

**Деструкция перфторкарбоновых кислот бактериями рода *Pseudomonas* подтверждена данными об их геномах и метаболитах**

С.П. Четвериков\*, Г.Г. Худайгулов, Д.А. Шарипов, С.Н. Стариков  
Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация,  
\*Эл. почта: che-kov@mail.ru

Статья поступила в редакцию 28.10.2024; принята к печати 25.11.2024

Изучен потенциал штаммов *Pseudomonas* sp. 2,4-D и *P. mosselii* 5(3) (UIB-53 и UIB-251 из коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН), выделенных из загрязненных пестицидами и галогенорганическими соединениями почв, в качестве деструкторов перфторкарбоновых кислот (ПФКК) и выполнен анализ полных геномов этих штаммов. Геномы длиной 5,68 и 5,86 млн. пар нуклеотидов у штаммов 5(3) и 2,4-D соответственно содержат гены белков, потенциально участвующих в деструкции (дегалогенировании) фторорганических соединений: галоалкандегалогеназы (*dhaA*), галоацетатдегалогеназы H-1 (*dehH1*), переносчика ионов фтора (*CrcB*) и алкансульфонатмонооксигеназы (*SsuE*). Штаммы за 7 суток культивирования в жидкой среде с различными (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>)-ПФКК в качестве единственного источника углерода и энергии полностью их утилизировали. Результаты анализа с помощью ЖХ-МС показали, что разложение ПФКК доходит до перфторгексановой кислоты с высвобождением, при различных стехиометрических соотношениях в зависимости от ПФКК, индикаторов минерализации ионов фтора, определяемых хроматографией с кондуктометрическим детектированием. Таким образом показано, что изученные штаммы бактерий рода *Pseudomonas* имеют большой генетически подтвержденный потенциал деструкции ПФКК.

**Ключевые слова:** перфторкарбоновые кислоты, деградация, *Pseudomonas*, геном

**Decomposition of perfluorocarbonic acids by *Pseudomonas* bacteria is confirmed by data on their genomes and metabolites**

S.P. Chetverikov,\* G.G. Khudaygulov, D.A. Sharipov, S.N. Starikov  
Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, the Russian Federation  
\*Email: che-kov@mail.ru

*Pseudomonas* strains 2,4-D and *P. mosselii* 5(3) designated as UIB-53 and UIB-251 in the Ufa Institute of Biology (UIB) Collection of Microorganisms were isolated from soils contaminated with pesticides and halogen-containing organic compounds and were evaluated for their potential ability to degrade perfluoroorganic acids (PFOA). Whole genome sequencing of their DNA (5.68 and 5.86 bp for 5(3) and 2,4-D strains respectively) showed the presence of genes whose products may be implicated in degradation (dehalogenation) of fluoroorganic compounds: haloalkane dehalogenase (*dhaA*), H-1 haloacetate dehalogenase (*dehH1*), fluorine ion transporter (*CrcB*), and alkanesulfonate monooxygenase (*SsuE*). After 7 days of cultivation in a liquid medium containing different C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub> PFOA species as the sole carbon and energy sources, the strains utilized them completely. LC-MS results suggest that PFOA decomposition leads to perfluorohexanoic acid formation associated with the generation, at different stoichiometric ratios depending on PFOA species, of indicators of fluorine ion mineralization, which were detected using chromatography with conductometric detection. The results suggest that the *Pseudomonas* strains studied possess potentially high potential for PFOA decomposition, which is confirmed by genomics data.

**Keywords:** perfluorocarbonic acids, decomposition, *Pseudomonas*, genome

**Введение**

Перфторкарбоновые кислоты (ПФКК) подвергаются строгому регулированию со стороны международных надзорных органов по причине высокой подвижности, способности к биоаккумуляции, и стойкости, включая биостойкость, основанной на силе взаимодействия углерода и фтора в самой прочной связи, известной в органической химии [1]. Выявление этих свойств, характеризующих токсичность ПФКК по отношению к живой природе, привело к их включению в Приложение В Стокгольмской конвенции по стойким органическим загрязняющим веществам<sup>1</sup>.

Основные представители этого класса соединений – перфтороктановая кислота (ПФОК) и перфтороктансульфонат (ПФОС) – это синтетические химические соединения с высокой стабильностью, широко используемые в производстве фторполимеров для антипригарных поверхностей, пестицидов, защитных средств для тканей, упаковки пищевых продуктов, гальванических покрытий и, в силу их поверхностной активности, в качестве компонентов противопожарных пен [2-7], в результате чего ПФКК распространены повсеместно в окружающей среде по всей планете, перемещаясь через почву и водные системы [8, 9]. Токсикологические воздействия ПФКК на человека включают канцерогенные эффекты, нарушения функций иммунной системы и работы печени, влияние на рост, развитие и репродукцию [10, 11].

<sup>1</sup> 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 // UNEP/POPS/COP.4/38. Geneva: Stockholm Convention Secretariat, 2009. P. 66–69

Поэтому разработка способов разложения ПФКК является актуальной задачей. Известны способы разложения ПФОС химической обработкой, сжиганием при высокой температуре, ультразвуком, но они дорогостоящие и малоэффективные [12-15]. Биodeградация ПФКК затруднена их необычными химическими свойствами, а именно сложностью строения и большими размерами молекул, поглощение которых бактериями требует участия специализированных активных путей транспорта. Ранее считалось, что у микроорганизмов не было времени эволюционировать к способности разлагать ПФКК (особенно при сравнении с дегалогенированием полихлорированных молекул [16]) благодаря возникновению ферментативных систем, воздействующих на них. Это связывалось с недостатком природных аналогов ПФКК, которые стимулировали бы эволюцию необходимых катаболических ферментов [17]. Но в последнее время было показано, что дефторирование ПФКК все же возможно. И происходит оно преимущественно, когда микроорганизмы атакуют углеродные ковалентные связи (например, C-S, C-O), не содержащие фториды, как показано при биodeградации ПФОК и ПФОС в аэробных [18, 19] и анаэробных [20-22] условиях. В некоторых работах показана деструкция ПФОС и (или) ПФОК, не подтверждаемая выделением ионов фтора. Это позволяет предполагать, что в результате этих процессов предпочтительно образуются минорные полифторированные соединения [23-26]. Эффективное расщепление связей C-F уже давно признано критически узким местом в биodeградации фторорганических соединений, включая ПФКК [27]. Удаление фторида устраняет влияние этого гетероатома на химическую стабильность органической молекулы, являющуюся прямым результатом его крайней электроотрицательности, а также повышает вероятность того, что образующиеся метаболиты будут разлагаться легче [28].

Как правило, в качестве бактерий-деструкторов в исследованиях фигурируют представители рода *Pseudomonas*. Псевдомонады разлагают различные ксенобиотики, используя их в качестве единственного источника углерода и энергии. Охарактеризованы геномы штаммов *Pseudomonas*, принадлежащих к разным видам, например, *P. protegens* (штамм Pf-5), *P. fluorescens* (штаммы Pf-01, SBW25), *P. azelaica* (штаммы HBP1, Agamco J), *P. putida* (штамм L48), *P. mendocina* (штамм YMP) и др. Размер геномов *Pseudomonas* составляет около 6 Мб [29], и многие гены участвуют в катаболизме различных молекул-источников углерода для адаптации к существованию в определенной экологической нише.

Но на сегодняшний день имеется мало информации о бактериальных штаммах, у которых были бы обнаружены и описаны гены, кодирующие ферменты, расщепляющие ПФКК. Исключение составляют штаммы *P. parafulva* YAB-1 и *Delftia acidovorans* D4B (род *Delftia* близок к роду *Pseudomonas*) – деструкторы с идентифицированными вероятными дегалогеназами галогенкислот и со фторацетатдегалогеназой, которые могут участвовать в деградации фторированных соединений [30, 31]. При этом известны лишь единичные штаммы бактерий, способные к трансформации перфторкарбоновых кислот. И они могут подвергаться биodeградации только ПФОК и ПФОС. Упоминания о них в контексте других ПФКК в литературе не найдены. Отмеченный выше штамм *P. parafulva* YAB-1 утилизирует 32,2% перфтороктановой кислоты при ее начальной концентрации 500 мг/л, а *P. aeruginosa* HJ4 способен разрушать ПФОС на 67% при концентрации, не превышающей 2 мг/л [23].

Внимание исследователей биodeградации ПФКК направлено в основном на соединения C<sub>8</sub>, но потенциал биоаккумуляции растет с увеличением длины углеродной цепи [32]. Также сообщалось, что ПФКК с короткой цепью более подвижны, водорастворимы и даже более стойки [33, 34], чем длинноцепочечные.

Следовательно, оценки биодеструкции не нужно ограничивать ПФОК и ПФОС; вероятно, список стойких фторсодержащих органических загрязнителей в Стокгольмской конвенции в будущем будет увеличен в связи с вновь открываемыми токсичными свойствами ПФКК. И, тогда как адаптация микроорганизмов к ПФОС и ПФОК уже представлена в публикациях, еще только предстоит оценить устойчивость микроорганизмов к промежуточным продуктам дефторирования и распада ПФКК, а также к выделяемым ионам фтора с одной стороны и к их высокомолекулярным предшественникам – с другой.

В настоящем исследовании проведено секвенирование геномов и изучены генетические особенности и деградационный потенциал штаммов псевдомонад 2,4-D и 5(3), выделенных из загрязненных пестицидами и галогенорганическими соединениями почв, по отношению к (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>)-ПФКК. Эти результаты могут быть применены в биотехнологиях реабилитации окружающей среды при загрязнении фторорганическими соединениями.

## Материалы и методы

### Бактериальные штаммы

Штамм 5(3) был выделен из почвы, загрязненной пестицидом, в Янаульском районе Республики Башкортостан. Пестицидное загрязнение представляло собой смесь, включающую фосфорсодержащий глифосат (действующее вещество (д. в.) – N-(фосфонометил)глицин), хлорсодержащий октапон (д. в. – 2-(2,4-дихлорфенокси)-уксусная кислота) и фторсодержащий флуорсулам (д. в. – N-(2,6-дифторфенил)-8-фтор-5-метокси-[1,2,4]триазоло[1,5-c]пиримидин-2-сульфонамид). Штамм 2,4-D выделен из почвы с территории предприятия производства галогенорганических соединений. Штаммы 2,4-D и 5(3) были выделены в результате обширного предварительного скрининга различных объектов и депонированы в Коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН под номерами UIB-53 и UIB-251 соответственно.

### *Химикаты и реагенты*

Перфторкарбоновые кислоты перфтордекановая кислота (ПФДК), перфторнонановая кислота (ПФНК), перфтороктановая кислота (ПФОК), перфторгептановая кислота (ПФГпК) и перфтороктансульфоновая кислота (ПФОС), все – высокой чистоты (> 98%), были приобретены у компании Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Ацетонитрил (качество для ВЭЖХ) был приобретен у компании Merck (Дармштадт, Германия). Все остальные реагенты имели квалификацию «ч. д. а.».

### *Секвенирование, сборка и аннотирование генома*

Геномную ДНК штаммов выделяли из биомассы фенол-хлороформным методом [35]. Секвенирование выполнено на оборудовании DNBSEQ-G50 (MGI, Китай), получены парноконцевые прочтения длиной 100 пар нуклеотидов (п.н.).

Контроль качества прочтений проведен методом HTQC (High-Throughput Quality Control) [38]. Низкокачественные ( $Q < 25$ ) и короткие ( $< 100$  п.н.) прочтения и адаптерные последовательности были удалены с использованием программы Trimomatic версии 0.39 [36]. Геномы были собраны с помощью программы SPAdes версии 3.15.4 [37]. Для исправления ошибок использовались программы Pilon версии 1.23 [38] и Bowtie2 версии 2.3.5.1 [39]. Чтобы подтвердить наличие собранного кольцевого репликона, мы проанализировали наличие перекрывающихся концов. Для идентификации штаммов использованы параметры средней нуклеотидной идентичности (ANI) (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani> [40]) и цифровой ДНК-ДНК гибридизации (DDH) (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php> [41]) с настройками по умолчанию.

Контиги короче 500 п.н. были удалены. Аннотирование выполнено с помощью программы Prokka версии 1.14.5 [42]. Анализ последовательностей целевых генов был выполнен с помощью сервиса BLAST NCBI [43], при использовании базы данных nt/nt и WGS.

Для построения минимального эволюционного дерева на основе полученных межгеномных расстояний использована программа FASTME 2.1.6.1 [44]. Дерево было укоренено по середине [45] и визуализировано с помощью <https://itol.embl.de/> (дата обращения 2 октября 2024 г.) [46]. Виды и подвиды были сгруппированы в соответствии с [47] и [48] соответственно. Для расчета средней нуклеотидной идентичности геномов (ANI) между штаммами и родственными штаммами использован алгоритм OrthoANI [49]

### *Среды и условия выращивания*

Штаммы выращивали на орбитальном шейкере-инкубаторе ES-20/60 (SIA BIOSAN, Рига, Латвия) при 180 об/мин и 28°C в жидкой минеральной среде Раймонда (граммы на литр дистиллированной воды):  $\text{NH}_4\text{NO}_3 - 2.0$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 2.0$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 3$ ,  $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0.01$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3 - 0.1$  [50], с ПФДК, либо ПФНК, либо ПФОК, либо ПФГпК, либо ПФОС (250 мг/л) в качестве единственного источника углерода и энергии.

Для получения инокулята штамм выращивали на минеральной среде Раймонда с добавлением пептона (1 г/л) в течение 24 ч. Биомассу осаждали и перед инокуляцией в экспериментальные колбы промывали стерильной дистиллированной водой. Полученный осадок ресуспендировали в минеральной среде и добавляли в экспериментальные колбы до достижения оптической плотности ( $\text{OD}_{600}$ ) 0.1.

Для получения отдельных колоний и оценки численности бактерий использовали среду LB [51], содержащей (на литр дистиллированной воды) 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl и 15 г агара (PanReac, Барселона, Испания),

Для оценки эффективности деградации ПФКК культивировали бактерии при 28°C в жидкой минеральной среде с индивидуальными (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>)-ПФКК в течение 7 суток. Все эксперименты проведены в трех независимых повторах.

### *Выделение и идентификация продуктов деградации ПФКК*

Содержание ПФКК в среде и идентификацию их метаболитов оценивали в Центре коллективного пользования оборудования АГИДЕЛ УФИЦ РАН на жидкостном тандемном хромато-масс-спектрометре LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Япония) в ультрафильтратах ( $\leq 3$  кДа) культуральных жидкостей, полученных на установке Vivaflow 50 (Sartorius AG, Геттинген, Германия) как описано [18].

Для хроматографического разделения применяли колонку Shim-pack XR-ODS (75 mm  $\times$  2.0 mm id, 2.2  $\mu\text{m}$ ) (Shimadzu, Киото, Япония), используя в качестве подвижной фазы 5 mM ацетата аммония в ацетонитриле (А) и 0,1% (об./об.) уксусную кислоту в воде (В). Элюирование в линейном градиенте проводили следующим образом: от 0 до 10 мин, 60%–30% В; от 10 до 20 мин, 30–60% В; скорость потока 0,25 мл/мин, объем вводимой пробы 5 мкл. Масс-спектры получали методом ионизации электрораспылением (ESI) в режиме отрицательных ионов со следующими параметрами: высоковольтный зонд – 3,5 кВ; поток распыляющего газа 1,5 л/мин; температура CDL 200°C; температура термоблока 50°C; давление газ-осушителя 150 кПа; напряжение детектора TOF 1,57 кВ. Раствор трифторуксусной кислоты использовался в качестве стандартного образца для настройки чувствительности и разрешения, а также для выполнения калибровки массового числа (ионная ловушка и времяпролетный анализатор).

Структуры полученных соединений определяли по совокупности данных анализа масс-спектров, основанных на распаде молекулярного иона, и сравнения с данными литературы. Фторидный баланс определяли методом ионной хроматографии с использованием системы ВЭЖХ LC-20 Prominence с кондуктометрическим детектором CDD-10Avp (Shimadzu, Japan). Разделение аналита проводили на колонке Shodex (Shodex, New York, NY, USA) при скорости потока 1 мл/мин элюента следующего состава: 1,8 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1,7 мМ NaHCO<sub>3</sub>, с применением супрессора Xenoic® XAMS ASUREX-A100 (Diduco AB, Умеа, Швеция). Метаболические пути изображены с помощью ChemDraw Ultra v. 12.0.2.1076.

#### Статистический анализ

Статистический анализ был выполнен с использованием Microsoft Office Excel 2021. На рисунках динамики роста микроорганизмов и изменения концентраций ПФКК и ионов фтора данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка ( $p \leq 0,05$ ),  $n=3$ .

#### Результаты и их обсуждение

##### Идентификация и функциональная аннотация генома штаммов

Геномы штаммов 2,4-D и 5(3) были собраны до контигов; параметры сборок представлены в табл. 1. Получены достоверные предварительные сборки геномов чистых культур, которые были использованы для идентификации и последующего функционального анализа.

Проект генома для штамма 5(3) депонирован в GenBank под номером JAUHUU000000000 и номерами BioSample SAMN36271085 и BioProject PRJNA990579.

Проект генома для штамма 2,4-D депонирован в GenBank под номером JAUHUI000000000 и номерами BioSample SAMN36271038 и BioProject PRJNA990562.

Табл. 1.

Метрики сборки геномов штаммов

Штамм	Число контигов > 1000 п.н.	Размер генома, млн. п. н.	N50, п.н.	Самый короткий контиг, п.н.	Самый длинный контиг, п.н.	N75, п.н.	N90, п.н.	GC-состав, %
2,4-D	94	5,86	112,669	1086	453,475	69,882	35,829	61,81
5(3)	76	5,69	165,927	1040	455,784	92,844	51,388	64,38

На основании предварительного анализа физиолого-биохимических данных и гена 16S рРНК изучаемые штаммы были отнесены к роду *Pseudomonas*. Для псевдомонад есть большое число сборок, представленных в различных базах данных, таких как NCBI, BV-BRS, TYG и Pseudomonas.com [52]. Несмотря на долгую историю изучения и обширные базы данных подробная систематика этого рода до сих пор отсутствует и постоянно пополняется новыми результатами. На основе полногеномного секвенирования была предпринята попытка определить филогенетическое родство между изучаемыми штаммами и их ближайшими типовыми штаммами. Штамм 5(3) достоверно относится к *Pseudomonas mosselii* (рис. 1); значения ключевых параметров идентификации относительно референса (*P. mosselii* DSM17497T) следующие: ANI 97.40%, DDH 80.30% (при видовых порогах >95% и >70% соответственно [53]). Штамм же 2,4-D ни по одному из параметров не проходит видовой порог для отнесения его к определённому виду (ANI ниже 90%, DDH ниже 60%) и, вероятно, является представителем нового вида бактерий рода *Pseudomonas*. Его видовая идентификация и характеристика – тема отдельной большой работы.



Рис. 1. Полногеномное древо положения штаммов 2,4-D и 5(3) в пределах рода *Pseudomonas*

Секвенирование и полная сборка генома *Pseudomonas mosselii* штамма 5(3) (штамма 2,4-D) выявили 5134 (5388) кодирующих последовательностей CDS, 4 (3) кластера rPHK и 65 (54) кластеров tPHK. Геномы собраны из 73 (92) контигов общей длиной 5676241 (5852124) п.н. с соотношением GC 64,38% (61,81%).

Из 5134 генов 2895 (56,8%) были функционально аннотированы (Рис. 2).

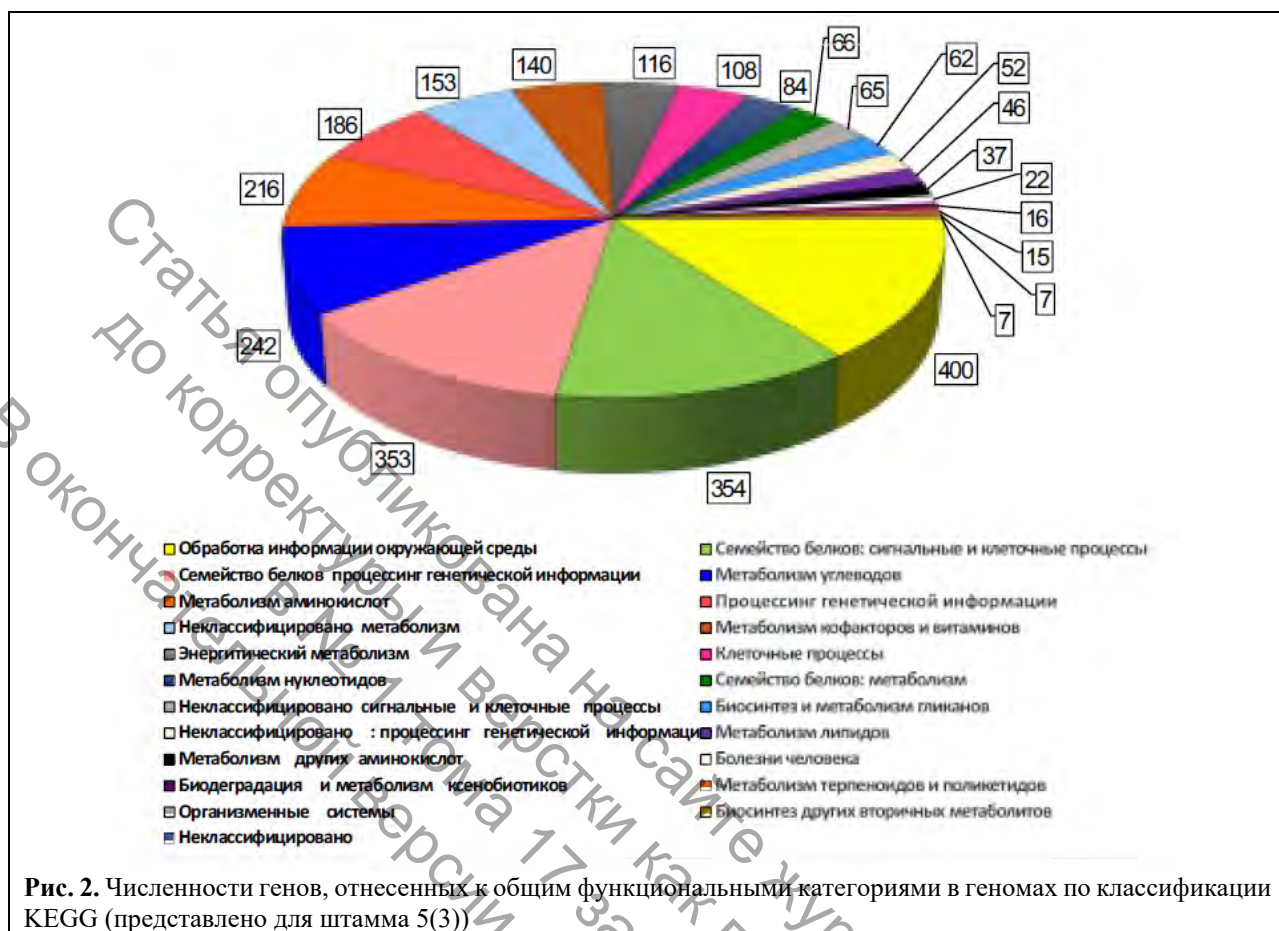


Рис. 2. Численности генов, отнесенных к общим функциональным категориям в геномах по классификации KEGG (представлено для штамма 5(3))

Результат функциональной аннотации показывает, что исследуемые штаммы обладают генами всех метаболических путей, необходимых для существования автономной культуры.

Категория «Деградация и метаболизм ксенобиотиков» для штаммов 5(3) и 2,4-D содержит более 60 генов. Большая часть в этой категории связана с деградацией различных ароматических соединений (этилбензол, ксилолы, стирен, нафталин, полициклические ароматические углеводороды, диоксины, атразин). По данным [54] наиболее вероятными ферментами-кандидатами для деструкции ПФОК являются лакказы и дегалогеназы. Эти ферменты в настоящее время находятся под пристальным вниманием ученых, исследующих биокатализ как инструмент для удаления стойких загрязнителей, в том числе ПФКК. Действительно, предполагаемые ферменты, вероятно участвующие в декарбоксилировании и декарбонилировании ПФКК, были обнаружены в исследуемых геномах поровну. Из генов, которые могли бы участвовать в деструкции фторорганических соединений (дегалогенирование), выделяются галоалкандегалогеназы (*dhaA*) и галоацетатдегалогеназы H-1 (*dehH1*). Они, как и охарактеризованные до сих пор фторацетатдегалогеназы [55], могут опосредовать дефторирование ПФКК по альфа-углероду молекулы.

Механизмы устойчивости к ПФКК могут быть опосредованы наличием:

- декарбоксилазы (*NovR*), которая может осуществлять несколько последовательных этапов окислительного декарбоксилирования ПФКК; это для подобных соединений ранее было описано и показано только химическим методом [56];
- алкансульфонатмонооксигеназы (*SsuD*), катализирующей десульфонирующее различия органосульфонатных субстратов в условиях сульфатного голодания и также могущей выполнять защитную роль в условиях окислительного стресса [57];
- переносчика ионов фтора (*CrcB*); эти «фторидные рибопереклюватели» увеличивают экспрессию нижестоящих генов при повышении уровня фторида, и предполагается, что они помогают смягчить токсические эффекты очень высоких уровней фторида [58]. Предполагается также, что этими фторидными рибопереклювателями регулируются многие гены. По данным [59] эффективная деятельность по дефторированию потребует высокого уровня толерантности к повышенным внутриклеточным концентрациям F<sup>-</sup> у микробного хозяина.

Геномы *Pseudomonas* кодируют различные типы ферментов, которые потенциально могут катализировать дефторирование как в процессах биодеградаций, опосредованных оксигеназой, так и благодаря активностям, обычно участвующим в анаэробном метаболизме. Хотя фактическую активность этих ферментов в процессах дефторирования еще предстоит полностью раскрыть, кажется правдоподобным, что такие деградирующие ферменты также могут играть роль в формировании реакции *Pseudomonas* на внутриклеточное высвобождение фторидов.

Ни в одной из предыдущих публикаций по деструкции перфторорганических соединений не найдены упоминания о подтвержденном наличии представленного комплекса ферментов у какого-либо микроорганизма-деструктора.

Нельзя также забывать, что геномы *Pseudomonas* кодируют >25% белков с неизвестной функцией, что позволяет предположить, что новая дефторизирующая активность может иметь отношение и к ним [60, 61].

#### *Рост на (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>)-ПФКК и их дефторирование*

Для роста на ПФКК бактериям необходимо транспортировать ее в клетку; выработать активный фермент, катализирующий разрыв связи C-F; обнаружить токсичный ион фтора и удалить его из клетки. И похоже, что для изучаемых штаммов *Pseudomonas* это – не проблема. Штаммы активно росли на минеральных средах, содержащих в качестве единственного источника углерода (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>)-перфторкарбоновые кислоты (рис. 3 А-Д), достигая максимального показателя оптической плотности культуральной жидкости через 6-7 суток, причем максимум оптической плотности находился в интервале 0,7-1,0 в зависимости от кислоты и был обратно пропорционален числу атомов углерода у ПФКК. При росте штаммов на (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>)-перфторкарбоновых кислотах происходило их полное разложение через 7 суток, для разложения ПФОС бактериям хватало 5 суток.

Полученные в настоящем исследовании результаты значительно превышают то, что было представлено ранее. Так, ближайший к нашему результат достигнут с использованием штамма бактерий *Acidimicrobium* sp. А6 для удаления ПФОК и ПФОС в аэробной среде, где степень биодеструкции не превышала 63% для концентрации 100 мг/л за 100 дней [20].

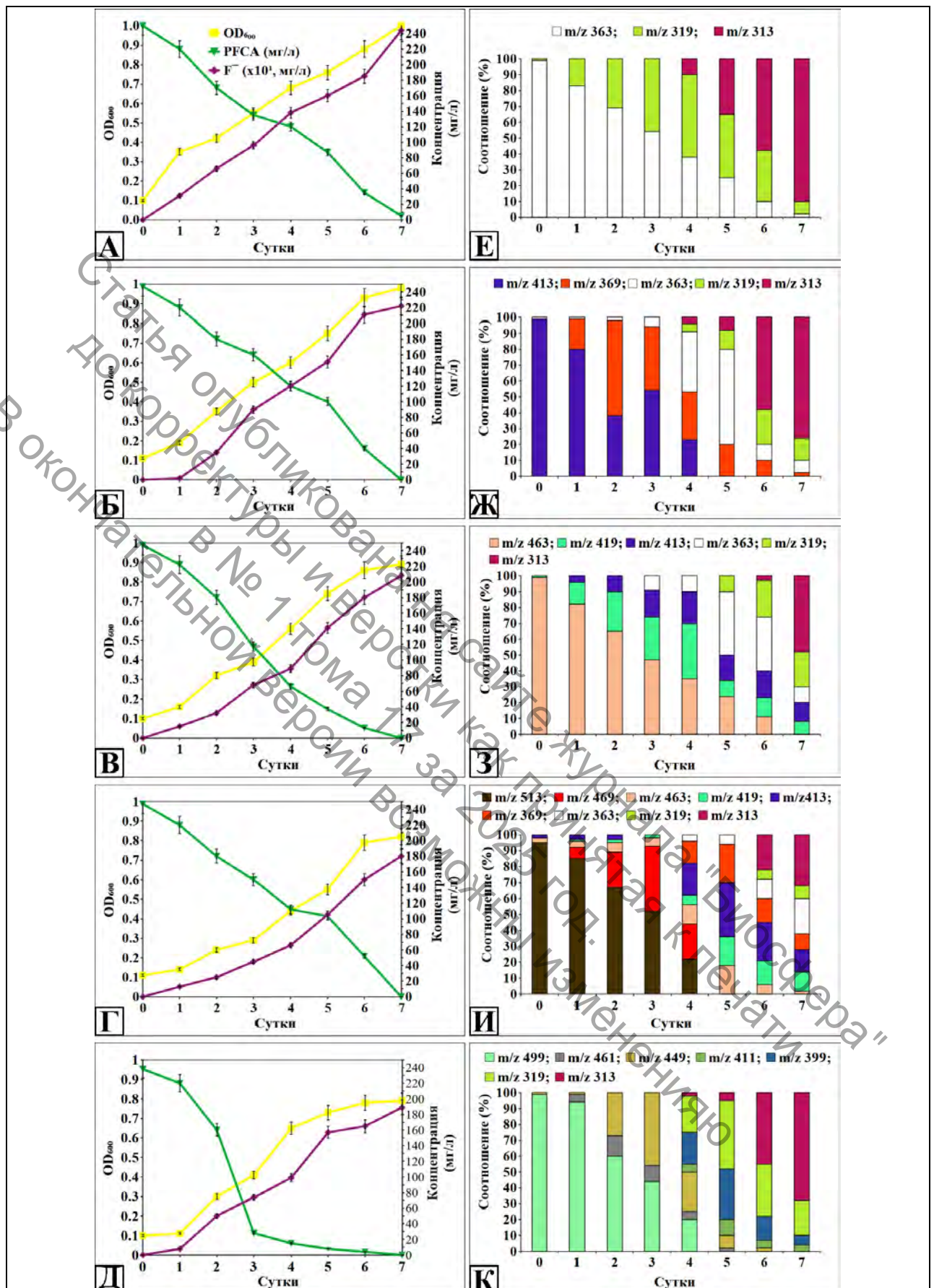
Только в отличие от этого мы наблюдали высвобождение ионов фтора в среду, что является проявление частичной минерализации, и, возможно, оказывает ингибирующий эффект на дальнейшую деструкцию промежуточных фторированных соединений. Конверсия перфторированных субстратов сопровождалась выходом в среду свободных ионов фтора, а начало высвобождения коррелировало с началом линейного снижения их концентрации в среде. Отсутствие ингибирующего эффекта на рост бактерий как раз объясняется наличием переносчика ионов фтора (*CrcB*), позволяющего перешагнуть физиологический барьер фторидной токсичности при разложении ПФКК и продолжать дефторирование на уровне дехлорирования полихлорированных соединений несмотря на разницу между окислительно-восстановительными потенциалами процессов.

#### *Биодеградация (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>)-ПФКК*

Биологическая деградация ПФКК может включать серию реакций декарбоксилирования, гидрокселирования, дефторирования. С учетом того, что методология определения ПФКК и их метаболитов отличается от методов оценки других «традиционных» стойких органических загрязнителей в связи с их особыми свойствами, их анализ ведется методами жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (рис. 4А). Но нужно ещё обнаружить высвобождающийся фторид-ион, что мы делали при помощи ВЭЖХ с кондуктометрическим детектированием (рис. 4Б).

При хроматографическом анализе с масс-спектрометрией в исходной КЖ при культивировании бактерий в среде с ПФГпК мы наблюдали ее диссоциированные кислотные ионы (молекулярный ион с отношением  $m/z$  363) (рис. 3Е). Через сутки в ультрафильтрате обнаруживалось соединение с  $m/z$  319, что возможно в результате реакции элиминирования диоксида углерода ( $m/z$  44) из карбоксильной группы. Его концентрация увеличивалась в срок до 4 суток, после чего в среде, вероятно под действием фермента галоалкандегалогеназы стал появляться компонент с  $m/z$  313, идентифицированный как перфторгексановая кислота (ПФГкК). Через 6 суток это соединение превалировало в культуральной жидкости. Аналогичная серия реакций проходила при превращении гомологичных кислот ПФОК ( $m/z$  413) (рис. 3Ж), ПФНК ( $m/z$  463) (рис. 3З), ПФДК ( $m/z$  513) (рис. 3И). Промежуточные продукты отличались между циклами на величину массы отщепляемой группы  $CF_2$ , то есть, на  $m/z$  50. Везде в качестве конечного превалирующего продукта деструкции обнаруживался ПФГкК в количестве от 50% до 95% от суммы продуктов деструкции. Для разложения ПФОК потребовалось два таких цикла реакций, для разложения ПФНК – три цикла, для ПФДК – четыре.

Предполагается, что ПФКК, содержащие еще и связи C-S (сульфонат) и C-C (карбоксилат), которые считаются более слабыми, чем связь C-F, могут подвергаться одноэлектронному восстановлению или окислению с образованием углерод-центрированного радикала с последующим гидрокселированием.



**Рис 3.** Динамика роста (по  $OD_{600}$ ) штамма-деструктора (штамм 5(3) в данном случае), высвобождения ионов фтора, изменений концентрации ПФКК (графики слева) и процентных соотношений между ПФКК и продуктами деструкции (по  $m/z$ ) (гистограммы справа) при культивировании в жидкой минеральной среде. А, Е – с ПФГпК, Б, Ж – с ПФОК, В, З – с ПФНК, Г, И – с ПФДК, Д, К – с ПФОС

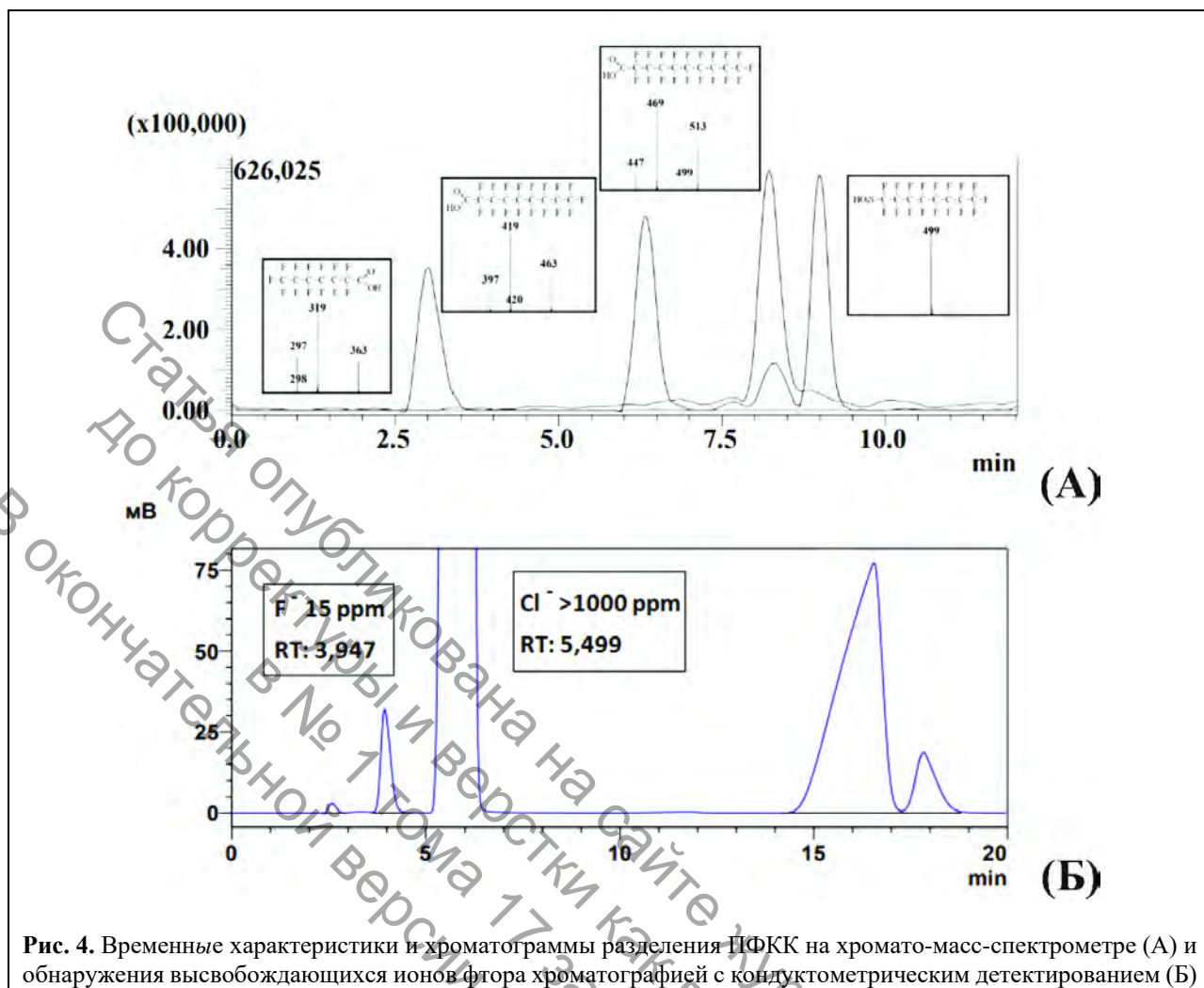


Рис. 4. Временные характеристики и хроматограммы разделения ПФКК на хромато-масс-спектрометре (А) и обнаружения высвобождающихся ионов фтора хроматографией с кондуктометрическим детектированием (Б)

Также и мы предполагали, что в ПФОС сначала разорвется связь С–S (сульфонатная) с высвобождением сульфита для метаболизирования бактериями и образованием перфтороктана с последующими реакциями гидроксирования, декарбоксилирования и дефторирования с образованием перфторгептановой кислоты, как это оказалось в нашей предыдущей работе [18]. Но в реалиях эксперимента все было иначе. При разложении ПФОС ( $m/z$  499) (рис. 3К), вероятно при участии галоацетатдегалогеназы H-1, происходит атака свободных электронов на наиболее уязвимое место, на атом фтора в  $\alpha$ -положении алкильной цепи, при этом заменяются 2 атома фтора на атомы водорода с последующим разрывом связи С–С алкильной цепи через промежуточный не идентифицированный продукт с  $m/z$  461, то есть с укорачиванием цепи на  $\text{CH}_2$ , высвобождением этой группы и образованием перфторгептансульфоната ( $m/z$  449) к 2 суткам культивирования; затем происходит аналогичный цикл и к 4-м суткам образуется перфторгексансульфонат ( $m/z$  399). И только после этого под вероятным действием алкансульфонатмонооксигеназы разрывается связь С–S и высвобождается  $\text{SO}_3^-$  с образованием соединения с  $m/z$  319 и его трансформацией в перфторгексановую кислоту; к 7-м суткам она составляет не менее 70% от суммы продуктов деструкции.

Таким образом, по окончании культивирования в среде обнаруживалась идентифицированная по диссоциированному кислотному иону перфторгексановая кислота. Полученные результаты позволили предположить схему деструкции ( $\text{C}_7\text{-C}_{10}$ )-ПФКК, показанную на рис. 5. Определить дальнейшее разложение для исследуемых штаммов сейчас не представляется возможным. Требуется продолжать изучение их катаболических возможностей. Более низкомолекулярные фрагменты деструкции ПФКК наблюдали только в работе [23], но без подтверждения описанным генетическим потенциалом и частичной минерализацией при выделении фтора. Литература по токсичности ПФКК указывает на то, что чем короче цепочка F – С, тем более благоприятен токсикологический профиль. Соответственно имеется определенный смысл в плане снижения токсичности ПФКК для человека, в том, чтобы сократить цепочку хотя бы на одно звено [62-64].



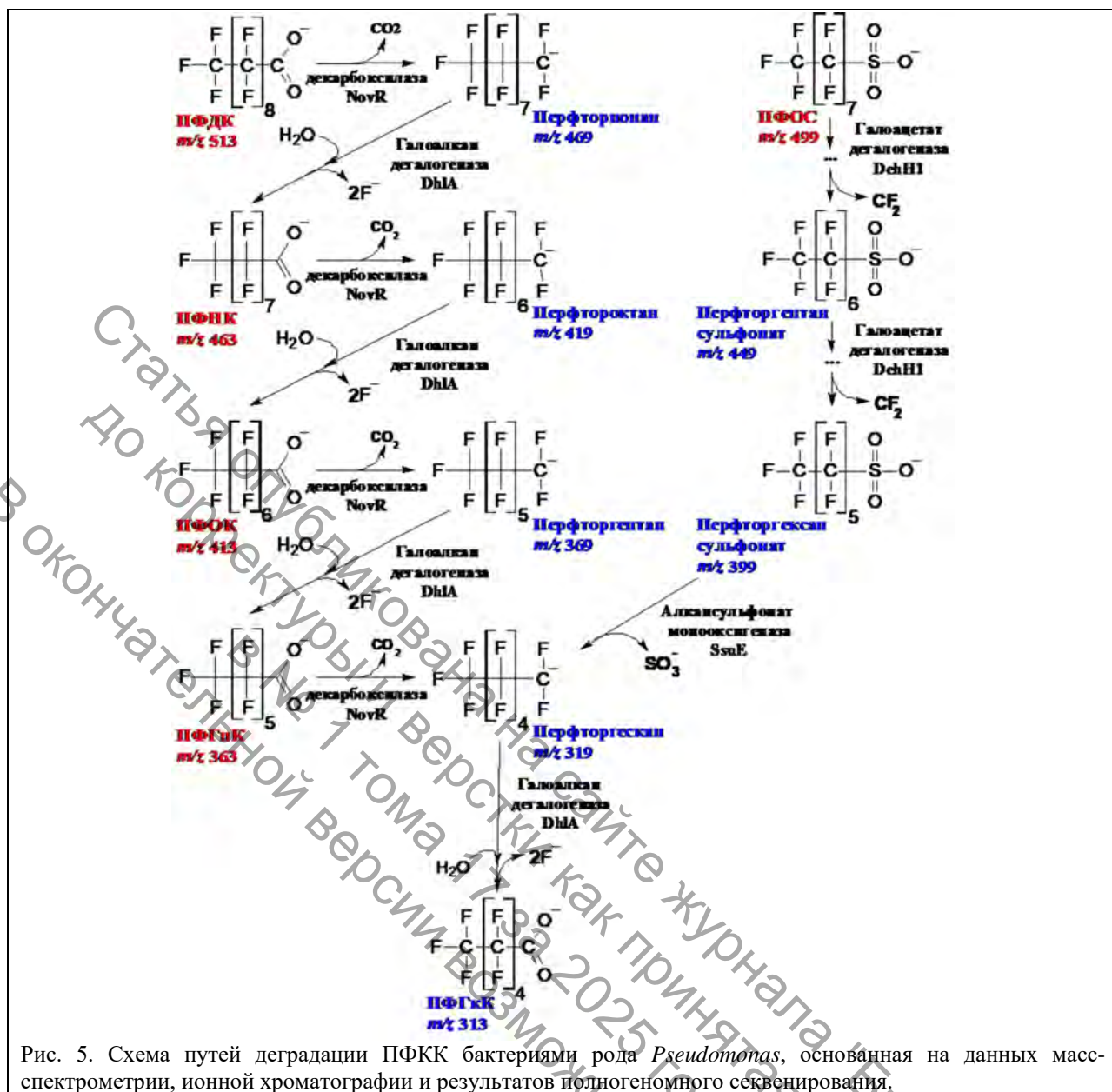


Рис. 5. Схема путей деградации ПФКК бактериями рода *Pseudomonas*, основанная на данных масс-спектрометрии, ионной хроматографии и результатов полногеномного секвенирования.

### Заключение

Впервые описаны штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, способные к деструкции (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>)-перфторкарбоновых кислот. Их геномы полностью секвенированы. Они содержат комплекс генов, продукты которых участвуют в деструкции фторорганических соединений (дегалогенировании) – гены галоалкандегалогеназы (*dhaA*), галоацетатдегалогеназы H-1 (*dehH1*), переносчика ионов фтора (*CrcB*) и алкансульфонатмонооксигеназы (*SsuE*), не упоминаемые в таком составе у микроорганизмов ранее. Штамм *Pseudomonas* за 7 суток культивирования в жидкой среде с различными (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>)-перфторкарбоновыми кислотами в качестве единственного источника углерода и энергии полностью их утилизировали. Результаты анализа с помощью ЖХ-МС показали, что разложение проходит до перфторгексановой кислоты с высвобождением, при разных стехиометрических соотношениях в зависимости от ПФКК, индикаторов минерализации ионов фтора, определенных ионной хроматографией. По полученным результатам можно утверждать, что механизм деградации ПФКК штаммами *Pseudomonas* состоит в образовании продуктов деградации с более короткими алифатическими цепями за счет удаления группы -CF<sub>2</sub>. Таким образом, штаммы бактерий рода *Pseudomonas* демонстрирует генетически подтвержденный большой потенциал разложения ПФКК, а полученные результаты помогут как в фундаментальном изучении процессов, происходящих в клетках штаммов, так и в разработке биотехнологий реабилитации окружающей среды при загрязнении фторорганическими соединениями.

### Благодарности

Работа выполнена за счёт Российского Научного Фонда (номер гранта 23-24-00154).

## Список литературы/References

1. Ross I, McDonough J, Miles J, Storch J, Kochunaryanan PT, Kalve E, Hurst J, Dasgupta SS . A review of emerging technologies for remediation of PFASs. *Remediation*. 2018;28:101-26. doi: 10.1002/rem.21553
2. Fujii S, Tanaka S, Hong Lien NP, Qiu Y, Polprasert C. New POPs in the water environment: Distribution, bioaccumulation and treatment of perfluorinated compounds: A review paper. *AQUA*. 2007;56(5):313-26. doi: 10.2166/aqua.2007.005
3. Nascimento RA, Nunoo DBO, Bizkarguenaga E, Schultes L, Zabaleta I, Benskin JP, Spano S, Leonel J. Sulfluramid use in Brazilian agriculture: A source of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) to the environment . *Environ Pollut*. 2018;242:1436-43. doi:10.1016/j.envpol.2018.07.122
4. Xia C, Diamond ML, Peaslee GF, Peng H, Blum A, Wang Z, Shalin A, Whitehead HD, Green M, Schwartz-Narbonne H, Yang D, Venier M. Per- and polyfluoroalkyl substances in North American school uniforms. *Environ Sci Technol*. 2022;56:13845-57. doi: 10.1021/acs.est.2c02111.
5. Schaidler LA, Balan SA, Blum A, Andrews DQ, Strynar MJ, Dickinson ME, Lunderberg DM, Lang JR, Peaslee GF. Fluorinated compounds in U.S. fast food packaging. *Environ Sci Technol Lett*. 2017;4:105-11. doi: 10.1021/acs.estlett.6b00435.
6. Pozo K, Moriera LB, Karaskova P, Pribylova P, Klanova J, de Carvalho MU, Maranhão LA, de Souza Abessa DM. Using large amounts of firefighting foams releases per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) into estuarine environments: A baseline study in Latin America. *Mar Pollut Bull*. 2022;182:113938. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113938.
7. Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ Sci Technol*. 2006;40(1):32-44. doi: 10.1021/es0512475.
8. Wang Y, Munir U, Huang Q. Occurrence of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in soil: Sources, fate, and remediation. *Soil Environ Health*. 2023;1(1):100004. doi: 10.1016/j.seh.2023.100004.
9. Bin J, Yaqian Z. World profile of foreseeable strategies for the removal of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) from water. In: *Persistent Pollutants in Water and Advanced Treatment Technology*. 2023. P. 47-69
10. Sung-Hee S. Health risk of human exposure to perfluorinated compounds (PFASs) in Hyeongsan River, Pohang. *Jf Environ Analysis Health Toxicol*. 2022;3:77-84. doi: 10.36278/jeaht.25.3.77
11. Calvert L, Green MP, De Iuliis GN, Dun M, Turner BD, Clarke BO, Eamens AL, Roman SD, Nixon B. Assessment of the emerging threat posed by perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances to mrle Reproduction in humans. *Front Endocrinol*. 2022;12:799043. doi: 10.3389/fendo.2021.799043.
12. Cheng J, Vecitis CD, Park H, Mader BT, Hoffmann MR. Sonochemical degradation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in landfill groundwater: environmental matrix effects. *Environ Sci Technol*. 2008;42:8057-63. doi: 10.1021/es8013858
13. Wang F, Shih K, Lu X, Liu C. Mineralization behavior of fluorine in perfluorooctanesulfonate (PFOS) during thermal treatment of lime-conditioned sludge. *Environ Sci Technol*. 2013; 47: 2621-27. doi: 10.1021/ es305352p
14. Marquínez-Marquínez AN, Loo-Molina NS, Quiroz-Fernández LS, Maddela NR, Luque R, Rodríguez-Díaz JM. Recent advances in the remediation of perfluoroalkylated and polyfluoroalkylated contaminated sites. *Environ Res*. 2023;219:115152. doi: 10.1016/j.envres.2022.115152.
15. Kabiri S, Navarro DA, Hamad SA, Grimison C, Higgins CP, Mueller JF, Kookana RS, McLaughlin MJ. Physical and chemical properties of carbon-based sorbents that affect the removal of per- and polyfluoroalkyl substances from solution and soil. *Sci Total Environ*. 2023;875:162653. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162653.
16. Mayer-Blackwell K, Sewell H, Fincker M, Spormann AM. Comparative physiology of organohalide-respiring bacteria. In: Adrian BTL, Löffler FE, eds. *Organohalide-Respiring Bacteria*. Berlin Heidelberg: Springer; 2016. P.. 259-80.
17. Wackett LP, McMahon K. Why Is the biodegradation of polyfluorinated compounds so rare? *mSphere*. 2021; 6(5):Article e00721-21. doi: 10.1128/mSphere.00721-21.
18. Chetverikov SP, Sharipov DA, Korshunova TY, Loginov ON. Degradation of perfluorooctanyl sulfonate by strain *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D. *Appl Biochem Microbiol*. 2017;53(5):533-8. doi: 10.1134/S0003683817050027
19. Shaw DMJ, Munoz G, Bottos EM, Duy SV, Sauve S, Liu J, Van Hamme JD. Degradation and defluorination of 6:2 fluorotelomer sulfonamidoalkyl betaine and 6:2 fluorotelomer sulfonate by *Gordonia* sp. strain NB4-1Y under sulfur-limiting conditions. *Sci Total Environ*. 2019;647:690-8. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.012.
20. Huang S, Jaffé PR. Defluorination of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) by *Acidimicrobium* sp. Strain A6. *Environ Sci Technol*. 2019;53(19):11410-19. doi: 10.1021/acs.est.9b04047.
21. Yu Y, Zhang K, Li Z, Ren C, Chen J, Lin Y.-H, Liu J, Men Y. Microbial cleavage of c-f bonds in two C6 Per- and polyfluorinated compounds via reductive defluorination. *Environ Sci Technol*. 2020;54(22):14393-402. doi: 10.1021/acs.est.0c04483.
22. Ruiz-Urigüen M, Shuai W., Huang S, Jaffé PR. Biodegradation of PFOA in microbial electrolysis cells by *Acidimicrobiaceae* sp. strain A6. *Chem*. 2022;292:133506. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133506.
23. Kwon BG, 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;109:221-5. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.01.072.

24. Yi LB, Chai LY, Xie Y, Peng QJ, Peng QZ. Isolation, identification, and degradation performance of a PFOA-degrading strain. *Genet Mol Res.* 2016;15:235-46. doi: 10.4238/gmr.15028043.
25. Beškoski VP, Yamamoto A, Nakano T, Yamamoto K, Matsumura C, Motegi M, Beškoski LS, Inui H. Defluorination of perfluoroalkyl acids is followed by production of monofluorinated fatty acids. *Sci Total Environ.* 2018;636:355-59. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.243.
26. Chiriac FL, Stoica C, Iftode C, Pirvu F, Petre VA, Paun I, Pascu LF, Vasile GG, Nita-Lazar M. Bacterial biodegradation of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorosulfonic acid (PFOS) using pure *Pseudomonas* strains. *Sustainability.* 2023;15(18):14000. doi: 10.3390/su151814000.
27. Zhang Z, Sarkar D, Biswas JK, Datta R. Biodegradation of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): a review. *Bioresour Technol.* 2022;344:126223. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126223.
28. Kiel M, Engesser KH. The biodegradation vs. biotransformation of fluorosubstituted aromatics. *App Microbiol Biotechnol.* 2015;99:7433-64. doi: 10.1007/s00253-015-6817-5.
29. Nogales J, García JL, Díaz E. Degradation of aromatic compounds in *Pseudomonas*: A systems biology view. In: Rojo F, ed. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* Cham, Switzerland: Springer; 2017. P. 1-49.
30. Yi L, Tang C, Peng Q, Peng Q, Chai L. Draft genome sequence of perfluorooctane acid-degrading bacterium *Pseudomonas parafulva* YAB-1. *Genome Announc.* 2015; 3: e00935–e00915. doi: 10.1128/genomeA.00935-15.
31. Harris J, Gross M, Kembal J, Farajollahi S, Dennis P, Sitko J, Steel JJ, Almand E, Kelley-Loughnane N, Varaljay VA. Draft genome sequence of the bacterium *Delftia acidovorans* Strain D4B isolated from soil. *Microbiol Resour Announc.* 2021;10(44):e0063521. doi:10.1128/MRA.00635-21.
32. Spaan KM, van Noordenburg C, Plassmann MM, Schultes L, Shaw S, Berger M, Heide-Jørgensen MP, Rosing-Asvid A, Granquist SM, Dietz R, Sonne C, Rigét F, Roos A, Benskin JP. Fluorine mass balance and suspect screening in marine mammals from the northern hemisphere. *Environ Sci Technol.* 2020;54(7):4046-8. doi: 10.1021/acs.est.9b06773.
33. Brendel S, Fetter E, Staude C, Vierke L, Biegel-Engler A. Short-chain perfluoroalkyl acids: environmental concerns and a regulatory strategy under REACH. *Environ Sci Eur.* 2018;30(1): 9. doi: 10.1186/s12302-018-0134-4.
34. Li F, Duan J, Tian S, Ji H, Zhu Y, Wei Z, Zhao D. Short-chain per- and polyfluoroalkyl substances in aquatic systems: occurrence, impacts and treatment. *Chem Engin J.* 2020; 380:122506. doi: 10.1016/j.cej.2019.122506.
35. Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *Cold Spring Harb Protoc.* 2006; 2006(1):pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455.
36. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
37. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin V, Nikolenko S, Pham S, Prjibelski A, Pyshkin A, Sirotkin A, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19:455-77. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
38. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012; 9:357-359. doi: 10.1038/nmeth.1923.
39. Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng Q, Wortman J, Young SK, Earl AM. Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS ONE.* 2014; 9: e112963. doi: 10.1371/journal.pone.0112963. eCollection 2014.
40. Yoon SH, Ha SM, Lim JM, Kwon SJ, Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antoine Van Leeuwenhoek.* 2017;110(10):1281-6. doi:10.1007/s10482-017-0844-4.
41. Meier-Kolthoff JP, Sardà Carbasse J, Peinado-Olarte RL, Göker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucl Acid Res.* 2022;50(D1):D801-7. doi: 10.1093/nar/gkab902.
42. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30:2068-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
43. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
44. Lefort V, Desper R, Gascuel O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Mol Biol Evol.* 2015;32:2798-800. doi: 10.1093/molbev/msv150.
45. Farris JS. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Am Nat.* 1972;6:645-67.
46. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucl Acids Res.* 2021;49:W293-6. doi: 10.1093/nar/gkab301.
47. Meier-Kolthoff JP, Goker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun.* 2019;10:2182. doi: 10.1038/s41467-019-10210-3.
48. Meier-Kolthoff JP, Hahnke RL, Petersen J, Scheuner C, Michael V, Fiebig A, Rohde C, Rohde M, Fartmann B, Goodwin LA, Chertkov O, Reddy T, Pati A, Ivanova NN, Markowitz V, Kyrpides NC, Woyke T, Göker M, Klenk H-P. Complete genome sequence of DSM 30083(T), the type strain (U5/41(T)) of *Escherichia coli*, and a proposal

- for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Stand Genom Sci.* 2014;9:2. doi: 10.1186/1944-3277-9-2. eCollection 2014.
49. Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66:1100-3. doi: 10.1099/ijsem.0.000760.
  50. Raymond RL. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Dev Ind Microbiol.* 1961;2:23-54.
  51. Bertani G. Studies on lysogenesis I. *J Bacteriol.* 1951;62:293-300. doi: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
  52. Olson RD, Assaf R, Brettin T, Conrad N, Cucinell C, Davis JJ, Dempsey DM, Dickerman A, Dietrich EM, Kenyon RW, Kuscuoglu M, Lefkowitz EJ, Lu J, Machi D, Macken C, Mao C, Niewiadomska A, Nguyen M, Olsen GJ, Overbeek JC, Parrello B, Parrello V, Porter JS, Pusch GD, Shukla M, Singh I, Stewart L, Tan G, Thomas C, Van Oeffelen M, Vonstein V, Wallace ZS, Warren AS, Wattam AR, Xia F, Yoo H, Zhang Y, Zmasek CM, Scheuermann RH, Stevens RL. Introducing the bacterial and viral bioinformatics resource center (BV-BRC): A resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucl Acids Res.* 2023; 51:D678-89. doi: 10.1093/nar/gkac1003.
  53. Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi H, Xu XW, De Meyer S, Trujillo ME. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018;68:461-6. doi: 10.1099/ijsem.0.002516.
  54. Marchetto F, Roverso M, Righetti D, Bogianni S, Filippini F, Bergantino E, Sforza E. Bioremediation of per- and poly-fluoroalkyl substances (PFAS) by *Synechocystis* sp. PCC 6803: A chassis for a synthetic biology approach. *Life.* 2021;11:1300. doi: 10.3390/life11121300.
  55. Li Y, Yue Y, Zhang H, Yang Z, Wang H, Tian S, Wang J, Zhang Q, Wang W. Harnessing fluoroacetate dehalogenase for defluorination of fluorocarboxylic acids: In silico and in vitro approach. *Environ Int.* 2019;131:104999. doi: 10.1016/j.envint.2019.104999.
  56. Trang B, Li Y, Xue XS, Ateia M, Houk KN, Dichtel WR. Low-temperature mineralization of perfluorocarboxylic acids. *Science.* 2022;377(6608):839-45. doi: 10.1126/science.abm8868.
  57. Park C, Shin B, Park W. Protective role of bacterial alkanesulfonate monooxygenase under oxidative stress. *App Environ Microbiol.* 2020;86(15):e00692-20. doi: 10.1128/AEM.00692-20.
  58. Calero P, Gurdo N, Nikel PI. Role of the *CreB* transporter of *Pseudomonas putida* in the multi-level stress response elicited by mineral fluoride. *Environ Microbiol.* 2022;24(11):5082-104. doi: 10.1111/1462-2920.16110.
  59. Wackett LP. *Pseudomonas*: versatile biocatalysts for PFAS. *Environ Microbiol.* 2022;24(7):2882-9. doi: 10.1111/1462-2920.15990.
  60. Winsor GL, Van Rossum T, Lo R, Khaira B, Whiteside MD, Hancock RE, Brinkman FS. *Pseudomonas* genome database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucl Acids Res.* 2009; 37:D483-8. doi: 10.1093/nar/gkn861.
  61. Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA, Brinkman FS. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucl Acids Res.* 2016;44:D646-53. doi: 10.1093/nar/gkv1227.
  62. Luz AL, Anderson JK, Goodrum P, Durda J. Perfluorohexanoic acid toxicity, part I: Development of a chronic human health toxicity value for use in risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2019;103:41-55. doi:10.1016/j.yrtph.2019.01.019.
  63. Zango ZU, Ethiraj B, Al-Mubaddel FS, Alam MM, Lawal MA, Kadir HA, Khoo KS, Garba ZN, Usman F, Zango MU, Lim JW. An overview on human exposure, toxicity, solid-phase microextraction and adsorptive removal of perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs) from water matrices. *Environ Res.* 2023;231(Pt.2):116102. doi:10.1016/j.envres.2023.116102.
  64. Han JS, Jang S, Son HY, Kim YB, Kim Y, Noh JH, Kim MJ, Lee BS. Subacute dermal toxicity of perfluoroalkyl carboxylic acids: comparison with different carbon-chain lengths in human skin equivalents and systemic effects of perfluoroheptanoic acid in Sprague Dawley rats. *Arch Toxicol.* 2020;94(2):523-39. doi: 10.1007/s00204-019-02634-z.