

Министерство образования и науки Российской Федерации
ОАНО Школа ЦПМ

**Микоремедиация: применение грибов для очистки окружающей
среды от полициклических ароматических углеводов (ПАУ)**

Работу выполнила:

Ученица класса 11Т

ОАНО Школа ЦПМ

Асманкина Анна Романовна

Научные руководители:

Железова Светлана Дмитриевна

Магистр МГУ имени М.В.Ломоносова

Москва, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1. Полиароматические углеводороды	6
1.2. Микоремедиация и ферменты	6
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	7
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	8
ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ	9
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	10
ПРИЛОЖЕНИЕ	

ВВЕДЕНИЕ

В условиях стремительного развития промышленности и урбанизации проблема загрязнения окружающей среды становится всё более острой. Традиционные методы очистки экосистем, основанные на использовании химических веществ, зачастую оказываются не только дорогостоящими, но и недостаточно эффективными. Более того, некоторые используемые вещества могут привести к образованию побочных продуктов, которые создают риск вторичного загрязнения и требуют дополнительной утилизации. В связи с этим всё больше внимания уделяется биоремедиации, которая является хорошей альтернативой традиционным методам. Живые организмы, используемые в биоремедиации, способны разлагать или накапливать широкий спектр органических и неорганических загрязнителей, при этом они сохраняют изначальный состав почвы, воды, не навредив другим компонентам экосистемы. [6]

Одним из видов биоремедиации является микоремедиация — метод, основанный на использовании грибов для очистки загрязнённых сред. Особый интерес вызывает способность грибов разрушать полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), которые высоко токсичны и устойчивы к разложению. Лакказа и вспомогательные ферменты, например, Mn-пероксидаза, вырабатываемые грибами во время роста, способны эффективно разрушать бензольные кольца в ПАУ до нетоксичных соединений [2]. Наибольшая активность лакказы характерна для грибов родов *Pleurotus* и *Fusarium*, что стало причиной их выбора в качестве объектов исследования [7]. Для оценки биodeградации в качестве индикатора были выбраны красители, содержащие три бензольных кольца, аналогично ПАУ.

Цель: Оценить способность некоторых штаммов грибов (*Pleurotus sp.*, *Fusarium sp.*) разлагать полициклические ароматические углеводороды, с использованием красителей "Бриллиантовый зелёный" и "Кристаллический фиолетовый" в качестве наглядных индикаторов разложения.

Задачи:

1. Изучить литературу по теме проекта.
2. Провести эксперимент, который доказывает способность выбранных штаммов разлагать модельные ПАУ.
3. Провести контрольный эксперимент без грибов, чтобы подтвердить, что разложение ПАУ происходит именно за счёт биологической активности грибов.
4. Проанализировать разложение модельных ПАУ с помощью оценки цвета среды.
5. Сделать выводы на основе полученных результатов.

Гипотеза: Грибы *Pleurotus sp.*, и *Fusarium sp.* разлагают полициклические ароматические углеводороды (ПАУ).

Значимость проекта: Данный проект может стать основой для разработки технологий, использующих микоремедиацию, по очистке водоёмов и почв от полиаренов в более крупных масштабах, что особенно актуально для регионов с высокой концентрацией токсина.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Полициклические ароматические углеводороды

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) - токсичные соединения, в составе которых содержится два и более конденсированных бензольных кольца [10]. Классифицировать полициклические ароматические углеводороды можно по числу конденсированных колец в их составе. ПАУ, которые содержат от 4-х кольца в составе, например, бенз(а)антрацен, бенз(а)-пирен и так далее, относят к 1-му классу опасности из-за их канцерогенных, мутагенных свойств [5]. Также они оказывают негативное влияние на среду, накапливаясь в ней, вызывают различные заболевания у живых организмов, самым распространенным является рак [9]. Поскольку ПАУ обладают низкой скоростью разложения (разрыв π -связи сложный и долговременный процесс) и гидрофобны они способны оседать в воздухе, позже попадая в водоёмы и почву [5]. Так, исследования показали аккумуляцию ПАУ (полициклических ароматических углеводородов) в водорослях озера Байкал. Эти токсичные соединения негативно влияют на водную экосистему, приводя к её деградации [4].

ПАУ являются побочными продуктами неполного сгорания органических материалов, таких как уголь, нефть, газ, древесина [10]. Отсюда можно сделать вывод, что самая высокая концентрация ПАУ наблюдается в районах с крупными промышленными предприятиями. В подтверждение этого можно привести исследование, которое показывает, что повышенные концентрации ПАУ характерно для зон города Новокузнецка с металлургическими и алюминиевыми заводами [1].

Таким образом, проблема загрязнения ПАУ требует повышенного внимания, а также мониторинга и принятия мер для исправления

экологической обстановки в промышленных регионах для минимизации негативного воздействия на окружающую среду и здоровье человека.

1.2 Микоремедиация и ферменты

Микоремедиация - одна из разновидностей on site биоремедиации [6]. Данный способ основан на использовании грибов, биodeградирующих некоторые токсичные соединения (включая ПАУ). Очищая экосистему, они выделяют ферменты, такие как Mn - пероксидазы и лакказы, которые разрушают сложные структуры за счёт окисления. Реакция окисления катализируется лакказами в присутствии Mn и легнин-пероксидаз и далее они восстанавливают радикалы до H₂O, CO₂ и соответствующих продуктов, не несущих опасности [2]. Преимущества микоремедиации заключаются в её простоте и низкой стоимости, поскольку она не требует дополнительного оборудования для транспортировки и утилизации почвы, воды, отходов и других сред [8]. За счёт естественного воздействия микоремедиация не оказывает негативного влияния на экосистему, так как изменения в окружающей среде происходят постепенно, не вызывая стресс у её обитателей. Кроме того, грибы способны адаптироваться к различным условиям, однако их диапазон толерантности ограничен. Важно соблюдать допустимый уровень pH, следить за наличием питательных веществ и кислорода, чтобы понять, способен ли гриб синтезировать необходимые ферменты [2].

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве модельных ПАУ были выбраны красители Бриллиантовый Зелёный и Кристаллический Фиолетовый. Они содержат по три конденсированных бензольных кольца и, подобно ПАУ, являются гидрофобными. При этом, в отличие от токсичных высокомолекулярных полиаренов, эти красители не наносят вреда. Это делает их удобными для лабораторных исследований и не несёт риски для здоровья.

Для эксперимента были подготовлены три питательные среды (см. прил. 1):

1. Агар и Бриллиантовый Зелёный (порошковый, 240 г.) , 250 мл.
2. Агар и Кристаллический Фиолетовый (порошковый, 240 г.) , 250 мл.
3. Агар без красителей, 250 мл.

И использованы два штамма грибов из коллекции кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В.Ломоносова:

1. *Pl. fusarium*
2. *Pl. ostreatus*

Среды стерилизовали автоклавированием при давлении 1 атмосфера и температуре 131°C в течение 15 минут. Далее, каждую из них разлили в чашки Петри и оставили на 30 минут до их застывания (см. прил. 2)

Посев на твёрдые питательные среды производился в стерильных условиях (см. прил. 3).

В результате были подготовлены (см. прил. 4):

1. Контрольные среды (бриллиантовый зелёный, кристаллический фиолетовый и агар) без культур (4 шт.)
2. Контрольные питательные среды без дополнительных веществ для каждого штамма (5 шт.).
3. Среда с бриллиантовым зелёным для каждого штамма (6 шт.).
4. Среда с кристаллическим фиолетовым для каждого штамма (5 шт.).

Грибы инкубировали при температуре 23–25°C в течение 7 дней. pH нейтральный. Контрольные среды без красителей хранились в таких же условиях.

По истечению 7 дней чашки вскрыли (см. прил. 5), измерили диаметр мицелия, а также с помощью микроскопирования определили его цвет, чтобы проверить аккумуляцию красителя.

С помощью эмпирического метода и измерения оценили степень разложения красителей.

По результатам эксперимента была составлена таблица (см. прил. 6) зависимости диаметра мицелия и области изменившего цвет мицелия от состава питательной среды.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Можно отметить, что наличие модельного ПАУ отрицательно влияет на рост мицелия: краситель замедляет его развитие, так как для разрушения бензольных колец требуется дополнительная энергия (например, она нужна для синтеза ферментов, способных разлагать сложные структуры). Однако, рост все равно наблюдается.

Микроскопирование мицелия показало, что гифы грибов не аккумуляруют краситель, они остались прежнего цвета (см. прил. 7).

Также нами отмечена связь между диаметром мицелия и диаметром области с изменённым цветом, где колония смогла окислить краситель (см. прил. 6). Это связано с тем, что по мере роста мицелия увеличивается количество вырабатываемых ферментов, необходимых для биодegradации полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). Данная закономерность особенно хорошо прослеживается у образцов с наибольшим диаметром мицелия. В других исследованиях результаты оказались похожи: трансформировалась окраска Блестящего Синего [11] и Гваякола [9], в этих зонах активно работают лакказа и остальные ферменты. В то же время у образцов с меньшим диаметром мицелия данная область либо выражена хуже, либо практически отсутствует.

Цвет контрольных групп без культур не изменился, следовательно, краситель разлагается только при участии грибов (см. прил. 5).

3. ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведённый эксперимент доказывает способность грибов разлагать красители Бриллиантовый Зелёный и Кристаллический Фиолетовый, что подтверждает их потенциал для очистки окружающей среды от токсичных органических загрязнителей, таких как ПАУ. Наличие области с ярким цветом вокруг мицелия указывает на синтез ферментов: вероятно, лакказы и Mn-пероксидазы, способных разрушать ароматические соединения. Гипотеза подтвердилась.
2. Контрольные группы без культур не изменили свой цвет, а значит изменение цвета происходит не произвольно, а из-за биологической активности грибов.

3. В некоторых образцах область деградации красителя слабо выражена или отсутствует, что может быть связано с неравномерным распределением ферментов или локальными различиями мицелия.
4. Для эффективной биоремедиации важно создать условия, способствующие быстрому росту мицелия, поскольку степень роста мицелия коррелирует с его ферментативной активностью.

В ходе данного исследования мы доказали, что ферменты, синтезируемые *Pleurotus sp.* и *Fusarium sp.*, способны безопасно разлагать сложные соединения, содержащие бензольные кольца, даже в условиях бедной питательной среды. Эти культуры можно рекомендовать для биоремедиации сред с высокой концентрацией ПАУ. Для эффективного процесса желательно создавать благоприятные условия, способствующие активному росту грибов, однако благодаря их высокой адаптивности разложение может происходить и без дополнительного вмешательства. Исследование также требует дальнейших экспериментов для оценки эффективности ферментов при разложении более токсичных соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Косой Г. Х., Хесина А. Я. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) в загрязнении атмосферного воздуха крупного промышленного центра // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 1994.
2. Поляк Ю. М., Сухаревич В. И. Почвенные ферменты и загрязнение почв: биodeградация, биоремедиация, биоиндикация // Агрoхимия. 2020. №3. С. 83-93.
3. Халиков И. С., Лукьянова Н. Н. Сезонная вариация содержания полициклических ароматических углеводородов в донных отложениях озера Байкал в районе г.

- Байкальска // XVI Международный научно-практический симпозиум и выставка "Чистая вода России-2021". Екатеринбург, 2021. С. 231-240.*
4. Халиков И. С., Лукьянова Н. Н., Пронин А. А. Полициклические ароматические углеводороды в макрофитах озера Байкал // *Современные методы и средства океанологических исследований (МСОИ-2019). Материалы XVI Всероссийской научно-технической конференции. Том I. – М.: ИД Академии Жуковского, 2019. С. 156-159.*
 5. Халиков И. С., Яхрюшин В. Н., Корунов А. О. Концентрация 4-6-ядерных ароматических углеводородов в воздухе городов России в зимнее время // *Экологическая химия. 2021. №30 (2). С. 59-70.*
 6. Янкевич М. И., Хадеева В. В., Мурьгина В. П. Биоремедиация почв: вчера, сегодня, завтра // *Биосфера. 2015. №2.*
 7. Akpasi, S.O.; Anekwe, I.M.S.; Tetteh, E.K.; Amune, U.O.; Shoyiga, H.O.; Mahlangu, T.P.; Kiambi, S.L. *Mycoremediation as a Potentially Promising Technology: Current Status and Prospects—A Review. Appl. Sci. 2023.*
 8. Nahid Akhtar, M. Amin-ul Mannan. *Mycoremediation: Expunging environmental pollutants // Biotechnology Reports, Volume 26, 2020.*
 9. Thrimothi D, Sujatha E, Swetha K. G, Krishna G. *Isolation, Screening, Identification, and Assessment of Laccase-Producing Fungi Isolated From Different Environmental Samples. Biotech Res Asia 2023.*
 10. *Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. U.S. Department of Health and Human Services, 1995.*
 11. Vinoth kumar, Vaidyanathan & Kirupha, Selvaraj & Manickam Periyaraman, Premkumar & Sivanesan, Subramanian. *Screening and induction of laccase activity in fungal species and its application in dye decolorization. African Journal of Microbiology Research. 5. 2011.*

Приложение №1

Среды в жидком состоянии



Приложение №2

Застывшие среды



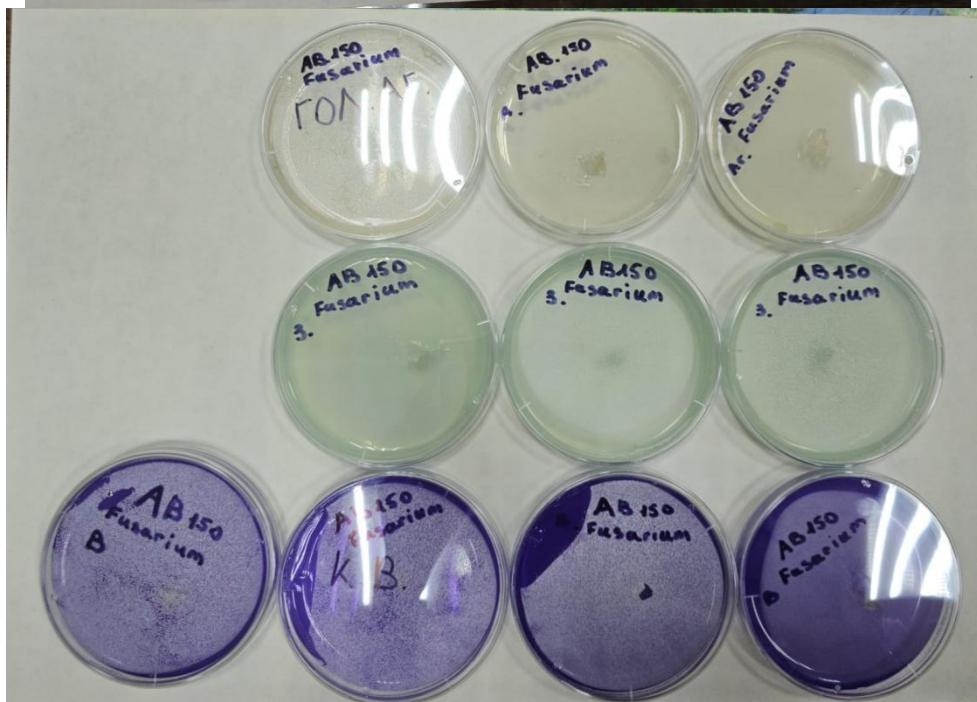
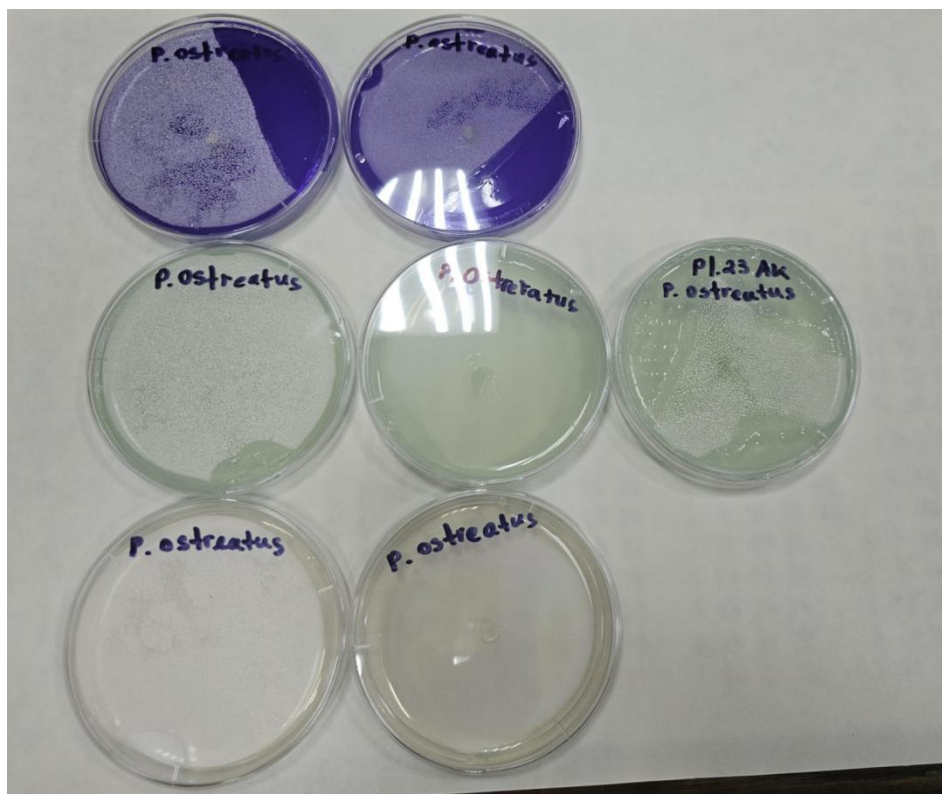
Приложение №3

Посев

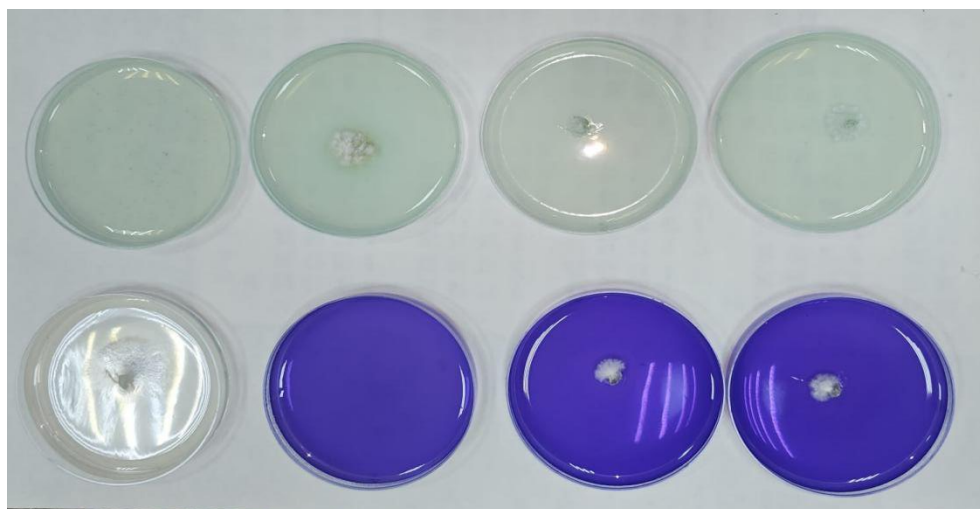
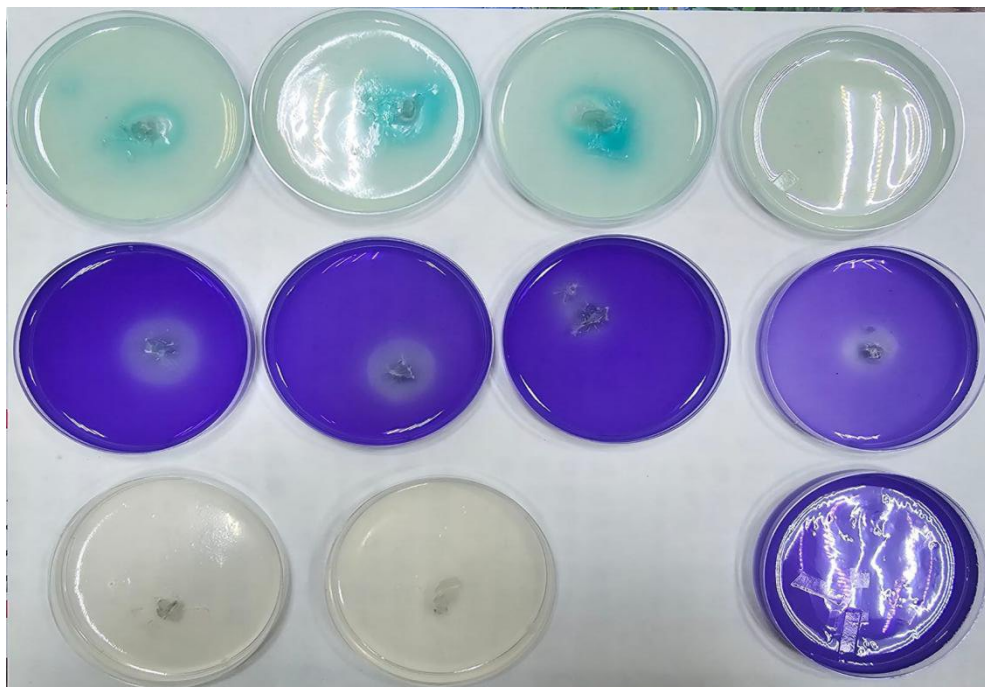


Приложение №4

Fusarium sp. и Pleurotus sp. 1-ый день



Приложение №5

Fusarium sp. и Pleurotus sp. 7-ый день

Приложение №6

Таблица №1

Род гриба	Среда	Д мицелия, мм	Д обесцвеченной области, мм
Fusarium sp.	Бриллиантовый зелёный	20	22
		21	23.5
		15	17
	Кристаллический фиолетовый	16	17
		21	23
		23	25
		15	16
	Агар	90	-
		90	-
	Pleurotus sp.	Бриллиантовый зелёный	20
20			22
10			-
Кристаллический фиолетовый		10	11
		12	12.5
Агар		45	-

Приложение №7

Гифы *Fusarium* sp. под увеличением x400