

УДК 579.66

## БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ КСИЛОТРОФНЫМ БАЗИДИОМИЦЕТОМ *Lentinula edodes*

© 2013 г. Е. П. Ветчинкина\*, А. М. Буров\*, М. В. Агеева\*\*, Л. А. Дыкман\*, В. Е. Никитина\*

\*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049

\*\*Казанский институт биохимии и биофизики РАН, Казань, 420111

e-mail: elenavetrus@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.07.2012 г.

Показано, что лекарственный базидиомицет *Lentinula edodes* восстанавливал ионы золота из тетра-хлороаурат (III) водорода (тетрахлорозолотая кислота) —  $\text{HAuCl}_4$  до элементного состояния с образованием сферических наночастиц. При глубинном выращивании культуры в присутствии золото-хлористоводородной кислоты было зафиксировано появление интенсивного сиренево-красного окрашивания мицелиальных гиф *L. edodes*, что может говорить о восстановлении ионов золота до золотых наночастиц. С использованием методов просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской флуоресценции наблюдали накопление коллоидного золота грибным мицелием в виде электронно-плотных сферических наночастиц диаметром от 5 до 50 нм как на поверхности, так и внутри грибных клеток.

DOI: 10.7868/S0555109913040132

Наночастицы в настоящее время находят широкое применение в медицине (синтез, доставка и утилизация лекарств, лечение рака), биологии (иммунные исследования, использование в качестве биомаркеров при изучении внутриклеточных процессов *in vivo*) и технологии (электроника, информационные технологии, получение новых материалов с улучшенными свойствами) [1]. Для синтеза наночастиц необходимой формы и размера было разработано множество физико-химических методов, однако несмотря на их успешное применение, они зачастую остаются дорогостоящими и требуют использования опасных химических соединений. Поэтому существует потребность в развитии безопасных для окружающей среды и человека эффективных методов синтеза различных наночастиц с применением, в частности, микробных биотехнологий [2]. О биологическом (“зеленом”, green) синтезе наночастиц золота, серебра, селена, платины, кварца и других соединений бактериями, актиномицетами, грибами, дрожжами и вирусами существует достаточно много сообщений, так как в настоящее время проводится активный поиск эффективных биообъектов для получения наночастиц различной химической природы [3–6]. Однако несмотря на стабильность, полученные биологически наночастицы не однородны, а синтез идет достаточно медленно. Чтобы преодолеть эти проблемы, необходимо всестороннее изучение всех факторов, влияющих на данный процесс, таких, как микробиологические методы культивирования, экстракции, ста-

билизации, расшифровка клеточных, биохимических и молекулярных механизмов для увеличения скорости синтеза и улучшения свойств наночастиц.

Кроме того, ввиду очень широкого разнообразия микроорганизмов необходимо вести исследования в направлении выявления новых перспективных объектов и изучения их потенциала как биологического материала для синтеза наночастиц. Исследователи отмечают способность к синтезу наночастиц золота и серебра у ряда низших грибов [7, 8]; сообщается также о синтезе наночастиц базидиомицетами *Volvariella volvacea* [9] и *Coriolus versicolor* [10], однако данные культуры высших грибов восстанавливали соединения в культуральной жидкости и не были способны к накоплению элементарных частиц внутри клеток. Данные литературы о получении наночастиц золота с помощью высших культивируемых базидиомицетов в настоящее время весьма немногочисленны.

Цель работы — изучение способности высшего целебного базидиомицета *Lentinula edodes* к синтезу золотых наночастиц и их накопление в мицелии.

### МЕТОДИКА

**Объект исследования и условия культивирования.** Объектом исследования послужил штамм ксилотрофного лекарственного базидиомицета *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] (шиитакэ) F-249 из коллекции высших

грибов кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Культуру поддерживали на 4%-ном пивном сусло-агаре при 4°C.

В условиях глубинного культивирования грибную культуру выращивали на синтетической среде состава (г/л): D-глюкоза – 1, L-аспарагин – 0.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 2.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.03, pH – 5.8. Культивирование проводили в колбах объемом 100 мл с 50 мл среды при 26°C, как оптимальной температуре роста мицелия для этого вида. В качестве инокулята брали 14-суточную культуру *L. edodes*, выращенную на агаризованной синтетической среде при 26°C.

При исследовании влияния на рост базидиомицета *L. edodes* золотосодержащего соединения и определении способности ксилотрофа к его восстановлению в жидкую синтетическую среду вносили в виде водного раствора золотохлористоводородную кислоту  $\text{HAuCl}_4$  (“Sigma-Aldrich”, США) в диапазоне концентраций от 10 до 500 мкМ. Растворы, используемые в качестве добавки к среде выращивания, были внесены в стерильных условиях непосредственно перед посевом отдельно в каждую из колб культивирования.

**Определение ростовых характеристик грибной культуры.** При глубинном культивировании рост шиитаке характеризовали по накоплению сухой биомассы. Мицелий фильтровали через предварительно взвешенные на аналитических весах фильтры, высушивали до постоянной массы и вновь взвешивали. Сравнивали прирост биомассы (по сравнению с 3-часовыми образцами культуры на данной среде) в контрольном и опытных вариантах.

Опыты по измерению ростовых характеристик и накоплению грибной биомассы проводили в 5–10 повторностях.

**Рентгеновская флуоресценция.** Для детектирования элементного золота и (или) соединений золота, содержащихся в мицелии гриба и культуральной жидкости, проводили рентгенофлуоресцентное исследование образцов мицелия и осадка среды культивирования. Для этого культура шиитаке была выращена на синтетической среде (контроль), вышеописанного состава, а также с добавлением 50 мкМ  $\text{HAuCl}_4$  (опыт) при 26°C в течение 14 сут. Далее выращенные образцы мицелия были отмыты от среды культивирования, собраны центрифугированием и высушены при комнатной температуре. Культуральная жидкость была подвергнута лиофилизации. Для обнаружения наночастиц внутри гиф грибной мицелий выращивали вышеописанным способом в присутствии 50 мкМ  $\text{HAuCl}_4$  14 сут, после чего отмывали от среды культивирования дистиллированной водой, собирали центрифугированием и подвергали лиофилизации,

затем грибные гифы механически разрушали и отделяли от элементарных частиц через фильтр Millipore (“Millipore Corp.”, США), с диаметром пор 0.22 мкм. Далее наночастицы ресуспендировали в минимальном объеме дистиллированной воды и высушивали на воздухе при 20°C. Анализ содержания золота в сухой биомассе, сухой культуральной жидкости и отфильтрованном материале проводили с помощью энергодисперсионного спектрометра модели ED 2000 (“Oxford Instruments”, Великобритания). Условия измерения были следующими: диапазон определяемых элементов от Na до U, рентгеновская трубка с серебряным анодом, напряжение на трубке 35 кВ, фильтр первичного рентгеновского излучения – тонкий серебряный, экспозиция 600 с, среда – воздух. Содержание определяемых элементов оценивали при помощи метода “фундаментальных параметров”, заложенных в программном обеспечении прибора.

**Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).** Образцы культур исследовали при помощи метода негативного контрастирования. Мицелий двукратно отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ): (г/л):  $\text{NaCl}$  – 8.5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 1.34,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.39, pH – 7.4, затем дистиллированной водой, предварительно пропущенной через фильтр Millipore (диаметр пор 0.22 мкм). Далее мицелиальные гифы ресуспендировали в минимальном объеме дистиллированной воды и наносили на никелевые сеточки с подложкой (1%-ный раствор формвара в дихлорэтаноле). После высыхания образца клетки контрастировали 1%-ным водным раствором уранилацетата [11].

Фиксацию грибных гиф для последующего получения ультратонких срезов проводили следующим образом. Мицелиальные гифы *L. edodes* собирали центрифугированием при 13000 g в течение 20 мин при комнатной температуре. Материал переносили в полипропиленовые пробирки объемом 2 мл и фиксировали в 0.5%-ном глутаровом альдегиде в течение 3 ч. Дальнейшую фиксацию проводили в растворе 2.5%-ного глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (0.1 М, pH – 7.2), в течение 12 ч. Затем материал выдерживали в 1%-ном растворе  $\text{OsO}_4$ , приготовленном на том же буфере, с добавлением 34 мг/мл сахарозы.

Дегидратацию образцов проводили в серии спиртов возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне. Затем препараты выдерживали в окиси пропилену 45 мин, пропитывали эпоксидной смолой ЭПОН и окисью пропилену по 24 ч в следующих соотношениях: 1) 1 : 2, 2) 1 : 1, 3) 2 : 1, и материал помещали в чистую смолу. Полимеризацию проводили при температурах 37°, 45° и 57°C по 24 ч. Ультратонкие срезы получали на микротоме (“LKB-III”, Швеция), монтировали на ни-



**Рис. 1.** Фотографии колб с культурой базидиомицета *L. edodes* штамм F-249, выращенной на синтетической среде в отсутствие (а – контроль) и присутствии 50 мкМ  $\text{HAuCl}_4$  (б) в течение 14 сут при 26°C.

келевые сеточки, окрашивали водным раствором уранилацетата [11] и цитратом свинца [12].

Для изучения наночастиц грибной мицелий выращивали вышеописанным способом в присутствии 50 мкМ золотохлористоводородной кислоты 14 сут, отмывали от среды культивирования дистиллированной водой, собирали центрифугированием и подвергали лиофилизации, затем грибные гифы механически разрушали и отделяли от элементарных частиц через фильтр Millipore (диаметр пор 0.22 мкм). Далее наночастицы ресуспендировали в минимальном объеме дистиллированной воды и наносили на никелевые сеточки с подложкой (1%-ный раствор формара в дихлорэтаноле).

Микрофотографии были получены на электронном микроскопе Libra 120 (“Carl Zeiss”, Германия) при 120 кэВ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние золотосодержащего соединения ( $\text{HAuCl}_4$ ) в среде культивирования на рост *L. edodes* F-249.** Первоначально была протестирована чувствительность базидиомицета *L. edodes* к золотохлористоводородной кислоте  $\text{HAuCl}_4$  и влияние данного соединения на ростовые характеристики и накопление биомассы грибного мицелия при глубинном

культивировании. Были определены концентрации, характеризующие токсичность золотосодержащего соединения для шиитакэ – ингибирующая рост культуры концентрация (минимальная концентрация, при которой было зафиксировано достоверное снижение прироста биомассы при выращивании в присутствии данного соединения) и летальная концентрация (минимальная концентрация, при которой наблюдалось полное отсутствие роста). Ингибирующая концентрация варьировала и составляла от 60 до 80 мкМ. При 300–500 мкМ рост полностью отсутствовал, а при 10 мкМ рост фактически не изменялся по сравнению с контролем.

Было отмечено, что в присутствии  $\text{HAuCl}_4$  в диапазоне концентраций 10–80 мкМ при культивировании *L. edodes* на жидкой синтетической среде уже на 3 сут мицелий начинал приобретать красновато-сиреневое окрашивание (рис. 1б), интенсивность которого зависела от концентрации золотосодержащего соединения: чем выше была его концентрация, тем сильнее окрашивался мицелий. Контрольная культура базидиомицета, которая выращивалась при аналогичных условиях, но без добавления в среду культивирования  $\text{HAuCl}_4$ , имела кремово-белый цвет на протяжении всего времени выращивания (рис. 1а). Именно изменение цвета колоний микроорганизмов, растущих в присутствии золотохлористоводородной кислоты от различных оттенков сиреневого до красного является первым признаком восстановления этого соединения до элементарного золота. Согласно данным литературы, такое окрашивание характерно для бактерий, водорослей и грибов, растущих на золотосодержащих средах, и указывает на накопление культурой элементарных наночастиц золота [9].

При концентрации 50 мкМ  $\text{HAuCl}_4$  наблюдался достаточно хороший рост культуры и интенсивное сиренево-красное окрашивание мицелиальных колоний, поэтому для всех последующих экспериментов мы выбрали именно эту концентрацию.

**Условия восстановления золотосодержащего соединения  $\text{HAuCl}_4$  культурой базидиомицета до элементарного состояния и локализация золотых наночастиц.** Культивирование в присутствии золотосодержащего соединения приводило к изменению как цвета грибных гиф, так и среды выращивания. Перед нами встал вопрос, с чем связано восстановление соединения до элементарного состояния – с грибной культурой или с химическим восстановлением под действием компонентов среды выращивания, а может с культуральной жидкостью, содержащей различные низко- и высокомолекулярные соединения жизнедеятельности гриба, в том числе и экстраклеточных ферментов. Для выяснения данного вопроса был проведен следующий экс-

перимент. Были взяты четыре типа колб: первые содержали синтетическую среду с золотохлористоводородной кислотой; вторые — дистиллированную воду с тем же соединением, третьи — культуральную жидкость, отфильтрованную от грибной культуры, полученную в результате выращивания шиитаке на синтетической среде в стандартных условиях без добавления  $\text{HAuCl}_4$ , четвертые содержали дистиллированную воду и 14-суточный контрольный мицелий *L. edodes*, выращенный на синтетической среде в стандартных условиях без добавления  $\text{HAuCl}_4$  и затем несколько раз отмытый от среды культивирования дистиллированной водой. К третьему и четвертому типам колб была добавлена золотохлористоводородная кислота в концентрации 50 мкМ. Все колбы были помещены в одинаковые условия на 14 сут, по истечении которых мы получили следующие результаты. Ни в первом случае, ни во втором случае восстановления золото содержащего соединения до элементного золота, изменения цвета и выпадения осадка не происходило, что говорит о непричастности дистиллированной воды или синтетической среды к процессу восстановления. В третьем случае — культуральная жидкость приобретала небольшое сиреневато-красное окрашивание, что свидетельствовало о присутствии в ней продуктов жизнедеятельности гриба, способных восстанавливать соединения золота до элементного состояния. В четвертом варианте эксперимента происходило, с нашей точки зрения, самое интересное: дистиллированная вода, в которой находился мицелий, оставалась прозрачной, а грибные гифы имели интенсивную сиренево-красную окраску, подтверждая, таким образом, предположение, что восстановление связано непосредственно с мицелием шиитаке. После интенсивного встряхивания и центрифугирования вода оставалась прозрачной, что позволило предположить внутриклеточную локализацию восстановленных частичек золота или, по крайней мере, очень сильное сцепление с поверхностью грибных гиф. Итак, можно сделать предварительный вывод о восстановлении и последующем накоплении частиц элементного золота либо на поверхности, либо внутри мицелиальных гиф *L. edodes*.

**Определение золота в мицелии с помощью рентгеновской флуоресценции.** Для данного анализа культура шиитаке была выращена в условиях глубинного культивирования на синтетической среде при 26°C в течение 14 сут в присутствии 50 мкМ  $\text{HAuCl}_4$ . Затем мицелий был высушен на воздухе при 20°C, а культуральная жидкость была подвергнута лиофилизации. Анализ грибных клеток и сухой культуральной среды методом рентгеновской флуоресценции показал значительное накопление золота в мицелии, растущем в присутствии золотохлористоводородной кислоты и содержание золота в культуральной жидкости

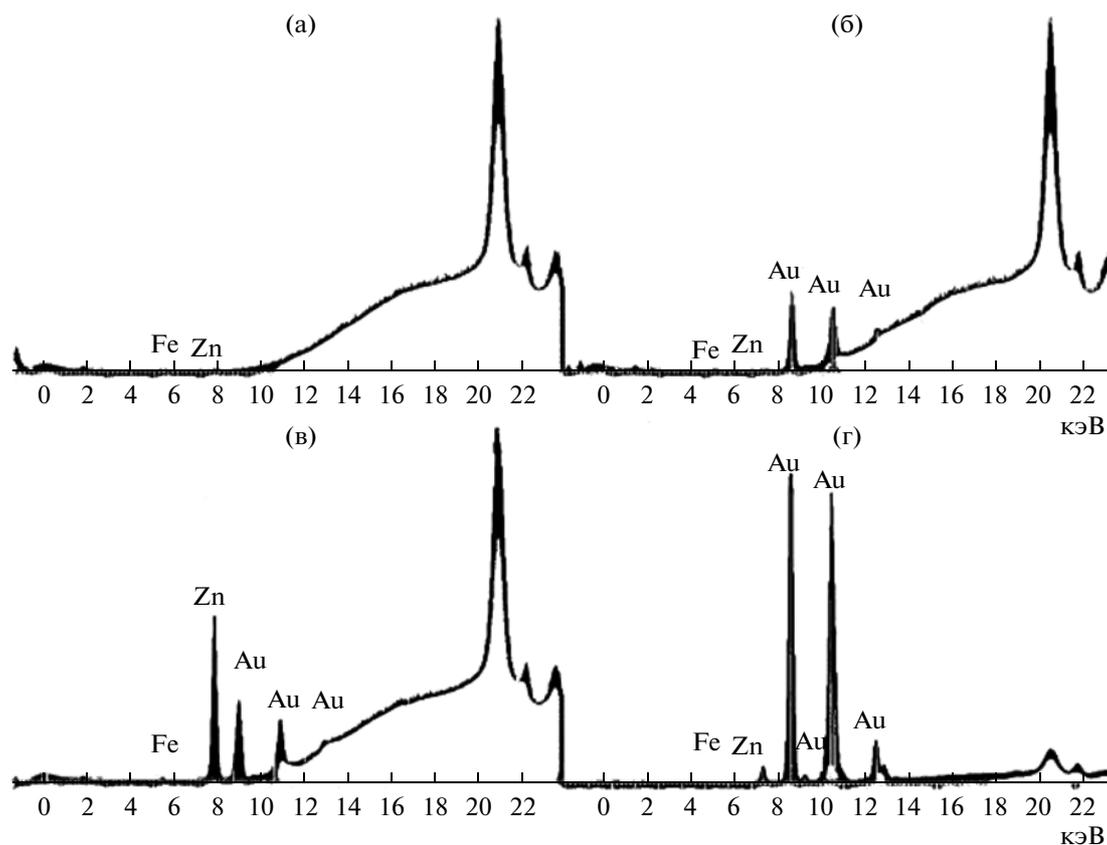
шиитаке, что характеризовалось появлением интенсивных эмиссионных линий, соответствующих золоту (рис. 2б, 2в). При этом спектры, снятые для контрольных культур, показали отсутствие золота (рис. 2а). Причем осадок культуральной жидкости шиитаке содержал большое количество цинка.

Для подтверждения того, что внутри гиф содержится именно золото, грибной мицелий выращивали вышеописанным способом в присутствии 50 мкМ  $\text{HAuCl}_4$  14 сут, подвергали механическому разрушению и отделяли от элементных частиц. Далее наночастицы были исследованы методом рентгеновской флуоресценции, наличие золота было определено по линиям при  $L\alpha_1$  — 9.713,  $L\beta_1$  — 11.443,  $L\beta_2$  — 11.585,  $L\gamma_1$  — 13.382 кэВ (рис. 2г).

**Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).** Было проведено исследование грибных гиф *L. edodes*, выращенных в присутствии 50 мкМ  $\text{HAuCl}_4$  в течение 14 сут методом негативного контрастирования. Не отмытый от культуральной среды мицелий шиитаке был нанесен на никелевые сеточки. Как видно на представленном рисунке (рис. 3), на поверхности мицелиальных гиф, а также около них наблюдали электронно-плотные образования сферической формы, отсутствующие в контроле. При этом размер данных частиц варьировал от 10 до 50 нм с преимущественным содержанием частиц диаметром около 20 нм.

Для подтверждения внутриклеточной локализации и накопления элементного золота внутри мицелия базидиомицета грибные гифы заливали в эпоксидную смолу для последующего получения поперечных ультратонких срезов. Результаты, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии, подтвердили наличие в цитоплазме гиф шиитаке электронно-плотных образований преимущественно сферической формы (рис. 4). Основная масса наночастиц имела размер от 10 до 15 нм, однако встречалось небольшое количество частиц 30–40 нм. Мы практически не обнаружили частиц на поверхности или внутри клеточной стенки, что может говорить о том, что частицы не проникали через клеточную стенку, а образовывались непосредственно в цитоплазме. Ранее наблюдавшиеся сцепленные частицы с поверхностью мицелиальных гиф, по-видимому, были удалены в процессе пробоподготовки, так как условия данного процесса довольно жесткие.

Для изучения наночастиц грибной мицелий, содержащий восстановленное золото, механически разрушали и отделяли от частиц, далее наночастицы ресуспендировали в дистиллированной воде и наносили на никелевые сеточки с подложкой. Отделенные фильтрованием и отмытые ча-



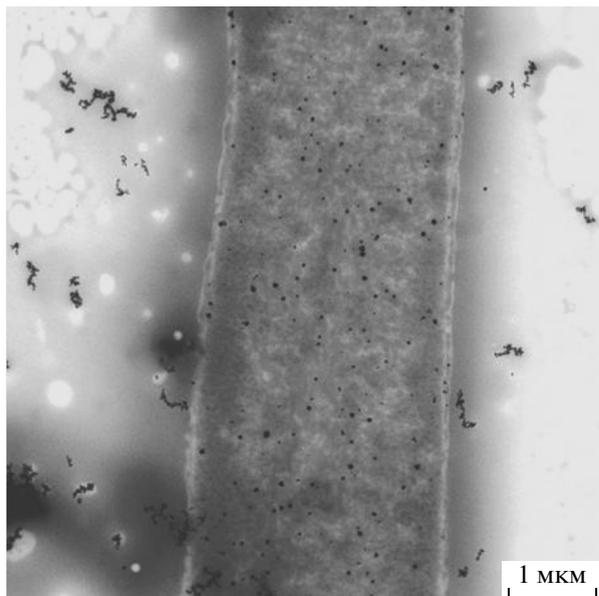
**Рис. 2.** Рентгеновский флуоресцентный анализ сухой биомассы мицелия *L. edodes* штамм F-249, выращенного на жидкой синтетической среде в отсутствие (а – контроль) и присутствии 50 мкМ  $\text{HAuCl}_4$  (б) в течение 14 сут при 26°C; анализ лиофилизованной культуральной жидкости шиитаке (в); результаты анализа чистых наночастиц (г). Золоту  $\text{Au}^0$  соответствуют эмиссионные линии при 9.713, 11.443, 11.585, 10.308 и 13.382 кэВ ( $L\alpha_1$ ,  $L\beta_1$ ,  $L\beta_2$ ,  $L\gamma_1$  соответственно).

стицы золота представляли собой довольно большое количество наносфер правильной формы, близких по размеру ~20 нм (рис. 5).

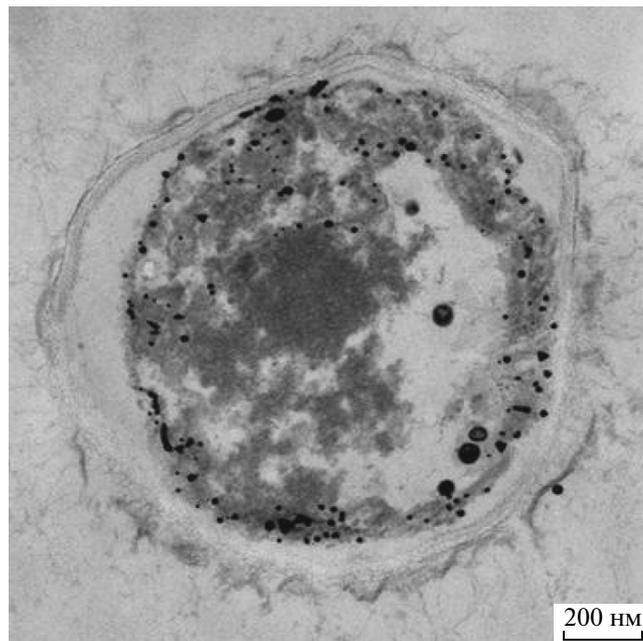
В последнее время актуальной областью исследований является синтез золотых наночастиц вследствие все более расширяющейся области их применения. Традиционно их синтезируют химическим способом с применением неорганических и органических соединений, использование которых экологически небезопасно. Поэтому перед исследователями встает вопрос поиска альтернативных путей синтеза наночастиц, ответом на который является биологический синтез с помощью микроорганизмов. В недавнем обзоре, посвященном синтезу наночастиц микроорганизмами, собрана последняя информация по данному вопросу [2]. Сведения о биотрансформации базидиальными грибами соединений золота с выделением его в элементной форме единичны. Однако высшие грибы могут быть благоприятным объектом в связи с их способностью накапливать высокие концентрации наночастиц. Установлено, что способностью к синтезу наночастиц золота обладают ряд низших грибов [7, 8]; а также некоторые бази-

диомицеты *Volvariella volvacea* [9] и *Coriolus versicolor* [10], но данные культуры высших грибов восстанавливали соединения в культуральной жидкости и не были способны к накоплению элементных частиц внутри клеток. На сегодняшний день мы не обнаружили информации о наночастицах золота, полученных путем биологического восстановления с помощью культуры базидиомицета *L. edodes*; мы не нашли ни фотографий этих частиц, ни описания их размеров, ни доказательств, что данные частицы способны накапливаться внутри грибного мицелия. В ходе нашей работы с применением методов рентгеновской флуоресценции и просвечивающей электронной микроскопии мы впервые получили данную информацию.

Известно, что различные микроорганизмы способны восстанавливать золото как внутриклеточно, так и внеклеточно [2]. Культивирование в присутствии золотосодержащего соединения приводило к изменению как цвета грибной культуры, так и среды выращивания. Мы выяснили, что компоненты синтетической среды к процессу восстановления не причастны. А культуральная жидкость и содер-



**Рис. 3.** Негативное контрастирование (ПЭМ) гиф мицелия базидиомицета *L. edodes* штамм F-249, выращенного на жидкой синтетической среде в присутствии 50 мкМ  $\text{HAuCl}_4$  в течение 14 сут при 26°C. Масштабная линейка – 1 мкм.

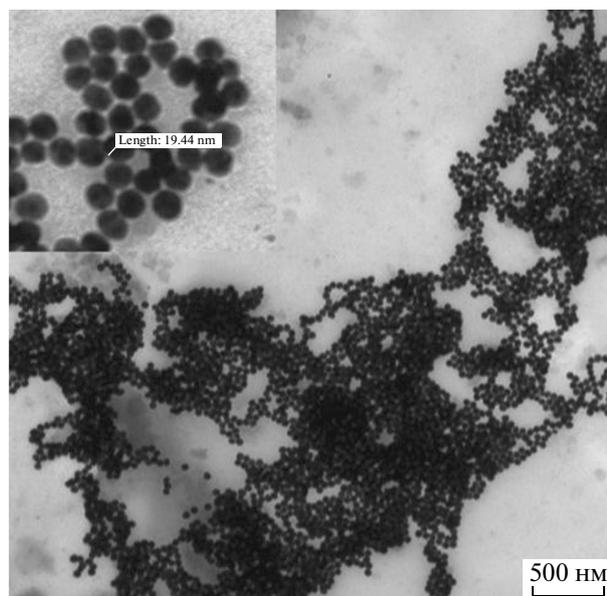


**Рис. 4.** Просвечивающая электронная микроскопия поперечного среза клетки базидиомицета *L. edodes* штамм F-249, залитой в эпоксидную смолу, после восстановления золота. Масштабная линейка – 200 нм.

жащиеся в ней различные соединения жизнедеятельности гриба, в том числе и экстраклеточные белки, способны восстанавливать соединения золота до элементного состояния. Также мы подтвердили наше предположение, что синтез золотых наночастиц связан непосредственно с мицелием *L. edodes*, наносферы  $\text{Au}^0$  были локализованы не только внеклеточно, но и в большом количестве накапливались внутри грибных клеток. В таком случае, опираясь на вышесказанное, можно говорить о том, что происходит биохимическое восстановление, напрямую связанное с метаболизмом высшего базидиомицета, не зависящее от химического восстановления под действием определенных компонентов среды. Поскольку накопление элементного золота в мицелии коррелирует с повышением концентрации  $\text{HAuCl}_4$  в среде культивирования, можно предположить, что разрушение этого соединения с образованием  $\text{Au}^0$  необходимо *L. edodes* для снижения его токсического действия, что характерно для многих микроорганизмов [13].

Таким образом, при культивировании лекарственного базидиомицета *L. edodes* в присутствии  $\text{HAuCl}_4$  при начальных концентрациях в синтетической среде выше 10 мкМ наблюдается сиреново-красное окрашивание мицелия, интенсивность и период возникновения которого зависят от концентрации золотосодержащего соединения. Методами рентгеновской флуоресценции и просвечивающей электронной микроскопии за-

регистрирована способность глубинной культуры шиитакэ к восстановлению  $\text{HAuCl}_4$  с образованием элементного золота. Данные электронной микроскопии показывают наличие на поверхности и внутри гиф гриба золотых наночастиц золо-



**Рис. 5.** Просвечивающая электронная микроскопия сферических наночастиц золота, полученных после разрушения мицелия *L. edodes* штамм F-249. Масштабная линейка – 500 нм.

та диаметром 5–50 нм. Накопление сферических золотых наночастиц внутри мицелиальных клеток высших базидиомицетов выявлено впервые. Биосинтез наносфер при помощи лекарственно-го высшего гриба шиитаке имеет особую актуальность в связи с простотой, доступностью и экологической безопасностью этого метода.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта корпорации “Сибирское здоровье”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krumov N., Perner-Nochta I., Oder S., Gotcheva V., Angelov A., Posten C. // Chem. Eng. Technol. 2009. V. 32. № 7. P. 1026–1035.
2. Narayanan K.B., Sakthivel N. // Adv. Colloid Interface Sci. 2010. V. 156. № 1. P. 1–13.
3. Durán N., Marcato P.D., De Souza G.I.H., Alves O.L., Esposito E. // J. Biomed. Nanotech. 2007. V. 3. № 4. P. 203–208.
4. Popescu M., Velea A., Lörcinczi A. // J. Nanomaterials Biostruct. 2010. V. 5. № 4. P. 1035–1040.
5. Metal Nanoparticles in Microbiology / Eds. M. Rai, N. Duran. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. 303 p.
6. Musarrat J., Dwivedi S., Singh B.R., Saquib Q., Al-Khedhairi A.A. // Microbes and Microbial Technol.: Agricultural and Environmental Applications / Eds. I. Ahmad, F. Ahmad, J. Pichtel. N.Y.: Springer Science+Business Media, LLC, 2011. P. 101–126.
7. Sastry M., Ahmad A., Khan M.I., Kumar R. // Curr. Sci. 2003. V. 85. № 2. P. 162–170.
8. Mourato A., Gadanho M., Lino A.R., Tenreiro R. // Bioinorg. Chem. Appl. 2011. V. 1. № 3. P. 241–248.
9. Philip D. // Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc. 2009. V. 73. № 2. P. 374–381.
10. Sanghi R., Verma P. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. № 5. P. 501–504.
11. Tandler B. // J. Electron. Microsc. Technol. 1990. V. 16. № 6. P. 1505–1517.
12. Reynolds E.S. // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. № 1. P. 208–212.
13. Garbisu C., Ishii T., Leighton T., Buchanan B.B. // Chem. Geology. 1996. V. 132. № 4. P. 199–204.

## Biological Synthesis of Gold Nanoparticles by the Xylotrophic Basidiomycete *Lentinula edodes*

E. P. Vetchinkina<sup>a</sup>, A. M. Burov<sup>a</sup>, M. V. Ageeva<sup>b</sup>, L. A. Dykman<sup>a</sup>, and V. E. Nikitina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia  
e-mail: elenavetrus@yandex.ru

<sup>b</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia

Received July 5, 2012

**Abstract**—This is the first study to demonstrate that the medicinal basidiomycete *Lentinula edodes* can reduce gold (III) ions from hydrogen tetrachloraurate (chloroauric acid) H[AuCl<sub>4</sub>] to the elementary state with the formation of spherical nanoparticles (nanospheres). When a culture was grown under submerged conditions in the presence of chloroauric acid, the appearance of an intense purple-red color of *L. edodes* filamentous hyphae was recorded, which indicates that gold ions were reduced to gold nanoparticles. Using transmission electron microscopy and X-ray fluorescence, we observed accumulation of colloidal gold by the fungal mycelium in the form of electron-dense nanospheres of 5 to 50 nm in diameter on the surface and inside fungal cells.