

## НОВЫЙ ШТАММ *ENSIFER ADHAERENS* M1 СПОСОБЕН К ТРАНСФОРМАЦИИ ПЕРФТОРКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

© 2019 г. С. П. Четвериков<sup>a</sup>, \*, О. Н. Логинов<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра  
Российской академии наук, Уфа, Россия

\*e-mail: che-kov@mail.ru

Поступила в редакцию 24.04.2018 г.

После доработки 05.06.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

DOI: 10.1134/S0026365618060083

Перфторкарбонные кислоты внесены в Приложение В Стокгольмской конвенции по стойким органическим загрязняющим веществам, что предусматривает принятие мер по минимизации и, по возможности, прекращению их производства и использования, с последующим уничтожением (Report..., 2009). Основные значимые представители этого класса соединений – перфтороктановая кислота (ПФОК) и перфтороктансульфонат (ПФОС) – это высокостабильные синтетические химические соединения, широко используемые в производстве фторполимеров, пестицидов и, вследствие их поверхностно-активных свойств, в качестве компонентов противопожарных пен. ПФОК и ПФОС крайне устойчивы к биоразложению и детектируются во многих объектах окружающей среды и живых организмах (Yamashita et al., 2005; Tao et al., 2006; Betts, 2007; Anderson et al., 2008). В настоящее время в литературе имеются лишь единичные сообщения об утилизации ПФОК и ПФОС бактериями рода *Pseudomonas* без раскрытия особенностей биодеструкции (Kwon et al., 2014; Yi et al., 2016), хотя представители других типов фторорганических соединений, такие как фторбензол, перфторбифенилы и пр. биодegradабельны (Carvalho et al., 2005; Hughes et al., 2011; Amorim et al., 2013).

В настоящей работе представлены результаты исследования физиолого-биохимических свойств и таксономического положения штамма *Ensifer adhaerens* M1, обладающего уникальной способностью к использованию ПФОК и ПФОС в качестве единственного источника углерода и энергии.

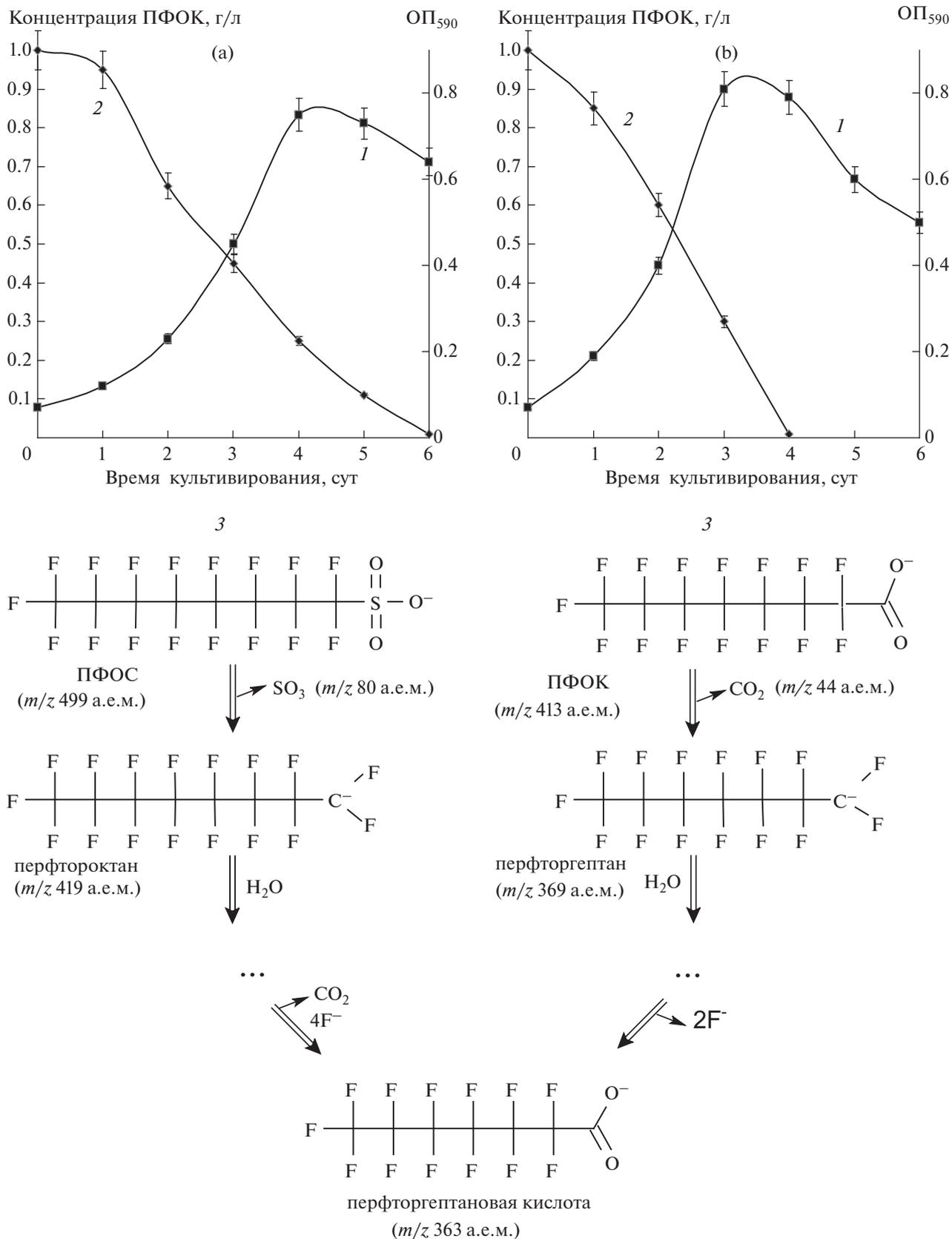
Штамм *E. adhaerens* M1 был выделен из почвы, отобранной с территории хранения и испытания средств тушения пожаров (Мальдивская Республика), методом накопительной культуры. При

выделении бактерий в качестве единственного источника углерода и энергии использовали ПФОС (1.0 г/л). Чистую культуру культивировали с использованием минеральной среды Раймонда (Raymond, 1961) с ПФОК или ПФОС (1.0 г/л) при 26°C и 160 об./мин. Рост штамма оценивали по оптической плотности (ОП<sub>590</sub>) клеточной суспензии на спектрофотометре СФ-56 (Россия).

Характеристику чистой культуры проводили по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам, используя общепринятые руководства (Методы ..., 1984, Определитель ..., 1997). Выделение и очистку ДНК, определение молярного % Г + Ц, амплификацию, секвенирование гена 16S рРНК, филогенетический анализ осуществляли общепринятыми методами. Определенная для штамма *E. adhaerens* M1 последовательность фрагмента гена длиной 1319 пар нуклеотидов депонирована в GenBank под номером MN141439.

Оценивали содержание ПФОК и ПФОС в среде и идентифицировали продукты их биотрансформации на жидкостном тандемном хромато-масс-спектрометре LCMS-IT-TOF (“Shimadzu”, Япония) в ЦКП “БиоАналит” УИБ УФИЦ РАН в ультрафильтрах (≤3 кДа) культуральных жидкостей (КЖ). Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме на колонке Shim-pak XR-ODS (75 × 2.0 мм) (“Shimadzu”, Япония) при соотношении растворителей 5 мМ ацетат аммония в воде–ацетонитрил = 56 : 44; скорость элюирования 0.2 мл/мин. Концентрацию фторид-иона в среде измеряли при помощи фторид-селективного электрода ЭЛИС-131F (Россия).

Клетки штамма M1 – грамотрицательные подвижные палочки размером 0.7–1.0 × 1.0–2.0 мкм;



**Рис. 1.** Динамика роста (1) штамма *Ensifer adhaerens* M1 и изменения концентрации перфторкарбоновой кислоты (2) со схемой ее бактериальной деструкции (3) при культивировании в жидкой минеральной среде: а – с ПФОС; б – с ПФОК.

имеют пучок жгутиков, неспорообразующие. На МПА колонии бело-кремовые, круглые, выпуклые, прозрачные, слизистые, диаметром 2–3 мм. Метаболизм дыхательный. Штамм М1 – каталазо- и оксидазоположительный, восстанавливал нитрат и нитрит, не гидролизировал казеин, крахмал. Культура росла при температуре 10–37°C (оптимум 26–28°C), рН 6.0–8.0 и концентрации NaCl до 2%.

Культура использовала в качестве единственного источника углерода D-глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, маннит, сорбит, D-арабинозу, D-ксилозу, D-маннозу, D-галактозу, D-рамнозу, сукцинат, малат, цитрат, 2-кетоглюконат, L-аланин, L-аспарагин, L-глутамин, L-глутаминовую кислоту.

Филогенетически выявлена принадлежность штамма М1 к виду *Ensifer adhaerens*, уровень сходства гена 16S рНК с типовым штаммом *E. adhaerens* LMG 20216 составил 99.85%. Содержание Г + Ц в ДНК 62.2 мол. % – типичное для бактерий данного вида.

Штамм М1 активно рос на минеральных средах, содержащих в качестве единственного источника углерода перфторкарбоновые кислоты (рисунок 1), достигая максимального показателя оптической плотности КЖ через 4 сут при культивировании на ПФОС с его полной трансформацией за 6 сут и через 3 сут выращивания на ПФОК с его разложением за 4 сут. Конверсия перфторированных субстратов сопровождалась выходом в среду свободных ионов фтора, а начало высвобождения коррелировало с началом линейного снижения их концентрации в среде.

При хроматографическом анализе с масс-спектрометрией в исходной культуральной жидкости (КЖ) наблюдали диссоциированные кислотные ионы ПФОС и ПФОК (молекулярные ионы с отношением  $m/z$  499 а.е.м. и 413 а.е.м. соответственно) характерные для анионных перфторсоединений. Через 1 сут в варианте с ПФОС детектировали наличие компонента, молекулярному иону которого соответствует  $m/z$  419 а.е.м., что возможно в результате прохождения процесса монооксигеназного удаления из ПФОС сульфатной группы ( $m/z$  80 а.е.м.) в виде сульфита, который способен метаболизироваться в условиях голодания. Вероятно, с этим связана более низкая скорость роста на этом субстрате. Через 3 сут культивирования помимо компонентов с  $m/z$  499 и 419 а.е.м. в ультрафильтрате обнаруживалось соединение, молекулярный ион которого имел соотношение  $m/z$  363 а.е.м., отсутствовавшее первоначально в среде. В последующие сутки концентрация этого компо-

нента в КЖ увеличивалась, а соединения с  $m/z$  499 и 419 а.е.м. через 6 сут культивирования в среде не детектировались. Соединение с отношением  $m/z$ , равным 363 а.е.м., по масс-спектрам MS<sup>1</sup> и MS<sup>2</sup> идентифицировали как перфторгептановую кислоту с характерным прекурсор-ионом ( $m/z$  363 а.е.м.) в масс-спектре MS<sup>1</sup>, фрагментирующемся с образованием продукт-иона с  $m/z$  319 а.е.м. в масс-спектре MS<sup>2</sup>.

В варианте же с ПФОК через 1 сут обнаружилось соединение, молекулярному иону которого соответствует  $m/z$  369 а.е.м., что возможно в результате реакции элиминирования диоксида углерода ( $m/z$  44 а.е.м.) из карбоксильной группы. В дальнейшем обнаруженное соединение полностью было трансформировано также в перфторгептановую кислоту.

Таким образом, в результате работы выделен и идентифицирован штамм *Ensifer adhaerens* М1, обладающий уникальной способностью использовать перфторкарбоновые кислоты, в частности, ПФОК и ПФОС, в качестве единственного источника углерода и энергии с образованием такого метаболита деградации, как перфторгептановая кислота, выделяя в среду свободные фторид-ионы, являющиеся индикатором частичной минерализации, и, возможно, оказывающие ингибирующий эффект на дальнейшую деструкцию промежуточных фторированных соединений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Методы общей бактериологии. В 3 т. Под ред. Герхардт Ф.М.: Мир, 1984. Т. 1–3.
- Определитель бактерий Берджи. Под ред. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уильямс С. М.: Мир, 1997. Т. 1, 2.
- Amorim C.L., Carvalho M.F., Afonso C.M.M., Castro P.M.L. Biodegradation of fluoroanilines by the wild strain *Labrys portucalensis* // Int. Biodeter. Biodegr. 2013. V. 80. P. 10–15.
- Anderson M.E., Butenhof J.L., Chang S. Perfluoroalkyl acids and related chemistries – toxicokinetics and modes of action // Toxicol. Sci. 2008. V. 102. P. 3–14.
- Betts K. PFOS and PFOA in humans: new study links prenatal exposure to lower birth weight // Environ. Health Perspectives. 2007. V. 115. P. 550.
- Carvalho M.F., Ferreira J.R., Pacheco C.C., De Marco P., Castro P.M.L. Isolation and properties of a pure bacterial strain capable of fluorobenzene degradation as sole carbon and energy source // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. P. 294–298.
- Hughes D., Clark B.R., Murphy C.D. Biodegradation of polyfluorinated biphenyl in bacteria // Biodegradation. 2011. V. 22. P. 741–749.
- Kwon B.G., Lim H.J., Na S.H., Choi B.I., Shin D.S., Chung S.Y. Biodegradation of perfluorooctanesulfonate (PFOS) as an emerging contaminant // Chemosphere. 2014. V. 109. P. 221–225.

*Raymond R.L.* Microbial oxidation of *n*-paraffinic hydrocarbons // *Develop. Industr. Microbiol.* 1961. V. 2. P. 23–32.

Report of the Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants on the work of its fourth meeting, 4–8 May 2009 // *UNEP/POPS/COP.4/38*. Geneva: Stockholm Convention Secretariat, 2009. P. 66–69.

*Tao L., Kannan K., Kajiwara N., Costa M., Fillmann G., Takahashi S., Tanabe S.* Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in albatrosses, elephant seals, pen-

guins, and polar skuas from the Southern Ocean // *Environ. Science Technol.* 2006. V. 40. P. 7642–7648.

*Yamashita N., Kannan K., Taniyasu S., Horii Yu., Petrick G., Gamo T.* A global survey of perfluorinated acids in oceans // *Marine Pollut. Bull.* 2005. V. 51. P. 658–668.

*Yi L.B., Chai L.Y., Xie Y., Peng Q.J., Peng Q.Z.* Isolation, identification, and degradation performance of a PFOA-degrading strain // *Genet. Mol. Res.* 2016. V. 15. doi 10.4238/gmr.15028043