



ВЫДЕЛЕНИЕ ДЕГАЛОГЕНАЗ ПЕРФТОРКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS PLECOGLOSSICIDA* 2,4-Д И *PSEUDOMONAS MOSSELLII* 5(3)

Стариков С.Н.*, Худайгулов Г.Г.,
Четвериков С.П.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия
*E-mail: senik0406@gmail.com

ISOLATION OF PERFLUOROCARBOXYLIC ACID DEHALOGENASES FROM *PSEUDOMONAS* *PLECOGLOSSICIDA* 2,4-D AND *PSEUDOMONAS MOSSELLII* 5(3)

Starikov S.N.*, Hkudaygulov G.G.,
Chetverikov S.P.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
*E-mail: senik0406@gmail.com

Целью работы стало выделение и изучение ферментов, участвующих в биодegradации перфторкарбоновых кислот (ПФКК) у штаммов *Pseudomonas plecoglossicida* 2,4-Д и *Pseudomonas mosselii* 5(3). В исследовании ферменты этих штаммов были сконцентрированы из культуральной жидкости методами ультрафильтрации и осаждения сульфатом аммония, а затем очищены эксклюзионной хроматографией. При этом активность ферментов после ультрафильтрации была выше.

Ферменты штамма 2,4-Д за 24 часа высвобождали 2 ppm фторидов, через 48 часов — 40,7 ppm. У штамма 5(3) значения составили 3 ppm и 46 ppm соответственно, что подтверждает активность выделенных дегалогеназ и их способность к биодegradации ПФКК. Эксклюзионная хроматография показала, что молекулярная масса ферментов штамма 5(3) составляет 80 кДа, а штамма 2,4-Д — 76 кДа.

Изучение ферментов имеет не только прикладное значение для разработки технологий очистки окружающей среды, а также фундаментальный смысл. Знание молекулярной структуры и механизмов действия дегалогеназ не только позволяет понять, как эти ферменты разрывают стойкие С-Ф связи, но и проливает свет на эволюцию ферментов в целом.

Ключевые слова: дегалогеназы ♦ дефторирование ♦ биоремедиация ♦ перфторированные соединения

Поступила в редакцию: 28.10.2024

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-3-204-210](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-3-204-210)

EDN: YJOGWQ

ВВЕДЕНИЕ

Перфторкарбоновые кислоты (ПФКК) представляют собой класс органических веществ, широко применяемых в промышленности и повседневной жизни благодаря уникальной химической стойкости, устойчивости к высоким температурам и водоотталкивающим свойствам [Crawford et al., 2022; Shojaei et al., 2022; Baduel et al., 2017]. Эти характеристики делают их крайне трудноразлагаемыми в природных условиях, что привело к значительному загрязнению окружающей среды, включая воду и почву

The aim of this study was to isolate and investigate enzymes involved in the biodegradation of perfluorocarboxylic acids (PFCAs) in *Pseudomonas plecoglossicida* strain 2,4-D and *Pseudomonas mosselii* strain 5(3). In this research, enzymes from these strains were concentrated from the culture medium by ultrafiltration and ammonium sulfate precipitation, followed by purification through size-exclusion chromatography. The enzyme activity after ultrafiltration was higher

Enzymes from strain 2,4-D released 2 ppm of fluoride ions after 24 hours, increasing to 40,7 ppm after 48 hours. For strain 5(3), fluoride release reached 3 ppm at 24 hours and 46 ppm at 48 hours, confirming the activity of the isolated dehalogenases and their ability to degrade PFCAs. Size-exclusion chromatography revealed that the molecular weight of enzymes from strain 5(3) is approximately 80 kDa, while for strain 2,4-D, it is 76 kDa.

The study of these enzymes holds both applied significance for environmental remediation technology development and fundamental importance. Understanding the molecular structure and mechanisms of dehalogenase activity not only provides insights into the cleavage of robust C-F bonds but also sheds light on enzyme evolution as a whole.

Keywords: dehalogenases ♦ defluorination ♦ bioremediation ♦ perfluorinated compounds

Принято в печать: 01.11.2024



[Kourtchev et al., 2022, Sörengård et al., 2022a, Beale et al., 2022]. Воздействие ПФКК на здоровье человека и экосистемы вызывает серьёзные опасения, так как они способны накапливаться в организмах и оказывать токсическое воздействие на различные биологические системы. [Sunderland et al., 2019; Death et al., 2021; Bolan et al., 2021; Olsen et al., 2017].

Актуальные подходы к ремедиации загрязнённых ПФКК сред включают в себя физико-химические методы и химические методы. Основными способами являются адсорбция на активированном угле, использование ионообменных смол, мембранные технологии и химическое окисление [Liu et al., 2022; Shu et al., 2023; Zhang DQ, 2019]. Однако эти методы зачастую связаны с высокими затратами и проблемами утилизации отходов. В последние годы внимание исследователей всё чаще привлекает биоремедиация с использованием микроорганизмов, которые могут применяться как самостоятельное средство очистки, так и в комбинации с другими методами [Zhou et al., 2024].

Несмотря на то, что доказано, что ряд микроорганизмов способен к деструкции этих соединений биодегградация ПФКК остаётся недостаточно изученной [Chetverikov et al., 2017; Huang et al., 2019; Biswas et al., 2024; Smorada et al., 2024]. В этом процессе ключевую роль играют ферменты дегалогеназы, которые катализируют удаление галогенов из органических соединений, способствуя разрушению стойких химических связей, характерных для ПФКК [Smorada et al., 2024].

Объектами исследования служили штаммы *Pseudomonas plecoglossicida* 2,4-Д и *Pseudomonas mosselii* 5(3). Ранее было показано, что оба штамма обладают способностью к дефторированию ПФКК с высвобождением свободного фтора [Chetverikov et al., 2017; Chetverikov et al., 2022].

Для лучшего понимания механизмов биодегградации ПФКК и изучения специфики действия дегалогеназ требуется их выделение и очистка из культур микроорганизмов. В связи с этим целью данной работы стало получение чистых образцов дегалогеназ для дальнейшего исследования их характеристик. Такой подход не только позволит глубже изучить процесс разрыва С-F связей, но и поспособствует разработке более эффективных методов для очистки окружающей среды от стойких загрязнителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы культивировались при температуре 28 °С на жидкой минеральной среде Раймонда, содержащей (на 1 литр дистиллированной воды): NH_4NO_3 – 2,0 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г, KH_2PO_4 – 2,0 г, Na_2HPO_4 – 3,0 г, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г, Na_2CO_3 – 0,1 г [Raymond, 1961]. В качестве единственного источника углерода и энергии в среду добавляли 100 мг/л перфтороктансульфоновой кислоты (C_8) и перфторнонановой кислоты (C_9). Культивирование проводилось в ферментере ФА-10 (Проинтех, Россия) объёмом 8 литров в течении трех суток.

Ультразвук применялся к биомассе клеток с помощью сонотрода, погруженного в воду примерно на 10 см на 1 мин (Techpan, Ultrasonic disintegrator type UD-20, Польша) с мощностью 180 Вт.

Культуральная жидкость была отцентрифугирована и очищена методом микрофльтрации через фильтр Sartobran P с размером пор 0.2 мкм. Далее высокомолекулярные компоненты одной половины культуральной жидкости (4 л) были

сконцентрированы с помощью кассеты Pellicon XL 50 Ultracel-5 (мембрана 5 кДа, Biomaх, США) до объема 100 мл при температуре 4 °С, вторая половина культуральной жидкости подвергалась осаждению белков путем добавления сульфата аммония до конечной степени насыщения 80%. После добавления сульфата аммония образцы перемешивали на льду в течение 60 минут. Затем образцы переносили в пробирки и центрифугировали (8000 об/м, 10 минут). Полученный супернатант отделяли, а осадок белка растворяли в К-фосфатном буфере (2,5 мл; 50 мМ; рН 7,0).

Фракции белка были получены с помощью эксклюзионной хроматографии на системе ВЭЖХ LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония), с использованием колонки TSK-gel G3000 SW (300 мм × 7,8 мм, 5 мкм, Tosoh, Япония) при скорости потока 1 мл/мин и объеме вводимой пробы 100 мкл. В качестве элюента использовался 100 мМ калийный фосфатный буфер, рН 7,0, содержащий 1 мМ ЭДТА. Элюированный белок обнаруживался при 280 нм, фракции собирались с интервалом 30 секунд, после промывки в 30 минут в одни и те же пробирки с соответствующим временем выхода. Оценку молекулярной массы проводили с использованием калибровочной кривой, построенной на основе стандартных растворов белков с молекулярными массами в диапазоне от 5,8 кДа до 200 кДа

Для оценки дегалогеназной активности во фракции добавляли C_8 и C_9 до конечной концентрации 100 мг/л и инкубировали при 28 °С, затем пробы анализировали с использованием системы ВЭЖХ LC-20 Prominence с кондуктометрическим детектором CDD-10Avp (Shimadzu, Япония). Ионы разделяли на колонке IC SI-90 4E (4 мм × 250 мм, 9 мкм, Shodex, США) с предколонкой IC SI-90G (4,6 мм × 10 мм, 9 мкм, Shodex, США) при скорости потока 1 мл/мин. В качестве элюента использовался раствор 1,8 мМ Na_2CO_3 и 1,7 мМ $NaHCO_3$. Для подавления фонового сигнала применялся супрессор Xenoic® XAMS ASUREX-A100 (Diduco AB, Умео, Швеция). Концентрацию фторид-ионов определяли с использованием калибровочной кривой, построенной на основе стандартных растворов с концентрациями фторидов в диапазоне от 1 до 100 ppm.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе экспериментов была оценена активность дегалогеназ в неочищенном виде путем сравнения активности культуральной жидкости и биомассы клеток после их разрушения ультразвуком. Результаты показали, что ферментативная активность наблюдалась исключительно в культуральной жидкости, тогда как в разрушенных клетках она отсутствовала. Этот результат указывает на то, что активные ферменты либо секретируются в среду, либо, возможно, неэффективно высвобождаются из разрушенной биомассы. На момент написания статьи сообщения о локализации дегалогеназ ПФКК нам неизвестны.

На втором этапе белки из культуральной жидкости концентрировали двумя методами: осаждением сульфатом аммония и ультрафильтрацией. Сравнение этих методов показало, что ультрафильтрация лучше сохраняла активность дегалогеназ по сравнению с осаждением.

Полученные результаты согласуются с данными предыдущих исследований, демонстрирующих способность некоторых микроорганизмов разлагать ПФКК с выделением ионов фтора [Шарипов et al., 2023; Park et al., 2023; Huang et al., 2019]. В нашем

исследовании концентрация ионов F^- в самой активной фракции достигла 2 ppm через 24 часа и 40,7 ppm через 48 часов для штамма *P. plecoglossicida* 2,4-Д (рис 1в), а для штамма *P. mosselii* 5(3) — 3 ppm через 24 часа и 46 ppm через 48 часов (рис 1з), тогда как в контроле, куда не были добавлены ферменты, в течении срока инкубирования фторидов не было обнаружено (рис 1а). Рост концентрации ионов F^- служит ключевым показателем процесса дефторирования и подтверждением биodeградации ПФКК [Smorada et al., 2024].

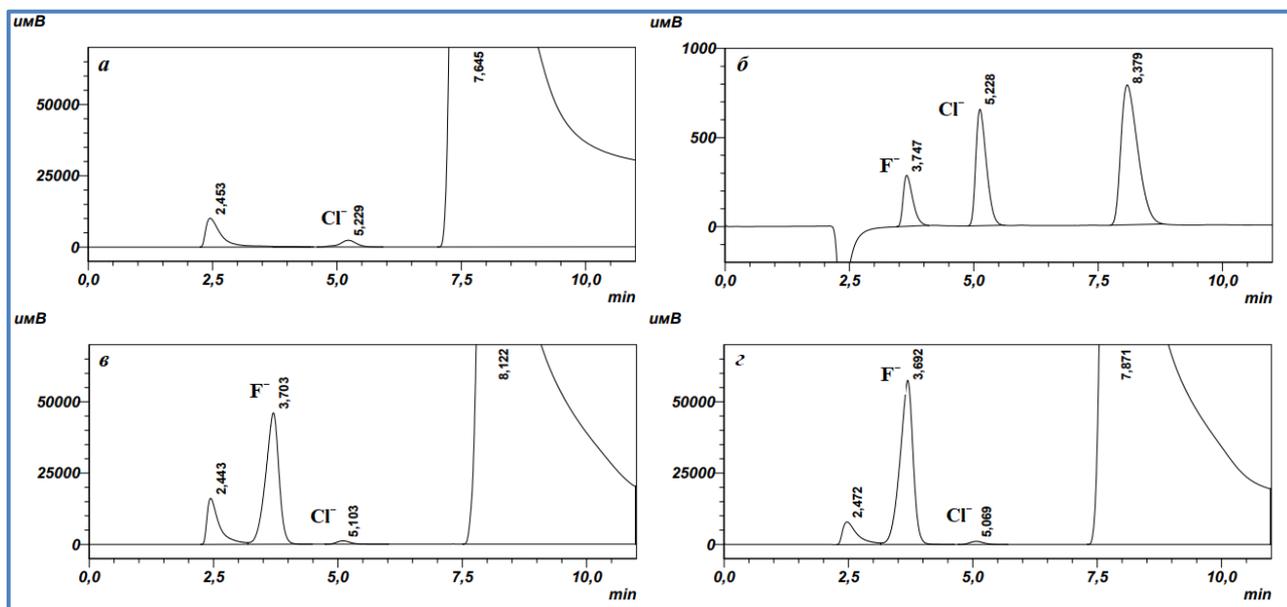


Рис. 1. Хроматограммы контрольного образца (а), стандартов 1ppm (б), и дегалогеназ штаммов 2,4 Д (в) и 5(3) (г) после 48 часов инкубации.

Эксклюзионная хроматография очищенных дегалогеназ штамма 2,4-Д показала, что время выхода основного пика фракции соответствует белку с молекулярной массой 76 кДа (рис 2а), что согласуется с предполагаемыми размерами некоторых дегалогеназ. Например, исследование Jaffé P.R. и соавторов показало, что ген, кодирующий гомолог восстановительной дегалогеназы (RdhA), имеет молекулярную массу около 72 кДа (по данным аминокислотной последовательности в NCBI) и связан с производством фторидов и удалением перфторированной кислоты (PFAA) в анаэробных условиях. Нокаут этого гена подтвердил, что RdhA играет ключевую роль в дефторировании PFAA у *Acidimicrobium sp.* А6 [Jaffé et al., 2024]. В свою очередь Молекулярная масса дегалогеназы штамма 5(3) составила 80 кДа, (рис 2б) что указывает на различия в структуре и, возможно, механизмах действия ферментов.

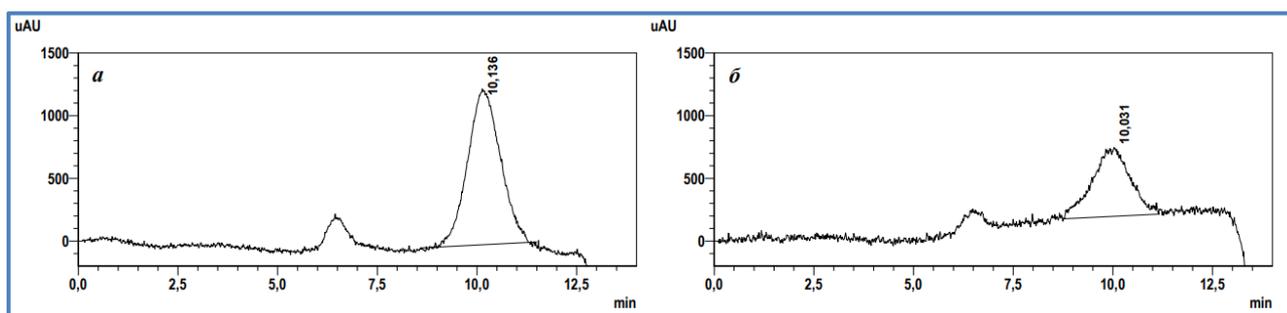


Рис. 2. Хроматограммы очищенных дегалогеназ штаммов 2,4-Д (а) и 5(3) (б) с временем выхода, соответствующим молекулярным массам 76 кДа и 80 кДа

Другие исследования, такие как исследование Harris JD и соавторов, показали, что аэробная бактерия *Delftia acidovorans*, обнаруженная в почвах, загрязненных ПФАС, способна расти, используя перфтороктановую кислоту (PFOA) как единственный источник углерода. Исследователи сконструировали вектор с генами дегалогеназ DeHa 1 и DeHa 2 этой бактерии для экспрессии в *Escherichia coli* и при добавлении PFOA (100 ppm) наблюдалось высвобождение фторидов [Harris et al., 2022]. Молекулярная масса DeHa 1 и DeHa 2 составляла 29,8 и 29,3 кДа соответственно (по данным аминокислотных последовательностей из NCBI), что может свидетельствовать о значительных различиях в структуре и функциях ферментов у различных микроорганизмов.

Для дальнейших исследований важно детально изучить механизмы действия ферментов, ответственных за дефторирование, и выявить структурные элементы, определяющие их активность. Кроме того, перспективным направлением для будущих исследований является изучение влияния различных факторов, таких как температура, pH среды и присутствие дополнительных субстратов, на активность дегалогеназ.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-00154). Использовалось оборудование ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шарипов Д. А., Худайгулов Г. Г., Стариков С. Н., Четвериков С.П. Дефторирование микроорганизмами новых фторорганических поллютантов // Естественные и Технические Науки. 2023. No. 9 (184). P. 10–13. DOI: [10.25633/ETN.2023.09.01](https://doi.org/10.25633/ETN.2023.09.01)
2. Baduel C., Mueller J. F., Rotander A. et al. Discovery of novel per-and polyfluoroalkyl substances (PFASs) at a firefighting training ground and preliminary investigation of their fate and mobility // Chemosphere. 2017. V. 185. P. 1030–1038. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2017.06.096](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.096)
3. Beale D. J., Sinclair G. M., Shah R. et al. A review of omics-based PFAS exposure studies reveals common biochemical response pathways // Science of the Total Environment. 2022. V. 845. 157255. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.157255](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157255)
4. Biswas S., Wang X., Wong B. M. Advanced experimental and computational approaches for advanced reduction of per-and polyfluoroalkyl substances // Current Opinion in Chemical Engineering. 2024. V. 44. 101017. DOI: [10.26434/chemrxiv-2024-fxq8c](https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2024-fxq8c)
5. Bolan N., Sarkar B., Vithanage M. et al. Distribution, behaviour, bioavailability and remediation of poly-and per-fluoroalkyl substances (PFAS) in solid biowastes and biowaste-treated soil // Environment International. 2021. V. 155. 106600. DOI: [10.1016/j.envint.2021.106600](https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106600)
6. Четвериков С. П., Шарипов Д. А., Коршунова Т. Ю. et al. Degradation of perfluorooctanyl sulfonate by strain *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D // Applied Biochemistry and Microbiology. 2017. V. 53 (5). P. 533–538. DOI: [10.1134/S0003683817050027](https://doi.org/10.1134/S0003683817050027)
7. Четвериков С., Хкудайгулов Г., Шарипов Д. et al. Biodegradation Potential of C7-C10 Perfluorocarboxylic Acids and Data from the Genome of a New Strain of *Pseudomonas mosselii* 5(3) // Toxics. 2023. V. 11 (12). 1001. DOI: [10.3390/toxics11121001](https://doi.org/10.3390/toxics11121001)
8. Crawford K. A., Doherty B. T., Gilbert-Diamond D. et al. Waxing activity as a potential source of exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and other environmental

- contaminants among the US ski and snowboard community // *Environmental Research*. 2022. V. 215. 114335. DOI: [10.1016/j.envres.2022.114335](https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114335)
9. Death C., Bell C., Champness D. et al. Per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in livestock and game species: A review // *Science of The Total Environment*. 2021. V. 774. 144795. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.144795](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144795)
 10. Harris J. D., Coon C. M., Doherty M. E. et al. Engineering and characterization of dehalogenase enzymes from *Delftia acidovorans* in bioremediation of perfluorinated compounds // *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2022. V. 7 (2). P. 671–676. DOI: [10.1016/j.synbio.2022.02.005](https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.02.005)
 11. Huang S., Jaffé P. R. Defluorination of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) by *Acidimicrobium sp.* strain A6 // *Environmental Science & Technology*. 2019. V. 53 (19). P. 11410–11419. DOI: [10.1021/acs.est.9b04047](https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04047)
 12. Jaffé P. R., Huang S., Park J. et al. Defluorination of PFAS by *Acidimicrobium sp.* strain A6 and potential applications for remediation // *Methods in Enzymology*. 2024. V. 696. P. 287–320. DOI: [10.1016/bs.mie.2024.01.013](https://doi.org/10.1016/bs.mie.2024.01.013)
 13. Kourtchev I., Hellebust S., Heffernan E. et al. A new on-line SPE LC-HRMS method for the analysis of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in PM2.5 and its application for screening atmospheric particulates from Dublin and Enniscorthy, Ireland // *Science of the Total Environment*. 2022. V. 835. 155496. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.155496](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155496)
 14. Liu C., Zhao X., Faria A. F. et al. Evaluating the efficiency of nanofiltration and reverse osmosis membrane processes for the removal of per-and polyfluoroalkyl substances from water: A critical review // *Separation and Purification Technology*. 2022. V. 302. 122161. DOI: [10.1016/j.seppur.2022.122161](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.122161)
 15. Olsen G. W., Mair D. C., Lange C. C. et al. Per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in American Red Cross adult blood donors, 2000–2015 // *Environmental Research*. 2017. V. 157. P. 87–95. DOI: [10.1016/j.envres.2017.05.013](https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.05.013)
 16. Park J., Huang S., Koel B. E. et al. Enhanced Feammox activity and perfluorooctanoic acid (PFOA) degradation by *Acidimicrobium sp.* Strain A6 using PAA-coated ferrihydrite as an electron acceptor // *Journal of Hazardous Materials*. 2023. V. 459. P. 132039. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2023.132039](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132039)
 17. Raymond R. L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Development Industrial Microbiology*. 1961. V. 2 (1). P. 23–32.
 18. Shojaei M., Kumar N., Guelfo J. L. An integrated approach for determination of total per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) // *Environmental Science & Technology*. 2022. V. 56 (20). P. 14517–14527. DOI: [10.1021/acs.est.2c05143](https://doi.org/10.1021/acs.est.2c05143)
 19. Shu X., Pulicharla R., Kumar P., Brar SK. Comparison between Chemical and Biological Degradation Processes for Perfluorooctanoic Acid // *Soil Systems*. 2023. V. 7 (4). P. 91. DOI: [10.3390/soilsystems7040091](https://doi.org/10.3390/soilsystems7040091)
 20. Smorada C. M., Sima M. W., Jaffé P. R. Bacterial degradation of perfluoroalkyl acids // *Current Opinion in Biotechnology*. 2024. V. 88. P. 103170. DOI: [10.1016/j.copbio.2024.103170](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2024.103170)
 21. Söregård M., Kikuchi J., Wiberg K., Ahrens L. Spatial distribution and load of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in background soils in Sweden // *Chemosphere*. 2022. V. 295. 133944. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2022.133944](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133944)

22. Sunderland E. M., Hu X. C., Dassuncao C. et al. A review of the pathways of human exposure to poly-and perfluoroalkyl substances (PFASs) and present understanding of health effects // *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. 2019. V. 29 (2). P. 131–147. DOI: [10.1038/s41370-018-0094-1](https://doi.org/10.1038/s41370-018-0094-1)
23. Wang J. B., Ilie A., Yuan S. et al. Investigating substrate scope and enantioselectivity of a defluorinase by a stereochemical probe // *Journal of the American Chemical Society*. 2017. V. 139 (32). P. 11241–11247. DOI: [10.1021/jacs.7b06019](https://doi.org/10.1021/jacs.7b06019)
24. Zhang D. Q., Zhang W. L., Liang Y. N. Adsorption of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) from aqueous solution - A review // *Science of the Total Environment*. 2019. V. 694. 133606. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.133606](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133606)
25. Zhou T., Li X., Liu H. et al. Occurrence, fate, and remediation for per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in sewage sludge: A comprehensive review // *Journal of Hazardous Materials*. 2024. V. 466. 133637. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2024.133637](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133637)

Цитировать как

Стариков С.Н., Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П. Выделение дегалогеназ перфторкарбоновых кислот штаммов *Pseudomonas plecoglossicida* 2,4 Д и *Pseudomonas mosselii* 5(3) // *Экобиотех*, 2024, Т. 7 № 3. С. 204-210. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-3-204-210](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-3-204-210) EDN: YJOGWQ

Cited as

Starikov S.N., Hkudaygulov G.G., Chetverikov S.P. Isolation of Perfluorocarboxylic Acid dehalogenases from *Pseudomonas plecoglossicida* 2,4-D and *Pseudomonas mosselii* 5(3). *Ekobioteh*. 2024, V. 7 (3). P. 204-210. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-3-204-210](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-3-204-210) EDN: YJOGWQ (In Rus.)