

ПЕРЕДАЧА МАРКЕРНЫХ НАНОЧАСТИЦ Pt В ТРЕХЗВЕННОЙ
ТРОФИЧЕСКОЙ ЦЕПИ *Chlorella Beijer–Daphnia magna Straus–Cyprinus carpio*© 2022 г. Ю. Н. Моргалёв^{1,*}, Т. Г. Моргалёва¹, С. Ю. Моргалёв¹¹Томский государственный университет, Томск, Россия

*E-mail: yu.morgalev@gmail.com

Поступила в редакцию 30.06.2020 г.

После доработки 09.10.2020 г.

Принята к публикации 09.10.2021 г.

Поступление маркерных наночастиц (НЧ) Pt в гидросферу приводит к ассоциации с одноклеточными водорослями *Chlorella* (фактор биоаккумуляции достигает 10000). Наблюдается значительное время элиминации ($t_{1/2} = 7$ сут) даже при однократной контаминации гидросферы. НЧ Pt, попадая в гидросферу, накапливаются в организме *Daphnia magna* Straus в большом количестве (фактор биоаккумуляции составляет 1000–2000), начиная с первых суток, что может представлять опасность для консументов более высокого трофического уровня. Накопление НЧ происходит как в пищеварительном тракте, так и на поверхности тела ($t_{1/2} = 3$ ч). Аккумуляция НЧ при передаче по пищевой цепи с хлореллой, контаминированной наночастицами, превышает аккумуляцию из окружающей среды в 4 раза, что связано с предварительной аккумуляцией НЧ кормом (хлореллой) и поглощением дафниями НЧ в концентрированном виде. НЧ накапливаются в организме рыб из среды (фактор биоаккумуляции до 2500) и по пищевой цепи (фактор биоаккумуляции до 350). Очищение от НЧ при накоплении по пищевой цепи происходит значительно медленнее, чем в серии с накоплением НЧ из среды. При использовании продуктов рыбоводства, подвергшихся контаминации НЧ, наибольшую опасность представляют такие органы и ткани, как кожа, мышцы и скелет.

DOI: 10.56304/S1992722322020145

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время из-за множественных путей выброса наноматериалов в окружающую среду растет их воздействие на экосистемы и здоровье человека [1–3]. Установлено, что кроме токсического воздействия на бактерии [4–6], низшие и высшие растения [7–9] некоторые наночастицы (НЧ) на основе металлов и высвобождающиеся из них ионы металлов могут адсорбироваться в водных организмах и передаваться по пищевым цепям водной экосистемы. Адсорбция, которая существенно зависит от свойств поверхности НЧ, является первым и важным этапом взаимодействия между НЧ и водными видами животных. После адсорбции НЧ могут накапливаться на поверхности клеток или проходить во внутриклеточную среду путем диффузии или эндоцитоза [10–12].

Адсорбция НЧ индуцирует повреждение клеточной стенки, вызывает тяжелую острую токсичность у пресноводных и морских водорослей *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella* sp., *Dunaliella tertiolecta* [13, 14]. Наблюдалось прилипание НЧ (НЧ TiO₂, Al₂O₃, многостенных углеродных нанотрубок) к внешней поверхности *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia du-*

bia, *Artemia salina*, *Danio rerio* в течение первых 48 ч от начала воздействия и накопление в кишечнике, липидных везикулах, фагоцитах с последующим снижением их содержания после 48 ч экспозиции [15–17]. Концентрация в *Daphnia magna* увеличивалась с ростом концентрации НЧ TiO₂ в среде [18]. Скорость вымывания НЧ Ag у дафний значительно ниже, чем ионов Ag, что свидетельствует о более медленной элиминации НЧ Ag [19]. При экспозиции *Ceriodaphnia dubia* в течение 6 ч в дисперсных средах с разной концентрацией (1–50 мг/л) НЧ Fe₂O₃ максимальное накопление НЧ наблюдалось при концентрации 20 мг/л [20]. При экспозиции нектонных организмов, таких как рыбы *Danio rerio*, в дисперсных системах НЧ TiO₂ с концентрациями 0.1 и 1.0 мг/л могут биоаккумулировать НЧ с коэффициентом биоаккумуляции (КБА) 25.38 и 181.38 соответственно [21]. Однако после 25 дней экспозиции карпа (*Cyprinus carpio*) в дисперсных системах НЧ TiO₂ с концентрациями 3 и 10 мг/л зависимость КБА от концентрации была не столь выражена, и он был равен 675 и 595 соответственно [22].

Накапливаясь в отдельных видах фито- и зоопланктона НЧ переносятся по пищевой цепи, что приводит к значительной биомагнификации: ве-

рифицирован перенос квантовых точек из водорослей (*Pseudokirchneriella subcapitata*) в зоопланктон (*Ceriodaphnia dubia*) после обработки ими водорослей [23]; квантовые точки CdSe, накапливаясь в бактериях (*Pseudomonas aeruginosa*), переносятся на *Tetrahymena thermophila* [24]; высокое содержание НЧ Au в видах первичного звена пищевой цепи приводит к высокому содержанию Au в первичном потребителе *Daphnia magna* [21]; использование контаминированной *Artemia salina* в качестве пищи золотой рыбки (*Carassius auratus*) привело к накоплению НЧ CuO и ZnO в кишечнике, жабрах, печени [25]. Наряду с этим выявлена отрицательная биомагнификация НЧ TiO₂ в упрощенной пищевой цепи из-за депурации НЧ TiO₂ из контаминированного корма [21]. Кроме того, продемонстрирован трехуровневый трофический перенос квантовых точек по водной пищевой цепи [26]. Прием контаминированной НЧ пищи может представлять собой их основной маршрут по трофической сети [21–26], что является потенциальным путем для НЧ войти в пищевую цепь человека.

Таким образом, НЧ могут накапливаться в водных организмах и переноситься на различные трофические уровни, включая водоросли, рыб и бентосных животных. Однако по-прежнему имеются некоторые противоречивые результаты в отношении биомагнификации НЧ в водной среде, требующие дальнейшего изучения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

НЧ Pt в виде водного коллоидного раствора с концентрацией 50 мг/дм³ приобретены в лаборатории новых материалов и перспективных технологий Сибирского физико-технического института Томского государственного университета. Коллоидные растворы НЧ получали методом лазерной абляции в дистиллированной воде из слитков металла высокой степени чистоты [27]. Для определения среднего размера НЧ использовали анализатор “Zetasizer Nano ZS” (США) и просвечивающий электронный микроскоп “Philips CM-12” (Франция). Удельную площадь поверхности измеряли методом БЭТ (метод Брунауэра–Эммета–Теллера) (“TriStar 3000”, США). Для определения концентрации ионной фракции в суспензии применяли атомно-адсорбционной спектроскоп “SOLAAR S2” (США). Концентрацию элемента Pt в образцах биообъектов определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (спектрометр “Elan DRC-e”, США). Оптическую плотность суспензии клеток водорослей определяли измерителем плотности суспензий ИПС-3 (“Европолитест”, Россия).

Тестируемые дисперсные системы (ДС) НЧ Pt создавали по разработанной нами методике пу-

тем разведения исходного коллоидного раствора с концентрацией 50.0 мг/дм³ культивационной средой и последующего ультразвукового редиспергирования (мощность ультразвука 30 Вт/л) в течение 5 мин [2]. Культивационной средой для водорослей служила 10%-ная среда Тамия, для *Daphnia magna* и *Cyprinus carpio* – питьевая вода, аэрированная, соответствующая нормативным документам [28]. На основании предыдущих исследований стабильности и токсичности ДС [29] для работы была выбрана концентрация НЧ Pt 1.0 мг/дм³.

Тест-организмы *Chlorella vulgaris* Beijer и *Daphnia magna* Straus приобретены в ООО “Европолитест” (Россия). Молодь *Cyprinus carpio* (масса 3–5 г, один помет) предоставлена ООО “Томский научно-производственный рыбоводный комплекс” (Россия). Условия содержания тест-организмов до и во время эксперимента соответствовали требованиям стандартных методик биотестирования: фотопериод 12/12, pH 7.0–8.2, содержание O₂ 26 мг/л [30]. Ежедневно обновляли 10% культивационной среды.

Исследования по аккумуляции включали в себя две фазы: накопления и очищения. Пробы для количественного определения концентрации Pt в тест-организмах отбирали в фазе накопления для хлореллы в конце 1, 2, 3, 4, 5, 10 и 20 сут культивирования, для дафний – в конце 1, 5, 10, 20 и 28 сут, для рыб – в конце 1, 5, 10, 20 сут. В фазе очищения – в конце 1 и 7 сут после переноса в среду, свободную от НЧ.

Суспензию хлореллы концентрировали трехкратным сепарированием с промывкой культивационной средой и финальным центрифугированием 15 мин при 1600 об./мин. Осадок подсушивали на фильтровальной бумаге. На анализ передавали образцы сырой массой ~1 г. Всего 33 образца.

Рачков дафний собирали с помощью сита, ополаскивали сверху культивационной водой и подсушивали на марлевой салфетке в течение 5 мин, после чего собирали в пробирку и взвешивали. На анализ передавали образцы сырой массой ~1 г. Всего 42 образца.

Молодь рыб после отлавливания обезболивали с помощью раствора трикаина и декапитировали. Для оценки интегральной аккумуляции проводили гомогенизирование. Для оценки накопления в органах рыб препарировали и готовили гомогенат тканей. На анализ передавали образцы сырой массой ~1 г. Всего 55 образцов.

Параллельно по той же схеме проводили исследования с культивационной средой, свободной от НЧ.

Статистическая обработка полученных данных выполнена в программах Statistica 10 и Excel 2010.

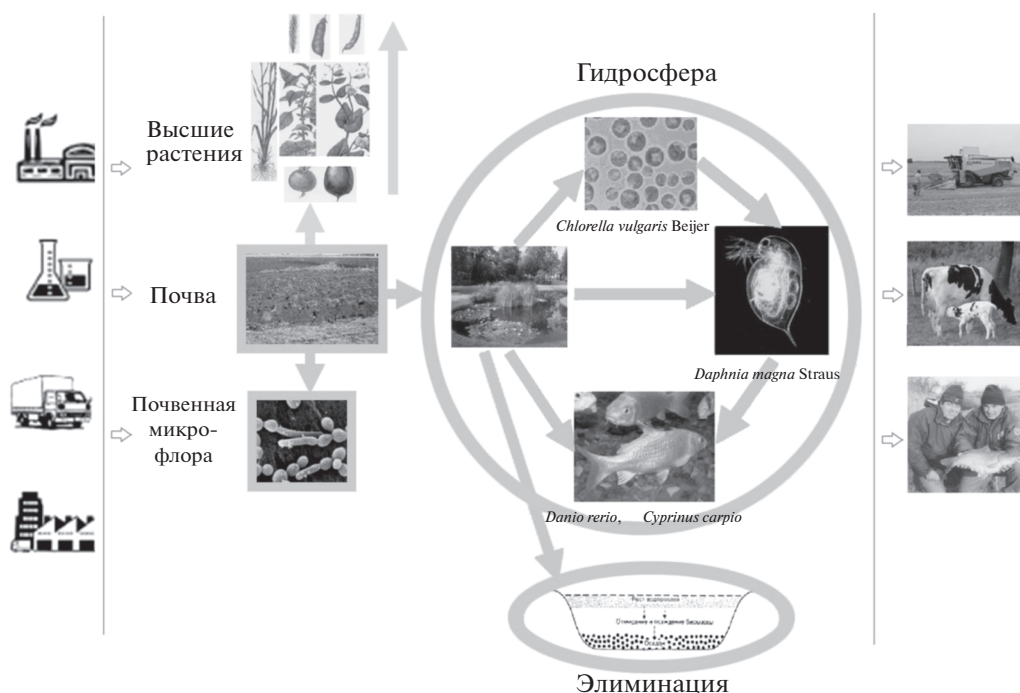


Рис. 1. Схема исследования транслокации НЧ в окружающей среде.

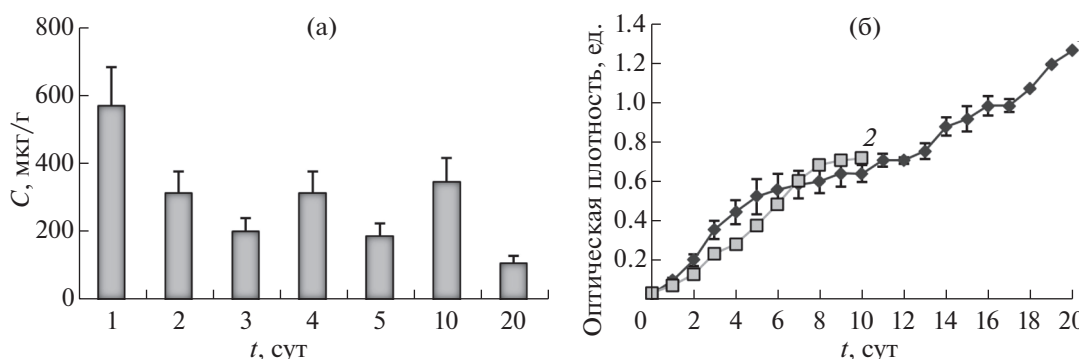


Рис. 2. Содержание Pt во фракции хлореллы по данным ICP-MS (а) и динамика оптической плотности суспензии водоросли *Chlorella* при культивировании в контрольной (1) и опытной среде (2) (б).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные в работе результаты относятся к части процесса транслокации наноматериалов в окружающей среде – транслокации в пищевой цепи гидробионтов (рис. 1).

Использованные в исследовании маркерные НЧ характеризовались следующими показателями: средний размер НЧ $\Delta_{50} = 5$ нм, удельная площадь поверхности $S_{sp} \approx 15$ м²/г, концентрация ионной фракции в суспензии не превышала 0.2%.

Аккумуляция НЧ Pt хлореллой. Вопрос о дисперсности аккумулированных частиц не рассматривали, так как во множестве публикаций показано накопление именно НЧ в разнообразных

биологических объектах [23–25]. В проведенной работе в пользу аккумуляции Pt в форме НЧ свидетельствует как ее низкая растворимость и, соответственно, практическое отсутствие ионной формы, так и накопление в тканях мышц и скелета даже при поступлении через желудочно-кишечный тракт.

При культивировании одноклеточной водоросли *Chlorella* в дисперсной системе НЧ Pt концентрация элемента Pt через 24 ч возрастала до 570 ± 96 мкг/г (рис. 2а). По мере увеличения времени экспозиции концентрация Pt в хлорелле снижалась и через 20 сут составляла 106 ± 18 мкг/г.

Одним из важных параметров для оценки накопления НЧ гидробионтами из среды является

фактор биоаккумуляции (ФБА), который отражает отношение концентрации вещества в тест-организме к концентрации вещества в среде культивирования тест-организма [31, 32] и вычисляется по формуле: $ФБА = C_{хл}/C_w$, где $C_{хл}$ – концентрация химического элемента в хлорелле, C_w – концентрация химического элемента в культивационной среде.

Учитывая начальную концентрацию НЧ Pt, равную 1 мг/л (1 мкг/мл), следовало бы ожидать диапазон КБА от 100 до 600, однако в реальности происходит ряд процессов, существенно изменяющих этот показатель.

Контакт НЧ с водной средой при их попадании в экосистему приводит к сложной цепи физико-химических перестроек структуры ДС, одним из важнейших звеньев которой является агрегация с последующей седиментационной или флотационной элиминацией НЧ из среды обитания гидробионтов в донные отложения или на поверхность водоемов. Процессы элиминации НЧ наряду с концентрационными параметрами определяются рядом факторов: электролитным составом среды, температурой, рН среды, зарядом частиц, степенью аэрации и т.д. [33].

Кроме того, существенный вклад вносят процессы захвата НЧ клетками хлореллы в первые 24 ч культивирования (концентрация в среде при этом снижается с 1.0 до 0.005 мг/л). Последующее добавление в тест-систему суспензий НЧ не может полностью скомпенсировать это изменение.

Расчетным методом оценить устойчивость ДС, особенно при ее полиэлектролитном составе, характерном для природных водных сред, крайне сложно. В связи с неустойчивостью дисперсной системы НЧ Pt, согласно принципам согласованной на глобальном уровне системы классификации опасности и маркировки химических веществ [34], при определении КБА необходимо проводить расчеты с учетом эффективной концентрации поллютанта в среде, которая рассчитывается как среднее геометрическое из начальной и конечной концентрации НЧ за период экспозиции.

Однако исследования [29] показали, что вычисление эффективной концентрации по формуле $C^e = (C^{in}C^{fin})^{1/2}$, где C^{in} и C^{fin} – начальная и конечная концентрация соответственно, возможно только при разовом введении НЧ. При повторных внесениях НЧ в концентрации C^{in} (недопустимо внесение в более высоких концентрациях, так как возможны эффекты кратковременного воздействия повышенных концентраций на тест-организмы) в первые сутки $C_1^e = (C^{in}C^{in}(e^{-K_e \times 24}))^{1/2} = C^{in}e^{-K_e \times 12}$. Коэффициент элиминации (K_e) является коэффициентом уравнения экспоненциальной аппроксимации $C_t = C_0e^{-K_e t}$ графика сниже-

ния концентрации взвешенных НЧ при отстаивании, где C_0 – исходная концентрация НЧ, t – время экспозиции в часах. Этот показатель, характеризующий устойчивость ДС, эффективную концентрацию воздействия диспергированных НЧ и возможное время их воздействия на тест-организм, необходимо определять экспериментально. Согласно [29] эта величина для используемых дисперсных систем НЧ Pt 1.0 мг/л составляет: в культивационной среде для хлореллы – 0.0144 ч⁻¹, в культивационной среде для дафний – 0.0201 ч⁻¹, в культивационной среде для рыб – 0.0261 ч⁻¹.

Для последующих $i = (n - 1)$ сут $C_i^m = ((C_{i-1}^{fin} + C^{in}K_{rep})C_i^{fin})^{1/2}$, где C_{i-1}^{fin} – конечная концентрация в предыдущие сутки, K_{rep} – коэффициент замены культивационной среды в долях объема. Тогда среднюю концентрацию за период $n > 1$ суток можно вычислить по формуле

$$C_n^m = \left(C^{in} e^{-12K_e} \prod_{i=2}^n ((C_{i-1}^{fin} + C^{in}K_{rep})C_i^{fin})^{1/2} \right)^{1/n}.$$

Альтернативой являются многократный (в течение каждого суток) отбор проб культуры, очистка их от тест-организмов, измерение концентраций НЧ в среде методом масс-спектрометрии и интегрирование полученных значений. Однако это приводит как к нарушению условий культивирования, так и к существенному удорожанию получения результатов.

Другим важным источником ошибки в определении ФБА является рост хлореллы в процессе экспозиции. При малых количествах НЧ, вносимых в среду, клетки водорослей последующих поколений являются “разбавителями”, не ассоциировавшими НЧ в тех же количествах, что и клетки первого поколения. Таким образом, необходимо учитывать скорость роста хлореллы и корректировать на него как величину определяемой концентрации НЧ, адсорбированных хлореллой, так и значение ФБА.

На рис. 26 показана динамика роста хлореллы, определенная стандартным методом измерения оптической плотности суспензии [35].

Отчетливо видно, что продолжительность фазы экспоненциального роста составляет трое суток. В эту фазу экспоненциального роста культуры в контрольной среде коэффициент среднего удельного прироста $\mu = \ln C_t/t$ составил 0.71. При культивировании *Clorella vulgaris* Beijer в дисперсионной среде НЧ Pt коэффициент среднего удельного прироста увеличивается до $\mu = 1.04$, что указывает на стимулирующий эффект НЧ Pt в фазе экспоненциального роста.

Исходя из полученных данных и применяя указанную коррекцию, можно рассчитать основ-

ные показатели биоаккумуляции: k_{cl} – коэффициент скорости очищения тест-организмов после переноса в среду, свободную от НЧ, и $t_{1/2}$ – время “полуочищения” – период, за который концентрация ассоциированных НЧ снижается в 2 раза:

$$k_{cl} = \frac{\ln(C_{xл,t_1}/C_{xл,t_2})}{t_2 - t_1}, \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{cl}}.$$

Результаты, полученные через 1 и 7 сут отмывания, показывают, что процесс очищения со временем замедляется. В первые сутки $k_{cl} = 0.16/\text{сут}$, $t_{1/2} = 4.2$ сут, в интервале 1–7 сут $k_{cl} = 0.10/\text{сут}$, $t_{1/2} = 7.0$ сут. Это может быть связано с быстрым начальным очищением культуры от НЧ, слабо связанных с поверхностью клеток.

Коэффициент скорости накопления НЧ (k_{up}) вычисляется по формуле

$$k_{up} = \frac{C_{xл}k_{cl}}{C_w(1 - e^{-k_{cl}t})}.$$

Поскольку $C_{xл}$ и C_w изменяются по ходу фазы накопления, значения коэффициента также не постоянны (табл. 1).

Кинетический фактор биоаккумуляции (ΦBA_k) вычисляется по формуле

$$\Phi BA_k = \frac{k_{up}}{k_{cl}}.$$

Обращает на себя внимание различие в величинах ФБА. Максимальное значение ФБА составляет 9400 ± 1800 , в то время как ΦBA_k на вторые сутки экспозиции достигает значения 31000 ± 5800 . Данный факт может отражать потенциальную способность культуры хлореллы накапливать значительное количество НЧ. Реализация этой возможности ограничивается снижением пассивного сорбирования НЧ в связи с насыщением локусов связывания, замедлением роста хлореллы вне фазы экспоненциального роста и, возможно, ограниченностью количества НЧ, способных в естественных условиях длительное время существовать в свободном состоянии. При этом высокий уровень накопления НЧ Pt уже в первые сутки экспозиции указывает на существенную значимость этого процесса в возможной передаче НЧ вверх по пищевой цепи.

Аккумуляция НЧ Pt дафниями из культивационной среды. В данной и последующих сериях экспериментов проводили измерения содержания Pt в контрольных условиях без внесения НЧ. Во всех случаях зарегистрированная в тест-организмах концентрация Pt не превосходила значения 0.0002 ± 0.0004 мкг/г массы.

При инкубировании в среде, содержащей НЧ Pt, концентрация элемента Pt в рачках дафний максимально возросла через 5 сут до 1680 ± 96 мкг/г. В дальнейшие дни отмечалось снижение концен-

Таблица 1. Значение коэффициента накопления (K_{up}), кинетического (ΦBA_k) и статического (ΦBA) факторов биоаккумуляции НЧ Pt в тест-системе *Chlorella*

Экспозиция, сут	K_{up}	ΦBA_k	ΦBA
1	750 ± 140	7000 ± 1300	710 ± 140
2	3300 ± 620	31000 ± 5800	5900 ± 1100
3	1900 ± 360	18000 ± 3300	4800 ± 920
4	2400 ± 450	22000 ± 4200	7700 ± 1500
5	1000 ± 200	9500 ± 1800	4000 ± 750
10	1500 ± 290	14000 ± 2700	9400 ± 1800
20	310 ± 60	2900 ± 560	2600 ± 490

трации – до 860 ± 45 мкг/г через 28 сут (рис. 3а). Снижение концентрации Pt в рачках дафний с 10 по 28 сут экспозиции частично связано с ее потерей при двух–трех линьках, которые происходили за это время, с выведением через пищеварительный тракт и с рождением молоди, которую не передавали на анализ.

Результаты, полученные через одни сутки отмывания, показывают, что очищение дафний от накопленных НЧ Pt проходит очень быстро: $k_{cl} = 5.2/\text{сут}$ ($0.2/\text{ч}$), $t_{1/2} = 0.13$ сут (3.2 ч).

Это указывает на накопление НЧ на поверхности тела и в пищеварительном тракте дафний и их достаточно быстрое вымывание при переходе в свободную от НЧ среду. Кроме того, присутствует фактор адгезии НЧ к экзоскелету, описанный в [36] для НЧ TiO_2 . Подтверждением этому может служить общий баланс аккумулированной Pt за сутки инкубации: при весе дафний ~50 мг и фильтрации до 10 дм³ жидкости в сутки 1 г дафний из среды с концентрацией 1 мг/дм³ может поглотить не более 200 мкг Pt. Превышение этого значения указывает на процесс адгезии.

Основные показатели биоаккумуляции также не постоянны и зависят от длительности экспозиции (табл. 2).

Таким образом, НЧ, попадающие в гидросферу, накапливаются в организмах *Daphnia magna* в большом количестве уже в первые сутки после поступления в среду обитания и достигают максимальной концентрации в течение одной недели. Количество накопленных НЧ (концентрирование приблизительно в 2 тыс. раз) может представлять опасность для консументов более высокого трофического уровня, а факт такого накопления должен учитываться при оценке возможного влияния объектов наноиндустрии на прилегающую территорию.

Аккумуляция НЧ Pt дафниями при кормлении контаминированными водорослями. В данном эксперименте в качестве корма для дафний исполь-

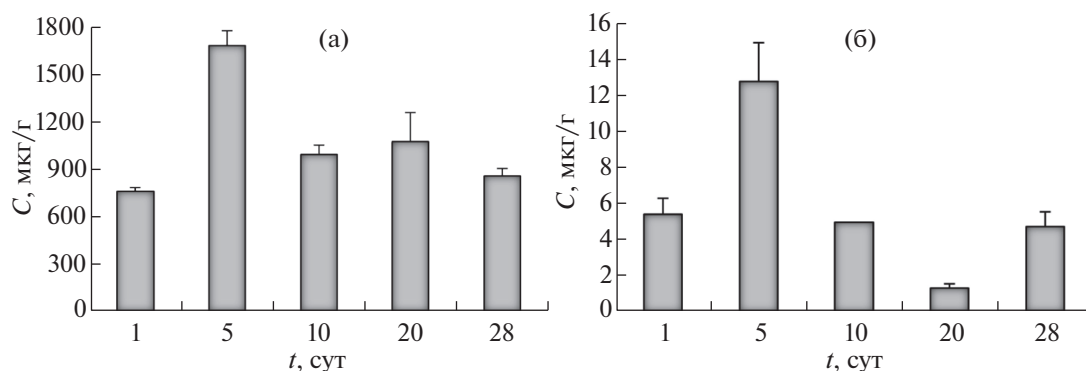


Рис. 3. Содержание Pt в тест-организме *Daphnia magna* Straus при культивации в дисперсной системе НЧ Pt с концентрацией 1.0 мг/л (а) и при поступлении с кормом (б).

зовали суспензию хлореллы, выращенной при 24-часовой культивации в дисперсной системе НЧ Pt с концентрацией 1.0 мг/дм³. После отмытия от среды Тамия и свободных НЧ (как указано выше) концентрат хлореллы разводили культивационной водой до оптической плотности, равной 0.300 ед., что соответствует 1.7×10^7 клеток/мл суспензии. Экспозицию дафний проводили в двухлитровых емкостях из расчета 1 л культивационной среды на 25 дафний. На 1 литр вносили 20 мл суспензии корма.

Исходя из среднего диаметра клетки хлореллы 2.5 мкм, указанной численности клеток в миллилитре суспензии, концентрации Pt 600 мкг/г хлореллы, при разовом кормлении в тест-систему вносили ~1.6 мкг Pt на литр культивационной среды (1.6×10^{-9} г/г среды).

Через 24 ч после поступления НЧ в виде пищи с контаминированными водорослями концентрация Pt в организме дафний составила 5.44 ± 0.91 мкг/г и через 5 сут кормления увеличилась до 12.83 ± 2.16 мкг/г (рис. 3б). Таким образом, в первые сутки ФБА составил 3400, что превосходит биоконцентрирование из среды.

Коэффициент скорости очищения $k_{cl} = 0.7/\text{сут}$ (0.03/ч), $t_{1/2} = 1$ сут, что существенно меньше, чем

Таблица 2. Значение коэффициента накопления (k_{up}), кинетического (ФБА_к) и статического (ФБА) факторов биоаккумуляции из среды НЧ Pt в тест-организмах *Daphnia magna*

Экспозиция, сут	k_{up}	ФБА _к	ФБА
1	12000 ± 920	940 ± 170	840 ± 160
5	5700 ± 2300	2300 ± 420	2000 ± 380
10	2300 ± 1100	1100 ± 200	1000 ± 200
20	7000 ± 1300	1300 ± 240	1200 ± 230
28	5600 ± 1100	1100 ± 190	960 ± 180

при поступлении непосредственно из среды. Это указывает на возможный переход НЧ из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в ткани и затрудненное очищение после переноса в интактную среду.

Основные показатели биоаккумуляции в зависимости от длительности экспозиции приведены в табл. 3.

Полученные данные согласуются с данными по биоконцентрации, представленными в [22]. Так, для НЧ Au диаметром 4 и 18 нм показано накопление за четверо суток с ФБА 6641 и 10207 [37]. Однако не выдерживают критики приведенные здесь же расчеты по биоаккумуляции от контаминированных водорослей *Selenastrum capricornutum* без учета количества вносимых с водорослями НЧ.

Отметим сложность моделирования данных процессов в применении к НЧ. В условиях инкубирования одновременно протекают несколько процессов:

- поглощение дафниями клеток хлореллы, контаминированной НЧ, определяемое коэффициентом трофической активности;
- переход части НЧ в ткани дафний (активный и пассивный);
- выброс из организма дафний части НЧ с отходами жизнедеятельности (k_{cl});
- снижение удельной концентрации НЧ в биомассе дафний, связанное с “разбавлением” растущей биомассой (k_g).

Кроме того, протекают процессы очищения клеток хлореллы от НЧ, определяемые k_{cl} хлореллы, и переход НЧ в культивационную среду с последующей агрегационно-седиментационной элиминацией. Это создает существенные сложности для моделирования и предполагает – как оптимальный – путь непосредственного измерения указанных величин для оценки потенциальных рисков попадания НЧ в окружающую среду.

Таблица 3. Значения параметров биоаккумуляции дафниями НЧ Pt 5 нм из культивационной среды (ср) и по пищевой цепи (пц) от контаминированной наночастицами хлореллы

Экспозиция, сут	$k_{\text{ср ср}}$	$k_{\text{ср пц}}$	ФБА ср	ФБА пц
1	12000 ± 920	15000 ± 1200	840 ± 160	3600 ± 600
5	5700 ± 2300	18000 ± 1500	2000 ± 380	8000 ± 1300
10	2300 ± 1100	7000 ± 930	1000 ± 200	4600 ± 760
20	7000 ± 1300	1900 ± 650	1200 ± 230	420 ± 120
28	5600 ± 1100	6600 ± 970	960 ± 180	1900 ± 530

Аккумуляция НЧ Pt рыбами из культивационной среды. Эксперимент по оценке ФБА молодью *Carpio* проводили по стандартной методике [31]. Через 24 ч инкубирования в опытной среде, содержащей Pt размером 5 нм в концентрации 1 мг/л, концентрация элемента Pt в организме рыб увеличилась незначительно – до 0.7 ± 0.1 мкг/г. Максимальный рост концентрации наблюдался через 10 сут – до 51.7 ± 10.0 мкг/г (рис. 4а). Последующее снижение концентрации до 18.8 ± 3.2 мкг/г может быть связано с активацией защитных механизмов, препятствующих накоплению тяжелых металлов.

Эффективная среднесуточная концентрация была рассчитана для каждого периода с учетом ежедневной замены раствора на 10% и полной смены раствора 1 раз в 10 дней. Одновременно с каждым отбором проб *Carpio* проводили анализ проб культивационной воды. Исходя из полученных данных коэффициент скорости очищения $k_{\text{cl}} = 5/\text{сут}$ (0.1/ч), $t_{1/2} = 0.3$ сут (6.73 ч).

Очищение *Carpio* от накопленных НЧ проходит очень быстро. Возможно, преимущественное накопление НЧ происходит на коже и в пищеварительном тракте *Carpio*, а в фазу очищения происходит их достаточно быстрое вымывание при переходе в свободную от НЧ среду. Это предположение подтверждают результаты анализа накопления в органах и тканях карпиков (рис. 5).

Основные показатели биоаккумуляции в зависимости от длительности экспозиции приведены в табл. 4.

Аккумуляция НЧ Pt рыбами при кормлении контаминированными дафниями. В использованной модели контаминирования *Carpio* по пищевой цепи источником НЧ являлись дафнии в возрасте 4–6 дней после 24-часового культивирования в дисперсной системе НЧ Pt. Концентрация НЧ, ассоциированных с дафниями, составляла 3063 ± 582 мкг/г.

Carpio содержали в культивационной воде НЧ из расчета 3 л воды на 1 г влажного веса рыб. Ежедневно проводили замену 10% культивационной воды на свежую. Кормление проводили в объеме 1–2% от влажного веса рыбы. Такой объем корма позволяет поддерживать постоянный вес рыбы [31]. Исходя из концентрации НЧ, накопленных в дафниях, массы дафний, которую использовали для кормления, и объема воды, концентрация НЧ Pt в модели составляла – 0.02 мг/л (0.02 мкг/г среды).

Через 24 ч после поступления НЧ в виде пищи концентрация Pt в гомогенате рыб возросла до 6.8 ± 1.4 мкг/г с последующим снижением и повторным ростом до 5.9 ± 1.2 мкг/г на 20-е сутки (рис. 4б).

Несмотря на существенное различие концентраций НЧ, вносимых в среду указанными мето-

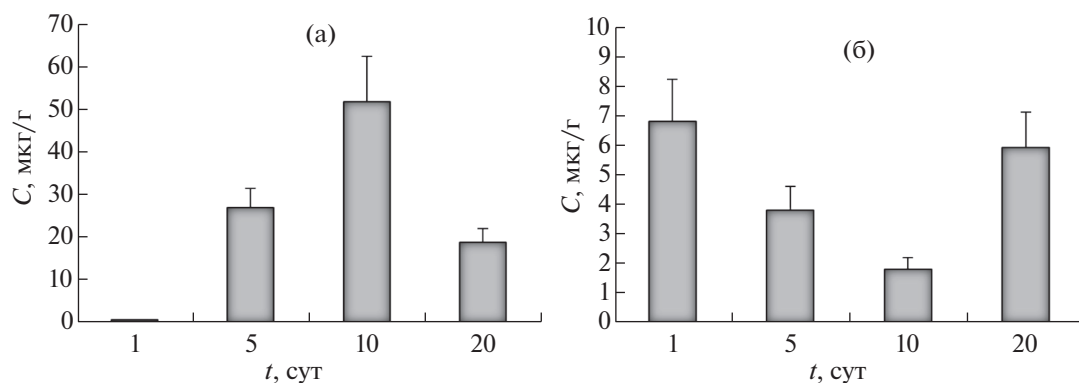


Рис. 4. Содержание Pt в тест-организме *Danio rerio* при культивации в дисперсной системе НЧ Pt с концентрацией 1.0 мг/л (а) и при поступлении с кормом (б).

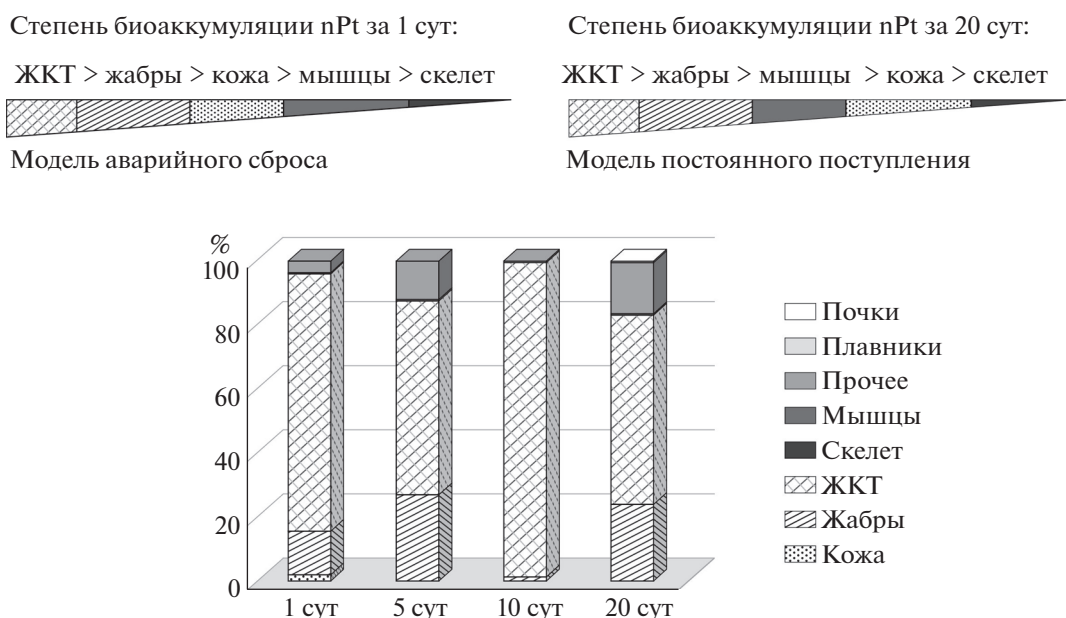


Рис. 5. Распределение Pt по органам и тканям в тест-организме *Cyprinus carpio*.

дами (1.0 мг/л в ДС и 0.02 мг/л в дафниях), накопленная концентрация в рыбах различается не столь существенно – максимальные зарегистрированные значения составляют соответственно 51.7 и 6.8 мкг/л.

Очищение от НЧ в данном эксперименте происходило значительно медленнее, чем в серии с

Таблица 4. Значение коэффициента накопления (k_{up}), кинетического (ΦBA_k) и статического (ΦBA) факторов биоаккумуляции НЧ Pt из среды в тест-организмах *Cyprinus carpio*

Экспозиция, сут	k_{up}	ΦBA_k	ΦBA
1	7 ± 1	3 ± 1	3 ± 1
5	1100 ± 200	420 ± 80	430 ± 60
10	5800 ± 1200	2300 ± 470	2400 ± 440
20	1100 ± 200	450 ± 90	450 ± 90

Таблица 5. Значение коэффициента накопления (k_{up}), кинетического (ΦBA_k) и статического (ΦBA) факторов биоаккумуляции НЧ Pt по пищевой цепи в тест-организмах *Cyprinus carpio*

Экспозиция, сут	k_{up}	ΦBA_k	ΦBA
1	490 ± 100	630 ± 130	340 ± 70
5	150 ± 30	190 ± 40	190 ± 40
10	66 ± 13	87 ± 17	87 ± 17
20	220 ± 40	290 ± 60	290 ± 60
28	55 ± 11	72 ± 14	72 ± 14

накоплением НЧ из среды. Коэффициент скорости очищения (k_{cl}) составляет 0.8/сут (0.03/ч), $t_{1/2} = 0.9$ сут (21.7 ч), что в 3 раза медленнее, чем в эксперименте по накоплению НЧ из среды. Основные показатели биоаккумуляции в зависимости от длительности экспозиции приведены в табл. 5.

Распределение НЧ Pt в тканях и органах *Carpio* при аккумуляции из культивационной среды. Как после первых суток экспозиции, так и в последующие сроки распределение накопленной Pt по тканям было неравномерным (рис. 5). Если рассматривать аккумуляцию в первые сутки как модель аварийного сброса наноматериалов, то опасность употребления и изготовления животноводческих кормов уменьшается в ряду: ткани ЖКТ–жабры–кожа–мышцы–скелет. При длительном воздействии опасность уменьшается в ряду: ткани ЖКТ–жабры–мышцы–скелет–кожа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что введение НЧ Pt в среду обитания гидробионтов приводит к аккумуляции с хлореллой с коэффициентом, близким к 10000 (9400 ± 1800).

Накопление Pt из окружающей среды в ракообразных и рыбах приблизительно одинаково ($\Phi BA_{max} = 2000 \pm 380$ и 2400 ± 440 соответственно). Но при передаче по пищевой цепи наблюдается более высокий уровень аккумуляции НЧ в *Daphnia* ($\Phi BA_{max} = 8000 \pm 1300$), чем в *Carpio* ($\Phi BA_{max} = 340 \pm 70$), что, по всей видимости, связано с накоплением НЧ в их корме – хлорелле.

После аварийного сброса наноматериалов в среду для очищения рыб от НЧ необходима экспозиция в чистой воде в течение не менее трех суток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-17-00185).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Morgaleva T., Morgalev Y., Gosteva I. et al.* // AIP Conf. Proc. 2017. V. 1899. P. 1. 050004. <https://doi.org/10.1063/1.5009867>
2. *Morgalev S., Morgaleva T., Gosteva I., Morgalev Y.* // IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 2015. V. 98. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012006>
3. *Coll C., Notter D., Gottschalk F. et al.* // Nanotoxicology. 2016. V. 10. P. 436.
4. *Lushchaeva I.V., Morgalyev Y.N., Loiko S.V.* // Nano Hybrids Composites. 2017. V. 13. P. 108.
5. *Li Y., Zhang W., Niu J., Chen Y.* // Environ. Sci. Technol. 2013. V. 47. P. 10293.
6. *Zhang W., Li Y., Niu J., Chen Y.* // Langmuir. 2013. V. 29. P. 4647.
7. *Astafurova T., Zotikova A., Morgalev Y. et al.* // IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 2015. V. 98. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012004>
8. *Wang Z.Y., Li J., Zhao J., Xing B.S.* // Environ. Sci. Technol. 2011. V. 45. P. 6032.
9. *Geisler-Lee J., Wang Q., Yao Y. et al.* // Nanotoxicology. 2013. V. 7. P. 323.
10. *Zhang W., Rittmann B., Chen Y.* // Environ. Sci. Technol. 2011. V. 45. P. 2172.
11. *Patil S., Sandberg A., Heckert E. et al.* // Biomaterials. 2007. V. 28. P. 4600.
12. *Schwegmann H., Feitz A.J., Frimmel F.H.* // J. Colloid Interface Sci. 2010. V. 347. P. 43.
13. *Lekamge S., Miranda A.F., Ball A.S. et al.* // PLOS One. 2019. V. 14. № 4. <https://doi.org/10.1371/1>
14. *Wang Y., Zhu X., Lao Y. et al.* // Sci. Total Environ. 2016. V. 565. P. 818.
15. *Zhu B., Zhu S., Li J. et al.* // Toxicol. Res. (Camb). 2018. V. 7. № 5. P. 897. <https://doi.org/10.1039/c8tx00084k>
16. *Zhu X., Zhu L., Chen Y., Tian S.* // J. Nanopart. Res. 2009. V. 11. P. 67.
17. *Adams L.K., Lyon D.Y., McIntosh A., Alvarez P.J.* // Water Sci. Technol. 2006. V. 54. P. 327.
18. *Zhu X., Chang Y., Chen Y.* // Chemosphere. 2010. V. 78. P. 209.
19. *Zhao C.M., Wang W.X.* // Environ. Sci. Technol. 2010. V. 44. P. 7699.
20. *Hu J., Wang D., Wang J.* // Environ. Pollut. 2012. V. 162. P. 216.
21. *Zhu X., Wang J., Zhang X. et al.* // Chemosphere. 2010. V. 79. P. 928.
22. *Zhang X., Sun H., Zhang Z. et al.* // Chemosphere. 2007. V. 67. P. 160.
23. *Bouldin J.L., Ingle T.M., Sengupta A. et al.* // Environ. Toxicol. Chem. 2008. V. 27. P. 1958.
24. *Werlin R., Priester J.H., Mielke R.E. et al.* // Nat. Nanotechnol. 2011. V. 6. P. 65.
25. *Ates M., Arslan Z., Demir V. et al.* // Environ Toxicol. 2015. V. 30. № 1. P. 119. <https://doi.org/10.1002/tox.22002>
26. *Lee W.M., Yoon S.J., Shin Y.J., An Y.J.* // Environ. Pollut. 2015. V. 201. P. 10.
27. *Svetlichnyi V., Shabalina A., Lapin I. et al.* // Appl. Surf. Sci. 2016. V. 372. P. 20.
28. ISO Water Quality Sampling. 1997. ISO 5667. Pt 16. Guidance on biotesting of samples. Wiley-VCH. Weinheim-New York. Available. <http://www.iso.org>
29. *Morgalev S., Morgaleva T., Morgalev Y., Gosteva I.* // Adv. Mater. Res. 2015. V. 1085. P. 424. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1085.424>
30. OECD Test № 236. “Fish Embryo Acute Toxicity (FET)”. Guideline for Testing of Chemicals. 2013.
31. OECD Test № 305. “Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure”. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 3. OECD Publishing. Paris. 2012. <https://doi.org/10.1787/9789264185296-en>
32. OECD Test № 317. “Bioaccumulation in Terrestrial Oligochaetes”. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 3. OECD Publishing. Paris. 2010. <https://doi.org/10.1787/9789264090934-en>
33. *Klaine S.J., Alvarez P.J., Batley G.E. et al.* // Environ. Toxicol. Chem. 2008. V. 27. № 9. P. 1825.
34. Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals. ST/SG/AC.10/30/Rev.6. 2015. P. 536. <https://doi.org/10.18356/4e868e57-ru>
35. ПНД Ф Т 14.1:2:4.10-2004. “Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по изменению оптической плотности культуры водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer”. Москва. 2014.
36. *Zhu X., Wang J., Zhang X. et al.* // Chemosphere. 2010. V. 79. P. 928.
37. Osborne-Koch M. “Uptake of Gold Nanoparticles in an Algae – Daphnid Food Chain”. A Thesis Presented to the Graduate School of Clemson University. In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science Environmental Toxicology. 2009. 44 p.