

УДК 579.222:579.66:579.695

## Дегградация пиридина суспензиями и биопленками штаммов *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Burkholderia dolosa* БОС, выделенных из активного ила очистных сооружений

© 2020 Ю.Г. МАКСИМОВА<sup>1,2,\*</sup>, А.А. СЕРГЕЕВА<sup>3</sup>, Г.В. ОВЕЧКИНА<sup>1</sup>, А.Ю. МАКСИМОВ<sup>1,2</sup><sup>1</sup>«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990<sup>3</sup>АО «СИБУР-ХИМПРОМ», Пермь, 614055

\*e-mail: maks@iegm.ru

Поступила в редакцию 31.10.2019 г.

После доработки 27.02.2020 г.

Принята к публикации 20.03.2020 г.

Из активного ила коммунально-бытовых биологических очистных сооружений (БОС) г. Перми и локальных очистных сооружений предприятия ООО «ЛУКОЙЛ-Пермнефтеоргсинтез» (ПНОС) выделены бактериальные штаммы, способные к дегградации 0,8–15,8 г/л гидрохлорида пиридина, и идентифицированы как *Achromobacter pulmonis* (ПНОС) и *Burkholderia dolosa* (БОС). Оптимальной концентрацией пиридина для роста выделенных штаммов является 4,0 г/л. Изучена дегградация пиридина в процессе роста обоих штаммов на среде с гидрохлоридом пиридина без дополнительных источников азота и углерода. Показано, что штаммы могут накапливать биомассу на среде с пиридином, используя его в качестве единственного источника углерода и азота. Добавление 1 г/л глюкозы в среду ускоряет процесс дегградации пиридина у *A. pulmonis* ПНОС, но подавляет у *B. dolosa* БОС. Биопленки *A. pulmonis* ПНОС и *B. dolosa* БОС, выращенные на базальтовых и углеродных волокнах, эффективно утилизируют пиридин в процессе роста, причем наибольшая скорость утилизации пиридина, равная 1,8 г/(л сут), отмечена у биопленок *A. pulmonis* ПНОС на базальтовых волокнах.

**Ключевые слова:** пиридин, биодегградация, активный ил, биопленки, *Achromobacter pulmonis*, *Burkholderia dolosa*.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-2-86-98

Пиридин – гетероциклическое соединение с атомом азота в структуре молекулы, широко используемое при производстве красок, гербицидов, пестицидов, фармацевтических препаратов [1]. Пиридин присутствует в сточных водах коксохимических и нефтеперерабатывающих предприятий. Попадание этого соединения в окружающую среду является причиной серьезных проблем из-за его токсичности, тератогенности и канцерогенности

[2]. В связи с этим его содержание в сточных водах строго регулируется, а загрязненные среды должны подвергаться ремедиации. Однако из-за хорошей растворимости и стабильности гетероциклической структуры этого соединения, физико-химические методы, такие как окисление, адсорбция и сжигание являются энергозатратными и дорогими. Поэтому биологические подходы к очистке окружающей среды от пиридина остаются актуальными.

**Список сокращений:** БОС – биологические очистные сооружения, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, ГХ-МС – газовый хроматограф с масс-детектором, КОЕ – колониеобразующие единицы, ОП<sub>540</sub> – оптическая плотность при длине волны 540 нм, ПНОС – «Пермнефтеоргсинтез»

Биологическая утилизация пиридина также представляет определенные сложности: это соединение плохо поддается микробному разложению и имеет тенденцию к персистированию в окружающей среде. Есть сведения о деградирующих пиридин микроорганизмах, которые относятся к родам *Arthrobacter* [3], *Bacillus* [2], *Lysinibacillus* [4], *Paracoccus* [5–8], *Pseudomonas* [9–12], *Rhizobium* [13, 14], *Rhodococcus* [15, 16], *Shewanella* [2], *Shinella* [17], *Streptomyces* [18]. Показана трансформация замещенных пиридинов, в частности, метил- и диметилпиридинов, штаммом *Arthrobacter crystallopoietes* KM-4 [19]. Изученные штаммы осуществляли деструкцию пиридина в невысоких концентрациях – от 0,03 до 2,8 г/л. Известно, что пиридин может быть утилизирован клетками микроорганизмов не только с целью очистки окружающей среды, но и для получения энергии в микробных топливных элементах [20]. Поэтому выделение из окружающей среды и селекция штаммов микроорганизмов, утилизирующих пиридин в более высоких концентрациях, представляет большой интерес.

Альтернативной технологией биологической очистки загрязненных сред является применение иммобилизованных клеток микроорганизмов-деструкторов. Основными преимуществами данной технологии является концентрирование биомассы и увеличение объемной продуктивности процесса, возможность повторного использования микробных клеток, обеспечение высокой скорости разведения и устранение проблемы вымывания клеток в непрерывных процессах, а также создание благоприятного микроокружения, защищающего микроорганизмы от токсичных веществ, экстремальных рН и температуры, воздействия растворителей и тяжелых металлов [21]. Свободные клетки плохо выживают в условиях механического и различных экологических стрессов, тогда как подходящие носители не только защищают клетки, но и адсорбируют на поверхности органические вещества, обеспечивая их постепенный контакт с иммобилизованными микроорганизмами [22]. Биопленки являются самоиммобилизованными микробными сообществами и могут эффективно использоваться в процессах биодegradации токсичных веществ [23], что обуславливает актуальность изучения деградации пиридина иммобилизованными клетками бактерий-деструкторов, в частности, их биопленками.

В связи с этим, целью исследования явилось изучение процесса трансформации пиридина штаммами *A. pulmonis* ПНОС и *B. dolosa* БОС в суспензионной культуре и в виде биопленок.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Выделение и идентификация пиридин-утилизирующих бактерий

Выделение бактериальных штаммов, утилизирующих пиридин, проводили на минеральной среде (рН 7,2±0,2), содержащей г/л:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,00,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 3,75,  $\text{NaCl}$  – 0,50,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,50,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,010,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,005 и гидрохлорид пиридина – 4,00 в качестве единственного источника углерода и азота. В среду объемом 50,0 мл вносили по 5,0 мл активного ила из аэротенка коммунально-бытовых БОС г. Перми и локальных очистных сооружений ПНОС и инкубировали 2 недели на шейкере S3.01 (ELMI, Латвия) со скоростью вращения 160 об/мин при 25 °С. Из накопительной культуры делали посев на агаризованную минеральную среду, содержащую микроэлементы и 4,00 г/л пиридина, и затем культивировали полученную биомассу на жидкой среде вышеприведенного состава. Пассажи проводили не менее трех раз до получения чистой культуры и идентифицировали штаммы.

Идентификация выделенных штаммов до вида была проведена путем ПЦР-анализа с праймерами к генам 16S рРНК (27F 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' и 1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), сконструированными на основе последовательностей, представленных в базе данных GenBank, и синтезированными ООО «Евроген» (Москва). Препараты хромосомной ДНК получали фенольным методом. Амплификацию ДНК проводили с применением термостабильной *Taq*-полимеразы производства ООО «СибЭнзим» (Новосибирск) на термоциклере ТЗ (Biometra, Германия). Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР-реакции проводили в 1,2–1,5% агарозном геле в трисборатном буфере при напряженности поля 5 В/см. Для оценки молекулярной массы фрагментов ДНК использовали молекулярные маркеры 1 т.п.н. и 100 п.н. (ООО «СибЭнзим» и Axigen®). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли после окрашивания геля бромистым этидием с использованием системы гельдокументации BioDocAnalyze (Biometra). Очистку ПЦР-продукта перед секвенированием осуществляли двумя способами: с использованием смеси ферментов ExoSAPMix (Fermentas Life Sciences) и с помощью аппарата E-Gel (Invitrogen, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Секвенирование проводили на приборе Genetic Analyzer 3500xl (Applied Biosystems, США), следуя инструкциям фирмы-производителя. Гомологию полученных нуклеотидных последовательностей генов

16S рРНК с известными генами микроорганизмов анализировали с использованием программного пакета BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi)) и программы Chromas lite 2.1. Полученные последовательности сравнивали с хранящимися в базе данных EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) [24].

### Культивирование и определение ростовых характеристик

Ростовые характеристики, такие как максимальная удельная скорость роста ( $\mu$ , ч<sup>-1</sup>) и максимальный уровень накопления сухой биомассы в среде  $C_{\max}$  (г/л) определяли при росте культур в 2,00 мл минеральной среды с гидрохлоридом пиридина как единственным источником углерода и азота в концентрации 0,8, 4,0 и 7,9 г/л в лунках 24-луночного планшета (Eppendorf, Германия). В среду вносили 25 мкл инокулята, содержащего 0,70 г/л сухих клеток и измеряли ОП<sub>540</sub> на микропланшетном ридере Infinity M1000 (Tecan, Швейцария).

Удельную скорость роста вычисляли по формуле:

$$\mu = 1/\text{ОП}_0 (\Delta\text{ОП}/\Delta t),$$

где ОП<sub>0</sub> – ОП<sub>540</sub> в момент времени  $t_0$ ,  $\Delta\text{ОП}$  – изменение оптической плотности культуральной среды за время  $\Delta t$ , ч.

Максимальный уровень накопления биомассы клеток в среде вычисляли следующим образом. Отбирали по 1 мл пробы культуры в стационарной фазе роста, центрифугировали 10 мин при 14000 g на центрифуге 5415D (Eppendorf, Германия), осадок высушивали в термостате ТС-1/80 (Россия) при 30 °С до постоянной массы и взвешивали на аналитических весах GR-202 (AND, Япония) с точностью до 0,1 мг.

### Изучение утилизации пиридина

Утилизацию пиридина изучали при росте выделенных штаммов *A. pulmonis* ПНОС и *B. dolosa* БОС на минеральной среде вышеприведенного состава с 4,0, 7,9 и 15,8 г/л гидрохлорида пиридина в качестве единственного источника углерода и азота. В 20,0 мл среды вносили 100 мкл инокулята, содержащего 0,7 г/л сухой биомассы. Культивировали в течение 14 сут при 30 °С на шейкере GFL 3031 (Германия) со скоростью вращения платформы 120 об/мин. С периодичностью 1–2 сут отбирали пробы культуральной жидкости, клетки осаждали на центрифуге (Eppendorf 5415D, Германия) 10 мин при 14000 g и определяли концентрацию пиридина в надосадочной жидкости методом ВЭЖХ (LC-10, Shimadzu, Япо-

ния), используя колонку Luna 5u C 18(2) 100A (250×4,6 мм), и 10 mM КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> с 25% ацетонитрила в качестве подвижной фазы, подаваемой со скоростью 0,5 мл/мин при 25 °С.

Адсорбцию пиридина на поверхности клеток, предварительно убитых автоклавированием в течение 1 ч при 121 °С, проводили в 50 мл дистиллированной воды, содержащей 2,5 г/л пиридина и 97 и 40 мг биомассы *A. pulmonis* ПНОС или *B. dolosa* БОС соответственно.

Наличие продуктов метаболизма пиридина в среде культивирования определяли методом хромато-масс-спектрометрии. Для этого пробы надосадочной жидкости экстрагировали этилацетатом в соотношении 1:1 (об./об.) и анализировали органическую фазу на ГХ-МС (689/573Т MSD, Agilent-Hewlett Packard, США) с капиллярной колонкой RTX-5MS длиной 5 м и предколонкой HP-5MS. Газ-носитель гелий подавали со скоростью 1 мл/мин. Использовали следующие протоколы хромато-масс-спектрометрии: для определения пиридина начальная температура колонки – 40 °С (2 мин), нагрев со скоростью 15 °С/мин до 280 °С, выдержка – 5 мин (методика 1); для определения продуктов метаболизма пиридина начальная температура колонки – 40 °С (2 мин), нагрев 5 °С/мин до 250 °С, выдержка 5 мин, затем нагрев до 280 °С, выдержка 2 мин (методика 2) [20]; 90 °С (3 мин), нагрев 15 °С/мин до 250 °С (методика 3) [25]. Температура испарителя составляла 280 °С.

### Получение био пленок, их характеристика и дегградация пиридина био пленками

Изучали утилизацию пиридина био пленками *A. pulmonis* ПНОС и *B. dolosa* БОС.

Основой для био пленки служила смесь (0,5 г) углеродных активированных волокон «Карбон-актив» (ОАО «СветлогорскХимволокно», Беларусь) или базальтовых волокон со средним диаметром 3 мкм («Новгородский завод стекловолокна», Россия). Волокна помещали в жидкую минеральную среду (50,00 мл) описанного выше состава с 4,0 г/л гидрохлорида пиридина в качестве единственного источника углерода и азота, и смесь инокулировали 100 мкл суспензии бактерий, содержащей 0,7 г/л сухой биомассы. После 7 сут культивирования волокна с био пленкой отмывали от среды калий-фосфатным буфером (рН 7,2±0,2), переносили в свежую минеральную среду с 4,0 г/л гидрохлорида пиридина и культивировали на шейкере GFL 3031 (Германия) со скоростью вращения 120 об/мин при 30 °С. Пробы отбирали с периодичностью 2–3 сут и анализировали методом ВЭЖХ. Адсорбцию пиридина в концентрации от 2,5 до 5 г/л на волокнах проводили в тех же условиях.

## ДЕГРАДАЦИЯ ПИРИДИНА СУСПЕНЗИЯМИ И БИОПЛЕНКАМИ ШТАММОВ

Определяли массу биопленки (мг/г носителя) и количество жизнеспособных клеток биопленки. Для этого отмытые 30 мл калий-фосфатного буфера (рН  $7,2 \pm 0,2$ ) волокна с биопленкой помещали в 10 мл буфера того же состава и обрабатывали на ультразвуковой бане S30 (Elma, Германия) 7 раз по 1 мин с перерывами по 1 мин. После этого бактерии из 10-кратных разведений высевали на полноценную агаризованную среду LB и подсчитывали количество выросших колоний. Количество жизнеспособных клеток выражали в КОЕ/г носителя и КОЕ/г биопленки. Биомассу, отделившуюся от волокон после обработки ультразвуком, собирали центрифугированием, высушивали до постоянной массы и взвешивали на аналитических весах, как описано ранее. Визуализацию биопленок проводили в сканирующем электронном микроскопе Vega 3 (TESCAN, Чехия) при ускоряющем напряжении 20 кВ.

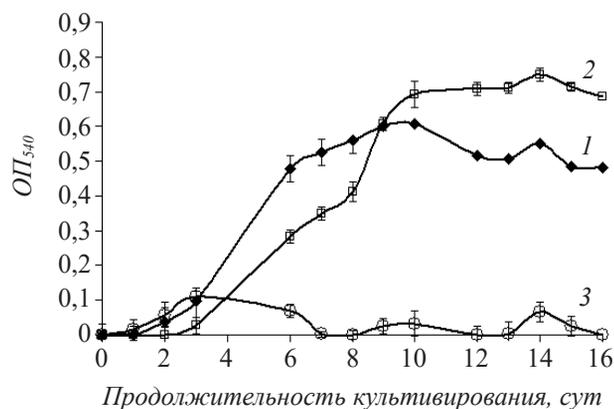
### Статистическая обработка результатов

Все эксперименты проводили в 3-кратной повторности, вычисляли среднее, стандартное отклонение и стандартную ошибку среднего.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы были выделены на среде с 4,0 г/л гидрохлорида пиридина в качестве единственного источника углерода и азота из активного ила аэротенка муниципальных и промышленных БОС. Методом секвенирования гена 16S рРНК штаммы были идентифицированы как *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Burkholderia dolosa* БОС.

Ростовые характеристики штамма *A. pulmonis* ПНОС были изучены на среде с 0,8, 4,0 и 7,9 г/л гидрохлорида пиридина (рис. 1) и представлены в табл. 1. При росте на среде, содержащей 4,0 г/л гидрохлорида пиридина, была отмечена самая длительная экспоненциальная фаза (168 ч) и высокая удельная скорость роста в этой фазе ( $0,148 \text{ ч}^{-1}$ ), а также максимальный уровень накопления биомассы клеток в среде (1,18 г/л). При росте на средах с 0,8 и 7,9 г/л гидрохлорида пири-



**Рис 1.** Рост *A. pulmonis* ПНОС на среде, содержащей 0,8 (1), 4,0 (2), 7,9 (3) г/л пиридина в качестве единственного источника углерода и азота.

**Fig. 1.** Growth of *A. pulmonis* PNOS in a medium with 0,8 (1), 4,0 (2), 7,9 (3) g/l pyridine as the sole source of carbon and nitrogen.

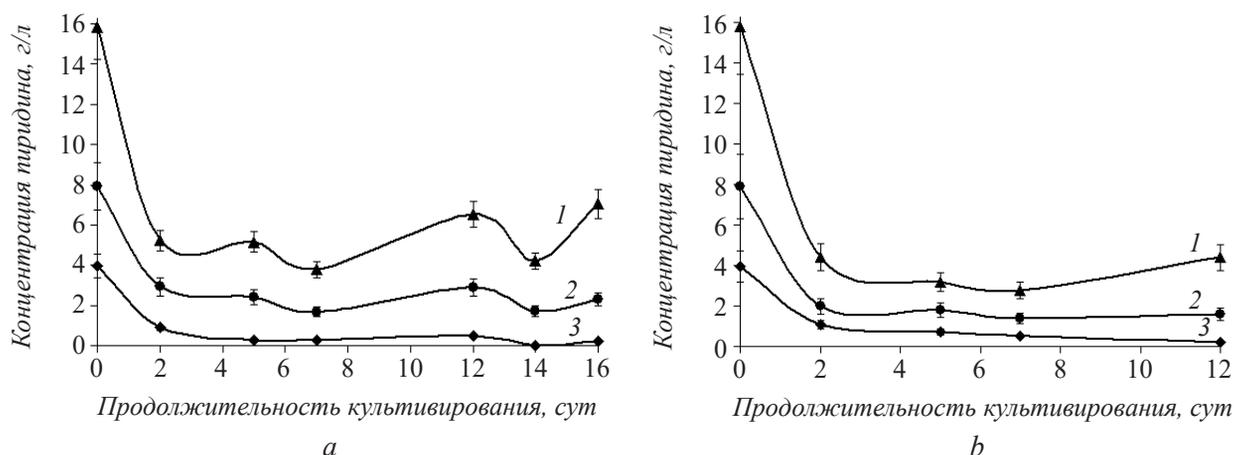
дина продолжительность экспоненциальной фазы и удельная скорость роста составили 96 и 48 ч и  $0,135$  и  $0,055 \text{ ч}^{-1}$  соответственно. Гидрохлорид пиридина в концентрации 7,9 г/л ингибировал рост, и  $C_{\max}$  не превышал 0,17 г/л. Максимальный уровень накопления биомассы на среде с 0,8 г/л гидрохлорида пиридина составил 0,95 г/л. Клетки штамма *B. dolosa* БОС в процессе роста на среде с пиридином формировали агрегаты, что не позволило построить кривую роста, используя значения оптической плотности.

Была изучена утилизация гидрохлорида пиридина в процессе роста штаммов на жидкой минеральной среде, содержащей его в концентрации 4,0, 7,9 и 15,8 г/л (рис. 2). За 12–14 сут штаммы полностью утилизировали 4,0 г/л субстрата. Отмечалось снижение концентрации пиридина, внесенного в среду в более высокой концентрации, но полной деградации субстрата не наблюдалось. Когда в качестве косубстрата для утилизации пиридина в среду вносили глюкозу в концентрации 1,0 г/л, *A. pulmonis* ПНОС полностью утилизировал 4,0–7,9 г/л гидрохлорида пиридина за 5 сут, концентрация пиридина, внесенного в среду

Таблица 1

**Ростовые характеристики *A. pulmonis* ПНОС при культивировании на среде, содержащей пиридин**  
Growth characteristics of *A. pulmonis* PNOS during cultivation in a medium with pyridine

Концентрация пиридина, г/л	Продолжительность экспоненциальной фазы, ч	Удельная скорость роста, $\text{ч}^{-1}$	$C_{\max}$ , г/л
0,8	96	0,135	0,95
3,9	168	0,148	1,18
7,9	48	0,055	0,17



**Рис. 2.** Утилизация 15,8 (1), 7,9 (2) и 4,0 (3) г/л пиридина как единственного источника углерода и азота в процессе роста *A. pulmonis* ПНОС (а) и *B. dolosa* БОС (b)

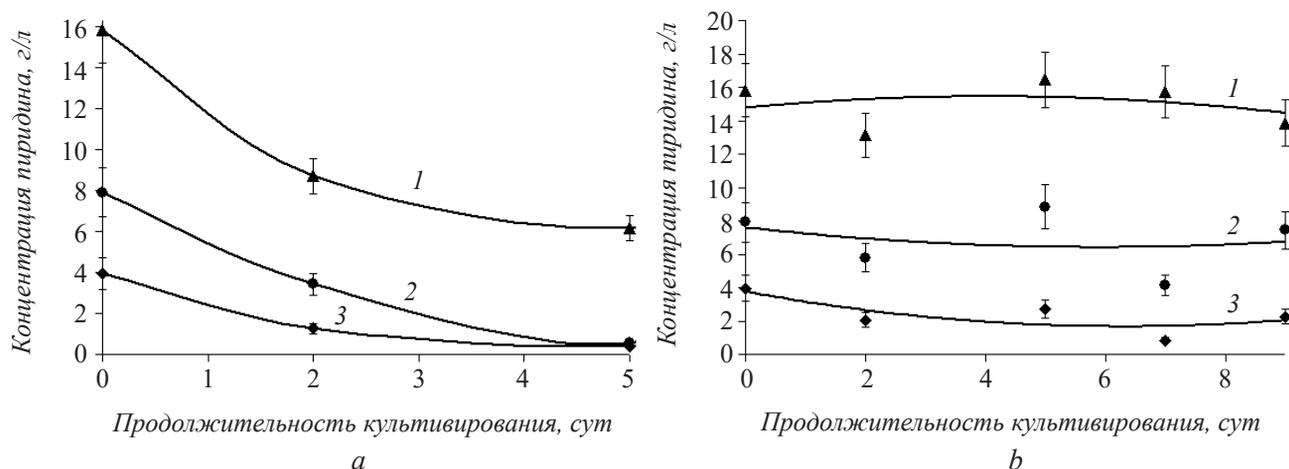
**Fig. 2.** Utilization of 15,8 (1), 7,9 (2) and 4,0 (3) g/l pyridine as the sole source of carbon and nitrogen during the growth of *A. pulmonis* PNOS (a) and *B. dolosa* BOS (b).

культивирования в концентрации 15,8 г/л, снижалась за 5 сут в 2,5 раза (рис. 3а). *B. dolosa* БОС в присутствии глюкозы пиридин не утилизировал. В данном случае имела место катаболитная репрессия, выражающаяся в подавлении экспрессии генов, участвующих в метаболизме пиридина, в присутствии легко катаболизируемого субстрата.

Было показано, что биопленки *B. dolosa* БОС и *A. pulmonis* ПНОС, выращенные на базальтовых и углеродных волокнах, эффективно утилизируют пиридин в процессе роста (рис. 4). Это может быть связано с адсорбцией контаминанта. В связи с этим была изучена адсорбция пиридина на волокнах без биопленок (рис. 5а) и на поверхности убитых клеток обоих штаммов (рис. 5b), а также оценена доля абиотического разложения пириди-

на. Показано, что эти процессы не вносят вклад в убыль пиридина из среды культивирования. В течение первых 7 сут культивирования отмечалась незначительная адсорбция компонента на клеточных стенках *B. dolosa* БОС, однако в процессе дальнейшей десорбции концентрация пиридина в среде возвращалась к исходным значениям.

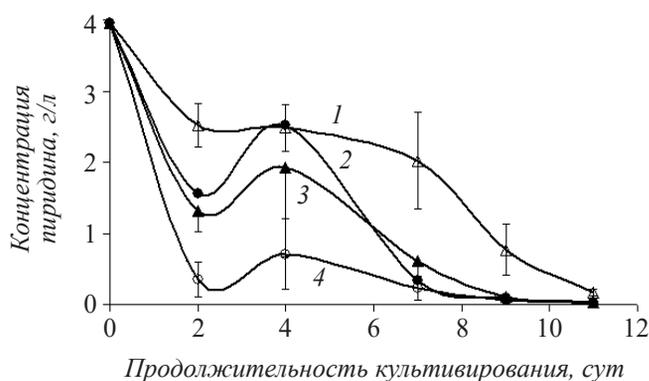
Наибольшая скорость утилизации пиридина, равная 1,8 г/(л сут), отмечена у биопленок *A. pulmonis* ПНОС на базальтовых волокнах. По данным электронной сканирующей микроскопии (рис. 6), на всех изученных волокнах наблюдали формирование массивных биопленок как *A. pulmonis* ПНОС, так и *B. dolosa* БОС. Наиболее массивные биопленки образовались на базальтовых волокнах – 13,6 мг/г носителя для *A. pulmonis*



**Рис. 3.** Утилизация 15,8 (1), 7,9 (2) и 4,0 (3) г/л пиридина с ко-субстратом глюкозой в процессе роста *A. pulmonis* ПНОС (а) и *B. dolosa* БОС (b).

**Fig. 3.** Utilization of 15,8 (1), 7,9 (2) and 4,0 (3) g/l pyridine with co-substrate glucose during the growth of *A. pulmonis* PNOS (a) and *B. dolosa* BOS (b).

## ДЕГРАДАЦИЯ ПИРИДИНА СУСПЕНЗИЯМИ И БИОПЛЕНКАМИ ШТАММОВ



**Рис. 4.** Утилизация пиридина биопленками *B. dolosa* БОС (1, 2) и *A. pulmonis* ПНОС (3, 4), выращенными на базальтовых волокнах (1, 4) и активированном Карбопоне (2, 3).

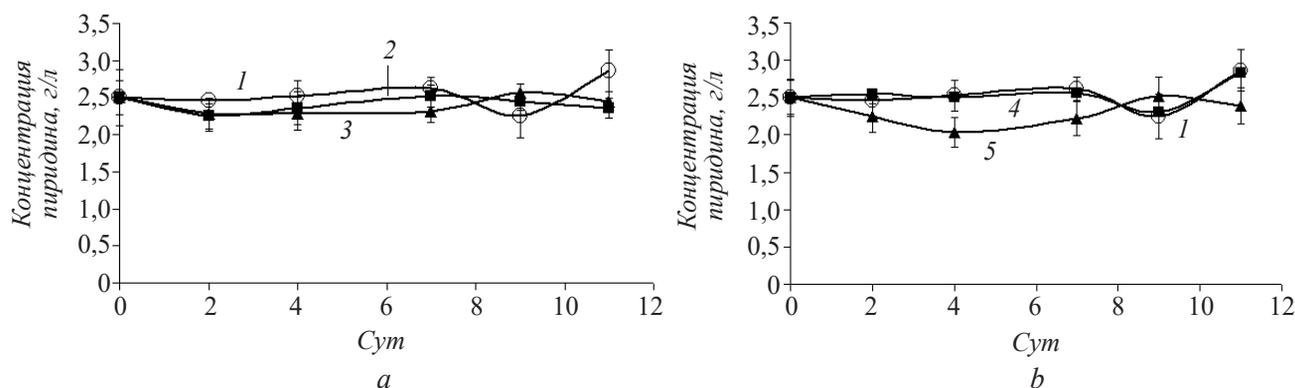
**Fig. 4.** Utilization of pyridine by *B. dolosa* BOS (1, 2) and *A. pulmonis* PNOS (3, 4) biofilms grown on basalt fibers (1, 4) and activated CarboPON (2, 3).

ПНОС и 11,2 мг/г для *B. dolosa* БОС, тогда как на активированном карбопоне масса биопленки составляла лишь 6,9 и 3,9 мг/г соответственно (табл. 2). Однако количество жизнеспособных клеток в биопленках обоих штаммов, выращенных на активированном карбопоне, превышает

такое на базальтовых волокнах. Биопленки на базальтовых волокнах могут иметь большую массу из-за более выраженного матрикса или за счет большего количества клеток, которые после деструкции пиридина частично отмирают.

Следует отметить, что полимерный матрикс защищает клетки бактерий в составе биопленок от неблагоприятных физико-химических факторов окружающей среды и воздействия токсичных соединений, что позволяет им более активно расти в присутствии высоких концентраций пиридина. На всех микрофотографиях бактериальные клетки не имеют четких очертаний, что связано с выделением клетками экзополисахаридов. Более эффективная и быстрая деструкция пиридина биопленками *A. pulmonis* ПНОС может быть обусловлена несколькими факторами: большей биомассой биопленки; меньшими диффузионными затруднениями, на которые влияет матрикс биопленки и структура зрелой биопленки (наличие или отсутствие каналов и пор); а также изменениями в метаболической активности клеток.

Продукты биотрансформации пиридина определяли методом хромато-масс-спектрометрии. При использовании методики 1 (см. «Условия эксперимента») была подтверждена утилизация



**Рис. 5.** Абиотический контроль (1) и адсорбция пиридина на базальтовых волокнах (2), активированном карбопоне (3), убитых клетках штамма *A. pulmonis* ПНОС (4) и штамма *B. dolosa* БОС (5) соответственно.

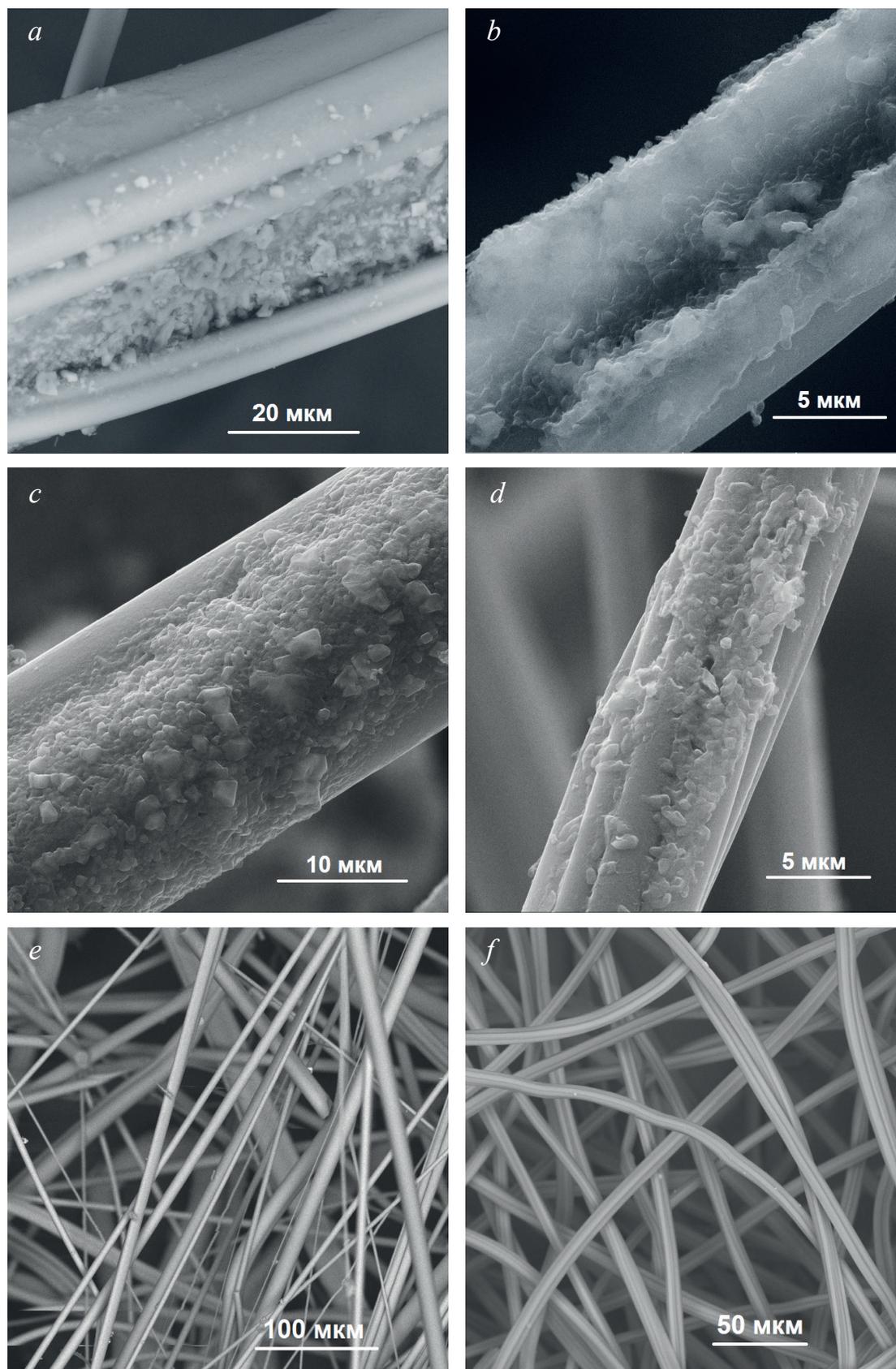
**Fig. 5.** Abiotic control (1) and pyridine adsorption on basalt fibers (2), activated CarboPON (3), killed cells of *A. pulmonis* PNOS (4) and *B. dolosa* BOS (5), respectively.

Таблица 2

### Характеристика бактериальных биопленок, утилизирующих пиридин

#### Characterization of bacterial biofilms utilizing pyridine

Штамм	Носитель	Масса биопленки, мг/г носителя	КОЕ/г носителя	КОЕ/г биопленки
<i>A. pulmonis</i> ПНОС	Базальтовое волокно	13,6	$(4,93 \pm 0,35) \cdot 10^8$	$(3,63 \pm 0,26) \cdot 10^{10}$
<i>A. pulmonis</i> ПНОС	Активированный Карбопон	6,9	$(3,60 \pm 0,18) \cdot 10^9$	$(5,22 \pm 0,26) \cdot 10^{11}$
<i>B. dolosa</i> БОС	Базальтовое волокно	11,2	$(1,47 \pm 0,35) \cdot 10^9$	$(1,31 \pm 0,31) \cdot 10^{11}$
<i>B. dolosa</i> БОС	Активированный Карбопон	3,9	$(2,16 \pm 0,78) \cdot 10^{10}$	$(1,00 \pm 0,20) \cdot 10^{13}$

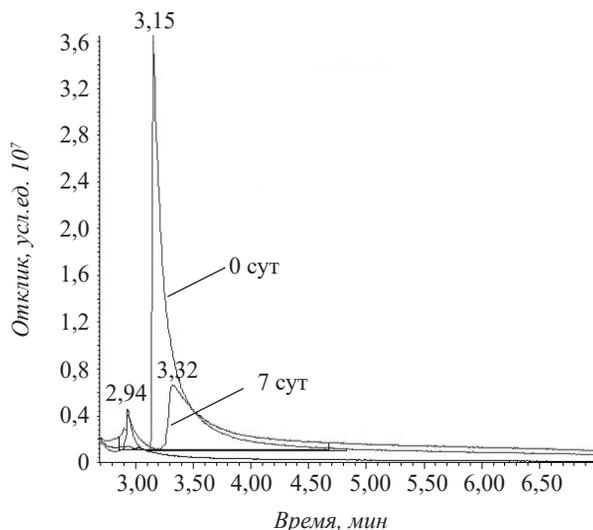


**Рис. 6.** Микрофотографии биофленок *A. pulmonis* ПНОС (a, b) и *B. dolosa* БОС (c, d) на базальтовом волокне (a, c) и активированном карбопоне (b, d). Базальтовые волокна (e) и активированный карбопон (f) без биофленок.

**Fig. 6.** Microphotographs of *A. pulmonis* PNOS (a, b) and *B. dolosa* BOS (c, d) biofilms on basalt fibers (a, c) and activated Carborone (b, d). Basalt fiber (e) and activated Carborone (f) without biofilms.

пиридина; время выхода пика составляло 3,15 и 3,32 мин в зависимости от концентрации пиридина в среде (рис. 7). Вещество, имеющее время выхода пика 2,94 мин, было идентифицировано как этиловый эфир пропановой кислоты. Концентрация данного вещества возрастала по мере убыли пиридина в процессе культивирования штаммов. Брутто-формула этилового эфира пропановой кислоты ( $C_5H_{10}O_2$ ) по количеству атомов углерода соответствует пиридину ( $C_5H_5N$ ). Можно предположить, что выделение в среду культивирования этилового эфира пропановой кислоты связано с метаболизмом пиридина. Для анализа продуктов метаболизма использовали методику 2, описанную в разделе «Условия эксперимента». На хроматограмме отсутствовали дополнительные пики, соответствующие другим продуктам метаболизма. Методика 3, использованная нами ранее для детекции никотинамида, не позволила обнаружить шестичленные гетероциклические соединения в среде.

В литературе имеются данные об утилизации пиридина бактериальными штаммами (табл. 3). Полная утилизация этого соединения штаммом *Rhizobium* sp. NJUST18 в растворе с начальной концентрацией не выше 1 г/л, достигалась за 102 ч [13]. Гранулы аэробного активного ила, в которых доминировали бактерии р. *Acinetobacter*, утилизировали 2,5 г/л пиридина в присутствии фенола за 25–40 ч [26], *Shewanella putrefaciens* и *Bacillus sphaericus* деградировали 0,5 г/л пиридина за 140 ч полностью и за 150 ч на 75%, соответственно [2]. *Streptomyces* sp. утилизировал 2 г/л пиридина за 8 дней (192 ч) [18], *Paracoccus* sp. – 0,9 г/л за 70 ч [6], *Paracoccus versutus* NJUST32 – 1 г/л за 36 ч [27], *Lysinibacillus cresolivorans* – 0,12 г/л за 55 ч [4], *Rhodococcus* sp. Chr-9 – 0,2 г/л в присутствии фенола и Cr (VI) за 30 ч [15], *Rhodococcus wratislaviensis* КМ-Р – 2,8 г/л пиридина за 26 ч [16]. Биомасса *Pseudomonas pseudoalcaligenes*-KPN, которой инокулировали реактор с активным илом, сконструированный по типу полного смешения, утилизировала до 0,2 г/л пиридина [10]. Внесение биомассы *Paracoccus denitrificans* W12 в мембранный биореактор для очистки сточных вод фармацевтического предприятия способствовало снижению концентрации пиридина с 0,25–0,5 г/л в инфлюенте до 10,2 мг/л в эфлюенте [28]. Пиридин в начальной концентрации 0,2, 1,0, и 1,5 г/л был утилизирован полностью за 4, 6 и 7 ч соответственно, тогда как в концентрации 2,0 г/л не подвергался полной деградации при 8-часовом цикле в реакторе периодического действия, заполненном гранулами аэробного активного ила [29]. На основании анализа литератур-



**Рис. 7.** ГХ-МС определение пиридина и метаболитов в культуральной жидкости. Пик 3,15 и 3,32 мин – пиридин, 2,94 мин – этиловый эфир пропановой кислоты.

**Fig. 7.** GC-MS determination of pyridine and metabolites in the culture media. Peak 3,15 and 3,32 min - pyridine, 2,94 min - ethyl ester of propanoic acid.

ных данных, касающихся биodeградации пиридина, можно заключить, что высокие концентрации контаминанта (более 2,8 г/л) не рассматривались. В нашем исследовании впервые была изучена биodeградация пиридина с участием штаммов *A. pulmonis* ПНОС и *B. dolosa* БОС в растворах с экстремально высокими (по сравнению с литературными данными) концентрациями компонента. Было показано, что данные штаммы в процессе роста утилизуют пиридин как единственный источник углерода и азота. В среде культивирования отмечена убыль пиридина, начальная концентрация которого составляла 15,8 и 7,9 г/л. Оптимальной для роста изученных штаммов являлась концентрация 4,0 г/л.

В литературе имеются данные об утилизации пиридина в присутствии косубстрата – глюкозы (табл. 3). *Paracoccus* sp. КТ-5 одновременно утилизировал 900 мг/л пиридина и 100 мг/л глюкозы. Несмотря на то, что этот штамм был способен расти на пиридине как единственном источнике углерода, добавление глюкозы способствовало более активному росту и не подавляло деградацию пиридина [6]. *Paracoccus* sp. NJUST30 за 48 ч полностью утилизировал 500 мг/л пиридина в присутствии 500 мг/л глюкозы, тогда как в среде без глюкозы этот процесс протекал за 52 ч. Однако дальнейшее увеличение концентрации глюкозы до 1–2 г/л приводило к ингибированию деградации пиридина [8]. Такая же зависимость деградации пиридина от концентрации глюкозы

Утилизация пиридина бактериальными штаммами в процессе культивирования

Utilization of pyridine by bacterial strains during cultivation

Биокатализатор	Концентрация пиридина, г/л	Время деградации, ч/%	ОП <sub>600max</sub> /C <sub>max</sub> , мг/л	Косубстрат или сопутствующее токсичное вещество в среде культивирования, г/л	Ссылка
Аэробный активный ил с преобладанием <i>Acinetobacter</i> sp.	2,5	25–40/100	–	фенол, 0,5	[26]
Аэробный активный ил в виде гранул, инокулированный <i>Rhizobium</i> sp. NJUST18	0,2	4/100	–	–	[29]
	1,0	6/100	–	–	
	1,5	7/100	–	–	
	2,0	8/95	–	–	
<i>Bacillus sphaericus</i>	0,5	150/75	1,2/–	–	[2]
<i>Lysinibacillus cresolivorans</i>	0,12	55/100	–/100	–	[4]
	0,03	27/100	–	м-крезол, 0,64	
	0,09	45/100	–	м-крезол, 0,6	
<i>Paracoccus</i> sp. KT-5	0,9	61/100	0,85/–	–	[6]
	0,9	61/100	0,9/–	Глюкоза, 0,1	
<i>Paracoccus versutus</i> NJUST32	1	36	–	–	[27]
<i>Paracoccus</i> sp. NJUST30	0,5	48/100	0,45/–	Глюкоза, 0,5	[8]
<i>Paracoccus</i> sp. BW001	2,614	49,5/100	2,81/–	–	[5]
	0,463	13/100	1,51/–	Глюкоза, не указано	
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> –KPN + активный ил	0,3	Непрерывный режим/97,7	0,21/–	–	[10]
<i>Rhodococcus</i> sp. Chr-9	0,2	25/100	0,3/–	–	[15]
	0,2	17–18/100	0,4/–	Фенол, 0,1	
	0,2	12/100	1/–	Cr (VI), 0,002+глюкоза, 5	
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> КМ-Р	2,8	26/100	–/1200	–	[16]
<i>Rhizobium</i> sp. NJUST18	1	102/100	–/491,7±17,6	–	[13]
<i>Rhizobium</i> sp. NJUST18	2,6	240/100	–/964,9±43,5	–	[14]
	1	102/100	–/491,7±17,6	–	
	1	100/100	–	Глюкоза, 0,5	
	1	100/100	–	Глюкоза, 0,5	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0,5	140/100	1,4/–	–	[2]
<i>Shinella zoogloeoides</i> BC026	1,806	45,5/100	–/288	–	[17]
	0,455	20/100	–/253	Глюкоза, не указано	
<i>Streptomyces</i> sp. HJ02	0,25	168/36,7	–	Сахароза, 5	[18]
	0,25	168/100	–	–	
	2	192/100	–	–	

наблюдалась при росте *Rhizobium* sp. NJUST18, что позволило авторам предположить, что низкие концентрации сахара стимулировали рост бактерий, тогда как высокие (более 500 мг/л) ингибировали деградацию пиридина [14]. Деградация пиридина штаммом *Paracoccus* sp. BW001 ускорялась в присутствии глюкозы [5], которая не влияла на деградацию пиридина штаммом *Shinella zoogloeoides* BC026 [17]. Присутствие глюкозы в среде культивирования стимулировало временное восстановление Cr (VI) и деградацию

пиридина штаммом *Rhodococcus* sp. Chr-9 [15]. Было изучено влияние сахарозы на деградацию пиридина штаммом *Streptomyces* sp. HJ02. Показано, что дополнительный источник углерода ингибировал утилизацию пиридина этим штаммом [18]. По нашим данным, *A. pulmonis* ПНОС с более высокой скоростью утилизировал пиридин в присутствии 1 г/л глюкозы, чем в ее отсутствие, тогда как деградация пиридина штаммом *B. dolosa* БОС в этих же условиях была подавлена. Следовательно, влияние дополнительного источника

## Дегградация пиридина иммобилизованными бактериальными клетками

## Pyridine degradation by immobilized bacterial cells

Биокатализатор	Носитель	Концентрация пиридина, г/л (г/м <sup>3</sup> /ч*)/ время деградации, ч (время работы биофильтра, год*)/% деградации	Биомасса	Ссылка
Смешанная культура <i>Paracoccus</i> sp. BW001 и <i>Pseudomonas</i> sp. BW003	Цеолит	0,25/14/98,7	–	[30]
<i>Paracoccus</i> sp. КТ-5	Активный уголь, полученный карбо- низацией бамбука	1,476/35/100	470–500 мг/г	[7]
<i>Pseudomonas</i> <i>pseudoalcaligenes</i>	Нейлоновые «веревки»	0,5/98 1/84	2·10 <sup>8</sup> КОЕ/г	[12]
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i> -KPN	Древесные опилки	434*/2*/99	9·10 <sup>6</sup> КОЕ/г	[11]

\*Газообразный пиридин (Pyridine gas)

углерода на деградацию пиридина зависит не только от концентрации глюкозы, но и от вида бактерий, что может быть связано с различием в экспрессии генов ферментов деградации этого токсичного вещества.

В литературе есть сведения об использовании иммобилизованных бактериальных клеток для биодеградации пиридина (табл. 4). Адсорбированные на цеолите *Pseudomonas* sp. эффективно осуществляли деградацию 250 мг/л пиридина [30]. При концентрации пиридина, превышающей 0,293 г/л, эффективность деградации штаммом *Paracoccus* sp. КТ-5 была значительно усилена путем иммобилизации клеток на активированном угле, полученном карбонизацией бамбука, при этом биомасса прикрепленных клеток увеличилась с 392 до 430–500 мг/г носителя [7]. Так как бактериальные клетки утилизируют пиридин в процессе роста, адгезированные на носителях клетки начинают делиться, образуя биопленку, с чем может быть связана более высокая скорость деградации этого токсичного вещества. Выращенные биопленки пиридин-деградирующих бактерий также были использованы в реакторах различной модификации. Деградацию пиридина проводили в биореакторе с вращающимися нейлоновыми «веревками», на которых были выращены биопленки смешанной аэробной культуры бактерий с преобладающими в ней представителями вида *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Эффективность очистки воды, содержащей до 1 г/л пиридина, в реакторе составляла более 85% при длительности работы реактора 13 недель [12]. Биопленки *P. pseudoalcaligenes*-KPN, выращенные на древесных опилках, очищали пиридин-содержащий газ в биофильтрах с эффективностью более 99% при нагрузке 434 г пиридина на 1 м<sup>3</sup> в час [11].

Нами была изучена утилизация пиридина биопленками *B. dolosa* БОС и *A. pulmonis* ПНОС, выращенными на базальтовых и углеродных волокнах. Было показано, что наиболее высокая скорость деградации пиридина наблюдалась у биопленок *A. pulmonis* ПНОС на базальтовых волокнах, при этом утилизация пиридина (4 г/л) составила 92% за 24 ч.

В литературе описаны различные схемы метаболизма пиридина (рис. 8), ключевым моментом которого является разрыв кольцевой структуры молекулы. *Arthrobacter* sp. КМ-4 при росте на среде с пиридином продуцировал семиальдегид сукцината путем образования в качестве промежуточных продуктов гидроксипиридина, фуранона-2, 2,5-пирролдiona, диксидроксипиридина, бутиролактона и, предположительно, пиперидиндиона [3]. *Bacillus* sp. разлагал пиридин до янтарной кислоты, муравьиной кислоты и аммиака, *Nocardia* sp. – до аммиака, углекислого газа и уксусной кислоты [31]. При росте *Shinella zoogloeoides* BC026 на среде с пиридином расщепление кольца происходило между вторым углеродом и азотом с последующим дезаминированием до глутарового диальдегида, за которым следовало последовательное окисление до глутарового семиальдегида, глутарата и ацетил-КоА [17]. Таким же образом расщеплялась кольцевая молекула пиридина между вторым углеродом и азотом при его деградации штаммом *Paracoccus* sp. BW001, и дальнейшая трансформация азота пиридина шла по пути гетеротрофной нитрификации с одновременной аэробной денитрификацией [5]. Предполагается, что анаэробная биодеградация содержащих азот гетероциклических соединений, в том числе пиридина, осуществляется в несколько этапов, которые включают раскрытие гетероциклического

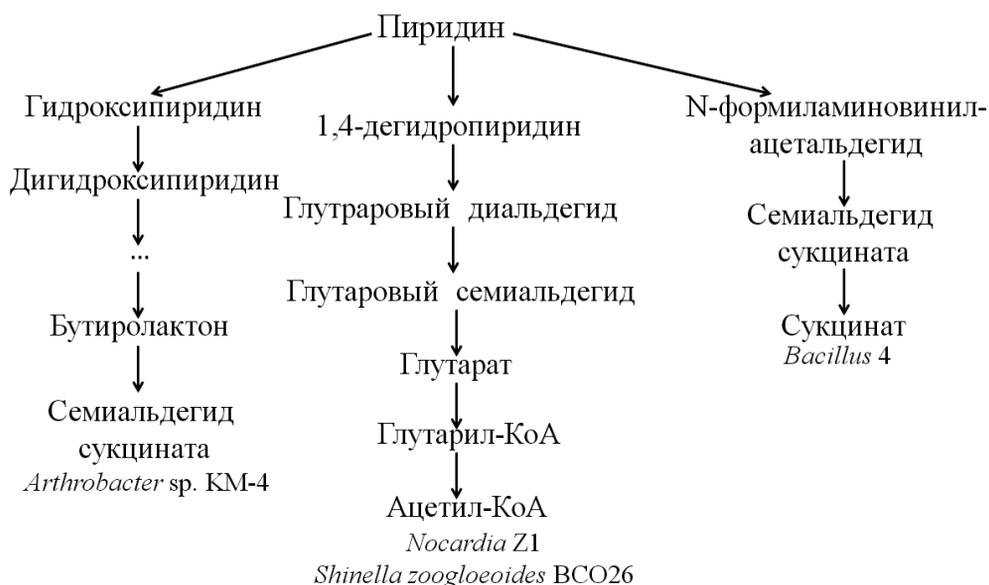


Рис. 8. Схема метаболизма пиридина у микроорганизмов [3, 17, 31]

Fig. 8. The scheme of pyridine metabolism in microorganisms [3, 17, 31]

кольца и удаление аммония. В результате разрыва двойной связи между азотом и углеродом и присоединения протона и метильной группы образуется 2-метилпиридин, после чего шестичленный цикл размыкается за счет разрыва связи N-C, происходит удаление аммонийного азота и образование 1,3-гексена [32].

При культивировании *A. pulmonis* ПНОС и *B. dolosa* БОС на среде с пиридином в среде культивирования детектируется алифатическое органическое соединение – этиловый эфир пропановой кислоты. Этот факт наряду с тем, что пиридин был единственным источником углерода и энергии, свидетельствует о раскрытии кольцевой структуры молекулы.

Таким образом, в работе было показано, что выделенные штаммы *A. pulmonis* ПНОС и *B. dolosa* БОС используют пиридин в качестве единственного источника углерода и азота. Оптимальной концентрацией гидрохлорида пиридина для роста выделенных штаммов является 4,0 г/л, убыль пиридина наблюдается при культивировании и при его высоких концентрациях (до 15,8 г/л). Наибольшая скорость утилизации пиридина, равная 1,8 г/(л сут), отмечена у биопленок *A. pulmonis* ПНОС на базальтовых волокнах. Глюкоза, добавленная в среду культивирования в концентрации 1 г/л, ускоряет процесс деградации пиридина штаммом *A. pulmonis* ПНОС, но подавляет его утилизацию штаммом *B. dolosa* БОС. Биомасса этих штаммов может быть использована для биоаугментации активного ила в очистных сооружениях нефтеперерабатывающих и коксо-

химических предприятий либо в виде биопленок в составе биофильтра, что обеспечит более эффективную очистку стоков от этого соединения.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят зав. лаб. геологии месторождений полезных ископаемых Горного института УрО РАН – филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, доктора геолого-минералогических наук И.И. Чайковского за помощь в электронной микроскопии образцов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Изучение функционального и видового разнообразия микроорганизмов, полезных для экоценозов и практической деятельности человека», регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290008-4.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mohan D., Singh K.P., Sinha S., Gosh D. Removal of pyridine derivatives from aqueous solution by activated carbons developed from agricultural waste materials. *Carbon*, 2005, 43, 1680–1693. doi: 10.1016/j.carbon.2005.02.017
2. Mathur A.K., Majumder C.B., Chatterjee S., Roy P. Biodegradation of pyridine by the new bacterial isolates *S. putrefaciens* and *B. sphaericus*. *J. Hazard. Mater.*, 2008, 157, 335–343. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.12.112
3. Khasaeva F., Vasilyuk N., Terentyev P. et al. A novel soil bacterial strain degrading pyridines. *Environ. Chem. Lett.*, 2011, 9, 439–445. doi: 10.1007/s10311-010-0299-6

4. Yao H., Ren Y., Deng X., Wei C. Dual substrates biodegradation kinetics of m-cresol and pyridine by *Lysinibacillus cresolivorans*. *J. Hazard. Mater.*, 2011, 186, 1136–1140. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.11.118
5. Bai Y., Sun Q., Zhao C. et al. Microbial degradation and metabolic pathway of pyridine by a *Paracoccus* sp. strain BW001. *Biodegradation*, 2008, 19, 915–926. doi: 10.1007/s10532-008-9193-3
6. Qiao L., Wang J.-l. Microbial degradation of pyridine by *Paracoccus* sp. isolated from contaminated soil. *J. Hazard. Mater.*, 2010, 176, 220–225. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.11.016
7. Qiao L., Wen D., Wang J. Biodegradation of pyridine by *Paracoccus* sp. KT-5 immobilized on bamboo-based activated carbon. *Bioresour. Technol.*, 2010, 101, 5229–5234. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.059
8. Wang J., Jiang X., Liu X. et al. Microbial degradation mechanism of pyridine by *Paracoccus* sp. NJUST30 newly isolated from aerobic granules. *Chem. Eng. J.*, 2018, 344, 86–94. doi: 10.1016/j.cej.2018.03.059
9. Mohan S.V., Sistla S., Guru R.K. et al. Microbial degradation of pyridine using *Pseudomonas* sp. and isolation of plasmid responsible for degradation. *Waste Manag.*, 2003, 23, 167–171. doi: 10.1016/S0956-053X(02)00150-2
10. Padoley K.V., Rajvaidya A.S., Subbarao T.V., Pandey R.A. Biodegradation of pyridine in a completely mixed activated sludge process. *Bioresour. Technol.*, 2006, 97, 1225–1236. doi: 10.1016/j.biortech.2005.05.020
11. Pandey R.A., Padoley K.V., Mukherji S.S. et al. Biotreatment of waste gas containing pyridine in a biofilter. *Bioresour. Technol.*, 2007, 98, 2258–2267. doi: 10.1016/j.biortech.2006.05.015
12. Mudliar S.N., Padoley K.V., Bhatt P. et al. Pyridine biodegradation in a novel rotating rope bioreactor. *Bioresour. Technol.*, 2008, 99, 1044–1051. doi: 10.1016/j.biortech.2007.02.039
13. Shen J., Zhang X., Chen D. et al. Kinetics study of pyridine biodegradation by a novel bacterial strain, *Rhizobium* sp. NJUST18. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2014, 37, 1185–1192. doi: 10.1007/s00449-013-1089-x
14. Shen J.Y., Zhang X., Chen D. et al. Characteristics of pyridine biodegradation by a novel bacterial strain, *Rhizobium* sp. NJUST18. *Desalin. Water Treat.*, 2015, 53, 2005–2013. doi: 10.1080/19443994.2014.915585
15. Sun J.-Q., Xu L., Tang Y.-Q. et al. Degradation of pyridine by one *Rhodococcus* strain in the presence of chromium (VI) or phenol. *J. Hazard Mater.*, 2011, 191, 62–68. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.04.034
16. Хасаева Ф.М., Василюк Н.В., Лебедев А.Т. и др. Штамм бактерий *Rhodococcus wratislaviensis* КМ-Р – деструктор незамещенного пиридина. *Вода: Химия и Экология*, 2010, 6, 29–35.
17. Bai Y., Sun Q., Zhao C. et al. Aerobic degradation of pyridine by a new bacterial strain, *Shinella zoogloeoides* BC026. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 36, 1391–1400. doi: 10.1007/s10295-009-0625-9
18. Li J., Cai W., Cai J. The characteristics and mechanisms of pyridine biodegradation by *Streptomyces* sp. *J. Hazard Mater.*, 2009, 165, 950–954. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.10.079
19. Хасаева Ф.М., Модянова Л.В., Воробьева Л.И., Терентьев П.Б. Биодegradация производных ряда пиридина I. *Arthrobacter crystallopoietes* КМ-4 – штамм-деструктор метил- и диметилпиридинов. *Биотехнология*, 2007, 3, 58–63.
20. Zhang C., Li M., Liu G. et al. Pyridine degradation in the microbial fuel cells. *J. Hazard Mater.*, 2009, 172, 465–471. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.027
21. Bayat Z., Hassanshahian M., Cappello S. Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: A mini review. *Open Microbiol. J.*, 2015, 9, 48–54. doi: 10.2174/1874285801509010048
22. Žur J., Wojcieszynska D., Guzik U. Metabolic responses of bacterial cells to immobilization. *Molecules*, 2016, 21 (7), 958. doi: 10.3390/molecules21070958
23. Singh R., Paul D., Jain R.K. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol.*, 2006, 14 (9), 389–397. doi: 10.1016/j.tim.2006.07.001
24. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017. 67:1613–1617. doi: 10.1099/ijsem.0.001755
25. Демаков В.А., Васильев Д.М., Максимова Ю.Г. и др. Бактерии активного ила биологических очистных сооружений, трансформирующие цианопиридины и амиды пиридинкарбоновых кислот. *Микробиология*, 2015, 84 (3), 369–378. doi: 10.7868/S0026365615030039
26. Adav S.S., Lee D.-J., Ren N.Q. Biodegradation of pyridine using aerobic granules in the presence of phenol. *Water Res.*, 2007, 41, 2903–2910. doi: 10.1016/j.watres.2007.03.038
27. Liang J., Li W., Zhang H. et al. Coaggregation mechanism of pyridine-degrading strains for the acceleration of the aerobic granulation process. *Chem. Eng. J.*, 2018, 338, 176–183. doi: 10.1016/j.cej.2018.01.029
28. Wen D., Zhang J., Xiong R. et al. Bioaugmentation with a pyridine-degrading bacterium in a membrane bioreactor treating pharmaceutical wastewater. *J. Environ. Sci.*, 2013, 25 (11), 2265–2271. doi: 10.1016/S1001-0742(12)60278-2
29. Liu X., Wu S., Zhang D. et al. Simultaneous pyridine biodegradation and nitrogen removal in an aerobic granular system. *J. Environ. Sci.*, 2018, 67, 318–329. doi: 10.1016/j.jes.2017.09.016
30. Bai Y., Sun Q., Xing R. et al. Removal of pyridine and quinoline by bio-zeolite composed of mixed degrading bacteria and modified zeolite. *J. Hazard Mater.*, 2010, 181, 916–922. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.05.099
31. Миндубаев А.З., Яхваров Д.Г. Биодegradации ксенобиотиков. *Бутлеровские сообщения*, 2013, 33 (3), 1–37.
32. Shi J., Xu C., Han Y., Han H. Enhanced anaerobic biodegradation efficiency and mechanism of quinoline, pyridine, and indole in coal gasification wastewater. *Chem. Eng. J.*, 2019, 361, 1019–1029. doi: 10.1016/j.cej.2018.12.162

# Pyridine Degradation by Suspensions and Biofilms of *Achromobacter pulmonis* PNOS and *Burkholderia dolosa* BOS Strains Isolated from Activated Sludge of Sewage Treatment Plants

Yu. G. MAKSIMOVA<sup>1,2,\*</sup>, A. A. SERGEEVA<sup>3</sup>, G. V. OVECHKINA<sup>1</sup>, and A. Yu. MAKSIMOV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Ural Branch, Perm, 614081 Russia*

<sup>2</sup>*Perm State National Research University, Perm, 614990 Russia*

<sup>3</sup>*SIBUR-KHIMPROM, Perm, 614055 Russia*

\*e-mail: maks@iegm.ru

Received October 31, 2019

Revised February 27, 2020

Accepted March 20, 2020

**Abstract**—Bacterial strains capable of degradation of 0.8–15.8 g/l pyridine hydrochloride have been isolated from activated sludge of municipal biological treatment plants in Perm (BOS) and local treatment facilities of the LUKOIL-Permnefteorgsintez enterprise (PNOS). The strains were identified as *Achromobacter pulmonis* and *Burkholderia dolosa*. The optimal pyridine concentration for the growth of the isolated strains was 4.0 g/l. The pyridine degradation during the *A. pulmonis* PNOS and *B. dolosa* BOS cultivation on a medium with ammonium chloride and glucose and without additional nitrogen or carbon sources was studied. It was shown that the strains are able to accumulate biomass in a medium with pyridine as the sole carbon and nitrogen source; the addition of glucose to the medium (1 g/L) accelerated the pyridine degradation by *A. pulmonis* PNOS, but inhibited the process carried out by *B. dolosa* BOS. *B. dolosa* BOS and *A. pulmonis* PNOS biofilms efficiently utilized pyridine during growth on basalt and carbon fibers; the highest rate of pyridine utilization (1.8 g/(L day)) was observed in *A. pulmonis* PNOS biofilms on basalt fibers.

**Key words:** pyridine, biodegradation, activated sludge, biofilms, *Achromobacter pulmonis*, *Burkholderia dolosa*

**Acknowledgements**—The authors grateful to Dr. I. I. Tchaikovsky, Head of the Laboratory of Geology of Mineral Deposits of the Mining Institute, a branch of the Perm Federal Research Center, for help with electron microscopy of the samples.

**Funding**—This work was carried out as part of a state assignment on the topic «Study of the Functional and Species Diversity of Microorganisms Useful for Ecocenoses and Human Practical Activity», registration number R&D AAAA-A19-119112290008-4.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-2-86-98