



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ САПРОТРОФНЫМИ БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП

Ветчинкина Е.П., Лощинина Е.А., Купряшина М.А., Буров А.М., Пылаев Т.Е., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратов, 410049, Проспект Энтузиастов 13, e-mail: elenavetrus@yandex.ru

Резюме

В работе показана способность сапротрофных грибов разных экологических групп – гумусовых (*Agaricus bisporus*, *A. arvensis*) и ксилотрофных базидиомицетов (*Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*) к восстановлению ионов золота, серебра и селена до элементного состояния с образованием наночастиц. Рассмотрено влияние соединений металлов и металлоидов на параметры роста и накопления биомассы грибов; определены оптимальные условия культивирования и концентрации изученных ионсодержащих соединений для получения наночастиц. Экстра- и внутриклеточные экстракты из базидиальных грибов были способны к биоредукции соединений HAuCl_4 , AgNO_3 и Na_2SeO_3 до Au^0 , Ag^0 и Se^0/SeO_2 с образованием наночастиц, а также к образованию наночастиц кремния из Na_2SiO_3 . Форма, размер и агрегационные свойства наночастиц зависели как от видов грибов, так и от типа экстракта. Цитотоксичность образующихся наночастиц Au^0 была пренебрежимо мала в широком диапазоне концентраций (от 1 до 100 мкг/мл), тогда как наночастицы Ag^0 были нетоксичными от 1 до 10 мкг/мл.

Ключевые слова: наночастицы, «зеленый синтез», сапротрофные базидиальные макромицеты, внеклеточные и внутриклеточные экстракты.

Цитирование - Ветчинкина Е.П., Лощинина Е.А., Купряшина М.А., Буров А.М., Пылаев Т.Е., Никитина В.Е. Синтез наночастиц сапротрофными базидиальными грибами разных экологических групп. *Биомика*. 2018. Т.10(2). С. 147-152. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-18

NANOPARTICLE SYNTHESIS BY SAPROTROPHIC BASIDIAL FUNGI OF DIFFERENT ECOLOGICAL GROUPS

Vetchinkina E.P., Loshchinina E.A., Kupryashina M.A., Burov A.M., Pylaev T.E., Nikitina V.E.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
13 Pr. Entuziastov, Saratov 410049, Russian Federation, e-mail: elenavetrus@yandex.ru

Resume

The work shows the ability of humus basidiomycetes (*Agaricus bisporus*, *A. arvensis*) and xylophilic basidiomycetes (*Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*) to recover gold, silver, and selenium, to the elemental state with nanoparticle formation. It examines the effect of these metal and metalloid compounds on the growth parameters and biomass accumulation; the optimal cultivation conditions and concentrations of the studied ion-containing compounds for recovery of nanoparticles have been evaluated. Extra- and intracellular extracts from the basidial fungi reduced HAuCl_4 , AgNO_3 , and Na_2SeO_3 , to nanoparticles of Au^0 , Ag^0 , and Se^0/SeO_2 , and also formed nanoparticles from Na_2SiO_3 . The shape, size, and aggregation properties of the particles depended both on the fungal species and on the extract type. The cytotoxicity of the formed Au^0 nanoparticles for Vero cells was negligible in a broad concentration range (1 to 100 $\mu\text{g/mL}$), while the Ag^0 nanoparticles were nontoxic only from 1 to 10 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: nanoparticles; green synthesis; saprotrophic basidial fungi; extra- and intracellular extracts.

Citation - Vetchinkina E.P., Loshchinina E.A., Kupryashina M.A., Burov A.M., Pylaev T.E., Nikitina V.E. Nanoparticle synthesis by saprotrophic basidial fungi of different ecological groups. *Biomics*. 2018. V.10(2). P.147-152. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-18 [In Russian]

Введение

Сапротрофные грибы разных экологических групп являются активными почвообразователями, которые могут разрушать различные органические и неорганические субстраты, выделяя в среду обитания гидролитические ферменты и органические кислоты [Castro-Longoria, 2016]. Чрезвычайно эффективные ферментативные системы грибов позволяют им разрушать сложные небелковые полимеры, такие как лигноцеллюлоза и хитин, труднодоступные или полностью недоступные для большинства прокариот, а также превращать ионы тяжелых металлов и другие микроэлементы в менее токсичные формы [Atila et al., 2017]. Эта способность сапротрофных грибов может быть использована для восстановления ионов металлов и металлоидов до элементного состояния с образованием наночастиц (НЧ). В последнее время широкое распространение получил экологически чистый «зеленый» синтез НЧ с использованием живых культур бактерий, грибов, растений, водорослей [Asmathunisha et al., 2013; Kharissova et al., 2013; Singh et al., 2016]. Съедобные сапротрофные базидиомицеты перспективны для биотехнологического получения НЧ, поскольку они выращиваются в чистой культуре, не являются токсичными или патогенными и продуцируют широкий спектр активных белковых молекул, оставаясь в то же время менее изученными в этой области по сравнению с бактериями и низшими грибами.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования в данной работе использовали ксилотрофные базидиомицеты *L. edodes* (Berk.) Sing штамм F-249, *G. frondosa* (Fr.) S.F. Gray штамм 0917, *G. lucidum* (Curtis: Fr.) штамм 1315, *P. ostreatus* (Fr.) Kumm. штамм НК-35 и почвенные (гумусовые) базидиомицеты *A. bisporus* (J.E. Lange) Imbach штамм 512 и *A. arvensis* Schaeff. sp., полученные из коллекции высших базидиальных грибов кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова и коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Культуры хранили в коллекции высших грибов лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН на косяках с агаризованным (2%) пивным 4° сусликом при 4°C. Грибы выращивали в условиях твердофазного (с добавлением 2% агар-агара) и глубинного культивирования на синтетической среде следующего состава (г/л): D-глюкоза – 1; L-аспарагин

– 0,1; KH_2PO_4 – 2; K_2HPO_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); на чашках Петри или при стационарных условиях в колбах объемом 100 мл с 50 мл среды при 26°C. В среду стерильно вносили растворы HAuCl_4 , AgNO_3 , Na_2SeO_3 , Na_2SiO_3 в диапазоне концентраций от 0,5 μM до 5 мМ (Sigma-Aldrich, США).

Результаты и обсуждение

Исследование особенностей роста сапротрофных базидиомицетов на средах, содержащих соединения золота, серебра, селена и кремния, выявило ряд общих закономерностей. Установлено, что при твердофазном и глубинном выращивании с добавлением в среду ионов металлов (золота и серебра) для всех грибов рост мицелия ухудшался по мере возрастания их концентраций в среде культивирования. Показано, что низкие концентрации соединений селена и кремния стимулировали рост грибов при глубинном и твердофазном культивировании, высокие – обладали значительным ингибирующим эффектом. Были определены оптимальные концентрации ионов металлов и металлоидов, при которых наблюдается интенсивное биообразование НЧ и незначительное ингибирование роста грибных культур. Для золотохлористоводородной кислоты эта концентрация составила 50 μM , а для нитрата серебра, селенита и силиката натрия – 0,5 мМ. При культивировании базидиомицетов на средах с добавлением Na_2SeO_3 мицелий приобретал оранжево-красное окрашивание. Появление подобной окраски у колоний микроорганизмов, растущих на селеносодержащих средах, свидетельствует о накоплении культурами красного элементного селена [Sarkar et al., 2011; Zare et al., 2013]. Добавление в среду выращивания HAuCl_4 или AgNO_3 при культивировании грибов на жидкой синтетической среде уже на вторые сутки вызывало, соответственно, сиренево-красное или рыжевато-бурое окрашивание грибных гиф, а также культуральной жидкости, с разной степенью интенсивности, что является признаком восстановления золота [Mukherjee et al., 2001; Binupriya et al., 2010] и серебра [Bhainsa et al., 2006; Kathiresan et al., 2009; Ingle et al., 2008] до элементного состояния. При культивировании на среде с добавлением разных концентраций Na_2SiO_3 окрашивания среды и гиф не наблюдалось. С помощью просвечивающей электронной

микроскопии (ПЭМ) была подтверждена способность изучаемых грибных культур к биообразованию НЧ золота, серебра, селена и кремния. В исследуемых образцах было обнаружено большое количество

электронно-плотных образований, различающихся по количеству, локализации и размеру в зависимости от культуры, с помощью которой они были образованы, и исследуемых соединений.

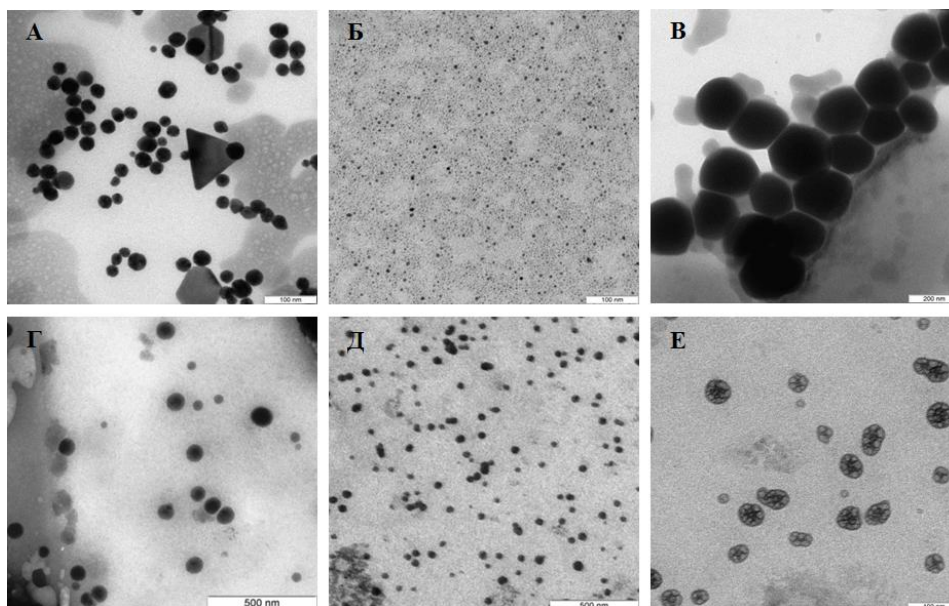


Рисунок 1. ПЭМ наночастиц: внутриклеточный экстракт: *L. edodes* AuНЧ (А), *G. frondosa* AgНЧ (Б), *A. arvensis* SeНЧ (В) и внеклеточный экстракт (культуральная жидкость): *P. ostreatus* SeНЧ (Г), *G. lucidum* SiНЧ (Д), *A. bisporus* SiНЧ (Е); масштаб – 100, 200 и 500 нм.

Figure 1. TEM of nanoparticles: intracellular extracts from *L. edodes* AuNP (A), *G. frondosa* AgNP (B), *A. arvensis* SeNP (C) and extracellular extracts from *P. ostreatus* SeNP (D), *G. lucidum* SiNP (E), *A. bisporus* SiNP (F); bar marker – 100, 200, and 500 nm

Более удобным методом получения биогенных НЧ может быть использование грибных экстрактов и культуральных жидкостей, поскольку такой способ не требует проводить отделение частиц от клеток микроорганизмов. Культуральную жидкость отделяли от мицелия центрифугированием при 12000 *g* и фильтровали. Для получения белковых внутриклеточных экстрактов грибной мицелий отделяли от среды культивирования, механически измельчали при 18°C с помощью фарфоровой ступки, пестика и кварцевого песка, разрушая клеточную оболочку, экстрагировали 15 минут 20 mM Na-K-фосфатным буфером (pH 6,0), центрифугировали 10 минут при 12000 *g*, фильтровали и диализовали против воды. Далее была изучена способность внеклеточных (культуральных жидкостей) и внутриклеточных экстрактов из глубинного мицелия изучаемых базидиомицетов к образованию НЧ *in vitro*, полученные суспензии НЧ исследовали методом ПЭМ (Рис. 1). При инкубации культуральной жидкости *L. edodes*, *P. ostreatus* и *G. frondosa* с золотохлористоводородной кислотой образовывались достаточно однородные, мелкие,

преимущественно сферические НЧ от 2 до 20 нм. С помощью *G. lucidum* образовывались частицы менее правильной формы размером 5–60 нм. Культуральная жидкость шампиньонов также образовывала мелкие золотые наносферы диаметром 2–10 нм.

Частицы золота, полученные с помощью внутриклеточных мицелиальных экстрактов *L. edodes*, *P. ostreatus* и *A. bisporus*, сильно отличались по размеру и форме, были в несколько раз крупнее и содержали некоторое количество еще более крупных частиц (30–100 нм) шести-, четырех- и треугольной формы. Такая же, но менее выраженная, разница между культуральной жидкостью и экстрактом наблюдалась у *G. lucidum* и *G. frondosa*. С экстрактом *A. arvensis* образовывались НЧ неправильной формы размером около 25–50 нм. Обратная картина наблюдалась в случае с нитратом серебра. При инкубации культуральной жидкости *L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *G. frondosa*, *A. bisporus* и *A. arvensis* с нитратом серебра синтезировались частицы сферической или неправильной формы, слипавшиеся в конгломераты. Напротив, с мицелиальными экстрактами образовывались мелкие однородные

частицы 1–10 нм. НЧ селена, образованные под влиянием культуральной жидкости *L. edodes* и *P. ostreatus*, имели правильную сферическую форму и размер около 100 нм. С экстрактами мицелия этих видов образовывались НЧ того же размера, но менее правильной формы. С культуральной средой *G. lucidum* и *G. frondosa* синтезировались однородные наносферы около 50 нм, часть из которых агрегировала, а с экстрактами – крупные сферические частицы до 300–350 нм. Диаметр сферических частиц селена, образованных *A. bisporus*, составил 100–250 нм, *A. arvensis* – 150–550 нм, с мицелиальными экстрактами шампиньонов синтезировались НЧ 40–140 нм и 100–250 нм соответственно.

При инкубации Na_2SiO_3 с культуральными жидкостями были обнаружены кремниевые НЧ, которые у *L. edodes* и *G. lucidum* были более крупными и не агрегировали между собой, тогда как у *P. ostreatus* и *G. frondosa* образовывались очень мелкие НЧ, слипавшиеся в конгломераты. Кремниевые НЧ, образованные под действием культуральных жидкостей шампиньонов имели мезопористую структуру. У *A. bisporus* преобладали НЧ диаметром 30–65 нм с размером пор 10–15 нм, у *A. arvensis* – НЧ 50–200 нм (Рис. 1).

Была установлена возможность влияния на размер НЧ благородных металлов и их процентное соотношение в зависимости от возраста грибной культуры. Базидиомицет *L. edodes* выращивали в течение 7 и 14 суток на синтетической среде в условиях глубинного культивирования. Культуральную жидкость отделяли от мицелия центрифугированием. Бесклеточный фильтрат инкубировали 30 минут с водным раствором HAuCl_4 или AgNO_3 в конечной концентрации 50 мкМ или 0,5 мМ, соответственно. Оценку размера, формы и относительного количества электронно-плотных нанобразований проводили с помощью трансмиссионных электронно-микроскопических изображений (Рис. 2). Содержание сверхмалых НЧ (5–10 нм) при инкубировании с фильтратом 7-суточной культуры составляло 23% и уменьшалось при использовании фильтрата 14-суточной культуры до 14%. Количество НЧ размерами 10–15 и 15–20 нм, наблюдаемых в большом количестве в первом случае, уменьшалось во втором случае в два и четыре раза, соответственно, за счет увеличения количества наносфер диаметром 25–40 нм (Рис. 3 А, Б). Таким образом, средний размер наносфер при использовании бесклеточного фильтрата более возрастной культуры увеличивался с 10 до 30 нм, НЧ были мономорфны и представлены сферами (Рис. 2 А, Б).

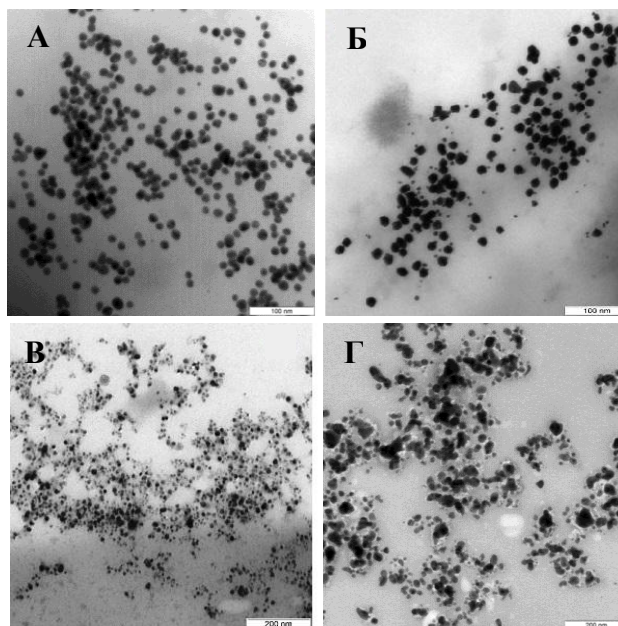


Рисунок 2. ПЭМ AuНЧ (А, Б), полученных из HAuCl_4 и AgНЧ (В, Г), полученных из AgNO_3 , с использованием культуральной жидкости 7 суточной (А, В) и 14 суточной культуры (Б, Г) базидиомицета *L. edodes* при 30 мин инкубирования; масштаб – 100 и 200 нм. Figure 2. TEM of AuNP (A, B) produced from HAuCl_4 and AgNP (C, D) produced from AgNO_3 by using extracellular 7-day (A, C) and 14-day (B, D) extracts from *L. edodes* at 30 min incubation; bar marker – 100 and 200 nm.

При биоредукции нитрата серебра AgNO_3 наблюдалось образование НЧ неправильной сферической формы (Рис. 2 В, Г). При инкубировании с фильтратом 7-суточной культуры в течение 30 минут диаметр НЧ варьировал от 5 до 30 нм, со значительным содержанием наносфер 10–15 нм (Рис. 3 В, Г). Использование фильтрата 14-суточной культуры при равном времени инкубации приводило к образованию НЧ большего размера (средний диаметр 35 нм) и менее однородных по размеру и форме, с тенденцией к слипанию в конгломераты.

Согласно данным МТТ-теста, цитотоксичность биообразованных НЧ золота была пренебрежимо мала в широком диапазоне концентраций (от 1 до 100 мкг/мл), тогда как НЧ серебра снижали дыхательную активность тестируемой клеточной линии Vero (эпителий почки африканской зеленой мартишки) начиная с 10 мкг/мл.

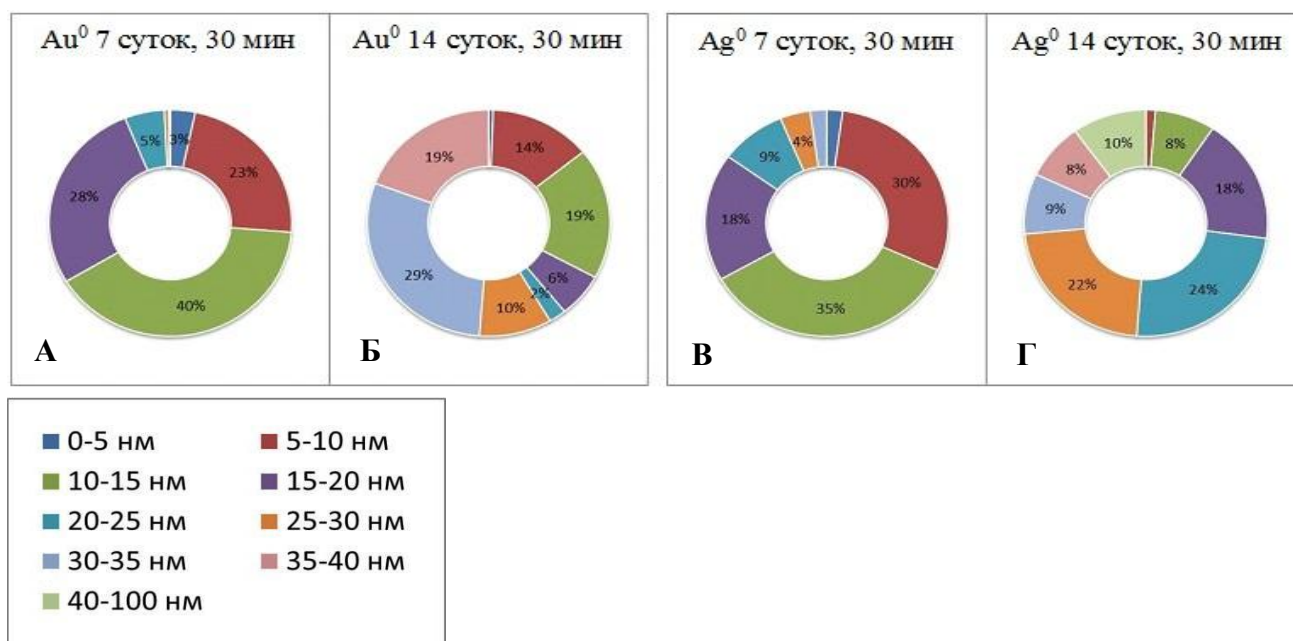


Рисунок 3. Распределение по размеру (в процентном соотношении) AuНЧ (А, Б) и AgНЧ (В, Г) с использованием культуральной жидкости 7-суточной (А, В) и 14-суточной культуры (Б, Г) базидиомицета *L. edodes* при 30 мин инкубирования.

Figure 3. Distribution by size (%) of AuNP (A, B) and AgNP (C, D) by using extracellular 7-day (A, C) and 14-day (B, D) extracts from *L. edodes* at 30 min incubation.

Таким образом, было установлено, что форма, размер и степень агрегации частиц сильно различаются в зависимости от вида базидиомицетов и типа экстракта. К синтезу НЧ были способны все виды исследуемых культур. НЧ благородных металлов, образованные при помощи ксилотрофных и почвенных грибов, имели небольшие различия. Однако частицы, сформированные под действием внеклеточных экстрактов, заметно отличались от НЧ, биообразованных при помощи внутриклеточных экстрактов. У трутовиков *G. lucidum* и *G. frondosa* в этом плане разница была менее выраженной. Стоит отметить способность почвенных сапротрофов к микосинтезу кремниевых НЧ, имеющих мезопористую структуру. Также была установлена возможность влияния на размер НЧ металлов в зависимости от возраста культуры. Биологический синтез НЧ с помощью культивируемых нетоксичных и непатогенных ксилотрофных и почвенных сапротрофов имеет многообещающий характер, потому что он доступен и экологически безопасен. При использовании бесклеточных мицелиальных экстрактов для биообразования НЧ не требуется их дальнейшее отделение от биомассы, что упрощает биотехнологический процесс и позволяет получить НЧ требуемого химического состава, размера и формы.

Литература / References

1. Castro-Longoria E. Fungal biosynthesis of nanoparticles, a cleaner alternative. In: Purchase D. (Ed.), *Fungal applications in sustainable environmental biotechnology*. 2016. Springer International Publishing, Switzerland. P. 323-352.
2. Asmathunisha N., Kathiresan K. A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. *Colloids Surf. B*. 2013. V. 103. P. 283-287. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.10.030
3. Atila F., Owaid M.N., Shariati M.A. The nutritional and medical benefits of *Agaricus bisporus*: a review. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2017. V. 7. P. 281-286. doi:10.15414/jmbfs.2017/18.7.3.281-286
4. Bhainsa K.C., D'Souza S.F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids Surf. B*. 2006. V. 47. P. 160-164. doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.11.026
5. Binupriya A.R., Sathishkumar M., Vijayaraghavan K., Yun S.-I. Bioreduction of trivalent aurum to nano-crystalline gold particles by active and inactive cells and cell-free extract of *Aspergillus oryzae* var. *viridis*. *Journal of Hazardous Materials*. 2010. V. 177. P. 539-545. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.066
6. Ingle A., Gade A., Pierrat S., Sönnichsen C., Rai M. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the

fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. *Current Nanoscience*. 2008. V.4. P.141-144. doi: 10.2174/157341308784340804

7. Kathiresan K., Manivannan S., Nabeel M.A., Dhivya B. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids Surf. B*. 2009. V. 71. P. 133-137. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.01.016

8. Kharissova O.V., Rasika Dias H.V., Kharisov B.I., Olvera Pérez B., Jiménez Pérez, V.M. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 240-248. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.01.003

9. Mukherjee P., Ahmad A., Mandal D., Senapati S., Sainkar S.R., Khan M.I., Ramani R., Parischa R., Ajayakumar P.V., Alam M., Sastry M., Kumar R. Bioreduction of $AuCl_4^-$ ions by the fungus, *Verticillium* sp. and surface trapping of the gold nanoparticles

formed. *Angewandte Chemie International Edition*. 2001. V. 40. No 19. P. 3585-3588. doi: 10.1002/1521-3773(20011001)40:19<3585::AID-ANIE3585>3.0.CO;2-K

10. Sarkar J., Dey P., Saha S., Acharya K. Mycosynthesis of selenium nanoparticles. *Micro & Nano Letters*. 2011. V. 6. No. 8. P. 599-602. doi: 10.1049/mnl.2011.0227

11. Singh P., Kim Y.-J., Zhang D., Yang, D.-C. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends Biotechnol.* 2016. V. 34. V. 588-599. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.02.006

12. Zare B., Babaie S., Setayesh N., Shahverdi A.R. Isolation and characterization of a fungus for extracellular synthesis of small selenium nanoparticles. *Nanomed. J.* 2013. V. 1. No. 1. P. 13-19. doi: 10.7508/nmj.2013.01.002