloogiline meetod, kus mikroorganismide abil puhastatakse saastunud keskkond sinna sattunud reostusest. Bioremediatsioon efektiivsusele annab juurde võimekate, näiteks toornaftat lagundavate looduslikust keskkonnast pärit mikroorganismide kaasamine. Bioremediatsioon jaguneb kaheks, *ex-situ* ja *in-situ*. *In-situ* on (kohapealne) protsess põhjavee ja pinnase puhastamiseks, kuid *ex-situ* protsesside alla kuuluvad näiteks komposteerimine, *land-farming* ja vee-pinnase segu reaktoris töötlemine (Keskkonna biotehnoloogia, 2005).

Bioremediatsioon alla liigituvad veel biostimulatsioon ja bioaugmentatsioon. Esimene tähendab tegevust, kus lisatakse keskkonda aineid, millega aidatakse kaasa mikroorganismide elutegevusele. Bioaugmentatsiooni alla loetakse kindla lagundamisvõimega mikroorganismide arvukuse tõstmist (Microbial Biodegradation, 2008). Bioaugmentatsioon on saastunud keskkonna parendamisel efektiivsem, kui kasutada sarnasest keskkonnast pärit baktereid/bakterikoosluseid. Kõige tähtsam tegur uues keskkonnas hakkama saamiseks on mikroobi kohanemisvõime keskkonna elus ja eluta looduse tekitatud tingimustega (Juhanson, 2010). Kasuks tuleb ka võime moodustada biofilmi, mis aitab ebasoodsates oludes organismil paremini ellu jääda.

Siinses töös simuleeriti bioremediatsiooniprotsessi käiku mirkokosm-katsetega, kasutades naftatöötlustehase reoveepuhastist isoleeritud baktereid. Mikrokosm-katsed võimaldavad ennustada bakterite võimalikku käitumist looduses.

1.3. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ICTN13 ja *Acinetobacter venetianus* ICP1

Uuritavad bakteritüved on isoleeritud India URAN FTP toornafta rafineerimistehase reovee järelsetist. Erinevate isoleeritud bakteriliikide ja -tüvede seast valiti nende erinevate ühendite lagundamisvõime põhjal välja *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ICTN13 ja *Acinetobacter venetianus* ICP1. Need tüved on võimelised kasvama nii aromaatsedel ühenditel nagu fenool kui ka alifaatsedel ühenditel nagu näiteks heksadekaan ja toornafta. Tüvi ICTN13 on suuteline kasvama edukalt fenoolil, tolueenil, heksadekaanil ja toornaftal. Fenooli lagundab antud tüvi mööda katehooli *meta*-rada, sünteesides mitmekomponendilist fenooli hüdroksülaasi ja katehooli 2,3-dioksügenaasi. Tüvi suudab moodustada keskpäraselt biomassi 1,3 mM kontsentratsioonidega kresoolidel. Alifaatsete ühendite lagundamiseks on tüvel ICTN13 alkaani hüdroksülaas (Viggor *et al.*, käsikiri)

A. venetianus ICP1 moodustab biomassi fenoolil ja heksadekaanil nagu ka tüvi ICTN13, kuid ta ei ole võimeline kasvama *p*-kresoolil ning kasvab halvasti ka *o*- ja *m*-kresoolil. Antud tüvi

lagundab fenooli mitmekomponendilise fenooli hüdroksülaasi ja katehooli 1,2-dioksügenaasi abil. Tüvel tuvastati veel erinevaid alkaani hüdroksülaasi geene ja alkaani monooksügenaasi geen alifaatsete ühendite lagundamiseks (Viggor *et al.*, käsikiri).

2. METOODIKA

2.1. Töös kasutatud bakteritüved, plasmiidid ja nende säilitamine

Siinses töös kasutati Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi geneetika õppetooli töötajate eraldatud bakteritüvesid *P. pseudoalcaligenes* ICTN13 ja *A. venetianus* ICP1 (tabel 1), mis on deponeeritud mikroobikogus CELMS (EEMB, mikroobikogu CELMS, 2019). Uuritavad tüved on eraldatud nafta rafineerimistehase puhastusjaamast Indias URAN FTP. Bakteritüvesid säilitati 30% glütseroolis –84 °C juures või agarkultuurina R2A söötmel (Difco).

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Tüvi või plasmid	Genotüüp või konstrueerimine	Allikas või viide
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ICTN13	Metsiktüvi	Viggor <i>et al.</i> , käsikiri; käesolev töö
<i>Acinetobacter venetianus</i> ICP1	Metsiktüvi	Viggor <i>et al.</i> , käsikiri; käesolev töö
<i>P. pseudoalcaligenes</i> ICTN13-OFP	E2-Orange fluorestsentsmärgisega ICTN13 tüvi	käesolev töö
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Boyer, Roulland-Dussoix, 1969
CC118 λ pir	$\Delta(ara-leu)$ <i>araD</i> $\Delta lacX74$ <i>galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (<i>Am</i>) <i>recA1</i> λ pir phage lysogen	Herrero <i>et al.</i> , 1990
AKN68	Sisaldab konjugatsiooniks abiplasmidi pUXBF13 (Ap^r)	Bao <i>et al.</i> , 1991
Plasmiidid		
pUXBF13	Abiplasmiid Tn7 transpositsiooniks (Ap^r)	Bao <i>et al.</i> , 1991
pminiTn7-lactac-OFP	pBK-miniTn7- Ω Gm sisaldab $lacI^q$ - P_{lac} -OFP (E2-Orange) ekspressiooni kasseti (Ap^r Gm r)	Rita Hõrak, TÜ MRI

2.2. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve ICTN13 märgistamine fluorestseeruva märgisega

Uuritava tüve ICTN13 märgistati fluorestseeruva märgisega kasutades OFP (*Orange Fluorescence Protein*) märgisega ülekandeplasmiidi pminiTn7-lactac-OFP, mis sisaldab gentamütsiini resistentsusgeeni ja oranžilt fluorestseeruvat valku kodeerivat geeni (Koch *et al.*, 2001; Lambertsen *et al.*, 2004) (tabel 1). Plasmiid viidi elektroporatsiooni abil *Escherichia coli* CC118λpir rakkudesse (vt ptk 2.2.1.).

2.2.1. *Escherichia coli* CC118λpir rakkude kompetentseteks muutmise ja elektroporatsioon

Plasmidi pminiTn7-lactac-OFP *E. coli* CC118λpir rakkudesse sisse viimiseks tuleb rakke töödelda, et rakkude rakumembraani läbilaskvamaks ehk kompetentseks muuta. Selleks tehti ümberkülv üleöö 5 ml LB-vedelsöötmes kasvanud *E. coli* CC18λpir rakkudest ning kasvatati 5 ml LB-söötmes 2 h. Seejärel eraldati söötimest rakud tsentrifuugimisega (Eppendorf lauatsentrifuugiga 12000 × g, 1 min). Järgmise sammuna pesti steriilsetes tingimustes rakke kaks korda 500 µl külma (4 °C) destilleeritud veega ning siis 2 korda 200 µl külma 10% glütserooliga ja suspendeeriti 50 µl 10% glütseroolis.

Rakud pipeteeriti elektroporatsiooni küvetti ning lisati 0,8 µl plasmidi pminiTn7-lactac-OFP. Elektroporatsiooni protsess tehti BioRad elektroporaatoriga pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni kanti segu 1,5 ml LB-söötmele katseklaasi ning kasvatati 37 °C 1 h. Kasvanud rakud tsentrifuugiti söötimest ning suurem osa sellest eemaldati. Rakud suspendeeriti alles jäänud söötmes (100 µl) ning plaaditi seejärel gentamütsiini (Gm, 10 µg/ml) sisaldavale LB-tardsöötmele, mis sisaldas 1,5% agarit ja kasvatati 37 °C 24 h.

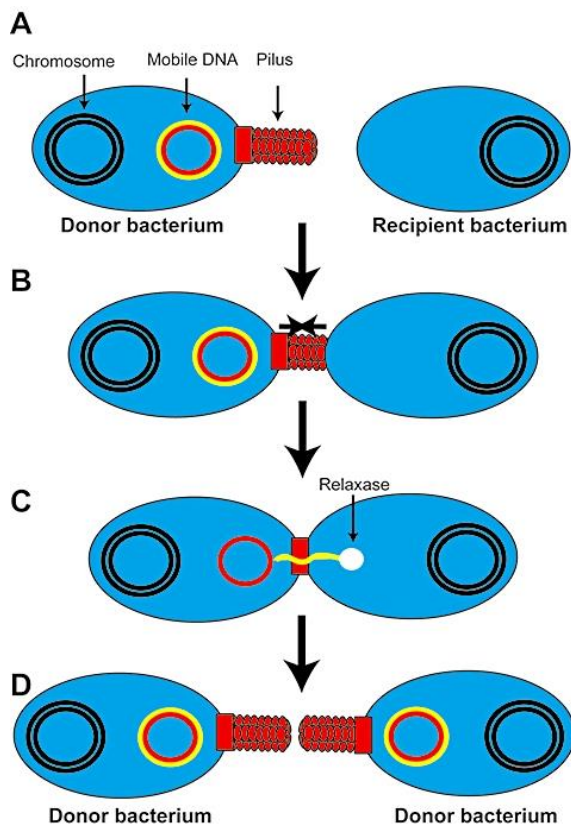
2.2.2. Konjugatsioon

Konjugatsioon on protsess, kus DNA kandub doonorrakkust läheduses asuvasse vastuvõtvasse ehk retsipientraku. Bakterid vahetavad/edastavad pärilikkusainet läbi tekkiva konjugatsioonikanali (vt joonis 2).

Fluorestseeruva märgise sisse viimiseks tüvesse *P. pseudoalcaligenes* ICTN13 kasutati ülekanduvat plasmidi pminiTn7-lactac-OFP, mis oli viidud *E. coli* CC118λpir rakkudesse (vt ptk 2.2.1.) ning konjugatsiooni abil viidi märgis tüvesse ICTN13. Selleks kasutati 4 bakteritüve, milleks olid: tüvi ICTN13; ülekandeplasmiidi pminiTn7-lactac-OFP sisaldav *E. coli* tüvi CC118λpir; abistav bakteritüvi *E. coli* HB101, mis sisaldab konjugatsiooniks vajalikke valke kodeerivat plasmidi pRK2013, ning abiplasmidi pUXBF13 sisaldav *E. coli* tüvi AKN68. Ülekantav plasmiid kandub *E. coli*le ja sealt omakorda *P. pseudoalcaligenes*'ele. *E. coli* tüvi CC118λpir ei ole suuteline ise pärilikkusainet üle kandma ja sellepärast ongi vaja kasutada

abistavaid plasmide. Lisaks helendavale märgisele lisati uuritavale tüvedele gentamütsiini resistentsuse geen bakteriaalseks selektsiooniks (Tover, 2008).

Konjugatsiooni läbiviimiseks kasvatati üleöö 5 ml LB-söötmes antibiootikumide juuresolekul järgmised tüved: 1) doonortüvi *E. coli* CC118 λ pir, mis sisaldas fluorestseeruvat geeni kandvat plasmidi; 2) retsipienttüvi *P. pseudoalcaligenes* ICTN13; 3) *E. coli* tüve HB101 ning 4) *E. coli* tüvi AKN68. Üleöö kasvanud kultuuridest tehti kahekümnekordsed lahjendused uude 1,5 ml ilma antibiootikumideta LB-söötmesse. Ristamissegude jaoks võeti 1,5; 2 ja 3 tunni tagant igast kultuurist 100 μ l, segati kokku ning pipeteeriti 100 μ l segu LB-tardsöötmele. Baktiereid kasvatati üleöö 30 °C termostaadis. Kasvanud rakud kraabiti steriilse külviaasaga plaadilt ning suspendeeriti 1 ml-s 1xM9 lahuses (Adams, 1959). Suspensioonist pipeteeriti 100 μ l selektiivsöötmetele, mis sisaldas Gm (10 μ g/ml) ja fenooli ning kus olid võimelised kasvama vaid *P. pseudoalcaligenes* ICTN13 rakud, mis olid endale saanud pminiTn7-lactac-OFP plasmidi. Kontrollimaks tüve fluorestseerumist, külvati rakud edasi LB-söötmele, mis sisaldas Gm ja fluorestsentsi indutseerimiseks 0,5 mM isopropüül-1- β -D-tiogalaktopüranosiidi (IPTG), ning uuriti neid fluorestsentsmikroskoobis Olympus BX41 (1000x suurendus, õliimmersioon-objektiiv, lihtmärgpreparaat).



Joonis 2. Bakteri konjugatsioon. **A** doonortüvi on alustamas DNA vahetusega. **B** rakud loovad konjugatsioonikanali. **C** üheaahelaline (single-strand) DNA mobiilne geneetiline element kantakse doonorilt retsiipiendile relaksaasi abil. **D** kummaski rakus sünteesitakse komplementaarsusprintsibi põhjal teine DNA ahel ning mõlemad konjugeeritud bakterid võivad olla uued potentsiaalsed doonorrakud. (Juhas *et al.*, 2008).

2.3. Bakteritüvede kasvuparameetrite määramine

Bakteritüvesid ICTN13, ICP1 ja nende optilise tiheduse järgi 1:1 segu kasvatati 150 ml Erlenmeyeri kolbides, mis sisaldasid 45 ml destilleeritud vett, 5 ml 10xM9 lahust, 125 µl 400x mikroelementide (Bauchop ja Elsdén, 1960) lahust ning substraadina 1,3 mM fenooli. Inokuleerimiseks kasutati üleöö samal substraadil kasvatatud loksutil bakterirakke (30 °C, 180 pööret/min) lõpptihedusega $OD_{580} = 0,1$. Katset tehti kolm korda. Kasvu jälgiti spektrofotomeetriliselt 580 nm ning bakterite generatsiooniaeg (aeg, mis kulub ühest rakust kahe raku tekkimiseks) leiti kasutades valemit $g = \frac{t \times \log 2}{\log N_t - \log N_0}$ ning kasvukiirus arvutati (generatsioonide arv ajaühikus) valemiga $v = \frac{1}{g}$.

2.4. Tüvede ICTN13 ja ICP1 suhtelise osakaalu leidmine tüvede segus

Segukultuurist, mis sisaldas tüve ICP1 ja fluorestsentsmärgisega tüve ICTN13 ning mida oli kasvatatud fenoolil (1,3 mM), tehti väljakülvid söötmele, mis sisaldas Gm ja fluorestsentsi indutseerimiseks IPTG-d (0,5 mM). Väljakülvid tehti ajapunktidel 2, 5, 7, 9 tundi ning kasutati

erinevaid lahjendusi. Tüvi ICTN13 oli märgistatud oranži fluorestsentsmärgisega ning kolooniad värvusid söötmel oranžiks, mis eristas teda tüvest ICP1. Väljakülvidest määrati kolooniaid moodustavate rakkude arvukused ning leiti uuritavate tüvede suhteline osakaal tüvede segus.

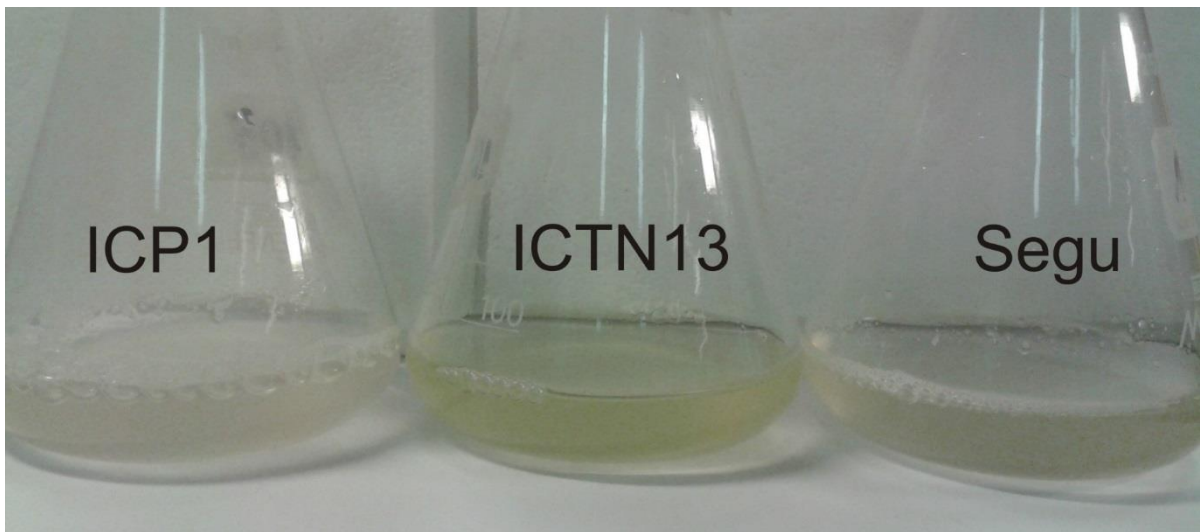
2.5. Uuritavate üksiktüvede ja tüvede segu kasvatamine toornafta mikrokosmis

Toornafta biodegradatsiooni võimet hinnati kaudselt visuaalsel vaatlusel, jälgides toornafta muutust ja bakterite kasvust tulenevat hägusust. Eeldati, et kui bakterid suudavad kasvada uuritava substraadil, mis on ainus süsinikuallikas, siis nad ka lagundavad seda substraati. Üksiktüvesid ja tüvede segu kasvatati 150 ml Erlenmeyeri kolbides, mis sisaldasid 45 ml destilleeritud vett, 5 ml 10xM9 lahust, 125 µl 400x mikroelementide lahust ning substraadina toornaftat (1%). Bakterite kasvu jälgiti 5 päeva jooksul ja iga päev tehti fotojäädvustusi. Kontrolliks oli ilma bakteriteta toornaftaga kasvukeskkond. Katset korrati kolm korda.

3. TULEMUSED JA NENDE ANALÜÜS

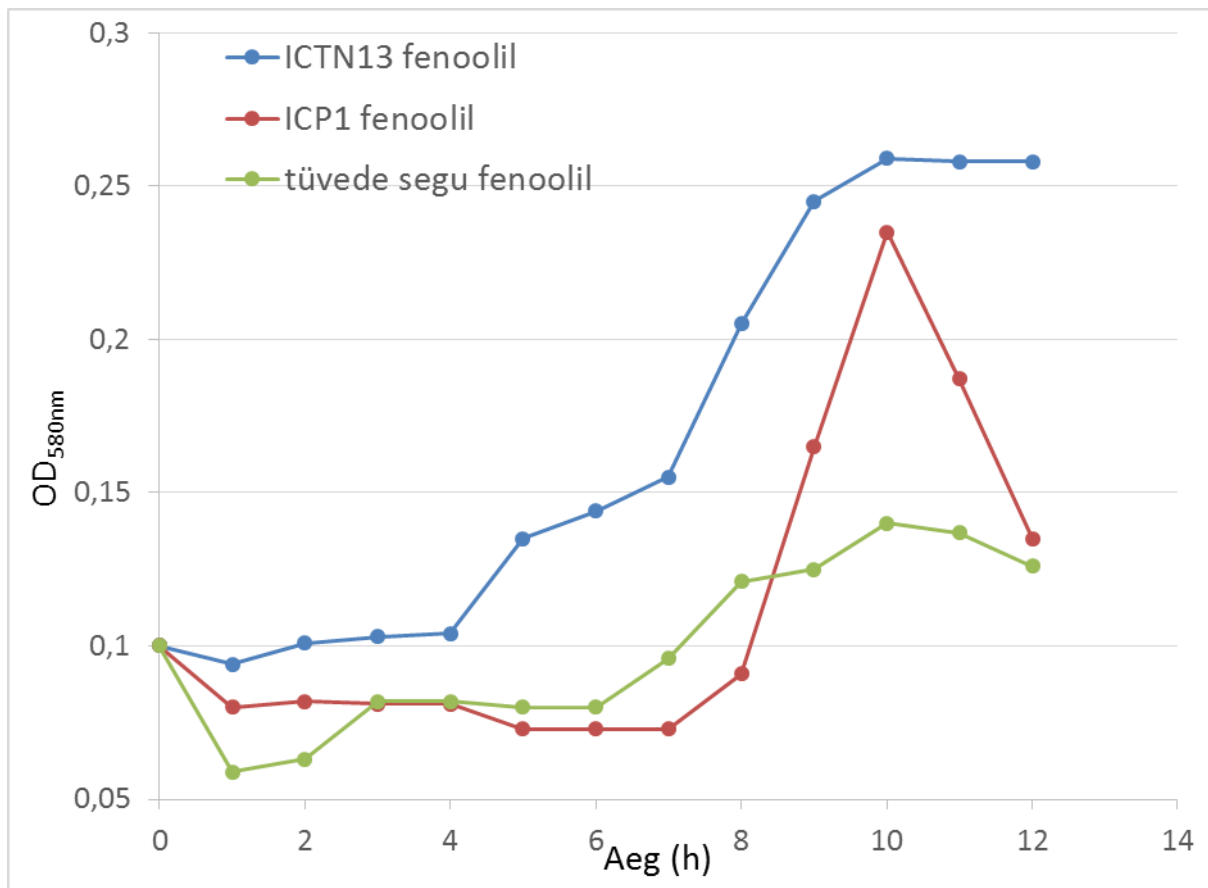
3.1. Mikrokosm-katsed fenooliga

Fenooli võib leida paljudes reostatud piirkondades ning selle ühendi lagundamine on raskendatud aines oleva väga stabiilse benseenituumata tõttu. Siiski on mikroorganisme, kes suudavad lagundada fenooli ja kasutada seda ühendit süsiniku- ja energiaallikana (Al-Khalid, El-Naas, 2012). Seetõttu on ka väga oluline uurida mikroobe, kes on võimelised fenoolseid ühendeid looduses lagundama. Sellest tulenevalt tehti uurimistöös mikrokosm-katse, et uurida *P. pseudoalcaligenes* ICTN13, *A. venetianus* ICP1 ja nende segu kasvamisvõimet fenoolil. Tüved kasvatati 1,3 mM fenooli sisaldavas 50 ml inimaalsöötmes 30 °C ning määrati kasvuparameetrid (vt ptk 2.3., vt joonis 3).



Joonis 3. Mikrokosm-katse, kus *P. pseudoalcaligenes* ICTN13, *A. venetianus* ICP1 ja nende segu kasvatati 12 h fenooli sisaldavas söötmes.

Mikrokosmid inokuleeriti rakkudega võimalikult ühtlaselt, algne sissekülv oli kõigil variantidel $OD_{580} = 0,1$, proovid võeti 1 tunni tagant kuni 12 tunnini. Jooniselt 3 on näha, et kolvid on erineva värvusega, see tuleneb sellest, et tüvi ICTN13 omab fenooli lagundamiseks *meta*-rada, milles tekkiv vaheühend muudab söötme kollaseks. Uuritavate tüvede ja nende segu kasvukõverad on toodud joonisel 4.

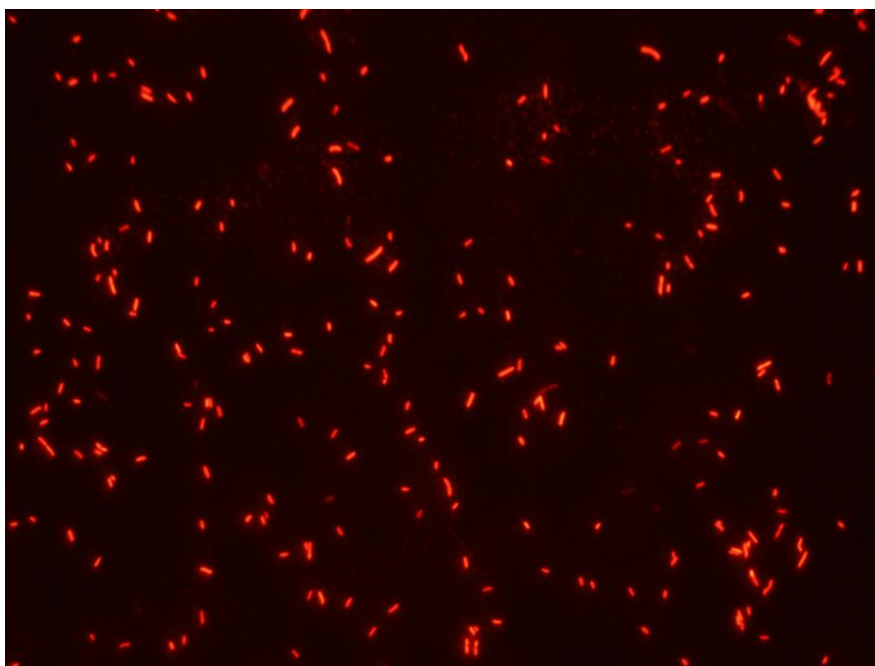


Joonis 4. Tüvede ICP1, ICTN13 ja nende segu kasvukõverad 1,3 mM fenoolil 30 °C.

Jooniselt 4 on näha, et kõik uuritavad tüved on pika kohanemisfaasiga enne, kui hakkavad aktiivselt kasvama. Tüve ICP1 arvukus esimesel tunnil langeb ning tüvi kohaneb kasvu keskkonnaga 7 tundi ja siis algab rakkude kiire kasv, mis saavutab tipu 10. tunniks ning seejärel arvukus langeb järsult. Tüve ICP1 generatsiooniaeg (aeg, mis kulub ühest rakust kahe raku tekkimiseks) on 1,78 h ning kasvukiirus 0,561 generatsiooni tunnis (h^{-1}). Tüvi ICTN13 kohaneb keskkonnaga kiiremini ja alustab 4. tunnist aktiivsema kasvuga (pooldumisega). Alates 10. tunnist algab statsionaarne kasvufaas, kus rakkude paljunemine ja suremine on tasakaalus. Tüve ICTN13 generatsiooniaeg on 4,6 h ning kasvukiirus 0,217 h^{-1} . Tüvede segu korral toimub kohanemine kasvukeskkonnaga kuuenda tunnini ja siis algab aktiivsem kasv, kuid kasv ei ole nii kiire kui üksiktüvede puhul. Nendest tulemustest lähtuvalt oli järgmiseks eesmärgiks teada saada, milline on üksiktüvede suhteline osakaal tüvede segus ja milline tüvi on domineerivam. Selleks märgistati tüvi ICTN13 fluorestseeruva märgisega (vt ptk 2.2.).

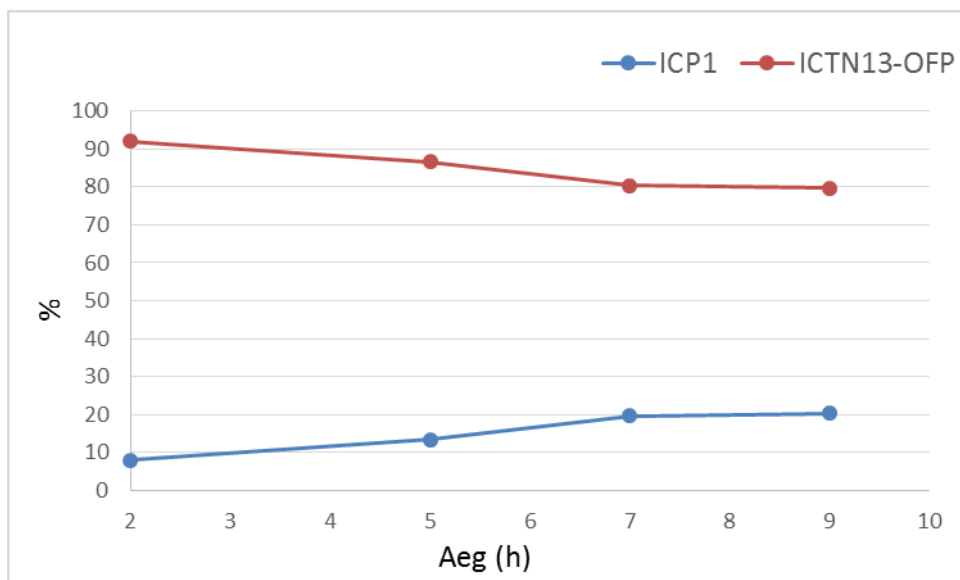
3.2. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* tüve ICTN13 märgistamine fluorestseeruva märgisega ning tüve ICTN13 suhteline arvukus tüvede segus

Saasteainete lagundamine toimub enamasti edukamalt mitmesuguste mikroobirühmade omavahelise koostöö tulemusena ning seega on oluline uurida, kuidas bakterid segukultuurina erinevaid substraate lagundavad. Selleks, et eristada üksiktüvesid segukultuuris, märgistati *P. pseudoalcaligenes* ICTN13 oranžilt fluorestseeruva märgisega. Selleks kasutati ülekandeplasmiidi pminiTn7-lactac-OFP, mis sisaldab GFP-d (*Orange Fluorescence Protein*) ning plasmiid viidi uuritavasse tüvesse konjugatsiooni teel (vt ptk 2.2.2.). Rakkude fluorestseerumise algatamiseks lisati söötmesse IPTG-d ning rakke vaadeldi fluorestsentsmikroskoobi abil (vt joonis 5) või kolooniate värvust hinnati söötmeplaadil (värvuvad oranžiks). Fluorestseeruva märgisega tüve ICTN13 kasutati peatükis 3.1. kirjeldatud mikrokosm-katsetes fenoolil.



Joonis 5. GFP-märgisega *P. pseudoalcaligenes* ICTN13 preparaati fluorestsentsmikroskoobis Olympus BX41 (suurendus 1000 korda).

Fenooli mikrokosmi segukultuurist, mis sisaldas tüve ICP1 ja fluorestsentsmärgisega tüve ICTN13-OFP (ptk 2.2. ja 2.4.), tehti väljakülvid ajapunktidel 2, 5, 7, 9 tundi erinevate lahjendustena söötmeplaatidele, mis sisaldasid Gm ja IPTG-d. Fluorestsentsmärgisega kolooniad värvusid söötmel oranžiks, mis eristasid neid tüvest ICP1. See on kaudne bakterite arvukuse määramisviis ja päris täpset tulemust ei anna, sest igast rakust ei pruugi kolooniat moodustuda, kuid annab ülevaate, milline tüvi segukultuuris domineerib.



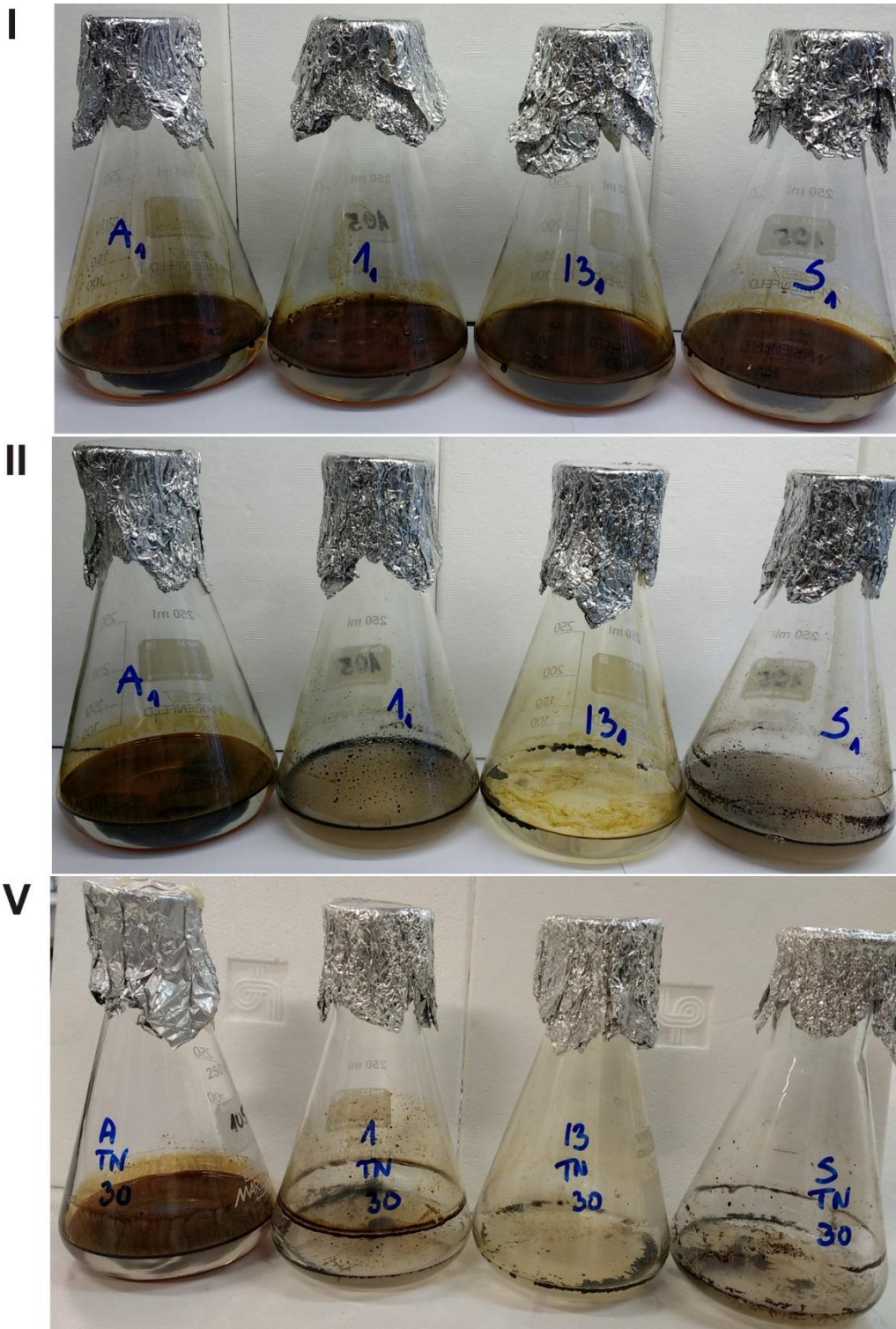
Joonis 6. Tüvede ICTN13-OFP ja ICP1 suhteline osakaal tüvede segus.

Jooniselt 6 on näha, et segukultuuris on tüve ICTN13 arvukus suurem kogu katse jooksul. Mikrokosm-katse 2. tunnil on tüve ICTN13 arvukus kõige suurem, aga siis hakkab langema ning jääb stabiilsele tasemele alates 7. tunnist. Tüve ICP1 arvukused on kogu katse jooksul madalamad kui ICTN13, kuid vastupidiselt ICTN13-le alates 2. tunnist tüve arvukus veidi suureneb ja jääb stabiilsele tasemele samuti alates 7. tunnist. Katsest tuleneb, et *meta-* (ICTN13) ja *ortho-* (ICP1) rada omavate tüvede arvukused muutuvad segukultuuris vastasfaasides, st et kui *meta*-rajaga tüve arvukus väheneb, siis *ortho*-rada omava tüve arvukus samal ajal suureneb. Sellist tulemust nähti ka Heinaru *et al.* (2005) tööühmas, kus näidati sarnast arvukuste kõikumist vastasfaasides. See asjaolu näitab, et tüvede segu saab vaadelda kui ühtset populatsiooni, kus igal üksiktüvel on korraga indutseeritud vaid üks biodegradatsioonirada, vältimaks substraatide segudest mitteproduktiivsete katabolismiradade käivitumist (Heinaru *et al.*, 2005).

3.3. Toornafta mikrokosm-katse

Kogu maailmas on väga oluline nafta ja naftaproduktide kasutamine kütusena ning on see lahutamatu osa tänapäeva maailma funktsioneerimisest, kuid sellega kaasneb ka märkimisväärne reostus ning saastuseoht (Atlas, Hazen, 2011). Toornafta on kompleksne segu, mille põhikomponendid võib jagada neljaks: alkaanid, aromaatsed ühendid, asfalteenid ja tõrv (Lenskaja, 2014; Head *et al.*, 2006). Bakteritel on oluline roll naftasaaduste ja teiste ohtlike kemikaalide lagundamisel (Viggor *et al.*, 2013). Sellest tulenevalt oli siinse uurimistöö üks eesmärk hinnata bakteritüvede toornafta lagundamise võimet. Selleks kasvatati uuritavaid tüvesid minimaalsöötmes, kuhu oli substraadina lisatud toornafta (1%). Bakterite kasvu jälgiti 5 päeva jooksul, hinnates visuaalselt toornafta muutust ja bakterite kasvul tekkinud hägusust,

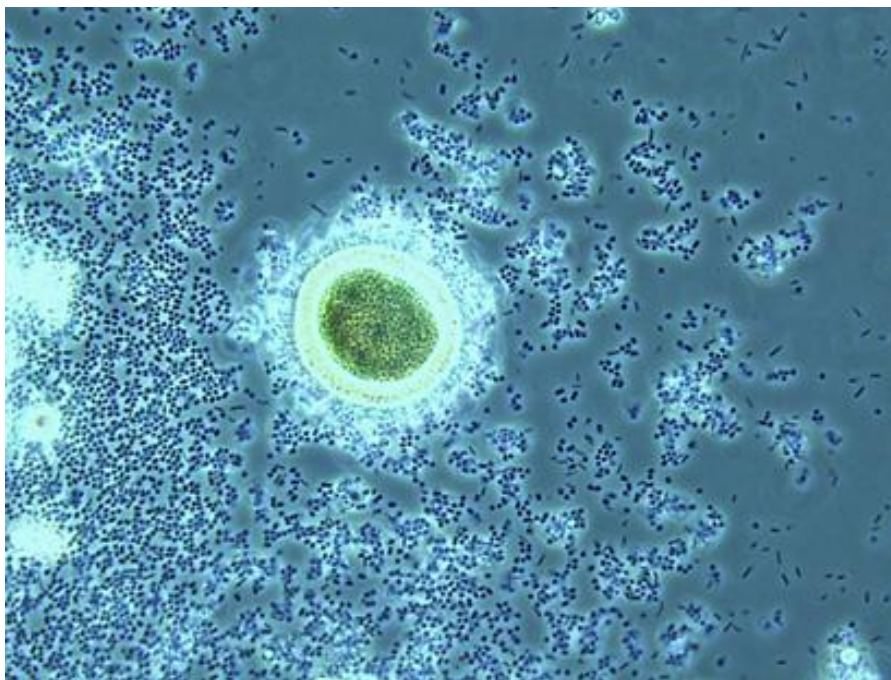
ning tehti iga päev fotojäädvustusi. Kontrolliks oli ilma bakteriteta toornaftaga sööde (vt joonis 7, ptk 2.5.).



Joonis 7. Toornafta-mikrokosm katse. A – abiootiline (rakkudeta) kontroll, 1 - tüvi ICP1, 13 – tüvi ICTN13, S – tüvede segu; I – 0 ajapunkt, II – 24 h, V – 5 päeva inkubeeritud kolvid.

Joonisel 7 on 3 ajapunkti fotod. I ajapunktil, kui katse käima pandi, on toornafta ühtlaselt kolvi vedelikpinnal, peale 24 h inkubeerimist oli selgelt näha muutusi kolbides võrreldes abiootilise kontrolliga. Tüvega ICP1 ja segukultuuri kolvis oli näha suuremat hägusust ja toornafta on

lagunenud mikrotilkadeks. Tüvega ICTN13 kolvis oli näha suured toornafta tilgad, mis aja jooksul lõhkesid ja toornafta kattis vedeliku pinda ja kolvi seinu. Abiootiline kontroll oli peale 5 päeva inkubeerimist muutumatu, kuid teistes kolvides oli toornafta valdavalt lagunenud väiksemateks tilkadeks (joonis 7). Mikrokosm-katse 5. päeva segukultuuri proovist tehti märgpreparaat ning vaadeldi faaskontrastmikroskoobiga Olympus BX41 1000x suurendusega (vt joonis 8), kus oli näha väikseid õlitilkasid, mida ümbritsesid ja katsid bakterid.



Joonis 8. Faaskontrastmikroskoobi Olympus BX41 märgpreparaadi pilt tüvede segukultuurist toornafta mikrokosm-katse 5. päeva proovist (1000x suurendus).

KOKKUVÕTE

Toornaftaga saastumine on üks tõsisemaid reostusi, mis mõjutab nii inimesi kui ka kogu ökosüsteemi. Bioremediatsioon on oluline tehnoloogia naftareostuse mikroorganismide abil keskkonnast eemaldamiseks. Eriti edukad tulemused on saadud kasutades kohalikku mikroobikooslust ehk loodusest eraldatud mikroorganisme. Nafta biolagunemise kiirus ja ulatus oleneb naftas esinevate süsivesinike ehitusest.

Sellest tulenevalt oli töö eesmärk kasutada looduslikust keskkonnast eraldatud mikroorganisme toornafta ja fenooli lagundamise kindlakstegemiseks. Tüved *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ICTN13 ja *Acinetobacter venetianus* ICP1 lagundavad mitmesuguseid aromaateid ja ka alifaatseid ühendeid. Mikrokosm-katsed fenooli ja toornaftaga tõestasid nende tüvede head biodegradatsioonivõimet, eriti tüve ICP1 juures, millel oli fenoolil kasvades suurem kasvukiirus. Mõlemad tüved lagundasid toornaftat. Segukultuuris suutsid tüved koos kasvada ning fenooli ning naftat lagundada. Uuritavate tüvede täpsemaks biodegradatsiooni efektiivsuse kindlakstegemiseks oleks vaja teha täpsemaid keemilisi katseid.

ABSTRACT

The experimental work „Study of biodegradation by bacteria strains isolated from oil refinery” conducted by Andres Reintam has been carried out in the Institute of Molecular and Cell Biology at University of Tartu. The aim of the study was to learn how bacterial strains *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ICTN13 and *Acinetobacter venetianus* ICP1 degrade phenol and crude oil in single and mixed culture conditions. Knowing different bacteria species' biodegradation efficiencies allows for the development of more effective bioremediation techniques.

The problem is that conventional ways to treat oily wastewater are not effective enough. There are other studies that observe biodegradation ability of various bacteria on different substrates. A fluorescent marker was added to ICTN13 strain with conjugation to distinguish it from ICP1. The next step was to obtain the data on optical density increase on phenol reflecting the increase in bacterial numbers. Then the microcosm experiments allowed to obtain the information of bacterial differential growth. The results show that both strains grow on phenol but ICP1 has higher growth rate. In the mixed culture strain ICTN13 dominates. Both of the strains are growing on crude oil and degrading it rather efficiently.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adams, M. H. 1959. Bacteriophages. In Interscience Publishers Inc. New York, , lk 445-447.
- Adbel-Shafy, Hussein, Mona S. Mohamed-Mansour, 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, nr 25(1), lk 107–123.
- Al-Khalid, Taghreed, Muftah H. El-Naas, 2012. Aerobic biodegradation of phenols: a comprehensive review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42(16), lk 1631–1690.
- Ashraf *et al.* = Ashraf, William, Alaa Mihdhir, J. Collin Murrell, 1994. Bacterial oxidation of propane. *FEMS Microbiology Letters*, nr 122(1–2), lk 1–6.
- Atlas, Ronald M., Terry C. Hazen, 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. *Environmental Science & Technology*, nr 45(16), lk 6709–15.
- Ayala, Marcela, Eduardo Torres, 2004. Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective. *Applied Catalysis A: General*, nr 272(1–2), lk 1–13.
- Bao, Ying, Douglas P. Lies, Haiyan Fu, Gary. P. Roberts. 1991. An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene*, nr 109(1), lk 167–168.
- Bauchop, T. and Elsdon, S. R. (1960). The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* 23:457–469.
- Boyer, Herbert W., Daisy Roulland-Dussoix, 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, nr 41(3), lk 459–472.
- Chakraborty, Romy, John D. Coates, 2005. Hydroxylation and Carboxylation—Two Crucial Steps of Anaerobic Benzene Degradation by Dechloromonas Strain RCB. *Applied environmental microbiology*, nr 71(9), lk 5427–5432.
- Chandra *et al.* = Chandra, Subhash, Richa Sharma, Kriti Singh, Anima Sharma, 2013. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of microbiology*, nr 63(2), lk 417–431.
- Chen *et al.* = Chen, Qingguo, Jingjing Li, Mei Liu, Huiling Sun, Mutai Bao, 2017. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. *PLOS ONE* 12(3): e0174445

Conney, Allan H, 1982. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: GHA Clowes Memorial Lecture. *Cancer research*, nr 42(12), lk 4875–4917.

Das, Nilanjana, Preethy Chandran, 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international* 2011.

EEMB, mikrobikogugu CELMS. Kättesaadav: http://eemb.ut.ee/celms/main_list.php?.

Harayama, S., Monique Rekik, 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *Journal Biological Chemistry*, nr 264(26), lk 15328–15333.

Head, *et al.* = Head, Ian M., D. Martin Jones, Wilfred F.M. Röling, 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, nr 4(3), lk 173–182.

Heinaru, *et al.* = Heinaru, Eeva, Merike Merimaa, Signe Viggor, Merit Lehiste, Ivo Leito, Jaak Truu, Ain Heinaru, 2005. Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. *FEMS Microbiol Ecology*, nr 51(3), lk 363–73.

HELCOM, 2010 = Maritime Activities in the Baltic Sea – An integrated thematic assessment on maritime activities and response to pollution at sea in the Baltic Sea Region. *Baltic Sea Environment Proceedings No. 123*.

Herrero, Marta, Victor de Lorenzo, Kenneth N. Timmis, 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, nr 172(11), lk 6557–6567.

Hoffman, David J., Martha L. Gay, 1981. Embryotoxic effects of benzo [a] pyrene, chrysene, and 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene in petroleum hydrocarbon mixtures in mallard ducks. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, nr 7(5), lk 775–787.

Janbandhu, Anjali, M. H. Fulekar, 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of hazardous materials* nr 187(1), lk 333–340.

Juhanson, Jaanis, 2010. Impact of phytoremediation and bioaugmentation on the microbial community in oil shale chemical industry solid waste. (doktoridissertatsioon). Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.

Juhas *et al.* = Juhas, Mario, Derrick W. Crook, Derek W. Hood, 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cellular Microbiology*, nr 10(12), lk 2377–2386.

Kampa, Marilena, Elias Castanas, 2008. Human health effects of air pollution. *Environmental pollution*, nr 151(2), lk 362–367.

Keskkonna biotehnoloogia, 2005. Kättesaadav: <http://gt.inkblue.net/Vee-%20ja%20mullamikrobioloogia/loeng10-11.pdf>. (7.01.2018).

Koch, Birgit, Linda Elise Jensen, Ole Nybroe, 2001. A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gramnegative bacteria at a neutral chromosomal site. *Journal of Microbiological Methods*, nr 45(3), lk 187–195.

Kriek *et al.* = Kriek, Erik, Margarita Rojas, Kroum Alexandrov, Helmut Bartsch, 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbon - DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, nr 400(1), lk 215–231.

Lambertsen *et al.* = Lambertsen, Lotte, Claus Sternberg, Søren Molin, 2004. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environmental microbiology*, nr 6(7), lk 726–732.

Lenskaja, Anastassija, 2014. Alkaani hüdroksülaasi (AlkB) mitmekesisus Läänemere bakterites. (bakalaureusetöö). Tartu: Tartu Ülikool.

Microbial Biodegradation, 2008. Microbial biodegradation: genomics and molecular biology. Toimetanud Eduardo Díaz. Norfolk: Caister Academic Press.

Nair *et al.* = Nair, C. Indu, K. Jayachandran, Shankar Shashidhar, 2008. Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology*, nr 7(25), lk 4951–4958.

Olajire, A.A., J. P. Essien, 2014. Aerobic Degradation of Petroleum Components by Microbial Consortia. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, nr 5(5), lk 1.

Peters *et al.* = Peters, M., Eeva Heinaru, E. Talpsep, H. Wand, U. Stottmeister, Ain Heinaru, and A. Nurk, 1997. Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, pheBA, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Applied and Environmental Microbiology*, nr 63(12), lk 4899–4906.

Prince *et al.* = Prince, Roger C., Kelly M. McFarlin, Josh D. Butler, Eric J. Febbo, Frank CY Wang, Tim J. Nedwed, 2013. The primary biodegradation of dispersed crude oil in the sea. *Chemosphere*, nr 90(2), lk 521–526.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 2017. Kättesaadav: https://toxtown.nlm.nih.gov/text_version/chemicals.php?id=80. (15.11.2017).

Rojo, Fernando, 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, nr 11(10), lk 2477–2490.

- Saeki *et al.* = Saeki, Hisashi, Masaru Sasaki, Koei Komatsu, Akira Miura, Hitoshi Matsuda, 2009. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresource Technology*, nr 100(2), lk 572–577.
- Schoefs, O., M. Perrier, R Samson, 2004. Estimation of contaminant depletion in unsaturated soils using a reduced-order biodegradation model and carbon dioxide measurement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, nr 64(1), lk 53–61.
- Souza *et al.* = Souza, Ellen Cristina, Thereza Christina Vessoni-Penna, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International biodeterioration & biodegradation*, nr 89, lk 88–94.
- Tover, Andres, 2008. Geneetika praktikum. Tartu: Sulemees OÜ.
- van Beilen *et al.* = Van Beilen, J. B., Z. Li, W. A. Duetz, T. H. M. Smits, B. Witholt, 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & gas science and technology*, nr 58(4), lk 427–440.
- van Schie, Paula M., Lily Y. Young 2000. Biodegradation of phenol: Mechanisms and Applications. *Bioremediation Journal*, nr 4(1), lk 1–18.
- Viggor *et al.* = Viggor, Signe, Jaanis Juhanson, Merike Jõesaar, Mario Mitt, Jaak Truu, Eve Vedler, Ain Heinaru, 2013. Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiological Research*, nr 168(7), lk 415–427.
- Viggor, *et al.* = Viggor, Signe, Merike Jõesaar, Paulo Santos, Pedro Soares-Castro, Atya Kapley, Maia Kivisaar, 2018. Ability of two bacterial strains isolated from crude oil refinery wastewater treatment plant degrade aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Käsikiri*.
- Watanabe, *et al.* = Watanabe, Kazuya, Maki Teramoto, Hiroyuki Futamata, Shigeaki Harayama, 1998. Molecular Detection, Isolation, and Physiological Characterization of Functionally Dominant Phenol-Degrading Bacteria in Activated Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, nr 64(11), lk 4396–4402.
- Watkinson, Robert J., Philip Morgan, 1990. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*, nr 1(2–3), lk 79–92.

LISA 1 Avaldus

Eesti Teadusagentuurile esitatud Noore uurija stipendiumi taotlus

Varasem kokkupuude uurimistöödega. Kas oled varem uurimistööd teinud? Kui jah, siis palun kirjuta siia selle uurimistöö teema, tegemise aasta ja juhendaja nimi.

Tegin õppeaastal 2014/2015 uurimistöö pealkirjaga „Inimeste teadlikkus patogeenidest“ millega soovisin osaleda õpilaste teadustöö konkursil, kuid kuna juhendaja leidmine võttis palju aega, ma ei jõudnud esitamise tähtajaks tööd valmis kirjutada. Töö sisaldas teoreetilist osa ja küsimustiku vastuste analüüsi. Juhendajad olid Tartu Mart Reiniku Kooli keemiaõpetaja Raili Ratasepp ja Katrin Lang Tartu Ülikooli Tervishoiu instituudist.

Tulevane uurimistöö. Millises valdkonnas soovid uurimistööd teha ja milline võiks olla Sinu uurimistöö temaatika. Kirjuta lühidalt, millised teemad Sind huvitavad. Võid välja pakkuda ka mitu valdkonda ja/või teemat.

Olen septembri algusest tegelenud uurimistööga, mis käsitleb kahe erineva bakteri liigi toornafta ja teiste aromaatsete ühendite biodegradatsioonivõime uurimisega. Juhendaja on PhD Merike Jõesaar, Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi teadur ja koolipoolne on Tartu Jaan Poska Gümnaasiumi bioloogiaõpetaja Lauri Mällo. Esmaselt oli plaan üldse teha multiresistentsete bakteritega praktilist tööd, kuid hiljem sain kooli bioloogia õpetaja kaudu infot, et on olemas ka teine võimalus.

Põhjenda oma valikut. Miks on Sinu väljapakutud teema(de) uurimine vajalik ja miks see Sind huvitab?

Uurimistöö tulemus annab infot, kuidas *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ICTN13 ja *Acinetobacter venetianus* ICP1 lagundavad toornaftat ja teisi aromaatsed ühendeid nii koosluses kui ka eraldi. Töö tulemusega saab muuta nafta reostuse likvideerimise efektiivsemaks.

Mul on huvi mikrobioloogia vastu, teada saamise soov, et kuidas mikrobioloogilised töid reaalselt teostatakse ning ka kogemuste saamiseks.

Milliste vahendite/võimaluste puudumine takistab Sul praegu uurimistööd ellu viia ja kuidas noore uurijastipendium aitab seda probleemi lahendada?

Stipendium võimaldab katta nii laboratoorsete töövahendite kulu kui ka TÜ poolse juhendaja töötasu. Kuna mikrobioloogiline töö nõuab palju aega, vahepeal ajaliselt kindlaid vahemikke ja kogemusi, siis seega kulutab juhendaja arvestatava koguses aega nii selgitamiseks kui ka bakterite valmispanemiseks. Noore uurija toetus aitaks palju kaasa uurimistöö valmimisele.