

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи



МАЗУР АНДРЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЛИЭТИЛЕНА
И ПОЛИСТИРОЛА НА ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ**

1.5.15. Экология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, с.н.с. Челомин Виктор Павлович

Ростов-на-Дону – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Производство пластика и его накопление в Мировом океане	13
1.2. Деградация пластика.....	20
1.3. Общее понятие микропластика	24
1.3.1. Первичный микропластик.....	24
1.3.2. Источники вторичного микропластика	29
1.4. Нанопластик	33
1.5. Влияние пластика на гидробионтов.....	36
1.6. Исследование токсичности материалов с помощью биотестирования.....	50
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
2.1. Объекты исследования.....	55
2.1.1. Плоский морской еж <i>Scaphechinus mirabilis</i>	55
2.1.2. Мидия тихоокеанская <i>Mytilus trossulus</i>	56
2.2. Материалы и методы исследования.....	57
2.2.1. Методика проведения эксперимента с плоским морским ежом <i>S. mirabilis</i>	57
2.2.2. Методика проведения экспериментов с мидией <i>M. trossulus</i>	60
2.3. Определение биомаркеров.....	61
2.4. Оценка генотоксического воздействия методом ДНК-комет	64
2.5. Статистическая обработка.....	66
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТОВ ПОЛИЭТИЛЕНА НА ТИХООКЕАНСКУЮ МИДИЮ	67

ГЛАВА 4. ТОКСИЧНОСТЬ МИКРОСФЕР ПОЛИСТИРОЛА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ	76
<i>4.1. Спермиотоксичность и эмбриотоксичность микросфер полистирола на примере плоского морского ежа <i>S. mirabilis</i></i>	<i>77</i>
<i>4.2. Генотоксичность микросфер полистирола на примере половых продуктов плоского морского ежа <i>S. mirabilis</i></i>	<i>80</i>
<i>4.3. Генотоксические свойства микросфер полистирола на примере моллюска <i>Mytilus trossulus</i></i>	<i>88</i>
ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ МИКРОСФЕР ПОЛИСТИРОЛА И НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ НА ТИХООКЕАНСКУЮ МИДИЮ	96
<i>5.1. Стабильность мембран лизосом</i>	<i>98</i>
<i>5.2. Интегральная антиоксидантная активность</i>	<i>101</i>
<i>5.3. Уровень продуктов перекисного окисления липидов</i>	<i>102</i>
<i>5.4. Карбонилы белков</i>	<i>104</i>
<i>5.5. Оценка повреждения ДНК</i>	<i>106</i>
ВЫВОДЫ	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Научное сообщество осознало проблему загрязнения биосферы пластиком в полной мере относительно недавно несмотря на то, что корнями она уходит в 50-е годы прошлого столетия. Тогда же было дано и определение понятию «пластик», объединяющего разнородные группы синтетических органических полимеров (Thompson et al., 2009; Wagner et al., 2014). Масштабное и повсеместное использование полимерных изделий привело к резкому скачку их производства. По оценкам исследователей за последние 50 лет производство пластика увеличилось в 600 раз. (Hamlin et al., 2015). Большая часть синтезируемого пластика — это устойчивые к распаду в окружающей среде соединения. В структуре промышленного производства данных материалов доминируют одноразовые изделия и изделия с ограниченным сроком использования. Например, в странах Евросоюза на долю упаковочного сектора приходится около 40% всего произведенного пластика. По оценкам экологов, ежегодно в мировой торговой сети только пластиковых пакетов используется от 500 до 1000 млрд., что составляет около 150 штук/год на каждого жителя планеты (Lithner et al., 2011).

В то же время резкое увеличение производства полимерных изделий стало причиной экспоненциального роста пластмассовых отходов, которые загрязняют большинство экосистем нашей планеты. На данный момент огромное количество пластиковых отходов сконцентрировано на многочисленных мусорных полигонах, откуда разносятся ветром и различными водотоками попадая в воды Мирового океана. Так, по самым скромным подсчетам на данный момент в Мировом океане находится около 5,25 трлн пластиковых фрагментов (Camargo et al., 2009; Dris et al., 2016). Однако, в начале нынешнего столетия ученые обнаружили более масштабную и серьезную экологическую проблему, связанную с поступлением полимерных отходов в окружающую среду. Было обнаружено, что под воздействием факторов окружающей среды крупные полимерные изделия со

временем разрушаются, образуя микроразмерные частицы пластика. Особенно быстро процесс разрушения пластика до микроскопических размеров происходит в морской среде, где синтетические фрагменты постоянно подвергаются воздействию солнечного света и волновой активности. В результате ряда химических преобразований крупные фрагменты полимерного морского мусора становятся более хрупкими и распадаются на мелкие частицы, для обозначения которых Томпсон с коллегами (Thompson et al., 2009) предложили использовать определение «микропластик». Такие частицы способны концентрироваться на поверхности морей и океанов и со временем, в зависимости от различных факторов среды и изменения плавучести, оседать, распределяясь в толще воды, и постепенно достигая донных отложений.

Также, в последние годы особое внимание со стороны исследователей уделяется способности полимеров адсорбировать и насыщаться разнообразными стойкими и высокотоксичными химическими веществами, среди которых обнаруживаются не только гидрофобные ксенобиотики (т.к. ПХБ, ДДТ, НФ, ПАУ и др.), но и ряд тяжелых металлов (Lithner et al., 2011; Chua et al., 2014; Napper et al., 2015). Считается, что соотношение сорбционно-десорбционных свойств полимеров по отношению к различным химическим соединениям в зависимости от характеристик среды лежит в основе их распространения и переноса из различных источников загрязнений в прибрежные и открытые воды океана (Mato et al., 2001; Teuten et al., 2009). Загрязнение прибрежно-морской зоны пластиком является глобальной экологической проблемой (UNEP, 2016).

Частицы микропластика могут попадать внутрь планктонных и бентосных морских организмов, что приводит не только к механическому повреждению слизистых тканей и засорению желудочно-кишечного тракта, но и к серьезным нарушениям физиологических процессов (Hernandez et al., 2017; Fahrenfeld et al., 2019). Однако биологическая активность данных частиц до сих пор остается невыясненной.

Степень разработанности темы. Большинство пластиков не подвержены разложению в окружающей среде. Под действием физических и химических факторов крупные пластмассы разрушаются до более мелких микро и наночастиц. Достигая морской среды частицы микропластика взаимодействуют с большим количеством бентосных и планктонных организмов (Barnes et al., 2009). Стоит отметить, что микропластиковые частицы представляют из себя сложную комбинацию мономеров и добавок, таких как пластификаторы и красители. Многие из этих добавок могут быть токсичны и оказывать негативное воздействие на живых организмов (Ananthaswamy, 2001). Было показано, что дополнительные компоненты, используемые при производстве пластиков, могут вымываться при попадании частиц микропластика в организм червей, оказывая негативное влияние на их кормовую активность (Browne et al., 2013). Пластиковые полимеры способны абсорбировать токсичные гидрофобные соединения (ДДТ, ПХД, ПАУ, нонилфенолы) из окружающей среды, потенциально увеличивая доступность этих загрязнителей для биоты (Chua et al., 2014).

Учеными зафиксирован тот факт, что морские организмы различных таксономических групп способны поглощать микропластиковые частицы. Наличие микропластика было отмечено в рыбах (Boerger et al., 2010; Davison, Asch, 2011; Lusher et al., 2012), бентосных полихетах (Wright et al., 2013), амфиподах и двустворчатых моллюсках (Thompson et al., 2004; Browne et al., 2008) и различных зоопланктонных организмах (Cole et al., 2015). Так, в результате исследования были выявлены более высокие уровни содержания микрочастиц в теле мидии (37000 шт./кг живого веса) по сравнению с донными отложениями (48 шт./кг сухого веса) и морской водой (27 шт./л), отобранных с их места обитания (Karlsson et al., 2018). Сходные результаты были получены для устриц, выращенных в 17 марикультурных хозяйства, расположенных вдоль побережья Китая. Усредненное количество частиц микропластика в перерасчете на одну устрицы составили 2,93 штуки на особь (Su et al., 2018).

Лабораторное исследование влияния микропластиковых частиц полистирола на артемий *Artemia parthenogenetica* Bowen & Sterling, 1978 показало аномальные изменения ультраструктур клеток эпителия кишечника (Steer et al., 2017), у копепод *Tigriopus japonicus* Mori, 1938 наблюдалось значительное снижение плодовитости, а большинство из полученных яиц были нежизнеспособны (Balbi et al., 2017). В экспериментах с пресноводными амфиподами *Gammarus fossarum* Koch, 1836 наблюдалось замедление роста особей при воздействии на них микрочастиц полиметилметакрилата. При хроническом воздействии наночастицы полистирола вызывали уменьшение длины тела дафний *Daphnia pulex* Leydig, 1860 (Liu et al., 2019).

Важно отметить, что чувствительность к токсическому воздействию частиц микропластика изменяется в зависимости от стадии жизненного цикла гидробионтов. Так принято считать, что личиночные формы являются наиболее уязвимыми. Использование планктонных личинок для оценки токсичности микропластика важно для понимания негативного воздействия на критические биологические процессы личиночного развития, способных изменить структуру популяций и сообщества.

Несмотря на это в настоящее время проведено относительно небольшое количество исследований, посвященных оценке токсического воздействия частиц микропластика на личинок морских гидробионтов. Так, например выраженный эмбриотоксический эффект был выявлен при изучении влияния аминополиситрола (PS-NH₂) (Della Torre et al., 2014) и поливинилхлорида (Oliviero et al., 2019) на личинки круглого морского ежа *Paracentrotus lividus*. Lamarck, 1816. При оценке воздействия полистироловых микросфер на взрослых особей тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793 было выявлено снижение количества ооцитов и сперматозоидов, что в дальнейшем повлияло на количество личинок, полученных от экспериментальных особей (Sussarellu et al., 2015). Микропластиковые гранулы оказывали влияние на развитие морфологических отклонений у эмбрионов и личинок зеленого морского ежа *Lytechinus variegatus* Agassiz,

1863 (Nobre et al., 2015). В присутствии микрогранул полистирола отмечалось снижение скорости метаморфоза молодых асцидий *Ciona robusta* Hoshino & Tokioka, 1967 и отклонения в морфологическом развитии плутеусов морского ежа *P. lividus* (Messinetti et al., 2017).

Цель работы: оценить влияние фрагментов полиэтилена и микросфер полистирола на отдельных представителей морских беспозвоночных с помощью биомаркеров.

Для выполнения цели работы были поставлены следующие **задачи**:

1) выявить изменение биохимических показателей в тканях тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* в присутствии фрагментов полиэтилена.

2) на основе метода ДНК-комет исследовать генотоксические свойства микросфер полистирола при воздействии на гаметы плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*.

3) оценить влияние микросфер полистирола на повреждение ДНК клеток жабр и пищеварительной железы мидий *M. trossulus*.

4) с помощью биомаркеров изучить влияние микросфер полистирола на мидию *M. trossulus* в присутствии наночастиц оксида меди.

Научная новизна. В настоящем исследовании впервые проведена оценка токсического влияния двух видов полимерных частиц на тихоокеанскую мидию *M. trossulus* с использованием методов определения параметров окислительного стресса на уровне клетки. В жабрах и пищеварительной железе моллюсков обнаружены изменения стабильности мембран лизосом и интегральной антиоксидантной активности, определен уровень малонового диальдегида, глутатиона и карбониллов белков, а также исследована степень повреждения ДНК клеток анализируемых тканей.

Получены принципиально новые данные об уровне повреждения генома сперматозоидов плоского морского ежа *S. mirabilis*, подвергшихся воздействию микроразмерных частиц полистирола в различных

концентрациях. Изучено и проанализировано влияние микропластика на процесс оплодотворения и раннее развитие плоского морского ежа *S. mirabilis*.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты проведенного исследования расширяют представление о биологической активности полимерных частиц инертных в химическом отношении. Полученные данные вносят вклад в процесс изучения ответа гидробионтов на воздействие микросфер полистирола, как на клеточном, так и на организменном уровне. Представленные в данной работе модели могут быть использованы для оценки токсичности других видов микропластика. Результаты этой работы могут быть использованы для учебных программ биологических специальностей по таким дисциплинам как «Общая экология», «Биоиндикация и биотестирование», «Экотоксикология».

Методология и методы диссертационного исследования. Данное исследование реализовано с использованием комплекса современных биологических экспериментальных методов. Для определения острой токсичности полистирольных микросфер сперматозоиды и яйцеклетки плоского морского ежа *S. mirabilis* получали по стандартной методике (Бузников, Подмарев, 1975). Дальнейшее оплодотворение проводили в чистой морской воде, в тестируемые экстракты помещали зиготы, в них же проходило дальнейшее развитие эмбрионов и личинок (Beiras et al., 2003). Оценку стабильности мембран лизосом мидии *M. trossulus* проводили с помощью цитохимический метода (Martínez-Gomez et al., 2015). Биохимические параметры определяли в пищеварительной железе и жабрах мидии. Интегральная антиоксидантная активность (ИАА) основана на способности антиоксидантов подавлять реакцию окисления ABTS пероксильными и алкоксильными радикалами (Bartosz et al., 1998). Оценку содержания малонового диальдегида (МДА) определяли по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Buege, Aust, 1978). Для определения карбонильных групп белков в пищеварительной железе мидий использовали щелочной метод (Mesquita et al., 2014). Измерения всех биохимических

маркеров проводили на спектрофотометрах Shimadzu UV-1650 PC и Shimadzu UV-2550 с термостатированной ячейкой.

Личный вклад автора состоит в поиске, обобщении и анализе литературных данных о физико-химических свойствах микропластиковых частиц и их токсическом воздействии на морских беспозвоночных. Автор работы принимал непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, а также в процессе планирования и проведения экспериментальных работ. Статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов выполнена автором самостоятельно в полном объеме. Кроме того, диссертант принимал участие в подготовке публикаций и докладов по теме исследования.

Соответствие паспорту специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.15. Экология, прежде всего, в пункте 10: «Антропогенное воздействие на популяции, сообщества и экосистемы. Биологические эффекты загрязнения среды токсичными веществами (экотоксикология). Разработка биологических методов и критериев оценки состояния среды, биоиндикация, биотестирование, биомониторинг. Разработка экологически обоснованных норм воздействия хозяйственной деятельности человека на живую природу».

Основные положения, выносимые на защиту:

1) Фрагменты полиэтилена вызывают у двустворчатого моллюска *M. trossulus* усиление процессов окислительного стресса, выраженное в снижении интегральной антиоксидантной активности и увеличении фрагментации ДНК клеток жабр и пищеварительной железы.

2) Микросферы полистирола проявляют генотоксические свойства, инициируя деструкцию ядерной ДНК сперматозоидов плоского морского ежа *S. mirabilis* и клеток пищеварительной железы мидии *M. trossulus*.

3) При воздействии микросфер полистирола в присутствии наночастиц оксида меди у мидии *M. trossulus* происходит усиление токсического эффекта,

что проявляется в снижении стабильности мембран лизосом и увеличении концентрации окисленных форм белков в пищеварительной железе.

Степень достоверности результатов. В процессе реализации данной работы использовались современные методы исследования, достаточный объем анализируемых данных, подкрепленный статистическим анализом с использованием специализированных программных пакетов. В дополнение к этому представление полученных в ходе исследования результатов в рецензируемых научных изданиях подтверждает их достоверность. Экспериментальная часть работы выполнена в полном соответствии с протоколами и методиками.

Апробация работы и публикации. Результаты научной работы были представлены на всероссийских и международных конференциях: VIII конференция молодых учёных «Океанологические исследования» 6–9 июня, 2018 г, Владивосток; Всероссийская научная конференция с международным участием, посвященная 20-летию Международной кафедры ЮНЕСКО «Морская экология» ДВФУ «Прибрежно-морская зона Дальнего Востока: от освоения к устойчивому развитию» 8–10 ноября, 2018, Владивосток; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» 10–27 ноября, 2020, Москва; IX конференция молодых учёных «Океанологические исследования» 29–30 апреля, 2021, Владивосток; Всероссийская конференция "Морская биология в 21 веке: систематика, генетика, экология морских организмов" 20–23 сентября, 2022, Владивосток.

Результаты исследования включены в отчеты гранта Российского фонда фундаментальных исследований №19-35-90015 по теме: «Оценка токсического воздействия разноразмерных частиц пластика на морских беспозвоночных».

По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и рекомендуемых ВАК России для опубликования научных результатов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, выводов, списка сокращений и обозначений, списка литературы (257, в том числе 14 отечественных и 243 зарубежных источников). Работа изложена на 145 страницах, содержит 20 рисунков и 7 таблиц.

Финансовая поддержка работы. Данное исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-35-90015.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность за постоянную помощь, внимание и поддержку при выполнении работы научному руководителю д.б.н., профессору Челомину Виктору Павловичу, а также коллегам лаборатории 5/1 «Морская экотоксикология» ТОИ ДВО РАН. Особую признательность автор выражает к.б.н., доценту Международной кафедры ЮНЕСКО «Морская экология» Института мирового океана ДВФУ Журавель Елене Владимировне за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Производство пластика и его накопление в Мировом океане

Под термином «пластик» или «пластмасса» понимают семейство синтетических органических полимеров, начало создания которых датируется 40-ми годами XX века. Важно отметить, что сам термин «пластик» используется с конца позапрошлого века. Благодаря своим свойствам, а порой и очевидным преимуществам (диэлектричность, теплопроводность, износоустойчивость, малый удельный вес и др.) перед традиционными материалами, такими как древесина, камень, металл или кожа, пластики быстро заняли многие потребительские ниши и альтернативы им пока нет. Это дешевый, легкий, крепкий, стойкий к коррозии материал длительного пользования (Barnes et al., 2009; Thompson et al., 2009; Wagner et al., 2014; Dris et al., 2016).

Создание синтетических полимеров осуществляется с помощью химических реакций: методами полимеризации и поликонденсации в результате многократного соединения мономерных структурных единиц в одну большую макромолекулу. Основным сырьем для производства выступают полезные ископаемые углеводороды: природный газ, нефть, уголь. Около 4% добываемой в мире нефти используется в качестве сырья при производстве пластмассы, примерно такое же количество нефти используется как источник энергии при производстве. В зависимости от желаемых свойств конечного продукта исходные полимеры при производстве смешивают с различными добавками, такими как пластификаторы, антиоксиданты, стабилизаторы ультрафиолетовой деградации и красители. Наиболее распространенными добавками, используемыми в процессах изготовления пластмассы, являются фталаты, бисфенол А, нонилфенол и антипирены (Geyer et al., 2017).

Точное количество видов и состав пластмасс, производимых на данный момент в мире, оценить невозможно, прежде всего из-за количества и состава,

используемых при производстве добавок, необходимых, как в процессе самого производства, так и для получения пластиков с определенными свойствами. Такими свойствами могут быть: цвет, гибкость, эластичность, устойчивость к ультрафиолетовому излучению, микробной деградации, обрастанию, огнеупорность и т. д. В среднем количество добавок составляет около 7% от общей массы пластика. Среди них преобладают пластификаторы, красители, наполнители, антивоспламенители, которые составляют около 75% всех включений (Geyer et al., 2017).

Бурное развитие производства пластиков началось после Второй мировой войны и сейчас число основных полимеров и их модификаций для массового производства насчитывает несколько десятков, а количество наименований полимеров, используемых для узкоспециальных целей или находящихся в предпроизводственной экспериментальной стадии исчисляется сотнями. Наибольшие группы составляют полимеры на основе полиэтилена (38%), полипропилена (24%), поливинилхлорида (19%). Далее следуют группы пластиков, получаемые на основе полиэтилентерефталата, полиуретана и полистирола, каждая из которых составляет менее 10% от общего объема производимых пластиков. В мировом производстве синтетических волокон доминирует полиэстер, который на 70% состоит из полиэтилентерефталата. Кроме общепринятых видов пластмасс, к пластикам также относятся синтетические каучуки, синтетические покрытия и герметики (Camargo et al., 2009; Dris et al., 2016).

Хотя массовое производство пластиков началось во второй половине 40-х годов XX века, уже к 1989 г. в мире производилось больше пластика, чем стали. Производство быстро реагировало на растущий спрос на промышленные товары, а также упаковки для товаров и хранения продуктов питания. Мировое производство полимеров за эти годы увеличилось с 0,5 млн т в 1950 г до 380 млн т в 2015, в том числе синтетических волокон 26,4 млн т (рис. 1).

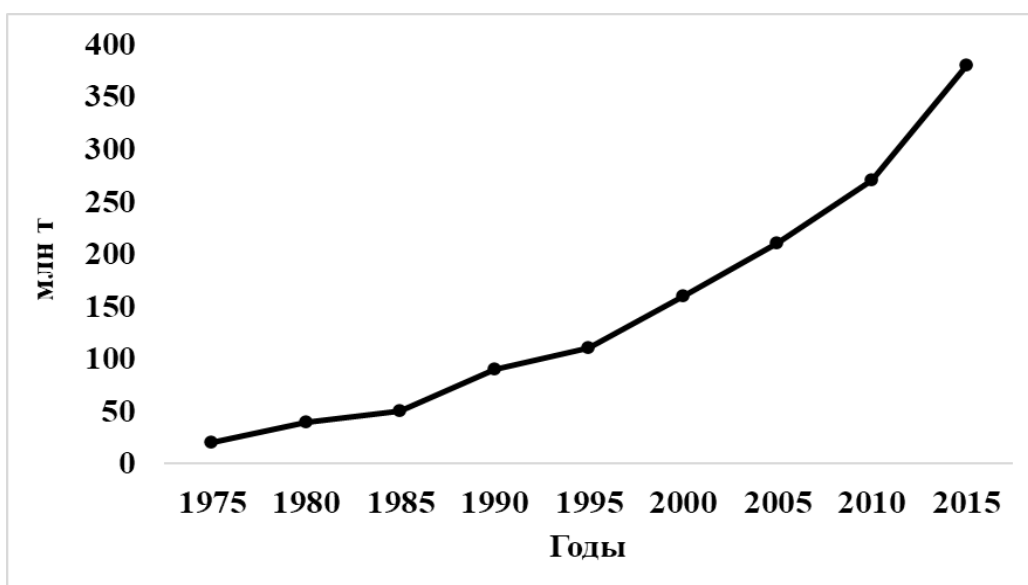


Рисунок 1 – Мировое производство полимерных материалов в период 1950–2015 гг

Совокупный годовой темп роста составил 8,4%, что примерно в 2,5 раза выше темпа роста глобального валового внутреннего продукта за этот период. Общий объем произведенных в 2015 году синтетических пластиков составил 407 млн т. В случае если современные тенденции масштабов промышленного производства пластика сохранятся, то к 2050 году в мире может производиться 2 млрд. т в год, то есть в 1000 раз больше чем в 1950 г. Общее количество смол и волокон, произведенное с 1950 по 2015 год, по разным оценкам составляет 7,8-8,3 млрд т. При этом половина (3,9 млрд т) всего пластика произведена за последние 13 лет. К 2050 г в мире может быть произведено 26 млрд т полимерных смол, 6 млрд т полиэстеровых, полиамидных и акриловых волокон, 2 млрд т пластиковых добавок (UNEP, 2016).

Несмотря на то, что производятся тысячи разнообразных типов полимеров, по объему производимой продукции преобладают четыре основных вида. По данным на 2010 год в мире производилось 73 млн т полиэтилена, 53 млн т полиэтилентерефталата, 50 млн т полипропилена и 35 млн т поливинилхлорида (UNEP, 2016). Производятся также значительные количества полистирола, включая пенополистирол и полиуретан.

В производстве полимеров преобладают четыре региона. Это прежде всего, Китай, который является лидером мирового производства пластика и выделяется в отдельный регион. Сегодня Китай производит 28% мирового объема синтетических смол и 68% полиэстеровых, полиамидных и акриловых волокон. За Китаем следуют Евросоюз, Северная Америка и совокупное производство других стран Азии, исключая Китай.

Пластиковые отходы в наши дни самый быстрорастущий вид твёрдых производственных и бытовых отходов, а если учесть стойкость пластика к внешним воздействиям и серьезные трудности в их дальнейшей переработке, то пластиковые отходы становятся одними из самых опасных. По оценке Geyer et al., 2017 за всю историю производства пластиков в мире было произведено около 6,3 млрд т пластиковых отходов, из которых 700 млн т составляют полиэстеровые, полиамидные и акриловые волокна. Только 9% пластиковых отходов было повторно переработано, из которых только 10% переработано более одного раза, остальные 12% было сожжено и 79% захоронено в грунт или находится в естественной природной среде. Эти цифры в значительной степени относятся к развитым странам, где налажена система сбора, сортировки и учета отходов. Если текущие тенденции в производстве и управлении пластиковыми отходами сохранятся, то к 2050 году на свалках или в естественной среде будет находиться примерно 12 млрд т пластиковых отходов (Jambeck et al. 2015; UNEP, 2016).

Существует ряд причин, по которым произошло резкое увеличение пластикового мусора за последние 50 лет. Во-первых, это доступность и дешевизна сырья при производстве пластиковых изделий, во-вторых, простота такого производства, так как весь процесс, вплоть до получения готового изделия можно автоматизировать, в-третьих, высокие потребительские качества готового товара. Также короткий срок использования большинства полимерных изделий и стойкость пластиков к внешним воздействиям повлияли на непрекращающийся бурный рост пластиковых отходов во всем мире. В результате увеличения производства полимеров доля пластика в

твердых бытовых отходах увеличилась с 1% в 1960 г. до 12% на данный момент (табл. 1).

Таблица 1 – Содержание пластика в твёрдых бытовых отходах разных стран (по Jambeck et al., 2015)

Страна	Содержание пластика, %	Страна	Содержание пластика, %
Испания	10,7	США	12,8
Финляндия	21,4	Канада	13,1
Италия	10,8-27,8	Малайзия	15
Польша	10,8	Иордания	16
Швеция	11,8	Мавритания	20
Великобритания	6,9-10,2	Китай	28,2
Дания	9,2-14,8	Мозамбик	8
Южная Корея	17	Турция	5,6

Во всем мире на полигоны, предназначенные для размещения и захоронения твердых отходов, попадает около 50% пластикового мусора, оставшаяся половина полимерных отходов попадает непосредственно в воды Мирового океана с водами рек. Суммарно крупные реки ежегодно приносят в воды морей и океанов, по самым приблизительным подсчетам, от 0,47 до 2,75 млн метрических тонн пластика. При этом, стоит отметить, что темпы загрязнения Мирового океана в целом и прибрежных акваторий в частности стремительно растут (Ribic et al., 2010; Andrady, 2011)

Несмотря на то, что исследования пластикового загрязнения Мирового океана проводятся с начала 1970-х годов, оценки количества накопленных в океанах пластиковых отходов могут существенно различаться. На основе расчетов количества твердых отходов, производимых населением в 50 км прибрежной полосе 192 государств, было установлено, что по состоянию на 2010 год ежегодное поступление пластикового мусора с суши в Мировой океан равно 2,8-7,7 млн. т в год, около 90% которого представлено полиэтиленом, полипропиленом, полистиролом и поливинилхлоридом (табл. 2)

Таблица 2 – Основные типы полимеров, составляющие морской мусор

Тип полимера	Удельный вес кг/м ³	Производство, %	Пример изделий
Полиэтилен низкой плотности	0,91	21	Пакеты, бутылки, рыболовные сети.
Полиэтилен высокой плотности	0,94	17	Коробки для соков и молока
Полипропилен	0,83	24	Пробки для бутылок, канаты и веревки
Поливинилхлорид	1,38	19	Упаковочный материал, детские игрушки
Полистирол	1,05	7	Одноразовая посуда, пищевые контейнеры.
Полиэстер	1,37	6	Синтетические ткани

По разным оценкам, на суше формируется от 80 до 98% поступающего в океан пластикового мусора, главным образом бытовые пластиковые отходы. Распределение пластикового мусора в различных частях океана зависит от близости к речным устьям в период паводков, погодных условий (направления и скорости ветра), океанических течений, формы береговой линии, а также антропогенных факторов, таких как близость к центрам урбанизации, туристическим районам, морским транспортным путям или зонам активного промышленного рыболовства (Andrady, 2017; Abbasi et al., 2018; Ryberg et al., 2019).

Стоит отметить, что количественная оценка плавающего пластикового мусора (обычно с использованием сбора мусора с поверхности воды с помощью нейстонных сетей) серьезно недооценивает количество пластика в океане, поскольку данный метод не позволяет учитывать фрагменты пластика, находящиеся в придонном слое воды и донных отложениях. С помощью нейстонных сетей можно собрать только куски полимеров, имеющих положительную плавучесть в морской воде (удельный вес морской воды составляет ~ 1,025). Однако, как видно из таблицы 3, только некоторые из пластиков, обычно используемых в морской среде, имеют удельный вес ниже, чем у морской воды. Более плотные разновидности пластика, такие как нейлон, имеют тенденцию погружаться в толщу воды и даже достигать придонных отложений (Conley et al., 2019; Corradini et al., 2019).

Пластики с низкой плотностью (полипропилен, полиэтилен низкой плотности) обычно плавают по морской поверхности, а пластики высокой плотности (полистирол, поливинилхлорид, полиэтилентерефталат) оседают на дно. Однако некоторые пластики имеют плотность близкую к плотности морской воды и могут быть найдены на поверхности, в толще воды или на дне. Одной из причин повышения плотности пластиковых фрагментов является появление на их поверхности биологических пленок, состоящих из микроводорослей или беспозвоночных (Andrady, 2017).

Появление пленки отмечается уже через 1–2 недели после попадания пластиковых фрагментов в водную среду. Достигнув определенной плотности, некоторые частицы оседают на дно, а другие остаются во взвешенном состоянии, поддерживаемые турбулентностью водных масс (Cole et al., 2011). При этом все фрагменты пластикового мусора, независимо от типа полимера и места нахождения в морской среде подвергаются деградации, образуя частицы меньшего размера.

В результате общей циркуляции океанов и концентрирования пластиковых отходов, сформировались 5 огромных мусорных пятен, распространяющихся на сотни километров, в северных и южных частях Тихого и Атлантического океанов, а также в южной части Индийского океана. Высокие концентрации пластика в Южном Тихоокеанском субтропическом круговороте дополнительно могут быть вызваны поступлениями с береговой линии Индонезии и Эквадора, переносимые вдольбереговыми течениями (Eriksen et al., 2013). Наблюдаемые в круговоротах фрагменты пластикового мусора в основном представлены кусками предметов, пленкой и гранулами.

Накопление пластикового мусора в морской среде может привести к ухудшению условий обитания большого количества видов животных и растений, в то время как плавающие пластмассовые фрагменты создают новые экологические ниши и позволяют транспортировать инвазивные виды на большие расстояния.

Первые сообщения о пластиковом мусоре в океанах в начале 1970-х годов (Carpenter et al., 1972, Colton, Knapp, 1974) привлекли минимальное внимание научного сообщества к данной проблеме. В последующие десятилетия, по мере накопления данных об экологических последствиях такого мусора, эта тема привлекала все более устойчивый исследовательский интерес. Большинство исследований было сосредоточено на изучении возможности запутывания морских млекопитающих (Laist, 1997), китообразных (Clapham et al., 1999) и других видов (Erikson, Burton, 2003) в брошенных в море рыболовных сетях и проглатывания фрагментов пластикового мусора. Запутывание животных в пластиковом мусоре отмечается чаще (55% случаев), чем проглатывание ими частиц (31% случаев). Запутывание приводит к более серьезному, прямому и видимому вреду для животных (Gall, Thompson, 2015). Проглатывание пластика птицами (Mascarenhas et al., 2004; Mallory, 2008) и черепахами (Bugoni, Krause, 2001; Tomas, Guitart, 2002) широко задокументировано во всем мире, и по крайней мере 44% видов морских птиц могут заглатывать пластмассу вместе с источником пищи. Проглатывание частиц пластика, что в свою очередь может привести к блокированию кишечного тракта, уменьшению фактического потребления пищи, снижению подвижности и неспособности к воспроизводству (Wright et al., 2013). Однако, наибольшую опасность для морских обитателей и морских экосистем в целом, представляют мелкие частицы пластика, образующиеся в результате деградации крупных фрагментов морского пластикового мусора.

1.2. Деградация пластика

Деградация пластика – это частичное или полное разрушение полимера в результате химических изменений в его структуре, что вызывает снижение молекулярной массы и механической интеграции. Достоверно установлено, что все пластики со временем начинают терять свои первоначальные свойства, при этом скорость такого процесса зависит как от свойств самих полимеров, так и от физических, химических и биологических условий, в которых они находятся.

Существует четыре механизма, с помощью которых пластиковый мусор деградирует в морской среде: фотодеградация, термоокислительная деградация, гидролитическая деградация и биodeградация. Деградация, связанная с климатическими условиями, приводит к прогрессированию физических изменений: повышение хрупкости, потеря механической целостности, фрагментация (Andrady, 1994; Andrady, 1998; Eubeler et al., 2009).

Основной агент деградации пластика на начальном этапе – высокоэнергетическое ультрафиолетовое излучение, вызывающее растрескивание фрагментов пластика. Считается, что именно фотолиз обладает достаточной энергией для разрушения химических связей в основной полимерной цепи. Наиболее ярко этот процесс выражен в прибрежной зоне, особенно в экваториальных и субэкваториальных районах, где пластиковый мусор разрушается довольно быстро. В дальнейшем процесс разрушения может идти по пути термоокислительной деградации, существенно зависящей от температуры внешней среды и содержания кислорода, однако уже не требующий дополнительной ультрафиолетовой радиации. Процессы фотодеградации и термоокислительной деградации влияют на поверхность пластиковых частиц путем создания новых функциональных групп через реакции с фотогенерируемыми радикалами. Другие виды деградации, включая гидролиз и биodeградацию, происходят значительно медленнее, чем термоокисление (Andrady, 2011; Muthukumar et al., 2011). Конечный этап процесса фрагментации – разламывание пластиковых предметов, обычно происходит под воздействием механических сил, таких как ветровые волны в прибойной зоне, трение об обломочный материал или другие пластиковые фрагменты. При этом фрагментируются сильно выветренные пластики, так как химические процессы на поверхности пластиковых фрагментов, попавших в природную среду, меняются в зависимости от времени нахождения пластика в таких условиях. Поскольку солнечный свет, температура и содержание кислорода играют ключевую роль в разрушении пластика, принципиальными являются место и условия деградации.

Поскольку солнечный свет, температура и содержание кислорода играют основную роль в процессе деградации полимеров, особенно важно учитывать место и условия деградации. К слову, деградация ускоряется при физическом истирании из-за волновой или ветровой активности. Наибольшая скорость фрагментации пластика достигается при условии, когда морской полимерный мусор непосредственно подвергается воздействию УФ-излучения в пределах прибрежной полосы. Кроме того, повышение температурного режима и увеличение концентрации кислорода в воде повышают скорость фрагментации. Например, в результате механического истирания синтетической одежды во время стирки происходит образование большого количества микроволокон полимеров, которые со сточными водами попадают в водные экосистемы. Также, механический износ автомобильных шин приводит к появлению микроразмерной пластиковой пыли, которая, смываясь с дорожного полотна, также попадает в водные объекты. С другой стороны, образование биопленок снижает скорость деградации пластика, из-за того, что микроорганизмы перехватывают часть солнечной радиации, поступающей на поверхность полимерных фрагментов. Кроме того, в результате биообрастания увеличивается удельный вес пластиковых частиц, что приводит к погружению пластика в воду или оседанию на дно и затрудняет дальнейшую деградацию (Gilan et al., 2004; Barnes et al., 2009).

Установлено, что, как только пластиковые фрагменты попадают в толщу воды, на дно или покрываются органической пленкой, происходит значительное уменьшение скорости фрагментации. Состояние морского пластикового мусора, находящегося на дне водоемов (полиэтиленовые бутылки и пакеты, рыболовные сети и канаты) часто длительное время остается стабильным, что связано с уменьшением поступления УФ-излучения, снижением температуры и более низким содержанием растворенного кислорода в придонных слоях воды. Кроме того, включенные при производстве в состав пластика стабилизаторы ингибируют процесс деградации (Backhurst, Cole, 2000; Katsanevakis et al., 2007).

В настоящее время процессы деградации и фрагментации различных полимеров в морских и прибрежных экосистемах широко изучаются исследователями разных стран. Например, группа исследователей из США изучала фрагментацию полиэтилена высокого давления, полипропилена и полистирола в условиях приливно-отливной зоне мелководного соленого эстуария. В ходе этого исследования было обнаружено, что уже через четыре недели на всех фрагментах исследуемых полимеров образовалась биопленка, что в свою очередь увеличило вес полимерных пленок на 33,5–167% и снизило поглощение УФ на 99%. Тем не менее, через восемь недель нахождения полимеров в экспериментальных условиях было зафиксировано, что все фрагменты покрылись множеством микротрещин, наблюдалось отделение микрофрагментов от основных частей пленок (Weinstein et al., 2016).

В другом исследовании с помощью инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием были изучены бутылки из полиэтилентерефталата, которые пролежали разное время на глубине от 150 до 350 м. Сравнив полученные спектры бутылок, исследователи сделали вывод, что в течение 15 полиэтилентерефталат устает устойчивым к различным факторам внешней среды, однако, затем происходит значительное снижение функциональных групп полимера, что изменяет его внутреннюю структуру (Ioakeimidis et al., 2016).

При биоразложении пластиковые фрагменты теряют вес, поскольку происходит выделение углекислого газа, однако сами частицы сохраняют внешний вид и форму, а также не теряют прочности на разрыв. Частичная биodeградация может привести к эмиссии наноразмерных частиц пластика и другим синтетическим продуктам распада. Большая часть полимеров не подвержены эффективной биологической деградации. Например, полиэтилен, поливинилхлорид, полиэтилентерефталат, полиуретан очень медленно распадаются под действием биологических факторов, однако, некоторые абиотические факторы могут способствовать деградации и окислению. Так скорость биodeградации такого распространённого полимера как полиэтилен

увеличивается с 0,2% до 8,4% при условии, что фрагменты пластика подвергались УФ- излучению до начала процесса биоразложения (Restrepo-Florez et al., 2014).

На способность к биодegradации полимера влияют и его физико-химические свойства. Например, молекулярная масса, температура плавления и степень кристалличности снижают скорость и успешность деградации. Чаще всего полимеры с чистым углеродным скелетом менее восприимчивы к биологическому разложению и, наоборот, особенно подвержены деградации полимеры, имеющие гетероатомы в основной цепи (полиэферы, полиамины). В экспериментах с полиамидом было показано, что при взаимодействии микробного сообщества с полимером остаточные мономеры и олигомеры существенно влияют на выработку органического углерода (Klaegar et al., 2019).

Недавние исследования доказали, что такие полимеры как полиэтилен и полиэтилентерефталат могут быть единственным источником углерода для некоторых бактерий. Несмотря на то, что полиэтилен чрезвычайно устойчив к деградации и считается химически и биологически инертным полимером, установлено, что широкий круг микроорганизмов участвует в формировании биопленки и деградации этого полимера. За последние 50 лет обнаружено 17 родов бактерий и 12 родов грибов, активно участвующих в биологической деградации полиэтилена (Sivan, 2011; Restrepo-Florez et al., 2014; Auta et al., 2018).

1.3. Общее понятие микропластика

1.3.1. Первичный микропластик

Под термином микропластик понимают частицы пластика размером менее 5 мм, а также микроволокна, которые возникают в процессе деградации пластиковых изделий. Кроме того, к данной группе относят микрогранулы полимерных смол (композитов), микрочастицы, которые входят в состав косметических продуктов и бытовой химии, а также непосредственно пластиковые микроизделия (Betts, 2008; Moore, 2008; Arthur et al., 2009; Duis, Coors, 2016). Данный размер диапазон имеет практический смысл, который заключается в том, что именно частицы размером не более 5 мм могут свободно захватываться биотой и транспортироваться по пищевым цепям.

Исходя из физико-химических характеристик микропластик можно разделить на первичный, имеющий первоначальные, заложенные производителем, свойства, и вторичный, характеризующийся случайными параметрами, приобретенными во время нахождения пластиковых предметов в окружающей среде (рис. 2). Также микропластик может быть ранжирован в зависимости от вида базового полимера, формы, размера, веса, цвета и типа поверхности (Li et al., 2016; Wang et al., 2019).



Рисунок 2 – Классификация микропластика

В процессе производства, транспортировки и выпуска готовых пластиковых продуктов часть из них попадает в природную среду, в том виде, в котором они были выпущены как сырье для дальнейшего производственного процесса. Большинство известных полимеров выпускается в виде гранул размером от 2 до 5 мм, которые могут иметь цилиндрическую или сферическую форму (Maynard, 2006; Moore, 2008). Большинство из первичных гранул прозрачные или имеют белый цвет (поливинилхлорид, полистирол), однако и их состав могут быть добавлены красители, различающиеся по своему составу.

Промышленное производство синтезирует большое количество микроизделий, по своему составу являющихся пластиком, имеющих

полимерную основу и различного рода добавки. Данные изделия могут иметь разную форму (сферическую, цилиндрическую), а также в них могут быть предусмотрены определенные функциональные отверстия (Woodall et al., 2014; Conley et al., 2019). Известным примером пластиковых микроизделий является бисер, используемый для декора и рукоделия.

Микропластики создаются для многих специфических видов использования, например, как абразивные материалы при струйной воздушной или водяной очистке фасадов зданий, а также корпусов кораблей (Siegfried et al., 2017). Пластиковые микрогранулы нашли широкое применение в качестве разрыхлителей почв (Coyle et al., 2020). Важно отметить, что в процессе вымывания из почв, данные гранулы могут концентрироваться в природных углублениях и достигать водных объектов.

В настоящее время все больше внимания уделяется микропластикам, входящим в состав средств личной гигиены и косметических продуктов. Установлено содержание полимерных микрочастиц в составе гелей для душа, зубной пасты, дезодорантов, краски для волос, репеллентов от насекомых и солнцезащитных кремов (Fendall, Sewell, 2009; Napper et al., 2015; Napper, Tompson, 2016). Повышение внимания к микропластикам в средствах личной гигиены главным образом связано с рядом факторов: во-первых, такие продукты используются массово; во-вторых, в 1 г произведенного вещества может содержаться несколько десятков тысяч микроразмерных полимерных частиц; в-третьих, из-за своих малых размеров такие частицы не задерживаются очистными сооружениями и в огромных количествах попадают в окружающую среду. Более того, найти и идентифицировать такие мелкие частицы в природных условиях крайне сложно (Napper et al., 2015; Rochman et al., 2016; Yu et al., 2020).

Первое замечание о том, что пластик, входящий в состав средств для очищения лица, может стать новым источником загрязнения морских экосистем, было сделано в середине 90 годов прошлого столетия, однако эта проблема осталась незамеченной более десяти лет, пока микропластиковое

загрязнение не обрело глобальный характер (Gregory, 1996). В последние несколько лет количество исследований о содержании микропластика в средствах личной гигиены неуклонно растет, кроме того, активно изучается влияние такого загрязнения на окружающую среду.

В ходе исследования скрабов для лица и от ведущих производителей косметических средств в Словении было обнаружено, что во всех брендах присутствуют белые полиэтиленовые микропластики. При этом большинство частиц имело нерегулярную форму, а средние размеры частиц находились в диапазоне от 38 до 56 и от 71 до 96 мкм для скрабов и гелей соответственно (Kalcikova et al., 2017). Аналогичные исследования 4 средств для очищения лица на водной основе были проведены в Испании. Во всех изученных продуктах были обнаружены полиэтиленовые микрочастицы белого и голубого цветов. Форма изменялась от сглаженных гранул до частиц неправильной формы и волокнообразных фрагментов. Средний диаметр микропластиков изменялся от 73,8 до 185,1 мкм (Bayo et al., 2017).

В настоящее время в процессе промышленного производства средств личной гигиены и косметических продуктов (мыло и гели для душа, скрабы для тела, а также зубная паста) используется большое количество микрочастиц пластика. Не исключением являются и средства декоративной косметики, такие как тени и базы для век, румяна, основы для макияжа, туши для ресниц, лаки для ногтей, а также большинство солнцезащитных средств. Микрочастицы используют в качестве абразивного агента для целей эксфолиации или для улучшения цвета. Использование полимерных частиц размером 74–420 мкм аморфной формы без острых краев в 1972 г. было одобрено в США в качестве приемлемых эксфолиантов в средствах для ухода за кожей. В 2012 г. около 6% средств для очищения лица производимых в Евросоюзе, Норвегии и Швейцарии содержали микропластики (Duis, Coors, 2016). В среднем косметические продукты содержат в своем составе до 12% пластиковых микрочастиц размером до 800 мкм. Также важно отметить, что

более половины европейских косметических брендов используют полимерные микрочастицы (Napper et al., 2015).

Основная доля первичного микропластика, поступающего в сточные воды, особенно муниципальные, составляют микрочастицы из средств личной гигиены. В результате одного использования средств для ухода за кожей в сточные воды попадает от 4600 до 94500 пластиковых микрочастиц, а одно использование зубной пасты дает эмиссию около 4000 микрочастиц (Napper, Thompson, 2016). В 2012 году из 30 стран Евросоюза эмиссию микропластика из средств личной гигиены составила от 20 до 300 т. Более ранними исследованиями установлено, что использование жидкого мыла одним человеком в США приносит в морскую среду 2,4 мкг полиэтилена ежедневно, что приводит к внесению 263 т микрочастиц пластика в год (Gouin et al., 2011).

Частицы первичного микропластика, изначально имея физико-химические характеристики, рассчитанные на их функциональное использование, попадая в другую внешнюю среду, могут изменять свои свойства. Внешняя, иногда весьма агрессивная, среда для значительной части первичных микропластиков начинается с момента их попадания в сточные воды, которые могут содержать всевозможные химические вещества. Уже здесь, в сточных водах, начинается процесс постепенного изменения физико-химических характеристик первичных микрочастиц, в результате чего они приобретают новые, вторичные свойства и становятся вторичным микропластиком (Murphy et al., 2016; Yu et al., 2020).

Часть первичных микропластиков попадают непосредственно в природную среду, хотя химически менее агрессивную, но не менее разнообразную. В результате разного времени нахождения в различных средах, микропластики, изначально имеющие одну и ту же форму, цвет и свойства, на момент их обнаружения могут существенно различаться. Основными процессами, участвующими в преобразовании частиц первичного микропластика во вторичный, являются: истирание, фрагментация, сорбция,

вымывание добавок, обесцвечивание и растрескивание (Andrady, 2011; Muthukumar et al., 2011).

1.3.2. Источники вторичного микропластика

В настоящее время большое внимание научных сообществ уделяется определению возможных источников вторичного микропластика. Существует несколько подходов к разделению источников микроразмерных частиц пластика. При анализе поступления таких частиц в Мировой океан, как правило, выделяют источники, расположенные на суше и в море. Значительно реже для идентификации источников пластиковых микрочастиц используется их полимерный состав (Helm, 2017; Fahrenfeld et al., 2019).

Самым массовым и неконтролируемым источником вторичного микропластика являются частицы, образующиеся в результате истирания автомобильных и мотоциклетных шин, а также дорожного покрытия. Большинство частиц имеют размер менее 80 мкм. По результатам группы исследований, проведенных в Норвегии, Голландии, Германии и Иране, этот источник определен как один из основных источников загрязнения моря микропластиком (Sundt et al., 2016; Verschoor et al., 2016; Dehghani et al., 2017). На основе модельных расчетов установлено, что из общего количества микропластиков, выносимых европейскими реками в море, 42% составляют микрочастицы от разрушения шин и дорожного полотна. Часть пыли от шин поднимается в воздух, другая часть попадает в почву вокруг дорог, может смешиваться со снегом, а затем при снеготаянии или с дождевым стоком попадает в континентальные водные объекты или море, поскольку абсолютное большинство фильтров и других процессов отделения твердой фазы в очистных сооружениях не рассчитано на задержание таких мелких полимерных частиц (Dehghani et al., 2017; Vogelsang et al., 2019). Ежегодная эмиссия в окружающую среду микропластика, представленного пылью от шин в Норвегии, Швеции и Германии составляет 4,5, 10 и 110 тысяч тонн соответственно. При этом в расчете на одного человека средняя эмиссия составляет 1–1,4 кг в год (Unice et al., 2019).

Разрушение синтетических текстильных изделий в результате их использования и, особенно во время стирки – второй источник микропластика (PlasticsEurope, 2019). Такие волокна массово продуцируются в результате человеческой деятельности. Количество и вид микроволокон, попадающих во внешнюю среду зависит от типа полимера, из которого изготовлено изделие, свойств синтетического волокна, вида переплетения нитей в ткани, а также от способа стирки. Микроволокна являются наиболее сложным видом из всех микропластиков по химическому составу (Dai et al., 2018; De Falco et al., 2018).

Например, механическое истирание при стирке синтетической одежды или другого текстиля в стиральной машине приводит к фрагментации и высвобождению пластиковых волокон в сточные воды, которые в свою очередь переносят такие частицы в воды Мирового океана. (UNEP, 2016).

В результате производственной деятельности всех текстильных предприятий, а также использования текстильных изделий из синтетических материалов (в том числе и стирки) и их последующей утилизации большое количество микроволокон попадает и аккумулируется в объектах окружающей среды. На долю производства синтетических тканей в мире приходится около двух третей мирового производства всех текстильных изделий. Ежегодно в мире перерабатывается 70 млн т волокон в 400 млрд м² тканей и это количество постоянно растет (Hernandez et al., 2017). На сегодняшний день почти все современные ткани содержат в своем составе искусственные волокна. Кроме того, более 85% аккумулированных в морской прибрежной зоне микропластиков представлены микроволокнами. С территории Финляндии в окружающую природную среду поступает до 411 т микроволокон на основе полиэстера и хлопка (Cesa et al., 2017). Работа прачечных Норвегии, а также бытовая стирка личных вещей местными жителями способствует образованию 100 и 600 т микроволокон соответственно (Almroth et al., 2018).

В результате стирки ткань подвергается множественной нагрузке, а именно растягиванию, переломам, изгибам, расщеплениям и отслаиваниям

волокон. Предполагается, что именно механическое истирание может быть одним из основных факторов выхода микроволокон из ткани. Ткань претерпевает значительные изменения в структуре волокон с увеличивающимся повреждением молекулярных цепей и снижением уровня полимеризации, что непосредственным образом связано с высоким уровнем механического и химического воздействия (Castillo et al., 2016; Hernandez et al., 2017). Количество отделяемых от ткани микроволокон зависит от типа стиральной машины. Эксперимент со стиркой пяти курток из разных синтетических материалов показал, что использование стиральной машины с верхней загрузкой одежды на 430% увеличивает эмиссию микроволокон по сравнению с машинами с фронтальной загрузкой. Наличие центральной мешалки, а также более продолжительный цикл стирки и больший уровень потребления воды в моделях с верхней загрузкой может приводить к выраженным механическим воздействиям и объясняет высокую степень ослабления волокон тканей. Данная ситуации также касается стиральных машин, эксплуатируемых на крупных промышленных предприятиях (Pirc et al., 2016).

Установлено, что обычная загрузка в стиральную машину 5 кг полиэстеровой ткани может дать эмиссию 6,0–17,7 микроволокон общим весом 0,43–1,27 г в зависимости от процесса стирки. Основными механическими параметрами, влияющими на выход микроволокон при стирке, являются: температура воды, продолжительность цикла стирки, скорость вращения барабана, расход воды, мощность машины и тип системы фильтрации. Кроме того, на количество микроволокон также влияет тип волокна и изделия, а также состояние изделия (De Falco et al., 2018).

Третий источник поступления микропластика в окружающую среду это – разрушение макропластикового мусора под совокупным воздействием физических, химических и биологических процессов, уменьшающих структурную целостность более крупных фрагментов. Имеются данные о том, что фрагментация одного макропластикового предмета диаметром 200 мм на более мелкие мезофрагменты диаметром 50 мм приводит к образованию 16

частиц, которые в свою очередь разрушаются на 625 более мелких микроразмерных частиц диаметром 2 мм (Eriksen et al., 2013).

Фрагменты пластиковых предметов могут быть всевозможной формы и размеров, в зависимости от исходных свойств, размера и формы изделия, а также от внешних условий. Разрушение объемных предметов чаще всего приводит к образованию микрочастиц, имеющих форму близкую к кубической. При этом новые фрагменты жестких пластиков, как правило, имеют острые края. Длительное нахождение в подвижной внешней среде (например, в прибойной зоне) приводит к значительному истиранию частиц, сглаживанию граней и углов. В конце концов, частицы приобретают округлую форму (Sutherland et al., 2010; Newman et al., 2015).

Как уже было отмечено, основную роль в деградации пластиков играют ультрафиолетовое излучение, температура, наличие кислорода и механическое воздействие. УФ-излучение приводит к формированию карбонильной группы, делая материал более хрупким, тем самым увеличивая вероятность механической деградации (Eubeler et al., 2009). Именно в прибойной зоне при прочих равных условиях наблюдается наибольшее количество пластиковых микрофрагментов. Стоит отметить, что механизмы деградации не одинаковы для всех пластиков. Так полистирол и полиэтилен более подвержены деградации под воздействием ультрафиолетового излучения, чем другие пластики (Alimi et al., 2018).

Лабораторные эксперименты с образцами полистирола кубической формы с размером граней 2 см показали, что за 3–6 дней при помощи песка в зоне активной волновой деятельности происходит разрушение исследуемых фрагментов до микроразмерных частиц. Для более твердых производственных полиэтиленовых гранул в моделируемой прибойной зоне существенная деградация поверхности частиц, связанная с их фрагментацией, происходила через 14 дней (Tsang et al., 2017).

Помимо трех вышеописанных крупных источников микропластикового загрязнения можно также выделить группу менее значимых источников.

Например, обслуживание судов приносит свою часть в общее микропластиковое загрязнение морской среды. Корпус корабля периодически необходимо очищать от обрастания, а также для подготовки к перекраске. Традиционно для этой цели используются воздушные пескоструйные установки, однако в последнее время в качестве абразивного материала используют пластиковые микрочастицы. В результате в окружающую среду могут попасть два вида микропластиков, во-первых, используемый в качестве абразивного материала и, во-вторых, частицы краски, которые также часто имеют полимерную основу. Фрагменты пластика и красок также попадают в морские экосистемы при массовой разборке кораблей, 70% которой осуществляется в Южной Азии (Индии, Пакистане, Бангладеш), а 19% в Китае (Rezania et al., 2018; Abreu, Pedrotti, 2019).

Также к появлению новых микропластиковых частиц приводит постепенное разрушение корабельных снастей, снаряжения и такелаж, таких как тралы, сети, причальные и буксировочные канаты, тросы, фалы, стропы, а также приспособления марикультуры. Установлено, что полиэтиленовые, полипропиленовые и нейлоновые канаты в условиях приливно-волнового движения воды при глубине 10 м ежемесячно теряют 0,39–1,02% веса. Разрушению погруженных частей поплавков и продуцированию огромного количества микроразмерного пластика способствуют изоподы, создающие норы во вспененном полистироле (Al-Oufi et al., 2004; Yong et al., 2014).

1.4. Нанопластик

Термин «нанопластик» до сих пор широко обсуждается в научном мировом сообществе, и в разных работах установлен верхний предел размеров 1000 или 100 нм (Alimi et al., 2018). Нанопластик, который потенциально может находиться в окружающей среде, определяется полимерные частицы, образованные в результате деградации и изготовления пластиковых объектов, у которых хотя бы в одном измерении размер находится в диапазоне от 1 до 1000 нм и, которые имеют коллоидное поведение (Gigault et al., 2018). Специфической

особенностью нанопластиков, как и других наночастиц является то, что их свойства отличаются от свойств исходного материала (табл.3)

Таблица 3 – Основные свойства, характеризующие нанопластики (по Ward, Kach, 2009).

Характеристика	Описание
Состав	Смесь значительно выветренных различных полимеров
Образование	Произвольное, не преднамеренное
Размер	1–1000 нм
Распределение размеров	Полидисперсное
Форма	Асимметричная, гетерогенная
Изменение поверхности	Неконтролируемое присутствие различных веществ (органических и неорганических) неоднородно на поверхности частицы.
Стабильность	Гетероагрегация с другими природными и антропогенными коллоидами в зависимости от физико-химических свойств частиц и окружающей среды
Агрегаты	Фрактальные агрегаты, в зависимости от процесса формирования
Пористость	Открытая структура, в зависимости от материала исходной частицы и процесса формирования

Источники нанопластиков в окружающей среде в значительной степени те же, что и микропластиков: эмиссия из недоочищенных сточных вод, которые принимают поступления коллоидных частиц из средств личной гигиены и от машинной стирки. Кроме того, выветривание и абразия пластиковых изделий на суше и в водных объектах, также приводит к образованию нанопластиков. В лабораторных условиях было установлено, что деградация фрагментов крышки стакана для кофе из полистирола приводит к формированию пластиковых наночастиц. В ходе этого эксперимента образцы полистирола 56 суток содержали в сосуде с деминерализованной водой, помещенный в климатическую камеру. В камере поддерживались постоянные условия с температурой 30°C и круглосуточным воздействием света, как в

видимом, так и в УФ диапазонах. Через 56 суток концентрация наночастиц полистирола в 1 мл воды составляла $1,26 \times 10^8$. Общий диапазон регистрируемых наночастиц составлял 30–1000 нм (Lambert, Wagner, 2016).

Многие потребительские товары, такие как скрабы и шампуни, содержащие пластиковые микрочастицы, механически обрабатывают и эмульгируют, используя высокоскоростные смесители. Физическая деградация и разрушение микропластиков во время их производства или во время подготовки средств личной гигиены могут привести к образованию нанопластиков. (Hernandez et al., 2017). С появлением 3D печати, широкодоступной для быстрого прототипирования и мелкого производства, количество полимерных наночастиц в окружающей среде значительно возросло. Размер частиц, применяемых для 3D печати, находится в диапазоне 11.5–116 нм. Поскольку 3D принтеры свободно продаются без каких-либо систем вытяжки или фильтрации высока вероятность того, что применяемые наночастицы окажутся в воздухе, почве и воде. Также специфическим источником нанопластиков является термическая резка пенополистирола, в результате которой образуются полимерные частицы в диапазоне 20–220 нм (Costa et al., 2018).

Не существует аналогии между нанопластиками из окружающей среды и другими наноматериалами ввиду различных производственных путей их получения и физико-химических свойств (размер, форма, поверхность, состав), которые не могут быть экстраполированы. Нанопластики в окружающей среде являются результатом выветривания или разрушения крупных пластиковых предметов и, в отличие от наноматериалов, у них нет определённого заданного размера. Соответственно, нанопластики значительно полидисперсные по физическим свойствам и гетерогенные по составу (Gigault et al., 2018).

Существует значительное количество лабораторных исследований агрегации пластиковых наночастиц, особенно сферических наночастиц полистирола. Было показано, что карбоксилированные частицы полистирола размером 300 нм в морской воде менее чем за 30 минут образуют агрегаты с

размером более 1000 нм (Hernandez et al., 2017). В других исследованиях чистые частицы полистирола диаметром 60 нм формировали агрегаты только после 28 суток. Размер агрегатов изменялся в пределах 100–500 нм. Аналогичные результаты получены в работе (Gigault et al., 2018), когда полистирольные нанопластики из окружающей среды были стабильны в водном растворе, содержащем 350 ммоль/л NaCl, а при увеличении концентрации раствора выше 500 ммоль/л начинали необратимо изменяться.

Таким образом, как и всем другим коллоидным системам, нанопластике присуще состояние стабильности и способность к объединению. Размер, форма и концентрация агрегатов определяют свойства нанопластической дисперсии. Нанопластики могут непосредственно связываться с растворенными органическими и неорганическими коллоидами, с образованием как стабильных, так и неустойчивых агрегатов в данных физических и химических условиях среды. Перемещение нанопластиков и их депонирование в комплексных пористых средах, таких как почва, донные отложения и прибрежные (пляжные) отложения зависит от физических и химических свойств поровых вод, размера, формы и свойств самих наночастиц (Besseling et al., 2017).

Значительное количество нанопластиков может попасть в грунтовые воды через неводонасыщенные зоны, где мобильность частиц снижена по сравнению с водоносными слоями из-за взаимодействия на границе воздух-вода и сил поверхностного натяжения. Как и другие коллоидные частицы, нанопластики способны повысить мобильность органических и неорганических загрязнителей в грунтах, грунтовых и поверхностных водах. Движение коллоидов может быть быстрее, чем поровых вод, поскольку коллоиды не могут попасть в мелкие поры (Alimi et al., 2018).

1.5. Влияние пластика на гидробионтов

Пластик может быть, как источником, так и переносчиком загрязняющих веществ в окружающей среде. Любая токсичность, связанная с пластмассами в целом, включая мезо- или микропластики, может быть связана с одним или несколькими из следующих факторов:

1. При проглатывании частиц пластика живыми организмами в процессе пищеварения возможно выщелачивание остаточных продуктов (например мономеров), образующихся в процессе полимеризации пластика при производстве и добавок, используемых при изготовлении для придания определенных свойств конечному изделию.

2. В результате пребывания пластика в окружающей среде под действием различных факторов могут образовываться токсичные промежуточные соединения. Так например, при фотоокислении полистирола образуются ароматические соединения, которые в свою очередь являются токсичными для живых организмов.

3. Частицы пластика любого размера во время пребывания в воде способны сорбировать и аккумулировать на своей поверхности стойкие органические загрязнители, содержащиеся в среде (Vandenberg et al., 2007; Bowmer, Kershaw, 2010). Поскольку все СОЗ гидрофобны и хорошо удерживаются на пластике их концентрация на частицах может в миллион раз превышать концентрацию в окружающей среде (Friedman et al., 2009; Cole et al., 2011).

На данный момент установлено, что частицы пластика, способны в значительной степени сорбировать такие высокотоксичные соединения как полихлорированные бифенилы, фенолы, полициклические ароматические углеводороды, нефтяные углеводороды и хлорорганические пестициды (Рис.3)

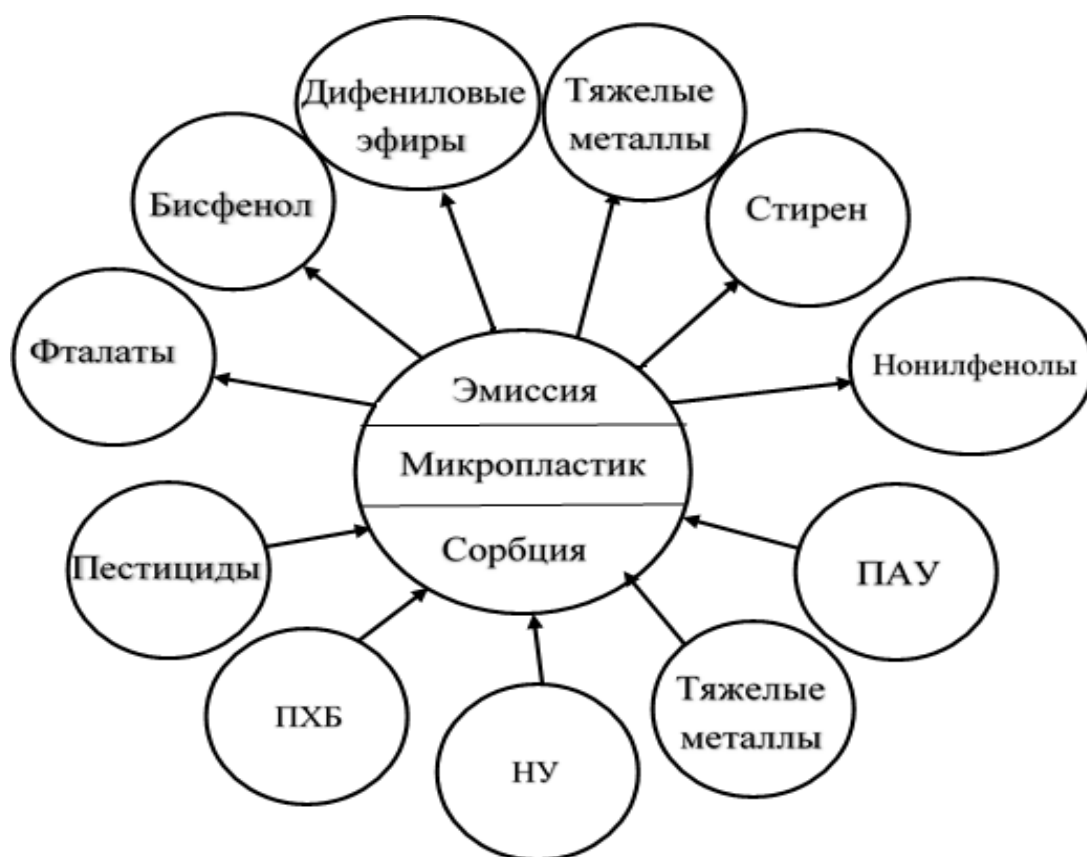


Рисунок 3 – Сорбция и эмиссия химических веществ частицами микропластика

В последнее время, учитывая глобальность микропластикового загрязнения вод Мирового океана, увеличивается количество научных трудов, посвященных способности пластика сорбировать на своей поверхности и переносить стойкие органические загрязнители и тяжелые металлы. Сорбционные свойства пластиков зависят от физико-химических характеристик базового полимера, химических свойств и состояния среды, в которой находятся частицы, уровня их выветривания и температуры (Rios, Moore, 2007; Ashton et al., 2010).

В результате деградации и разрушения пластиков, увеличивается площадь доступной поверхности, площадь микропор, а также степень окисления и, как следствие, возрастает сорбционная способность. Старые, выветренные гранулы обладают более высокой сорбционной способностью (Napper et al., 2015). Наибольшую удельную площадь поверхности имеют наночастицы, которые могут очень эффективно связывать гидрофобные химикаты, в особенности

полициклические ароматические углеводороды, увеличивая токсичность при поглощении таких частиц биотой. Сорбционные свойства пластиков напрямую зависят от типа базового полимера. Резиноподобные полимеры, такие как полиэтилен и полипропилен обладают более высоким уровнем диффузии загрязняющих веществ, чем стекловатые полимеры, такие как полиэтилентерефталат и поливинилхлорид. Из этой общей тенденции выпадает полистирол, который, имея стекловатую структуру, демонстрирует высокую сорбционную способность (Thompson, 2009).

Кроме адсорбированных токсичных поллютантов повышенную экологическую опасность представляют эндогенные химические вещества, которые используются при производстве полимеров. По оценкам Araújo et al. (2002) у разных производителей концентрация мономеров в различных видах полимеров может сильно варьировать от очень низких 0.0001% (100 ppm) до более 4% (40000 ppm). Помимо этого, в синтетических полимерах могут присутствовать низкомолекулярные фрагменты олигомеров, катализаторы, синтетические стабилизаторы, а также широкий спектр химических добавок (фталаты, бисфенол А, ПХБ, красители, пластификаторы и др.), придающих полимерам специфические потребительские характеристики. Одним из первых на химическую опасность, исходящую от синтетических полимеров, обратил внимание Литнер с коллегами (Lithner et al., 2011). Проанализировав водные «вытяжки» из нескольких десятков распространенных пластиковых бытовых изделий, они показали, что из ряда полимеров в водную среду вымываются опасные химические вещества, вызывающие в кратковременных (48 час.) экспериментах гибель ветвистоусых рачков - дафний *Daphnia magna* Straus, 1820. Аналогичную картину наблюдала американская группа исследователей (Li et al., 2016). В водных «вытяжках» из 7 разных видов полимеров они обнаружили сложную смесь химических веществ, которые в экспериментальных условиях вызывали гибель взрослых особей и подавляли оседание личинок усоного рачка *Amphibalanus amphitrite* Darwin, 1854.

Большая часть адсорбированных на поверхности и «собственных» (эндогенных) низкомолекулярных химических соединений связана с полимерными структурами не химически, а физически, и могут высвобождаться (диффундировать) в окружающую среду, представляя угрозу жизнедеятельности для широкого спектра водных организмов.

Морские организмы особенно восприимчивы к загрязнённому пластику из-за его повсеместности в водной среде, большого отношения площади поверхности к объёму и малых размеров. Наибольшую опасность для биоты, связанную с проглатыванием пластиковых частиц, представляет возможность выхода высоких концентраций сорбированных липофильных загрязнителей в организм животного, в результате чего может возникнуть токсический эффект. В общем случае влияние сорбированных органических загрязнителей на организм животного будет зависеть от биодоступности поллютанта, массы животного, общей концентрации загрязнителей на микрочастицах и их способности к биоаккумуляции (Von Moos et al., 2012; Van Cauwenberghe, Janssen, 2014; Napper et al., 2015).

После того, как пластиковые частицы попадают в организм, присутствующие пищеварительные поверхностно-активные вещества повышают биодоступность сорбированных загрязняющих веществ и значительно увеличивают скорость десорбции. Поскольку температура и pH играют важную роль в десорбции стойких органических соединений из пластиков, было установлено, что в условиях кишечника гидробионтов, скорость десорбции загрязнителей выше, чем в морской воде (Thompson, 2009; Lithner et al., 2011).

Из-за небольшого размера пластиковых микрочастиц, широкий спектр водных организмов, в том числе зоопланктон может поглощать их. Ряд исследований показали, что несколько таксонов зоопланктона способны к активному поглощению микропластиков, что имеет ряд определенных негативных последствий для биологических процессов, проходящих внутри организма. Зоопланктон обитает и активно питается в поверхностном слое воды, где концентрации частиц микропластика достаточно велики, что в

значительной степени увеличивает вероятность их захвата биологическими системами (Rossi et al. 2014; Long et al., 2014).

Экология вида, а также время, проведенное в различных слоях толщи воды, имеют существенное значение. Некоторые зоопланктонные виды являются исключительно нейстонными (например, личинки рыб), а другие проводят только определенные периоды времени (обычно ночное время) на поверхности воды. Более того, зоопланктон – важный источник пищи для многих вторичных потребителей, в том числе и коммерчески важных видов рыб и китообразных, следовательно, это один из путей, по которому микропластики могут войти в пищевую цепь и мигрировать на более высокие трофические уровни. Поглощение микропластика было зафиксировано у 39 видов морского зоопланктона из 28 таксономических рангов, голо- и меропланктонных видов (Botterell et al., 2019).

Лабораторные исследования влияния микропластика на пресноводный зоопланктон в основном сконцентрированы на влиянии частиц полистирола на кладоцер *Daphnia galeata* Sars, 1864, *D. magna* и *D. pulex* (Lin et al., 2019). В большинстве работ отмечается острая токсичность пластиковых микрочастиц для этих видов.

Меропланктон, особенно личинки рыб, также проглатывают пластиковые микрочастицы. Около 2,9% личинок рыб, собранных в западной части Английского канала, имели внутри микропластики, большинство из которых были микроволокнами (Steer et al., 2017).

Зоопланктон представляет собой таксономически разнородную группу, и поэтому он демонстрирует несколько различных стратегий кормления. Было показано, что микропластики препятствуют кормлению и ограничивают потребление пищи зоопланктоном, вплоть до того, что могут заблокировать или повредить желудочно-кишечный тракт. Кормление морских веслоногих ракообразных *Calanus helgolandicus* Claus, 1863 природными водорослями с добавлением микросфер полистирола показало значительное снижение потребления микроводорослей (Cole et al., 2011). У артемий *A. parthenogenetica*

под воздействием микросфер полистирола форсировались аномальные изменения ультраструктур клеток эпителия кишечника (Steer et al., 2017).

Снижение энергозатрат может иметь негативные последствия для состояния зоопланктона, а также влиять на их репродуктивную способность и продолжительность жизни. При воздействии на копепод *T. japonicus* микрочастиц полистирола разной концентрации, наблюдалось значительное снижение плодовитости в течение двух поколений. Также было обнаружено большое количество яиц, которые не развивались (Lee et al., 2013).

Снижение активности поведения при добыче пищи и, следовательно, ее потребления, может привести к дефициту энергии. Для ранних личиночных стадий это может иметь пагубное влияние на рост и дальнейшее развитие. Было установлено, что снижение питания водорослями из-за присутствия микропластиков удлиняет фазу науплиуса у *T. japonicus* (Lee et al., 2015). Полистирольные микрогранулы размером 2–5 мкм, проглоченные велигерами морской улитки *Crepidula onyx* Sowerby, 1824 привели не только к замедлению темпов роста, но и к более раннему поселению на морском дне с меньшим размером, что может негативно повлиять на их дальнейшую выживаемость (Fernandez, Albentosa, 2019).

Кроме того, особи, которые подверглись воздействию микропластиков во время их личиночной стадии, продолжали демонстрировать задержки развития через 65 дней после проглатывания пластиковых микрочастиц. Замедление роста наблюдалось у пресноводных амфипод *G. fossarum* при воздействии на них микрочастиц полиметилметакрилата (Straub et al., 2017). Воздействие экологически значимых концентраций микрочастиц полистирола (90 мкм) препятствовало вылуплению, снижало скорость роста, изменяло предпочтения в питании и врожденное поведение личинок речного окуня *Perca fluviatilis* Pokrovsky, 1951. Кроме того, у особей, подвергшихся воздействию микропластика, значительно увеличивалась смертность от хищников (Lonnstedt, Eklov, 2016).

Микропластик может нарушить не только темпы роста, но и физическое развитие зоопланктона. Так, личинки морского ежа *P. lividus* развивались с

изменениями при попадании в организм микрочастиц пластика (Pinsino et al., 2017). У дафний *D. pulex* хроническое воздействие наночастиц полистирола вызвало уменьшение длины тела (Liu et al., 2019). Более того, аномальное эмбриональное развитие другого вида морского ежа *Lytechinus variegatus* Lamarck, 1816 увеличилось на 66,5% при воздействии продуктов, выделяющихся с первичных полиэтиленовых гранул с концентрацией 200 шт./л (Nobre et al., 2015). Токсическое воздействие продуктов выщелачивания при деградации пластиков наблюдалось у гарпактикоидных *Nitocra spinipes* Boeck, 1865 (Bejgarn et al., 2015) и каланоидных копепод *Parvocalanus crassirostris* Dahl, 1894 (Heindler et al., 2017). Эти физиологические эффекты были вызваны не воздействием микропластиков при их проглатывании, а в результате всасывания химических веществ, вышедших из первичных пластиковых гранул и разрушающихся частиц, что указывает на чувствительность ранних стадий жизни, как на внутреннее, так и на внешнее воздействие микропластиков и неопределенность будущих последствий для онтогенеза организмов (Botterell et al., 2019).

Биологическая доступность микропластика является пропорцией общего количества частиц, присутствующих в окружающей среде к количеству, доступному для поглощения организмом. На биодоступность микропластика для зоопланктона могут влиять многие абиотические и биотические факторы, такие как, обилие микропластика, характеристики пластиковых частиц, трансформация и избирательность зоопланктоном. Так, например, цвет микропластика может потенциально увеличить его биодоступность из-за сходства с объектами добычи, особенно у хищных видов (Wesch et al., 2016; Foley et al., 2018). Пластиковые микрочастицы, обнаруженные у эвфаузиид и веслоногих ракообразных в северо-восточной части Тихого океана, были преимущественно черными, синими и красными. Вместе с тем не было обнаружено какой-либо разницы в цвете проглоченных частиц между видами. Точно также, в пищеварительной системе молоди рыб в Английском канале встречались преимущественно синие микропластики

(66%), что не соответствовало цветовому соотношению пластиковых микрочастиц в окружающей среде (Desforges et al., 2015).

Кроме того, биопленки на микропластиках могут содержать добычу, подобную той, которой может питаться зоопланктон, и выделять химические вещества, которые способствуют их обнаружению, поэтому увеличивается вероятность того, что покрытые пленкой микропластики будут случайным образом приняты за добычу. Веслоногие ракообразные *Acartia longiremis* Lilljeborg, 1853 и *Calanus finmarchicus* Gunnerus, 1770 значительно чаще проглатывали старые пластиковые микрогранулы, чем новые микрочастицы без биопленок. Это подтверждает тот факт, что процессы старения, выветривания и биообрастания увеличивают биодоступность микропластика (Vroom et al., 2017; Rehse et al., 2018).

Помимо зоопланктонных организмов высокой степенью потребления и накопления микропластиковых частиц обладают бентосные гидробионты. Как и зоопланктон, морской и пресноводный зообентос представлен разными таксономическими группами животных, среди которых доминируют моллюски. Они же имеют важное коммерческое значение, что в свою очередь стимулирует значительный интерес к исследованию влияния микропластиков на эту группу живых организмов (Su et al., 2016; Horn et al., 2019; Lin et al., 2019). Кроме того, моллюски широко распространены в континентальных и морских водах. Сравнение потребления микропластиков 5 видами морских моллюсков, включая брюхоногих и двустворчатых, с различными стратегиями питания, показало, что хищные виды содержат большее количество пластиковых микрочастиц. Для этих организмов дополнительным источником микропластика может быть трофический перенос (Leslie et al., 2017; Karlsson et al., 2017).

Именно мидии – морские двустворчатые моллюски из семейства митилид, предлагается использовать в качестве биоиндикаторов глобального загрязнения микропластиком морских вод, из-за их широкого распространения, присутствия в жизненно важных экологических нишах, прямой подверженности влиянию пластиковых микрочастиц, а также тесной связи с морскими хищниками и здоровьем человека (Watts et al., 2016; Wesch

et al., 2016; Brate et al., 2018). В качестве индикаторов загрязнения микропластиком континентальных водных объектов предлагается использовать пресноводных моллюсков рода *Corbicula* (Li et al., 2019).

Полевые исследования демонстрируют широкое распространение микропластиков в мидиях со всего мира, но их обилие сильно варьирует. Во многих случаях количество микропластика в мидиях, собранных в природных условиях, тесно связано с деятельностью человека, и есть доказательства положительной корреляции между микропластиками в мидиях и окружающей среде, что также подтверждено лабораторными экспериментами (Karlsson et al., 2017; Su et al., 2018). Кроме того, лабораторные исследования демонстрируют, что мидии могут быть хорошими модельными организмами для выявления поглощения микропластиков, их накопления и токсичности.

Полевые исследования потребления микропластика мидиями проводилось во многих странах, включая Германию, Францию, Бельгию, Италию, Китай, Индонезию, Канаду и Бразилию. Наиболее часто в организме мидии обнаруживались микроволокна (48%) и значительно реже пластиковые фрагменты (18%) (Setälä et al., 2014; Cho et al., 2019). Самыми распространёнными полимерами являются: полиэтилен, полипропилен, полистирол, полиэстер, полиэтилентерефталат, полиамид и поливинилхлорид. В большинстве случаев морфотип и полимерный состав микрочастиц, обнаруженных внутри мидии, совпадал с таковым в донных отложениях и воде района исследований, однако у мидий мелкие частицы встречались чаще, чем в окружающей среде. Наиболее мелкие из обнаруженных частиц имели размер 5 мкм (Su et al., 2019).

Количество пластиковых микрочастиц, обнаруженных у мидий разных регионов варьировало от 0,05 до 259 шт./г ткани. Особи из областей с интенсивной человеческой деятельностью имели значительно большее количество микропластиков (Lin et al., 2019). Есть свидетельства того, что микропластики могут накапливаться в организме мидий, поскольку значительно более высокие уровни содержания микрочастиц были обнаружены в теле моллюсков (37000

шт./кг живого веса) по сравнению с окружающими донными отложениями (48 шт./кг сухого веса) и морской водой (27 шт./л) (Karlsson et al., 2017).

Лабораторные исследования воздействия пластиковых микрочастиц на мидий показали, что, когда микропластики, находятся в воде вблизи жаберных пластинок, они могут быть захвачены и пойманы липкой слизью, образующейся на жабрах, а затем посредством ресничного эпителия транспортируются в пищеварительную систему. Ток воды создается действием ресничного эпителия, покрывающего внутреннюю поверхность мантии, окологотовые выросты и жаберные пластинки, которые располагаются по обеим сторонам тела и являются своеобразным ловчим аппаратом. Не каждая частица, захваченная жабрами, попадает в организм, поскольку мидии способны сепарировать и отвергать несъедобные частицы, что является способом защиты организма от большого количества взвешенного в воде вещества (Von Moos et al., 2012; Brate et al., 2018).

Мидии могут часами поглощать и накапливать микропластики размеров до 80 мкм. Более мелкие частицы поглощаются и удерживаются мидиями легче, чем крупные. Микропластики большего размера (до 500 мкм) были обнаружены в псевдофекалиях мидий, в то время как в тканях животных находились частицы размером 20–80 мкм. Кроме того, мидии чаще поглощают состарившиеся и выветренные частицы по сравнению с первичными микропластиками (Lin et al., 2019).

Аналогичные результаты получены для устриц из 17 хозяйств марикультуры, находящихся в различных районах вдоль побережья Китая. Среднее количество частиц микропластика в устрице составляло 0,62 шт./г сырого веса или 2,93 шт./экз. Устрицы южных районов содержали более количество микрочастиц, чем северных. Микроволокна были наиболее распространенной формой пластиковых частиц (60,67%), размер которых чаще всего (82%) не превышал 1500 мкм. Анализ методом микро-FTIR выявил 8 различных полимеров с преобладанием полиэтилена и полиэтилентерефталата (Su et al., 2018).

У пресноводных двустворчатых моллюсков *Corbicula fluminea* Müller, 1774, собранных в континентальных водных объектах Китая, и охватывающих широкий спектр (21 участок) озер, рек и эстуариев среднего и нижнего течения реки Янцзы, количество микропластиковых частиц варьировало в пределах 0,3-4,9 шт./г или 0,4-5,0 шт./экз., что близко к значениям содержания микропластика моллюсках из прибрежных районов страны. Также, пластиковые частицы были обнаружены в *C. fluminea* на всех исследуемых участках озера Тайху (Liu et al., 2018). Как и во многих других случаях поглощения микропластиков водными животными у исследуемых моллюсков со всех участков наблюдалось абсолютное преобладание микроволокон (60–100%). Размер обнаруженных микрочастиц находился в пределах 0,021–4,83 мм (средний размер 0,61 мм). Более 30% микрочастиц имели голубой цвет или были прозрачными. Среди полимеров преобладал полиэстер (33%), за которым следовали полипропилен (19%) и полиэтилен (9%). Регрессионный анализ показал, что, как и у мидий, обилие, распределение размеров и цвет микропластиков, обнаруженных у *C. fluminea*, совпадали с их распределением в окружающей воде и особенно в донных отложениях (Su et al., 2019).

Пластиковые микрочастицы могут оставаться в пищеварительной системе бентосных организмов длительное время. Например, в лабораторных условиях полное очищение у мидий от микрогранул полистирола размером 2,6 мкм не было достигнуто даже после семидневного пребывания в чистой воде. Помимо этого, было установлено, что при поглощении мидиями микрогранул полистирола размером 3–10 мкм, эти частицы способны попадать в кровеносную систему моллюсков. Перемещение мелких частиц происходит значительно быстрее, чем больших, и они способны оставаться в гемолимфе съедобной мидии *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 в течение 48 суток после воздействия (Liu et al., 2019).

При воздействии пластиковых микрочастиц на бентосных животных в лабораторных условиях наблюдаются множественные токсические эффекты. У мидий отмечены значительные гистологические изменения в жабрах и

тканях пищеварительной систем, сильное воспаление, нарушение целостности лизосомальных мембран, образование гранулоцитов, нейротоксические эффекты, которые увеличивались со временем воздействия. При воздействии наночастиц полистирола размером 30 нм, у мидий проявлялась сниженная фильтрационная активность, а также увеличивался вес псевдофекалий (Wegner et al., 2012). Сходные результаты получены при кормлении мидии микроводорослью *Rhodomonas salina* Hill & R. Wetherbee, 1989 с добавлением микроволокон с концентрацией 30 шт./мл (Woods et al., 2018) и при ежедневном двухчасовом воздействии взвешенных микрочастиц поливинилхлорида размером 1-50 мкм с концентрациями 21,6 216 и 2160 мг/л в течение 44 дней. Кроме того, снижалась выживаемость мидий при воздействии данных концентраций микрочастиц поливинилхлорида в течение 91 дня (Rist et al., 2016).

При воздействии первичных микрочастиц полистирола диаметром 2 и 6 мкм с концентрацией 0,023 мг/л на взрослые особи тихоокеанских устриц *Grassostrea gigas* Thunberg, 1793 в течение 2 месяцев, у них существенно снижался выход (41%) и развитие (18%) личинок. Устрицы преимущественно поглощали частицы 6 мкм (Sussarellu et al., 2016). Также были обнаружены молекулярные признаки эндокринных нарушений. Наночастицы полистирола размером 50 нм с карбоксильными и аминогруппами значительно снижали успешность оплодотворения и развития эмбрионов тихоокеанских устриц. Эмбрионы имели многочисленные патологии, вплоть до полной остановки развития (Tallec et al., 2018).

Особое внимание исследователей, занимающихся изучением воздействия различных полимерных частиц на окружающую среду в целом и живые организмы в частности, направлено изучение влияния наноразмерных полимерных частиц. На данный момент еще не разработаны и методы обнаружения и идентификации столь малых частиц в природных средах, а также методы оценки их воздействия на биоту, хотя существует определенный прогресс в этом направлении. Малый размер нанопластиков создает особый

риск, поскольку они сопоставимы с клеточными мембранами и другими клеточными компонентами. Гидрофобная природа нанопластиков в сочетании с их размером позволяют им проникать в клетки через мембраны или разрушать клеточные стенки, что может привести к цитотоксичности (Alimi et al., 2018; Schwaferts et al., 2019).

Было обнаружено, что наноразмерные частицы полистирола могут легко проникать в липиды мембраны и, что проникшие в сердцевину мембраны, полимерные цепи полистирола могут вызывать изменения в ее структуре, значительно уменьшая молекулярную диффузию, тем самым, влияя на клеточную функцию (Rossi et al., 2014). Кроме физиологических последствий, нанопластики могут также производить химический эффект. Большая площадь поверхности пластиков может быть причиной высокой сорбционной способности токсических веществ, потенциально ведущие к токсическим эффектам от самих частиц и приносимых ими химических веществ после того, как частицы прошли через мембраны клеток (Schwaferts et al., 2019).

Существует немало других факторов, характеризующих токсическое влияние наночастиц на живые организмы. Сообщается о накоплении наночастиц латекса, главным образом, в жабрах и кишечнике пресноводной рыбы *Oryzias latipes* Temminck & Schlegel, 1846, но также в печени и крови. Более того, наночастиц также были идентифицированы в мозге этих рыб, что означает, что изучаемые частицы способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, имеющий высокую селективную проницаемость, необходимую для защиты мозга от токсинов и для поддержания гомеостаза, необходимого для функционирования нейронов (Costa et al., 2018). Есть доказательства морфологических, поведенческих и репродуктивных последствий от воздействия наноразмерных пластиков, хотя они получены на основе данных, и использование значительно более высоких концентраций наночастиц, чем те, которые могут быть встречены в окружающей среде (Besseling et al 2017).

1.6. Исследование токсичности материалов с помощью биотестирования

Под термином «биотестирование» чаще всего понимается частный случай биоиндикации, когда исследователи изучают изменения физиологических, морфологических и биохимических норм лабораторных животных при воздействии на них любых неблагоприятных факторов в стандартизированных и контролируемых условиях эксперимента. Такие исследования хоть и не позволяют описать природу отдельного токсического агента, однако представляют широкую и важную информацию об общей степени токсичности изучаемого вещества или смеси веществ, а также позволяют с достоверностью оценить качество исследуемой среды (Ляшенко, 2012).

Метод биотестирования имеет ряд преимуществ перед химическими методами анализа:

1. Возможно осуществление прямой количественной оценки вероятности проявления биологических эффектов в исследуемой среде, вызванных загрязнением.
2. Тесты на токсичность определяют воздействие смеси химикатов, что позволяет автоматически учитывать возможный синергизм действия этих загрязняющих веществ.
3. В сочетании с химическими методами анализа тесты на токсичность позволяют устанавливать корреляции между токсическими эффектами и концентрациями отдельных поллютантов. Подобные корреляции являются косвенной мерой способности вещества к биоаккумуляции.
4. В отличие от химических методов, тесты на токсичность работают «вслепую», т. е. не зависят от точного списка поллютантов, наличие которых проверяется с помощью химических методов. Следовательно, если в ходе исследования токсический эффект был установлен, а корреляция между этим эффектом и концентрацией определенного загрязнителя отсутствовала, можно заключить, что наблюдавшийся эффект был вызван каким-то неизвестным веществом.

5. Тесты на токсичность, как правило, проводятся в контролируемых экспериментальных условиях. Это позволяет снизить вариабельность важных природных факторов, например, температуры. В результате становится легче установить «чистое влияние» загрязнителя на исследуемую биологическую функцию.

6. Пробы для тестов на токсичность могут быть отобраны с четко ограниченных небольших участков (например, поля, реки). Это повышает пространственное разрешение результатов тестов и позволяет выполнить точное картирование загрязненной территории.

7. Тесты на токсичность относительно дешевы и быстры в выполнении (Доронин и др., 2008).

В качестве объектов для биотестирования применяются разнообразные гидробионты: бактерии, водоросли, пиявки, ракообразные, иглокожие, моллюски и рыбы. Чаще всего выбор тест-организма объясняется рядом причин, к которым относится например широкая распространенность вида, низкая рыночная стоимость организма, простота его содержания в лабораторных условиях. Кроме того, важно, чтобы методики наблюдений за изменениями любых характеристик организма были просты для воспроизведения тестируемых условий.

Выбор тест-организмов определяется их распространенностью, простотой содержания и культивирования в лаборатории, низкой стоимостью, легкостью наблюдений эффектов токсикантов на организм и разработанностью простых методик таких наблюдений.

Часто в мировой практике в качестве тест-объекта используются морские ежи. Это связано с тем, что они отвечают всем критериям выбора тест-объекта, описанным выше. Морские ежи позволяют обеспечить простоту лабораторных экспериментов на взрослых особях, эмбрионах, яйцеклетках и сперме (Ващенко, 2003).

Биотестирование с помощью морских ежей в настоящее время достаточно широко распространено в Италии, Англии, Норвегии, Японии, Южной Африке и Соединенных Штатах Америки. В каждой из этих стран

разработаны стандартные протоколы биотестирования, в которых предусмотрено использование местных видов морских ежей (Kobayashi, 1984). Многие виды морских ежей широко распространены, например, ежи рода *Strongylocentrotus* – вдоль тихоокеанского побережья, *Paracentrotus* – средиземноморского и атлантического, что делает возможным сравнивать результаты, полученные в разных частях Мирового океана.

Одним из основных способов биотестирования с помощью морских ежей является эмбриотест, который позволяет проследить действие токсикантов на развитие эмбрионов и личинок морских ежей на разных стадиях. Для этого яйцеклетки и сперму по отдельности подвергают воздействию исследуемых веществ, затем смешивают. Затем определяется процент оплодотворенных яйцеклеток, а также частота аномалий развития. Кроме того, через 48 часов после оплодотворения регистрируют процент аномальных гаструл и плутеусов (Kobayashi, 1984).

В настоящее время тест с использованием эмбрионов и личинок морских ежей применяют в Японии, Канаде и США для анализа токсичности загрязняющих веществ картирования загрязнения (качества) морской среды (Kobayashi, 1984). Так как морские ежи распространены по миру достаточно широко, в качестве тест-объектов применяются различные виды. Так, например, анализируя стадии развития морского ежа *L. variegatus* от эмбриона до личинки, оценивают качество прибрежных вод в Бразилии, в Чили оценивают процент оплодотворенных яйцеклеток ежа *Arbacia spatuligera* Valenciennes, 1846. В Японии в качестве тест-объекта используют плоского морского ежа *Peronella japonica* Mortensen, 1948, в Австралии *Helicodaris erythrogramma* Valenciennes, 1846 (Kobayashi, 1984), в Испании *P. lividus*, которых активно используют для анализа грунтов, как очень чувствительных к содержанию Cu, Zn, Pb, в Англии и Франции – *Sphaerechinus granularis* Lamarck, 1816. Выбор вида морского ежа в качестве тест-объекта зависит от его распространения на исследуемой территории, часто используют местные виды (Duran, 2012).

Ряд исследований показали чувствительность эмбрионов морских ежей к различным загрязняющим веществам. В частности, имеются данные, показывающие чувствительность ранних стадий жизни морского ежа *P. lividus* к ионам свинца, меди и цинка (Manzo et al., 2013).

В литературе имеются данные об успешном использовании плоского морского ежа для оценки воздействия токсичных загрязняющих веществ в водной среде (Журавель и др., 2013).

Личинок морских ежей часто используют в качестве тест-объекта для оценки воздействия таких металлов как кадмий, медь, свинец, цинк и др. (Вашенко, 2003). Данный метод позволяет быстро и достоверно оценить степень загрязненности прибрежных акваторий тяжелыми металлами. Кроме того, можно определить не только летальные концентрации всех металлов, но и проследить прямую зависимость между увеличением концентрации вышеупомянутых элементов и увеличением доли аномально развивающихся в загрязненной воде личинок.

В качестве тест-организмов, для оценки степени антропогенного воздействия на морские акватории, активно используют особей мидий различных видов, что связано с особыми биологическими характеристиками этих гидробионтов. Данные организмы одними из первых были применены для оценки качества морской воды в окружающей среде. Данный факт связан с тем, что мидии соответствуют всем необходимым критериям тест-организма, а именно распределены по всему миру, имеют высокую устойчивость к широкому диапазону параметров окружающей среды (соленость, температурный режим, насыщение кислородом). Кроме того, мидии являются представителями бентосной формы жизни, вследствие чего могут активно накапливать большой спектр загрязняющих веществ из морской воды. Мидии выступают в качестве пищи и среды обитания для многих видов морских организмов, образуя важные связи между пелагическими и бентическими экосистемами. Также они принимают участие в миграции загрязняющих

веществ в прибрежной морской пищевой цепи до более высоких трофических уровней (Beyer et al., 2017).

В настоящее время, голубые мидии (*Mytilus spp.*) являются доминирующим видом, используемым для исследований воздействия микропластиков на живые организмы. Род *Mytilus* имеет семь подвидов, которые могут скрещиваться между собой и широко распространены по всему миру. Например, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 стал инвазивным видом и широко распространен в Южной Америке, Южной Африке, Японии, Калифорнии, Новой Зеландии и Австралии (Beyer et al., 2017). Разные виды в пределах рода *Mytilus* имеют различный геномный состав и профили экспрессии генов, что может привести к различиям в способах борьбы со стрессом, а также с поглощением микропластиков (De Witte et al., 2014).

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Плоский морской еж *Scaphechinus mirabilis*

Scaphechinus mirabilis Agassiz, 1864 – типичный представитель иглокожих, является низкобореальным видом, массово распространен вдоль побережья Японского моря (Репина и др., 2012). Морские ежи, в частности их гаметы и эмбрионы, используются в современной экотоксикологии для тестирования токсичности различных видов загрязнения. В период нереста гаметы морского ежа выделяются непосредственно в морскую воду, и подвергаются воздействию широкого спектра химических веществ.

Вид отмечен в прибрежных водах Атлантического океана на восточном североамериканском побережье. В Тихом океане распространён вдоль берегов Британской Колумбии, а также на азиатском побережье в водах Японского моря. Обитает в районах с песчаным грунтом в пределах приливно-отливной зоны с глубиной не более 150 м, чаще в диапазоне от 1 до 60м (Дроздов, 2006).

Отличительной характеристикой *S. mirabilis* является сплюснутый дисковидный панцирь с немного выпуклой спинной и плоской брюшной сторонами. Скорлупа довольно толстая, апикальное поле находится в центре спинной стороны, и немного возвышается над краем панциря. Край скорлупы чаще всего ровный. С помощью многочисленных мелких иголок темно-фиолетового цвета, которыми покрыты панцири ежей, особи выглядят бархатными на вид. На спинной стороне особей рядами амбулакральных каналов формируется своеобразная фигура, напоминающая пятилепестной «цветок». Ветвление амбулакральных борозд начинается ближе ко рту. Ротовое отверстие расположено на брюшной стороне, в центральной части панциря к которому ведут многочисленные ветвящиеся бороздки. Данные морское ежи способны закапываться в песок на непродолжительное время с помощью своих иголок. Размеры половозрелых особей *S. mirabilis* достигают до 10 см в диаметре (Дроздов, 2006).

На глубинах от 20 до 60 м на мелкозернистых песчаных грунтах особи данного вида могут скапливаться в большие и высокие по плоскости поселения. Так, в прибрежных водах Приморского края ежи образуют скопления с биомассой до 20 кг/м. Основу питания данных ежей составляет детрит из придонного слоя воды. Частички, оседающие на поверхность панциря ежей, по средствам ресничного аппарата перемещаются со спинной стороны на брюшную и далее к ротовому отверстию. Также ежи используют в пищу одноклеточные водоросли, корненожек и мелких веслоногих рачков (Репина и др., 2012).

Данный вид плоских морских ежей благодаря высокой численности и биомассе выступает как объект питания многих рыб, в том числе камбаловых, а также крабов (Шунтов, 2001).

2.1.2. Мидия тихоокеанская *Mytilus trossulus*

Тихоокеанская мидия *Mytilus trossulus* Gould, 1850 – двустворчатый моллюск из семейства Mytilidae. Моллюски-фильтраторы, в частности двустворчатые моллюски, широко используются как биоиндикаторы загрязнения. В процессе питания, профильтровывая большие объемы воды, они наряду с пищевыми частицами, неизбежно извлекают, концентрируют и длительное время удерживают частицы антропогенного происхождения, в том числе и микрочастицы пластика.

Вид распространен вдоль северо-западного и северо-восточного побережья Тихого океана, в морских и солоноватых водах (до 40 ‰) с температурой не более 26 °C (оптимальный температурный режим от 9 до 18 °C). Довольно часто особи данного вида создают плотные поселения на разнообразных мягких и твердых субстратах, а именно песках, гальках, камнях, валунах, скалах, а также створках других моллюсков. Предпочтительными к заселению являются именно твердые естественные субстраты, такие как скальные литоральные ванны, где отмечают максимальные поселения мидий данного вида с плотностью до нескольких сотен экземпляров на 1 м². *M. trossulus* не является глубоководным видом и распространен на глубинах не более 200 м.

Основная биомасса вида в береговых зонах открытых акваторий отмечается на глубинах до 100 м, а в заливах и лагунах — до 50 м (Inoue et al., 1995).

Раковина имеет треугольно-овальную немного выпуклую форму с отсутствующим дорсальным крылом. Отпечаток переднего аддуктора не вдавлен. Узкая часть заднего комбинированного мускульного отпечатка длиннее, чем широкая примерно в 1,5 раза. Длина раковины половозрелой особи достигает 9 см. Взрослые особи *M. trossulus* являются разнотелыми, достигая половозрелости в течение первого года жизни. Нерестятся особи в период с мая по август, когда температура в водах достигает 9 °С, но не превышает 18 °С. Планктонные личинки (велигеры) находятся в приповерхностном слое воды от восьми до десяти недель после чего оседают на субстрат (педивелигеры). Наиболее интенсивные темпы роста *M. trossulus* отмечают в первые три года жизни.

Основу питания составляет детрит, а также простейшие. Но также отмечают, что взрослые особи могут поглощать микроводоросли и других одноклеточных и мелких беспозвоночных. Мидии данного вида являются фильтраторами. Отмечено, что одна особь длиной около 3 см за час может профильтровать около 1,4 л воды при температуре от 18 до 20° С, а поселение с высокой плотностью в течение суток может пропустить через себя до 280 л воды. Благодаря данной особенности мидии имеют высокое биоценотическое значение в прибрежных экосистемах (De Witte et al., 2014).

2.2. Материалы и методы исследования

2.2.1. Методика проведения эксперимента с плоским морским ежом *S. mirabilis*

Половозрелые особи *S. mirabilis* были собраны в преднерестовый период в заливе Восток (зал. Петра Великого, Японское море) на глубине 3–4 м. После отбора гидробионты были доставлены в лабораторию, где три дня содержались в чистой морской воде в контролируемых условиях (температура 18–19 °С; рН 8.2 ± 0.1 ; концентрация O_2 7.5 ± 0.3 мг/л) для акклиматизации.

После акклиматизации были получены половые продукты плоского морского ежа для дальнейшей оценки острой токсичности исследуемых микрочастиц пластика. Для этого стимулировали нерест *S. mirabilis* инъекцией 0,2 мл 0,5 М раствора KCl в перивисцеральную полость плоского морского ежа. Затем яйцеклетки и сперматозоиды подготавливали по методике описанной в работе (Бузников, Подмарев, 1975). Непосредственно перед экспериментами предварительно проверяли качество полученных половых продуктов. Для этого проводили контрольное оплодотворение всех родительских пар ежей и последующий подсчет образовавшихся зигот. В эксперименте не использовали половые продукты, если процент оплодотворенных яйцеклеток был ниже 95%.

Проверенные вышеописанным методом сперматозоиды и яйцеклетки использовали для биотестирования чистой морской воды с добавлением 10^4 , 10^5 , 10^6 шт/л микросфер полистирола. Для приготовления тестируемых растворов использовали микросферы полистирола диаметром 0.9 мкм научного центра Tianjin BaseLine ChromTech Research Centre (Китай) (рис. 4 и 5).

Было проведено два варианта эксперимента. В эксперименте 1 сперматозоиды выдерживались в течение 1 ч в исследуемых растворах. В эксперименте 2 яйцеклетки подвергались воздействию растворами, содержащими пластиковые частицы. Соотношение сперматозоидов и яиц во всех экспериментах было 200:1. Оплодотворение проводилось в чистой стерильной воде, и доля сформировавшихся зигот подсчитывалась через 20 минут. Влияние микропластика оценивалось визуально по образованию оболочки оплодотворения. Подсчет проводили в 4 родительских парах ($n = 4$), каждая в 4 параллелях ($n = 16$), содержащих не менее 100 зигот

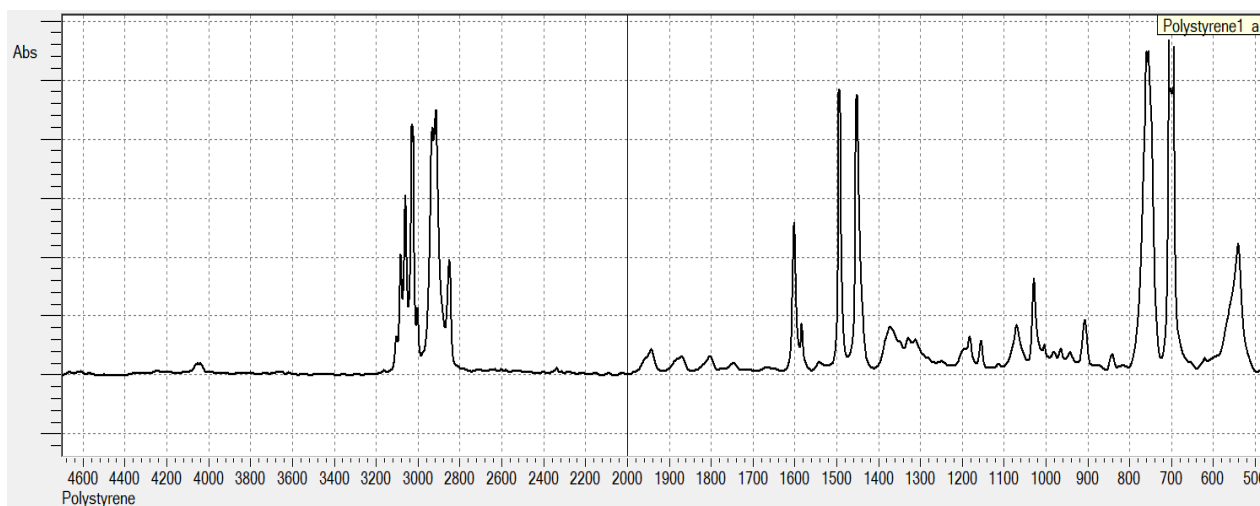


Рисунок 4 – Спектр тестируемого полимера, полученный с помощью ИК-Фурье спектрометра IRAffinity-1S, Shimadzu

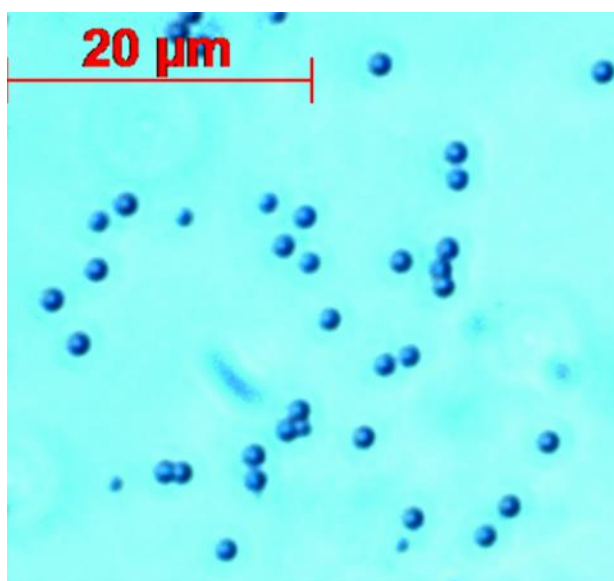


Рисунок 5 – Изображение исследуемого полимера, полученное с помощью микроскопа Axio Imager A1, Carl Zeiss

Контрольные сперматозоиды и яйцеклетки помещали в профильтрованную и стерилизованную морскую воду, ее же использовали для приготовления растворов токсикантов. Всю морскую воду, используемую в экспериментах сначала фильтровали через трехфракционный гравийный фильтр, а затем для стерилизации обрабатывали ультрафиолетом.

После получения зигот на протяжении двух суток наблюдали эмбриональное развитие до стадии среднего плутеуса, подсчитывая аномалии развития на индикаторных стадиях. Для этого с помощью микроскопа Axio Imager A1 (Carl Zeiss) подсчитывали процент аномального развития эмбрионов и личинок на следующих стадиях: образование бластомеров (спустя 8 часов после оплодотворения); гастрюляция (18 ч) и образование планктонной личинки (средний плутеус через 48 ч) (Kobayashi, 1984).

2.2.2. Методика проведения экспериментов с мидией *M. trossulus*

В качестве объекта исследований были использованы взрослые особи (5–7 см) мидии тихоокеанской *M. trossulus*, собранные в б. Воевода (Амурский залив, Японское море).

Эксперимент по оценке комбинированного воздействия микросфер полистирола и наночастиц оксида меди с моллюсками проводились в аквариумах при постоянной температуре (18–19 °C) с интенсивным воздухоподдувом для поддержания в воде достаточной концентрации кислорода. После трехдневной акклиматизации 50 особей были помещены в аквариумы с объемом воды 50 л. Всех мидий экспонировали в течение 5 суток в четырех аквариумах. В первом аквариуме содержалась контрольная группа мидий. Во второй аквариум добавляли микросферы полистирола в концентрации 10^5 шт/л диаметром 0.9 мкм научного центра Tianjin BaseLine ChromTech Research Centre (Китай). В третий аквариум добавляли 20 мкг/л раствора наноформы оксида меди. В последнем аквариум вносили и микросферы полистирола и наночастицы оксида меди.

Все растворы готовили непосредственно перед экспериментами. Стоковый раствор нанодисперсного оксида меди готовили, используя наноразмерный порошок оксида меди фирмы Sigma-Aldrich, с заявленным производителем размером частиц менее 50 нм. Для приготовления раствора к навеске наночастиц приливали дистиллированную воду, и помещали колбу с раствором в ультразвуковую ванну «Сапфир», где в течение 30 минут проводили обработку ультразвуком для предотвращения агрегации исследуемых частиц.

В работе по оценке воздействия фрагментов полиэтилена на взрослых особей *M. trossulus* были проведены серии модельных экспериментов, в которых моллюски-фильтраторы после акклимации в лабораторных условиях кратковременно (в течение 72 час) содержались в аквариумах в присутствии 2-х видов фрагментов полиэтилена (ПЭ). В первой серии были использованы не побывавшие в употреблении фрагменты ПЭ (пакеты), полученные непосредственно от производителя - фасовочные пакеты отвечают требованиям ГОСТа на пленку ПНД (16338-85). Во второй – свободно плавающие листовые фрагменты ПЭ, выловленные в толще воды бухты Золотой Рог, где концентрация отдельных загрязняющих веществ в воде (Качество..., 2016; Зубцова и др., 2018; Пелех, Абрамова, 2020) превышает ПДК в десятки раз («грязные» фрагменты ПЭ). Последние представляли собой лоскуты ПЭ, частично деградированные под воздействием кислорода, солнечного света (УФ) и колебаний температуры. С характерным запахом нефтепродуктов и разлагающейся органики. Цвет фрагментов варьировал от светло- до темно-коричневого.

В экспериментальных аквариумах общая площадь пластиковых фрагментов составила 50 см²/л, как рекомендовано в работе Li et al., 2016.

Качественный и количественный анализ содержания тяжелых металлов в жабрах и пищеварительной железе контрольной и экспериментальных групп *M. trossulus* проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре (Shimadzu 6800), подготавливая пробы по стандартной методике методики (Julshamn, Andersen, 1983).

2.3. Определение биомаркеров

Для оценки стабильности мембран лизосом (СМЛ) применяли цитохимический метод, подробно описанный в работе иностранных коллег (Martínez-Gomez et al., 2015). Данный метод основан на возможности лизосом удерживать краситель нейтральный красный в течение времени в зависимости от степени поврежденности лизосомальных мембран.

Для этого из переднего мускула-аддуктора исследуемых особей *M. trossulus* собирали гемолимфу объемом 0,1 мл, используя шприца для подкожных инъекций. Затем гемолимфу в шприце разбавляли профильтрованной морской водой в соотношении 1:1). Полученные гемоциты окрашивали нейтральным красным и инкубировали в течение 15 минут при температуре 15–17 °С. После этого препарат исследовали под микроскопом Axiostar plus (Carl Zeiss при 400-кратном увеличении). Процедуру повторяли каждые 30 минут в течение трех часов. При этом каждый раз исследуемый препарат находился в поле светового облучения микроскопа не дольше одной минуты, для предотвращения выгорания красителя. Результаты исследования стабильности мембран выражали как общее время визуального удержания нейтрального красного половиной клеток препарата.

Для определения биохимических параметров использовали пищеварительную железу и жабры, которые, после извлечения из моллюсков, незамедлительно помещали в жидкий азот и хранили при температуре –80°С. Ткани гомогенизировали в охлажденном 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0 при 4°С. Супернатант получали центрифугирования при 10000 оборотах в течение 40 мин.

Содержание в тканях низкомолекулярного антиоксиданта глутатиона (GSH) определяли по методу Морона с соавторами (Moron et al., 1979).

Показатель интегральной антиоксидантной активности (ИАА) основан на способности суммарного количества пероксильных и алкоксильных радикалов антиоксидантов, полученных при разложении АВАР (2,2'-азобис(2-аминопропан) препятствовать окислению АВТС (2,2-Азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты диаммониевой соли) (Bartosz et al., 1998). Для этого готовили состав реакционной смеси в следующих пропорциях: 0.1 М фосфатный буфер со щелочностью 7.0; 50 мМ АВТС; 200 мМ АВАР.

Величину интегральной антиоксидантной активности рассчитывали, используя построенный по тролоксу градуировочный график при длине волны 414 нм.

Уровень малонового диальдегида (МДА) рассчитывали по образованию цветной реакции при взаимодействии гомогената тканей с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), описанному в работе Buege и Aust, 1978. Для этого к гомогенату исследуемых тканей объемом 375 мкл последовательно приливали по 1.6 мл 30% раствора трихлоруксусной кислоты и 0.75% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты. Полученную пробу тщательно перемешивали и в течение 25 минут грели при температуре 95 °С на водяной бане. Затем пробу охлаждали и центрифугировали в течение 15 минут при 3000 оборотах в минуту для отделения осадка. После центрифугирования проводили измерения интенсивности окрашивания при длине волны 580 нм и 532 нм. Пересчет содержания МДА в пробе проводили, используя коэффициент молярной экстинкции равный 1.56×10^5

Концентрацию карбониллов белков в жабрах и пищеварительной железе моллюсков определяли с помощью щелочного метода. (Mesquita et al., 2014). Для этого к белковому раствору объемом 0,4 мл приливали 0,4 мл динитрофенилгидразин (ДНФГ) (10 Ммоль), растворенного в 0,5 М ортофосфорной кислоте. После инкубирования пробы в течение 10 минут к смеси приливали 0,2 мл 6М NaOH и оставляли еще на 10 минут. Затем измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 450 нм. Концентрацию карбонильных групп белков рассчитывали, используя коэффициента молярной экстинкции для динитрофенилгидразина.

Концентрацию белка в трех проворностях определяли по модифицированному методу Лоури (Markwell et al., 1978).

Измерения всех биохимических параметров проводились с использованием программного обеспечения UVProbe, спектрофотометра Shimadzu UV-1650 PC и спектрофотометра с термостатированной ячейкой Shimadzu UV-2550.

2.4. Оценка генотоксического воздействия методом ДНК-комет

Степень повреждения ДНК определяли в клетках жабр и пищеварительной железы *M. trossulus*, а также в сперматозоидах, яйцеклетках и личинках плоского морского ежа *S. mirabilis*. Для выделения отдельных клеток использовали изотонический раствор, не содержащий ионы кальция и магния. После отмывки пробы раствором полученную суспензию клеток фильтровали через мельничный газ с диаметром ячеек 40 мкм, центрифугировали и разбавляли искусственной морской водой до конечной концентрации клеток (10^5 кл. на мл) (Слободскова, 2012).

Для определения количества повреждений в молекуле ДНК мы использовали щелочную версию кометного анализа (Comet assay) (Singh et al., 1988), успешно адаптированную для гидробионтов. (Mitchelmore et al., 1998). Для этого разбавленную суспензию клеток объемом 0,05 мл приливали к 0,1 мл легкоплавкой агарозы, растворенной в фосфатном буфере (0,04 М, pH 7.4). Пробу нагревали до 37 °С, непрерывно перемешивая, и наносили на предметное стекло. На предметное стекло предварительно наносили тонкий слой 1% раствора агарозы для улучшения прилипания отдельных клеток. Затем образец накрывали покровным стеклом и помещали в холодильник на 5 минут для застывания агарозы. После охлаждения образца осторожно снимали покровное стекло и на 1 час опускали слайд в раствор для лизиса (состав раствора: 2,5М NaCl; 0,1М ЭДТА-Na₂, 1% Тритон X – 100; 10% ДМСО; 0,02 М Трис, pH 10).

Затем слайды трижды промывали охлажденной дистиллированной водой и опускали в буфер для электрофореза (состав: 300 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА-Na₂), где выдерживали образец в течение 40 минут. После в течение 15 минут проводили электрофорез при напряжении 2 В и окрашивали образец этидиум бромидом.

Для оценки степени повреждения ДНК использовали флуоресцентный микроскоп Axio Imager A1 (Carl Zeiss) с цифровой камерой AxioCam MRc, с помощью которых получали цифровое изображение ДНК-комет. Для каждой

пробы сохраняли изображение не менее ста ДНК-комет. Затем, используя компьютерную программу CASP версии V 1.2.2., обрабатывали полученные кометы. Уровень повреждения ДНК клеток оценивали, определяя параметр, характеризующий долю ДНК в хвосте кометы (% ДНК в хвосте кометы).

На основе данных процентного соотношения ДНК в хвосте кометы рассчитывали индекс генетического повреждения (ИГП). Этот индекс основан на разделении всех комет на 5 классов, в зависимости от количества фрагментации ДНК в хвосте кометы. Предложено выделять следующие классы: C_0 (повреждение менее 5%); C_1 – низкий уровень повреждения (от 5 до 20%); C_2 – среднее повреждение (от 20 до 40%); C_3 – высокая степень повреждения (от 40 до 75%) и C_4 , для которого характерно очень высокое повреждение ядерной ДНК (более 75%). (Mitchelmore et al., 1998) (рис. 6). После подсчета в образце количества комет, принадлежавших к вышеописанным классам, подсчитывался индекс генетического повреждения (ИГП) по формуле $ИГП = (C_1 + 2 * C_2 + 3 * C_3 + 4 * C_4) / (C_0 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4)$, предложенной в работе Savas и Konen, 2008.

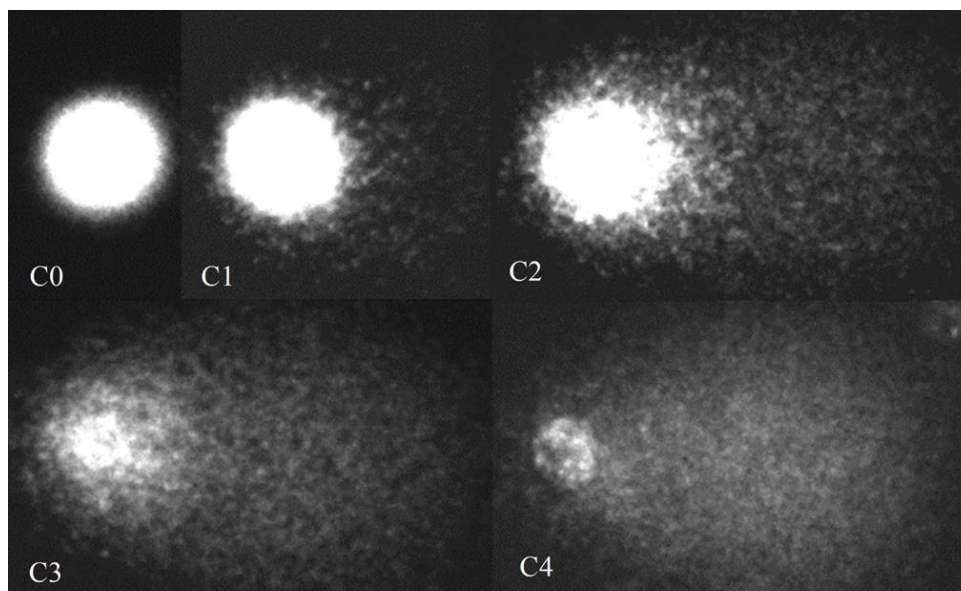


Рисунок 6 – Классы комет по степени повреждения ДНК

2.5. Статистическая обработка

Полученные в ходе всех экспериментов данные обрабатывали с помощью пакетов программ MS Excel and Statistica 10. Для этого определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Достоверную значимость различий определяли, используя однофакторный дисперсионный анализа ANOVA по непараметрическому критерию Краскела-Уоллиса с последующим парным тестом Манна-Уитни.

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТОВ ПОЛИЭТИЛЕНА НА ТИХООКЕАНСКУЮ МИДИЮ

Колоссальные объемы пластиковых отходов в Мировом океане в настоящее время являются одной из глобальных экологических проблем вследствие серьезной опасности для жизни морских обитателей. Проникая внутрь организмов, фрагменты пластика приводят не только к механическому повреждению слизистых тканей и засорению желудочно-кишечного тракта, но и к серьезным нарушениям физиологических процессов, включая такие, как блокада секреции пищеварительных ферментов, снижение уровней стероидных гормонов, нарушение овуляции и репродуктивной функции (Mato et al., 2001).

Длительное время считалось, что синтетические полимеры химически инертны за счет высокомолекулярных размеров и не относятся к опасным для здоровья животных и человека материалам. Однако, относительно недавние исследования показали, что, кроме потенциальной физической опасности, фрагменты пластика и частицы микропластика несут и химическую угрозу (Lithner et al., 2011). Обладая относительно большой гидрофобной поверхностью, фрагменты полимеров способны адсорбировать и насыщаться разнообразными стойкими и высокотоксичными химическими веществами, осуществляя их распространение и перенос с различных источников загрязнений в прибрежные и открытые воды океана (Mato et al., 2001; Teuten et al., 2009). Кроме адсорбированных токсичных поллютантов повышенную экологическую опасность представляют «собственные» (эндогенные) химические вещества, которые используются при производстве полимеров. По оценкам Araújo et al. (2002) у разных производителей концентрация мономеров в различных видах полимеров может сильно варьировать от очень низких 0.0001% до более 4%. Помимо этого, в синтетических полимерах могут присутствовать низкомолекулярные фрагменты олигомеров, катализаторы, синтетические стабилизаторы, а также широкий спектр химических добавок (фталаты, бисфенол

А, ПХБ, красители, пластификаторы и др.), придающих полимерам специфические потребительские характеристики (Hamlin et al., 2015).

Большая часть адсорбированных на поверхности и «собственных» (эндогенных) низкомолекулярных химических соединений связана с полимерными структурами не химически, а физически, и могут высвобождаться в окружающую среду, представляя угрозу жизнедеятельности для широкого спектра водных организмов.

Число публикаций, в которых оценивается потенциальная угроза от химических веществ, высвобождающихся из пластиковых фрагментов при их заглатывании и проникновении в пищеварительную систему различных видов морских организмов, неуклонно растет (Bejarn et al., 2015; Silva et al., 2016). Однако, как правило, в этих исследованиях используются организмы, склонные к поглощению пластиковых частиц и только в единичных работах обращается внимание на возможные токсичные последствия для организмов не способных поглощать их, но при этом непосредственно находящихся в окружении пластиковых фрагментов (Hermabessiere et al., 2017). Существуют опасения, что пластиковый мусор может выделять в морскую среду потенциально токсичные вещества, которые были использованы при производстве полимеров или накопились в процессе эксплуатации и миграции в различных загрязненных нишах окружающей среды. Экологические последствия этих процессов совершенно очевидны, поскольку опасности прямого воздействия химических веществ в результате десорбции и диффузии их в морскую среду подвержены значительно большее число как микро-, так и макроформ морских организмов, включая их планктонные стадии развития (Martinez-Gomez et al., 2017).

В ходе модельных лабораторных экспериментов, несмотря на короткий срок и отсутствие контактов животных с пластиком, мы выявили в тканях моллюсков обеих экспериментальных групп биохимические изменения, свидетельствующие о развитии окислительного стресса.

Так, у экспериментальной группы мидий *M. trossulus* в присутствии «чистого» пластика в клетках жабр и пищеварительной железы интегральный

показатель антиоксидантной активности снизился в 1,5 и 1,3 раза, соответственно, а в присутствии «грязных» фрагментов ПЭ падение этого индекса было более выраженным – в 1,7 и 2,5 раза, соответственно (рис. 7 А). При этом, у мидий обеих экспериментальных групп в различной степени снизился уровень низкомолекулярного антиоксиданта глутатиона. Если у моллюсков из аквариумов с условно «чистыми» фрагментами ПЭ в клетках жабр содержание глутатиона уменьшилось на ~ 25% (в 1,4 раза), а в пищеварительной железе – только на ~ 3%, то в присутствии фрагментов ПЭ из вод бухты Золотой Рог наблюдалась иная картина - в клетках жабр концентрация этого антиоксидантного трипептида оставалась, практически, на уровне контрольных мидий, а в клетках пищеварительной железы снизилась более чем на 15% (рис. 7 Б).

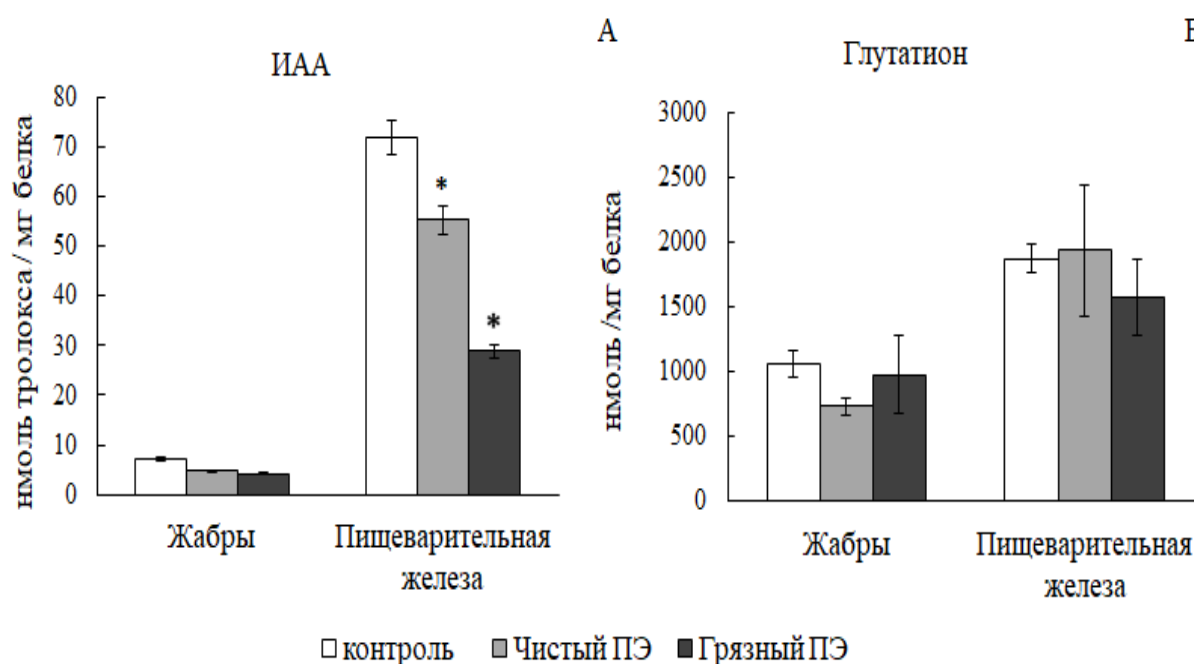


Рисунок 7 – Изменение молекулярных биомаркеров в присутствии «чистых» и «грязных» фрагментов ПЭ (А - индекс антиоксидантной активности (ИАА), нмоль тролокса / мг белка; Б – восстановленный глутатион, нмоль / мг белка; (среднее $\pm$ станд. откл., $n=15$). * - достоверность отличия от контроля при $p<0.05$

Очевидно, существенное снижение защитного антиоксидантного потенциала у мидий обеих экспериментальных групп привело к резкому развитию проокислительных процессов в тканях, что подтверждается усилением окислительной деструкцией молекул ДНК. По данным кометного анализа, в клетках жаберной ткани и тканей пищеварительной железы особей, содержащихся в присутствии «чистых» фрагментов ПЭ, степень повреждения ДНК, которую мы оценивали как процент ДНК, мигрирующей в электрофоретическом поле в «хвост» образующихся комет, увеличилась, по сравнению с контрольными моллюсками, практически, в 2 и 1,5 раза, соответственно. В то же время, у экспериментальных моллюсков в присутствии фрагментов ПЭ из бухты Золотой Рог этот показатель был еще более выражен и вырос в 2.5 и 4 раза, соответственно (табл. 4).

Таблица 4 – Уровень повреждения ДНК в клетках исследуемых тканей мидий в экспериментальных условиях (среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n = 15$)

	% ДНК в «хвосте»		ИГП	
	Жабры	Пищеварительная железа	Жабры	Пищеварительная железа
Контроль	2,59 ^a $\pm$ 0,48	3,35 ^a $\pm$ 0,67	0,18	0,27
Чистый ПЭ	5,21 ^b $\pm$ 0,61	5,39 ^b $\pm$ 0,33	0,40	0,41
Грязный ПЭ	10,79 ^b $\pm$ 1,17	8,62 ^b $\pm$ 0,81	0,79	0,59

*Буквами обозначены значения, достоверно отличающиеся друг от друга ($p < 0,05$).

Кроме того, анализируя распределение ДНК комет по классам было обнаружено снижение количества комет, относящихся к классу C_0 , для которого характерны неповрежденные жизнеспособные клетки в жабрах мидий, находящихся в воде в присутствии как чистых фрагментов ПЭ так и загрязненных. В то же время заметно увеличение процента комет классов C_1 и C_2 для которых характерно умеренное повреждение ДНК клеток, что в свою очередь указывает на проявление генотоксичных свойств (рис. 8).

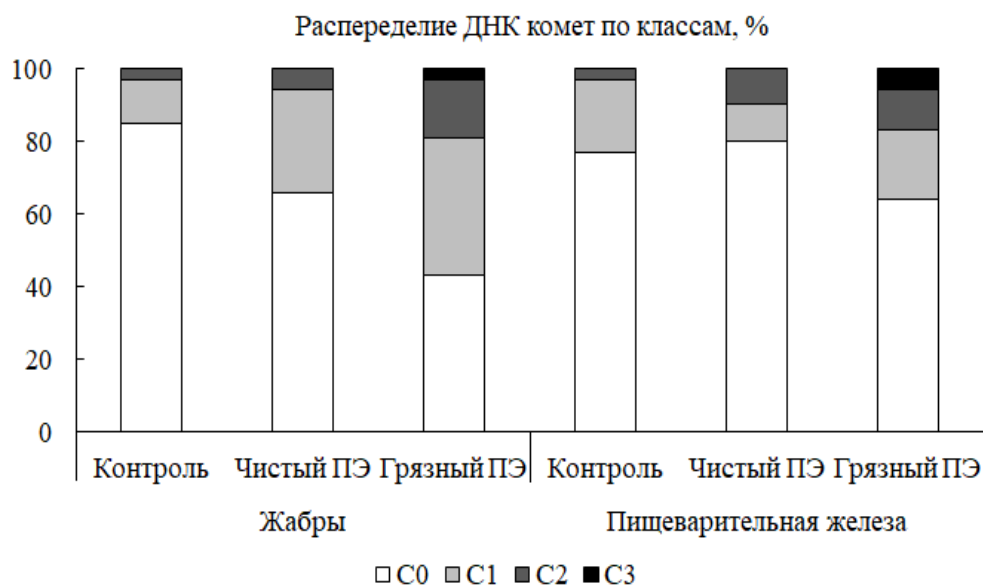


Рисунок 8 – Соотношение классов ДНК комет в соответствии со степенью повреждения

Одновременно, учитывая сорбционные свойства полимеров, в тканях экспериментальных мидий был определен микроэлементный состав (табл.5).

Таблица 5 – Изменение микроэлементного состава в тканях жабр и пищеварительной железы *M. trossulus* под воздействием фрагментов пластика (среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n = 15$). * – достоверное отличие ($p < 0.05$)

	Жабры			Пищеварительная железа		
	Контроль	Чистый ПЭ	Грязный ПЭ	Контроль	Чистый ПЭ	Грязный ПЭ
	мкг / г сух. массы			мкг / г сух. массы		
Zn	158,6 $\pm$ 5,1	177,2 $\pm$ 7,8*	152,5 $\pm$ 4,4	109,4 $\pm$ 10,9	91,1 $\pm$ 4,9	98,8 $\pm$ 2,9
Fe	109,2 $\pm$ 8,1	93,3 $\pm$ 10,4	110,4 $\pm$ 11,9	155,5 $\pm$ 11,9	140,5 $\pm$ 7,5	154,3 $\pm$ 21,9
Cu	5,7 $\pm$ 0,6	5,3 $\pm$ 0,3	5,8 $\pm$ 0,5	8,2 $\pm$ 0,4	8,1 $\pm$ 0,1	11,5 $\pm$ 1,2
Cd	0,96 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,19	0,49 $\pm$ 0,02*	1,68 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,02*	1,61 $\pm$ 0,05
Pb	1,40 $\pm$ 0,15	0,70 $\pm$ 0,03*	0,96 $\pm$ 0,08*	0,78 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,18
Mn	18,5 $\pm$ 2,6	17 $\pm$ 0,5	15,2 $\pm$ 0,6*	18,4 $\pm$ 0,2	9,9 $\pm$ 0,5*	10,6 $\pm$ 0,1*

В целом, анализы тканей мидий обеих экспериментальных групп показали, что, выявленные некоторые сдвиги в концентрациях большинства микроэлементов носили недостоверный характер. Исключение составил цинк

(Zn), концентрация которого достоверно увеличилась в жабрах мидий из аквариумов с «чистыми» фрагментами пластика. Кроме того, достоверное уменьшение концентрации кадмия (Cd), свинца (Pb) и марганца (Mn) отмечено в жабрах и пищеварительной железе у экспериментальных моллюсков. Очевидно, чтобы в полной мере выявить и оценить влияние полимеров на микроэлементный состав гидробионтов, необходимы более длительные эксперименты. Но, даже основываясь на полученных результатах, мы считаем выделить следующий момент. Нет сомнения, что сорбционно/десорбционные свойства полимеров могут влиять на «биодоступность» микроэлементов и, как следствие, оказывать прямое воздействие на уровень этих элементов, прежде всего, в клетках жабр и опосредованное (через метаболические сдвиги) – в других тканях, в том числе и в клетках пищеварительной железы.

Учитывая характер проведенных нами модельных экспериментов (относительно большие фрагменты ПЭ и организмы-фильтраторы), есть все основания полагать, что ведущим фактором, определяющим биохимические сдвиги у экспериментальных мидий, стал химический фактор. Другими словами, оба вида фрагментов пластика являются источником химических веществ, вызвавших у животных развитие процессов окислительного стресса и проявляющих генотоксичность. В поисках объяснений полученных результатов следует особо подчеркнуть следующее, если в первом случае свежесинтезированные, не побывавшие в применении фрагменты ПЭ являются источником исключительно эндогенных химических веществ, используемых при синтезе этого полимера, то фрагменты ПЭ, выловленные из воды бухты Золотой Рог, несут широкий спектр химических соединений, загрязняющих данную акваторию.

В литературе имеются веские экспериментальные данные в пользу этих представлений. Одним из первых на химическую опасность, исходящую от синтетических полимеров, обратил внимание Литнер с коллегами (Lithner et al., 2011). Проанализировав водные «вытяжки» из нескольких десятков распространенных пластиковых бытовых изделий, они показали, что из ряда

полимеров в водную среду вымываются опасные химические вещества, вызывающие в кратковременных (48 час.) экспериментах гибель ветвистоусых рачков - дафний *D. magna*. Аналогичную картину наблюдала американская группа исследователей (Li et al., 2016). В водных «вытяжках» из 7 разных видов полимеров они обнаружили сложную смесь химических веществ, которые в экспериментальных условиях вызывали гибель взрослых особей и подавляли оседание личинок усоного рачка *A. amphitrite*. Установлено также, что из пищевого пластика в морскую воду диффундирует ряд высокотоксичных соединений, используемых при синтезе полимеров, включая бисфенол А, 4-нонилфенол, 4-метилбензофенол, фталаты, индол и др. (Hamlin et al., 2015). Эти мигрирующие из пластика в морскую среду химические добавки в кратковременных и хронических экспериментах вызывали резкое увеличение гибели морских коралловых рыбок *Pseudochromis fridmani* Klausewitz, 1968. Подтверждением этому служат также исследования Хермабиссира с коллегами (Hermabessiere et al., 2017), которые показали, что высокотоксичные аддитивы (полибромиды, дифенилы, фталаты, нонилфенол, бисфенол А и др.), широко используемые при производстве полимеров, обнаруживаются в различных концентрациях в акваториях, в которых отмечено скопление пластикового мусора. Более того, согласно экспериментальным данным (Bejam et al., 2015), токсичность водных «вытяжек» из отдельных видов полимеров, предварительно подвергшихся воздействию солнечного света, существенно возрастает. Очевидно, воздействие УФ солнечного света, вызывая «старение» полимеров, способствует усиленному вымыванию аддитивов, так как, по утверждению авторов, анализ этих «вытяжек» не выявил среди присутствовавших в «вытяжках» различных химических компонентов продуктов деградации полимеров.

Тем не менее, Мартинез-Гомез с коллегами (Martinez-Gomez et al., 2017), анализируя результаты подавления эмбрионального развития морского ежа *P. lividus* в присутствии полистирольных микрогранул и полиэтилена высокой плотности, пришли к выводу, что в морскую воду могут вымываться не только химические добавки (аддитивы), но и незаполимеризовавшиеся мономеры,

которые также относятся к категории высокотоксичных. Так, содержание остаточных мономеров при полимеризации зависит от многих причин, включая, главным образом, разновидность полимера, технологию и условия полимеризации. Поэтому, как определили Araujo et al. (2002), у разных производителей концентрация мономеров в различных видах полимеров может сильно варьировать от очень низких 0.0001% (100 ppm) до более 4% (40000 ppm).

В последние годы особое внимание со стороны исследователей уделяется способности полимеров адсорбировать и насыщаться разнообразными стойкими и высокотоксичными химическими веществами, среди которых обнаруживаются не только гидрофобные ксенобиотики (т. к. ПХБ, НУ, ПАУ и др.), но и ряд тяжелых металлов. Считается, что соотношение сорбционно-десорбционных свойств полимеров по отношению к различным химическим соединениям в зависимости от характеристик среды лежит в основе их распространения и переноса из различных источников загрязнений в прибрежные и открытые воды океана (Mato et al., 2001; Teuten et al., 2009).

В процессе миграции и «плавания» на поверхности фрагменты пластика подвергаются воздействию кислорода, температуры и УФ, что приводит к постепенной физико-химической деградации структуры и, как следствие, к изменению сорбционных свойств полимеров. В связи с этим, существует вероятность, что плавающий пластиковый мусор может выступать в роли вектора в переносе различных высокотоксичных химических соединений, сорбированных на поверхности полимерных фрагментов, в различные виды гидробионтов. Эта точка зрения нашла свое подтверждение в экспериментальных работах (Nobre et al., 2015; Silva et al., 2016). Эти исследовательские группы показали, что из «чистого» микропластика и микропластика, собранного в загрязненной прибрежной полосе, в водную фазу переходят химические вещества, токсичные для развивающихся эмбрионов морского ежа *L. variegatus* (Nobre et al., 2015) и мидии *Perna perna* Linnaeus, 1758 (Silva et al., 2016). При этом, анализируя полученные результаты с выраженными отличиями в степени токсичности этих двух видов микропластика, авторы подчеркивают, что в токсичности полимеров

из прибрежной полосы принимают участие сорбированные химические вещества, тогда как в случае «чистого» пластика – ответственны аддитивы. Особенно отчетливо это проявилось в экспериментах с эмбрионами мидии *P. perna* (Silva et al., 2016), в которых десорбированные химические вещества проявили большую токсичность, чем эндогенные соединения из «нативного» микропластика.

Эти результаты согласуются с результатами наших экспериментов. Выраженное подавление антирадикального звена антиоксидантной системы и усиление деструкции ядерной ДНК в мидиях во второй серии наших экспериментов, мы также рассматриваем как реакцию экспериментальных животных на стресс, индуцируемый химическими соединениями, десорбированными с поверхности фрагментов МП при переносе их из загрязненных вод бухты Золотой Рог в экспериментальные условия. Косвенным подтверждением этому служат систематические гидрохимические наблюдения (Качество....., 2016), согласно которым воды бухты Золотой Рог относятся к категории сильнозагрязненных с высокими концентрациями ряда тяжелых металлов и НУ, причем концентрации последних периодически в десятки раз превышают предельно допустимые.

Приведенные выше примеры в дополнение к полученным нами экспериментальным данным позволяют сделать вывод о том, что реальная опасность синтетических полимеров связана не только лишь с поглощением данных материалов гидробионтами, но и с обилием токсикантов как эндогенной, так и экзогенной природы, связанных с данными полимерами.

Более того, учитывая масштабы производства и проникновение пластикового мусора в различные экосистемы, необходимо отметить, что при анализе экотоксикологической ситуации в следует принимать во внимание не только присутствие в среде распространенных поллютантов, но и наличие пластиковых фрагментов различного размера.

ГЛАВА 4. ТОКСИЧНОСТЬ МИКРОСФЕР ПОЛИСТИРОЛА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Планктонные и бентосные морские организмы наиболее подвержены негативному воздействию микропластиковых частиц, так как подавляющее количество полимерных частиц, попавших в морскую среду, находятся либо в толще воды, либо в придонном слое (Thomas et al., 2020). Кроме того, относительно недавние исследования показали, что, кроме потенциальной физической опасности в результате блокирования или повреждения пищеварительной системы при заглатывании гидробионтами микропластика, такие частицы несут и химическую угрозу, связанную с воздействием химических веществ, используемых при производстве полимеров (Lithner et al., 2011). Несмотря на широкий спектр представленных в литературе физиолого-биохимических сдвигов, инициированных полимерными микрочастицами при проникновении в различные виды, механизмы токсичности микропластика для морских организмов, включая их ранние стадии жизненного цикла, до сих пор, практически, не ясны (Hamlin et al., 2015; Martinez-Gomez et al., 2017).

В современной экотоксикологии гаметы, эмбрионы и личинки различных видов морских беспозвоночных, в частности морских ежей, являются одними из наиболее распространенных биологических моделей, используемых для тестирования токсичности различных видов загрязнения. Это связано с общепринятой в литературе точкой зрения, что ранние стадии развития более чувствительны, чем взрослые, и представляют критический период в жизненном цикле организма (Nobre et al., 2015; Mazur et al., 2020 Thomas et al., 2020).

Также, гаметы и личинки являются частью планктона, и, в отличие от активно плавающих организмов, не способны избегать загрязнённых водных масс. Кроме того, в период нереста гаметы морского ежа выделяются непосредственно в морскую воду, незащищены, а их внешние мембраны и рецепторы напрямую подвергаются воздействию широкого спектра химических веществ, включая частицы микропластика, присутствующих в окружающей среде (Nobre et al., 2015; Trifuoggi et al., 2019).

4.1. Спермиотоксичность и эмбриотоксичность микросфер полистирола на примере плоского морского ежа *S. mirabilis*

При анализе развития морских ежей от эмбриональной до личиночной стадии с целью определения доли особей, развивающихся с отклонениями от нормальных показателей, в качестве оценочных критериев рассматривается процесс остановки или замедления процесса развития на стадии зародыша, развитие бластулы в присутствии оболочки оплодотворения, формирование аномальных скелетных форм личинок, а также специфичные изменения в форме и пропорциях тела личинок на стадии среднего плутеуса (Kobayashi, 1984).

В результате эксперимента по оценке влияния микросфер полистирола на процесс оплодотворения не было отмечено значительного воздействия как на подвижность сперматозоидов морского ежа, так и на сам процесс оплодотворения. Процент нормально сформированных зигот, развившихся после экспозиции половых продуктов в воде с добавлением исследуемых концентраций первичного микропластика, (10^4 , 10^5 и 10^6 частиц микропластика в 1 литре), достоверно не отличался от контрольных значений ни в одном из случаев (рис. 9).

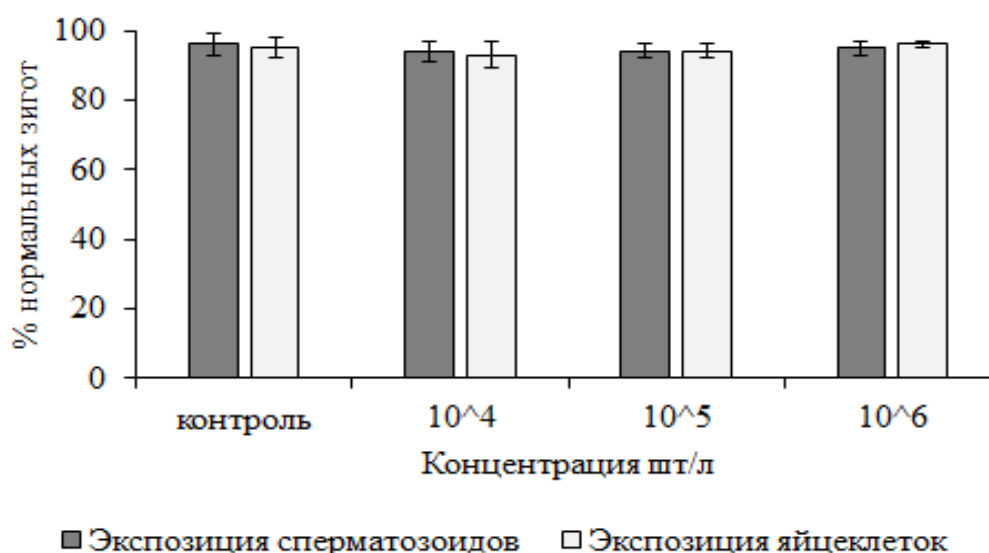


Рисунок 9 – Влияние микропластика на сперматозоиды и процесс оплодотворения плоского морского ежа *S. mirabilis* (среднее $\pm$ станд. откл, $n=100$). *– достоверность отличия от контроля при $p<0.05$

В нашем исследовании в ходе эмбриотеста мы рассматривали 3 стадии развития: бластула, гастрюла и средний плутеус. Экспериментальные результаты краткосрочного токсического влияния микросфер полистирола на раннее личиночное развитие *S. mirabilis* приведены ниже (рисунок 10).

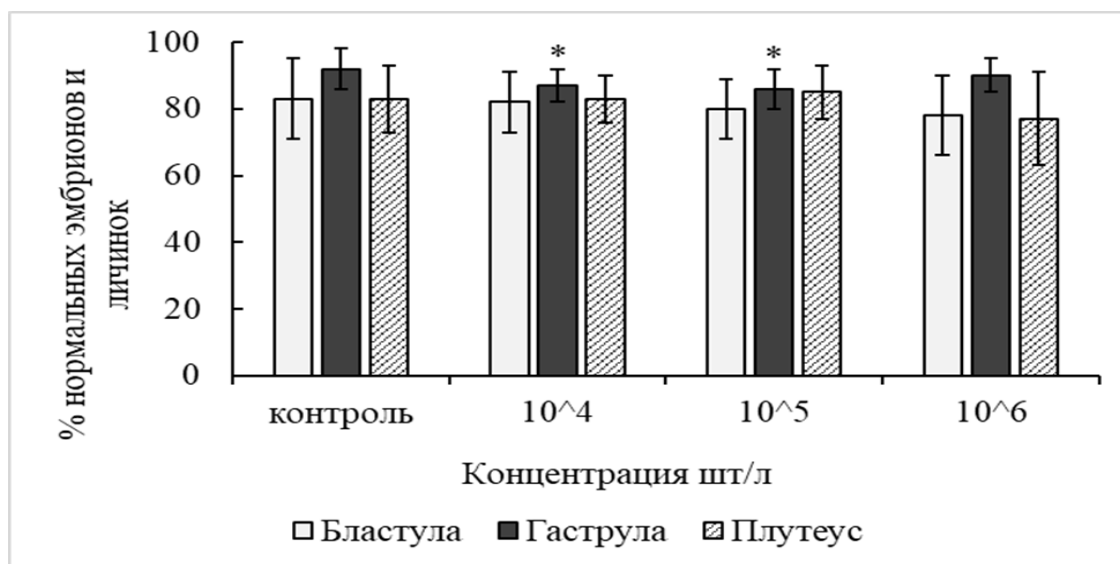


Рисунок 10– Влияние микропластика на эмбрионы плоского морского ежа *S. mirabilis* (среднее $\pm$ станд. откл, n=100) * – достоверность отличия экспериментальных данных от контроля при $p < 0.05$

Зиготы морского ежа, которые развивались в воде с добавлением исследуемых концентраций микропластика на стадии бластулы достоверно не отличались от контрольных значений. Процент аномально развивающихся эмбрионов составил 18–20%. На стадии гастрюляции было отмечено ингибирование развития, процент нормально развивающихся личинок достоверно снизился до 85% в тестируемой воде с добавлением 10^4 и 10^5 первичных микросфер полистирола на литр по сравнению с контрольными значениями (95% нормально развивающихся эмбрионов). Важно отметить, что дальнейшее развитие личинок до стадии среднего плутеуса происходило без значительных отклонений от контроля.

Известно, что ранние стадии развития водных беспозвоночных высокочувствительны к воздействию токсичных веществ, соответственно, их

гаметы, эмбрионы и личинки, контактируя с пластиковыми частицами, на которых адсорбированы различные загрязняющие вещества, подвергаются токсическому воздействию, что в дальнейшем сказывается на состоянии их популяций. Токсичность первичных микросфер полистирола может быть обусловлена тем, что в синтетических полимерах могут присутствовать низкомолекулярные фрагменты олигомеров, катализаторы, синтетические стабилизаторы, а также широкий спектр химических добавок, которые в свою очередь являются токсичными соединениями.

Кроме того, на основе экспериментов с микросферами пластика с флюоресцентными метками было показано, что пелагические личинки (плутеусы, трохофоры) могут их заглатывать (Martines-Gomez et al., 2017). При этом наблюдается, как и увеличение аномально развивающихся личинок, так и достоверное уменьшение размеров личинок. Так как из-за попадания полимерных микрочастиц в пищеварительный тракт плутеусов происходит недостаточное потребление питательных веществ, блокирование или повреждение пищеварительной системы. При этом сведения об опасности заглатывания микропластика противоречивы – имеются как утверждения о безопасности поглощенного микропластика для личинок (Karosi et al., 2014), так и о снижении доли нормально развивающихся в присутствии частиц пластика эмбрионов и личинок морских ежей (Nobre et al., 2015). Еще более выраженный эмбриотоксический эффект был выявлен при изучении аминополистирола (Della Torre et al., 2014).

В литературе имеются данные о негативном воздействии полистирольных микрочастиц на различные группы морского зоопланктона. Так, например было изучено, что полистирольные микрогранулы размером 2-5 мкм, проглоченные велигерами морской улитки *C. onux* привели не только к замедлению темпов роста, но и к более раннему их поселению на морском дне с меньшим размером, что может негативно повлиять на их дальнейшую выживаемость. Кроме того, особи, которые подверглись воздействию микропластиков во время их личиночной стадии, продолжали

демонстрировать задержки развития через 65 дней после проглатывания пластиковых микрочастиц (Lo, Chan, 2018).

Замедление роста наблюдалось у пресноводных амфипод *Gammarus fossarum* Koch, 1836 при воздействии на них микрочастиц полиметилметакрилата. Воздействие экологически значимых концентраций микрочастиц полистирола (90 мкм) препятствовало вылуплению, снижало скорость роста, изменяло предпочтения в питании и врожденное поведение личинок речного окуня *Perca fluviatilis*. Кроме того, у особей, подвергшихся воздействию микропластика, значительно увеличивалась смертность от хищников (Straub et al., 2017).

4.2. Генотоксичность микросфер полистирола на примере половых продуктов плоского морского ежа *S. mirabilis*

Результаты оценки генотоксического эффекта полистирольных микросфер на половые продукты плоского морского ежа *S. mirabilis* представлены ниже (табл. 6). При кратковременном воздействии исследуемых концентраций микропластика на яйцеклетки морского ежа не было обнаружено достоверного отличия процента поврежденной ДНК в сравнении с контрольными значениями. Однако обнаружено, что процент поврежденной ДНК в мужских половых клетках, подверженных экспозиции в воде с добавлением всех исследуемых концентраций микросфер полистирола, значимо отличался от контрольных значений.

Наибольший процент повреждения ДНК (более 20%) выявлен в сперматозоидах, находящихся в течение 1 часа в воде, содержащей 10^5 микросфер пластика в 1 л.

Таблица 6 – Оценка повреждения ДНК (N=16; n=800) * – достоверность отличия экспериментальных данных от контроля при $p < 0.05$

Концентрация, шт/л	% ДНК в хвосте		ИГП	
	Спермии	Яйцеклетки	Спермии	Яйцеклетки
Контроль	10.89 ± 0.72	5.51 ± 0.57	0.88	0.47
10^4	$14.06^* \pm 1.03$	4.86 ± 0.62	1.06	0.34
10^5	$20.17^* \pm 0.81$	4.15 ± 0.49	1.43	0.28
10^6	$19.11^* \pm 0.90$	5.17 ± 0.51	1.26	0.37

На основании классификации Коллинза и соавторов (Collins et al., 2013) было определено, что мужские половые клетки контрольной группы в своем подавляющем большинстве формировали кометы, относящиеся к классам C_0 и C_1 , а именно характеризовались отсутствием или незначительными повреждениями клеток ДНК. Увеличение числа комет 2 класса, которые характеризуются средним повреждением и появление комет 3 класса с высоким уровнем повреждения отмечали в экспериментальных образцах, где происходило воздействие микропластика на сперматозоиды (рис. 11).

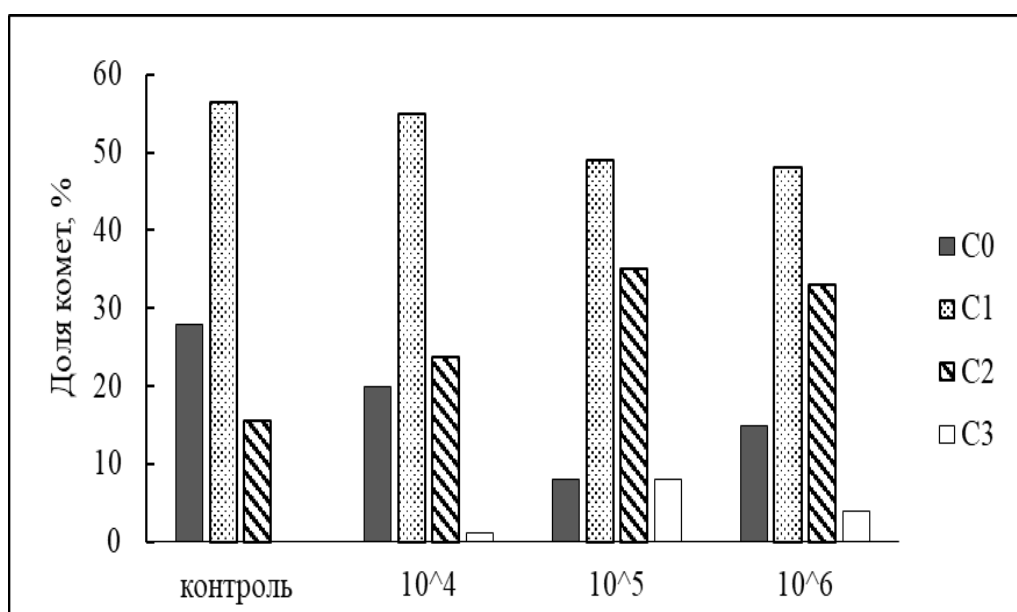


Рисунок 11 – Распределение ДНК комет сперматозоидов по классам

Помимо определения процентного соотношения ДНК в хвосте комет, был подсчитан индекс генетического повреждения (табл. 6). При всех концентрациях микропластика, исследуемых в эксперименте, значения ИГП в

сперматозоидах превосходили уровень контроля. Стоит отметить, что при концентрации 10^5 частиц микропластика в 1 л значение ИГП в сперматозоидах достигло значения 1.43, что указывает на выраженное генотоксическое воздействие исследуемого токсиканта.

В экспериментах со спермиями морского ежа *S. mirabilis* % ДНК в «хвосте» комет существенно возрастал в зависимости от концентрации полимерных микрочастиц. Данный факт свидетельствует о процессе повреждения целостности генома в мужских половых клетках. Результаты проведенного эксперимента были представлены в виде диаграммы, более детально характеризующей распределение клеток по степени повреждения ДНК ядер с интервалом в 3% (рис. 12).

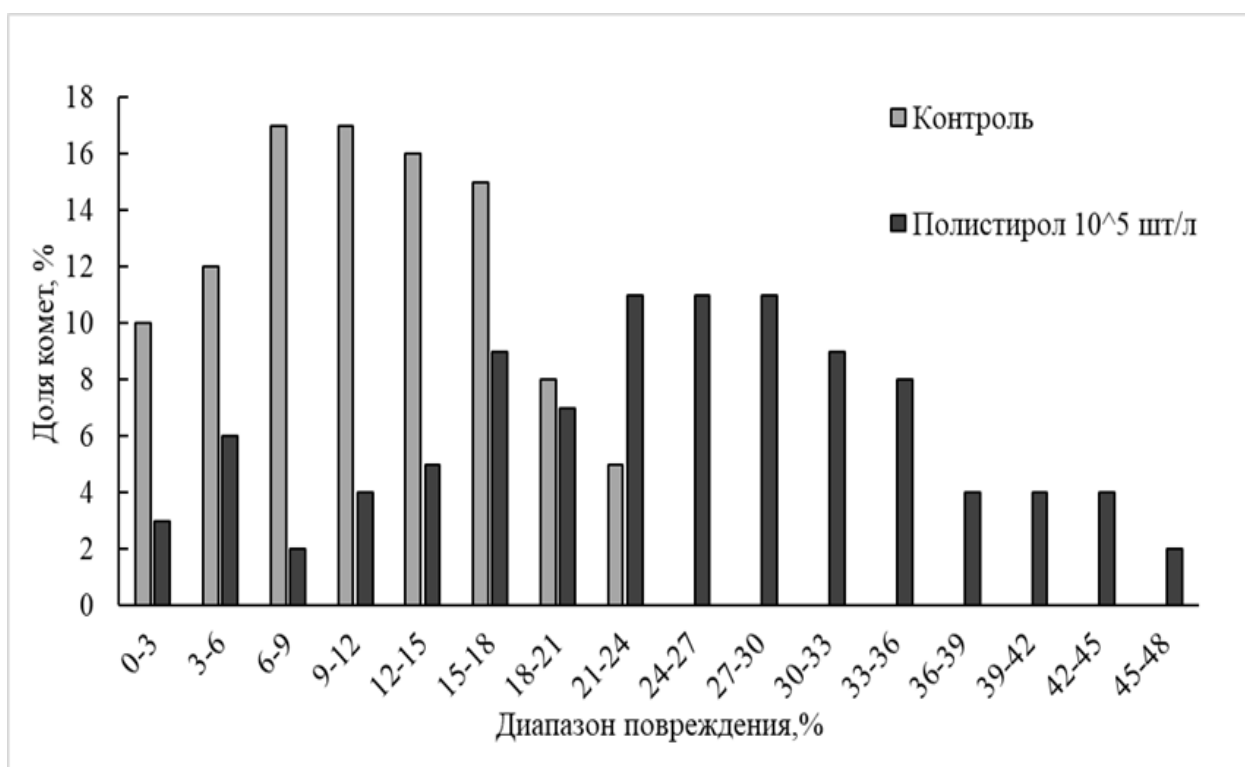


Рисунок 12 – Распределение комет сперматозоидов с интервалом 3%

Стоит отметить, что в контроле наибольшее количество клеток имели диапазон повреждения от 6 до 18%, при этом максимальное содержание ДНК в хвосте кометы (21–24%) наблюдалось только у 5% клеток. При кратковременном воздействии микросферами полистирола около трети от

общего количества сперматозоидов имели повреждения в ДНК в диапазоне от 21 до 33%. Кроме того, около 10% клеток, формировали кометы с повреждением выше 40%, что характерно для существенного генотоксического воздействия.

Морские ежи имеют внешнее размножение и в период нереста их гаметы выделяются непосредственно в морскую воду и напрямую подвергаются воздействию широкого спектра факторов, включая частицы микропластика, присутствующих в окружающей среде (Lithner et al., 2011; Hamlin et al., 2015).

В этом отношении наши эксперименты, в определенной мере, имитируют условия окружающей среды с точки зрения взаимодействия микрочастиц пластика и гамет морского ежа. В то же время, наши исследования были проведены в контролируемых лабораторных условиях, где сведены к минимуму воздействия других сопутствующих стрессовых факторов, характерных для морской среды.

В работе использовались концентрации микрочастиц ПС, которые, хотя и были во много раз ниже концентраций, широко используемых в экотоксикологических экспериментах и вызывающих эмбриотоксичность (Balbi et al., 2017; Martinez-Gomez et al., 2017), тем не менее были существенно выше концентраций микрочастиц пластика, регистрируемых в самых «горячих точках» Мирового океана (Paul-Pont et al., 2018). Данный подход, относящийся к категории «острых» экспериментов, оправдан для выявления вероятных «мишеней», т. е. наиболее уязвимых структур клетки, чтобы показать связанные с этим механизмы токсичности. Более того, имеющиеся в современной экотоксикологической практике аналитические инструменты пока не в состоянии идентифицировать биологические эффекты, возникающие при низких концентрациях возмущающих факторов.

В нашей работе был использован высокочувствительный и надежный инструмент для оценки выраженности повреждения ДНК отдельных эукариотических клеток – метод ДНК-комет (Jha, 2008; Istomina et al., 2019). По оценкам специалистов данный молекулярный подход в десятки раз (от 35

до 50 раз) более чувствителен, чем любой биомаркер, использующийся для оценки степени токсичности на организменном уровне (такие как выживаемость, размножение, рост и т. д.) (Smith et al., 2009).

Этот метод позволил нам выявить уровень повреждения генома у обоих видов гамет до и после кратковременного воздействия микрочастиц полистирола (ПС) (табл. 6). Наличие небольшого процента фрагментации ядерной ДНК в необработанных обоих видах гамет можно объяснить накоплением в процессе оогенеза щелочнолабильных участков и/или одно- и двуцепочечных разрывов (Kazama, Hino, 2012).

В качестве интересного примера можно привести работу Трифуоджи с коллегами (Trifuoggi et al., 2019), в которой показано, что воздействие микрочастиц ПС на ранние стадии развития морского ежа *S. granularis* приводит к существенному увеличению цитогенетических аномалий, выраженных в виде митотических aberrаций и дефектов развития.

В то же время, получены достаточно убедительные данные на примере экспериментов с двустворчатыми моллюсками - морским гребешком *C. farreri* (Xia et al., 2020) и пресноводным *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 (Magni et al., 2018), свидетельствующие об отсутствии генотоксичных повреждений в гемоцитах после воздействия микрочастиц ПС.

Эти противоречивые данные не вызывают особого удивления, поскольку в этих работах модельные эксперименты проводились в разных условиях, включая различия в типах, форме и концентрации микрочастиц пластиков, температуры и продолжительности проведения экспериментов.

Отличительной особенностью результатов, полученных в результате нашего исследования, является демонстрация деструкции целостности ядерной ДНК гамет при воздействии полистирольных микрочастиц, что свидетельствует об их генотоксическом эффекте. Кроме того, при обсуждении полученных результатов следует отметить следующий факт, что, при равных условиях воздействия микрочастиц ПС на мужские и женские гаметы морского ежа, геном спермиев оказался более чувствителен, чем ооцитов (табл. 6).

По всей вероятности, столь существенные различия в реакции гамет морского ежа на воздействие микрочастиц полистирола можно объяснить как эффективной работой систем защиты и физиолого-биохимическими особенностями организма, а также различающимися механизмами поддержки целостности генома. Хорошо известно, что сперматозоиды в отличие от соматических клеток или ооцитов потенциально более восприимчивы к повреждению при загрязнении окружающей среды веществами, обладающими генотоксическими свойствами, поскольку считается, что сперматозоиды обладают ограниченной способностью к репарации ДНК и антиоксидантной защите (Lewis, Galloway, 2008; Lacaze et al., 2011).

Из результатов наших экспериментов следует, что, независимо от уровня повреждения ДНК, сперматозоиды сохраняли способность оплодотворять яйцеклетки с эффективностью до 97% (рис. 9). На основании этих экспериментов можно предположить, что уровень биохимических сдвигов, индуцированных микрочастицами ПС, достаточен, чтобы вызвать повреждения ДНК в спермиях, но недостаточен, чтобы повлиять на их оплодотворяющую способность. Из этого следует, что целостность генома спермиев не является критическим условием оплодотворения, по крайней мере, у этого вида морских ежей. Имеются веские экспериментальные данные в пользу этого представления. Так, например, кратковременное воздействие генотоксичных агентов, таких как бенз[а]пирен и диурон на сперматозоиды двустворчатых моллюсков мидии и устрицы привело к значительному и дозозависимому повреждению ДНК, но при этом сперматозоиды сохраняли оплодотворяющую способность (Lewis, Galloway, 2008; Akcha et al., 2012). Также, в других исследованиях, несмотря на высокий уровень повреждений в ДНК спермиев рыб, индуцированных воздействием генотоксических агентов метилметансульфоната и диурона, успешность оплодотворения сохранялась на высоком уровне (Santos et al., 2013; Devaux et al., 2015).

В другом исследовании (Thomas et al., 2020) при воздействии на сперматозоиды морского ежа *P. lividus* микрочастицами полистирола и

полиметилметакрилата (ПММА) обнаружены спермиотоксические эффекты, что, в свою очередь, сказалось на незначительном снижении успешности оплодотворения.

Неоднозначность имеющихся данных о влиянии микропластика на различные виды гидробионтов, вероятно, связана с различиями межвидовой чувствительности по отношению к таким частицам.

Механизмы, лежащие в основе генотоксического действия микрочастиц синтетических полимеров, в частности ПС, не ясны. В отличие от химических соединений, проникающих внутрь клетки и иницирующих, прямо или косвенно, процессы деструкции генома, микрочастицы ПС химически инертны, что существенно затрудняет интерпретацию полученных результатов. Большинство исследователей, при объяснении причин возможного генотоксического эффекта микропластика обращают внимание на способность таких частиц индуцировать повышенную внутриклеточную генерацию активных форм кислорода (АФК), что в свою очередь приводит к окислительному стрессу. Активация антиоксидантной системы была обнаружена в модельных экспериментах, изучающих воздействие микропластика на гидробионты различных трофических уровней, включая личинок тихоокеанской устрицы *C. gigas* (Cole, Galloway, 2015), коловраток *Brachionus koreanus* Hwang, Dahms, Park & Lee, 2013 (Jeong et al., 2016) и ветвистоусых рачков *D. magna* (Imhof et al., 2017). Считается, что именно высокореакционные оксирадикалы являются главной причиной окислительного повреждения и разрывов цепей молекулы ДНК (Avio et al., 2015; Ribeiro et al., 2017).

В случае со сперматозоидами, при отсутствии литературных данных, свидетельствующих о проникновении микрочастиц размером 50 мкм в спермию, можно высказать иное предположение. Учитывая относительно гидрофобную природу полимеров и, ПС, в частности, можно предположить, что микрочастицы, адсорбируясь на различных гидрофобных участках внешней мембраны спермиев, могут в некоторой степени дезорганизовать рецепторно-сигнальную систему и спровоцировать вспышку окислительного стресса. Как

показано ранее, сперматозоиды морского ежа способны генерировать, по крайней мере, два вида АФК – H_2O_2 и O_2^- (Kazama, Hino, 2012).

Очевидно, для того, чтобы в полной мере выявить и оценить последствия воздействия микрочастиц пластика на мужские и женские гаметы необходимы более длительные эксперименты, включающие последующие стадии развития. Но, даже основываясь на полученные результаты кратковременных контактов гамет и микропластика, мы считаем необходимым подчеркнуть следующие моменты.

Индукция повреждений ДНК в клетках сперматозоидов, свидетельствует о неспособности защитных механизмов спермиев морского ежа защитить ДНК от воздействия микрочастиц полистирола. Соответственно, фрагментированные цепочки ДНК, не репарированные в гаплоидных зрелых сперматозоидах, в случае успешного оплодотворения, передаются в ооциты, участвуя в формировании генома следующего поколения. Вклад этих повреждений в геном ооцита может быть различным и, в случае малых повреждений, есть вероятность, что они могут быть восстановлены уже на стадии зиготы.

Учитывая, что ДНК контролирует последовательное развитие всех физиолого-биохимических и морфологических процессов, внесенные существенные повреждения целостности генома могут повлиять на нормальное протекание этих процессов вплоть до возникновения аномалий и остановки развития с последующей гибелью эмбрионов. Эти рассуждения согласуются с мнением исследователей (Chatel et al., 2017), которые полагают, что накопление повреждений в ДНК спермиев является основной причиной эмбриотоксичности ряда химических поллютантов. Льюис и Галловэй (Lewis, Galloway, 2008) на примере двух видов морских беспозвоночных установили, что, несмотря на успешное оплодотворение, значительный процент эмбрионов, полученных от сперматозоидов с индуцированным повреждением ДНК, проявляют в дальнейшем тяжелые аномалии в развитии.

4.3. Генотоксические свойства микросфер полистирола на примере моллюска *Mytilus trossulus*

Живые организмы, обитающие в морской среде, в настоящее время испытывают влияние не только широкого спектра естественных факторов, но и воздействие отходов промышленности и хозяйственной деятельности человечества, среди которых особое место занимает синтетический мусор.

Особую остроту эта проблема приобрела после обнаружения в морской среде микроразмерных частиц пластика, которые образуются при механическом повреждении и последующей фрагментации более крупных синтетических фрагментов. Имея размеры, соизмеримые с размерами пищевых частиц большинства морских гидробионтов, частицы микропластика, активно или пассивно, заглатывается ими, включаясь, таким образом, в различные пищевые цепи (Lusher, 2015; Rochman et al. 2015; Galloway et al., 2017; Santana et al., 2017)

Микропластик, попадая в организм гидробионтов, приводит к многочисленным серьезным повреждениям токсического характера, включая такие, как блокада секреции пищеварительных ферментов, снижение уровней стероидных гормонов, нарушения в иммунной системе, овуляции и репродуктивной функции, замедление роста и развития, изменения в пищевом поведении (Ribeiro et al., 2017; Detree, Gallardo-Escarate, 2018; Varo et al., 2019). Тем не менее, до сих пор остаются не изученными причины биологической активности и проявления токсичности микроразмерных частиц полимеров. Учитывая тот факт, что на данный момент исследователями со всего мира подтверждено повсеместное присутствие микропластика в биосфере, важность исследования причин и механизмов биологической активности таких частиц не вызывает сомнения (Avio et al., 2017; Faggio et al., 2018).

Среди широкого разнообразия морских организмов моллюски-фильтраторы, в частности двустворчатые моллюски, представляют особый интерес с точки зрения изучения механизмов, лежащих в основе токсических

эффектов микропластиц пластика. В процессе питания моллюски, профильтровывая большие объемы воды, наряду с пищевыми частицами, неизбежно извлекают, концентрируют и длительное время удерживают абиотические частицы антропогенного происхождения, в том числе и микропластицы пластика. (Qu et al., 2018; Ward et al., 2019;).

Исследования последних лет показали, что микропластицы различных полимеров, несмотря на химическую инертность, оказывают негативное токсическое воздействие на широкий круг морских организмов, включая представителей полихет, моллюсков, иглокожих, ракообразных и рыб (Steer et al., 2017; Berlino et al., 2021). В экспериментальных условиях микропластицы полимеров, в частности полистирола, вызывали у морских беспозвоночных на молекулярно-биохимическом уровне различные сублетальные эффекты. Было показано, что даже при кратковременном воздействии фрагменты микропластика оказывают влияние на активность различных ферментов и АО систему, индуцируют образование АФК и стресс-белков, а также являются причиной воспалительных процессов и развития окислительного стресса (Avio et al., 2015; Paul-Pont et al., 2016; Detree, Gallardo-Escarate, 2018).

В то же время причины такого разнообразного проявления токсичности микропластика далеко не изучены. Есть основания полагать, что молекулярной основой всех выявленных физиолого-биохимических сдвигов является деструкция генома, которая может усиливаться в клетках при проникновении и концентрировании частиц микропластика.

На основе метода ДНК-комет с использованием экспериментального подхода мы показали, что микропластицы ПС, взаимодействуя с пищеварительными тканями двустворчатого моллюска *M. trossulus*, несмотря на химическую инертность, проявляют биологическую активность, выраженную в генотоксических свойствах. Данный метод позволил нам оценить уровень повреждения генома в клетках двух тканей мидий и после непродолжительного воздействия микропластиц ПС (рис.13).

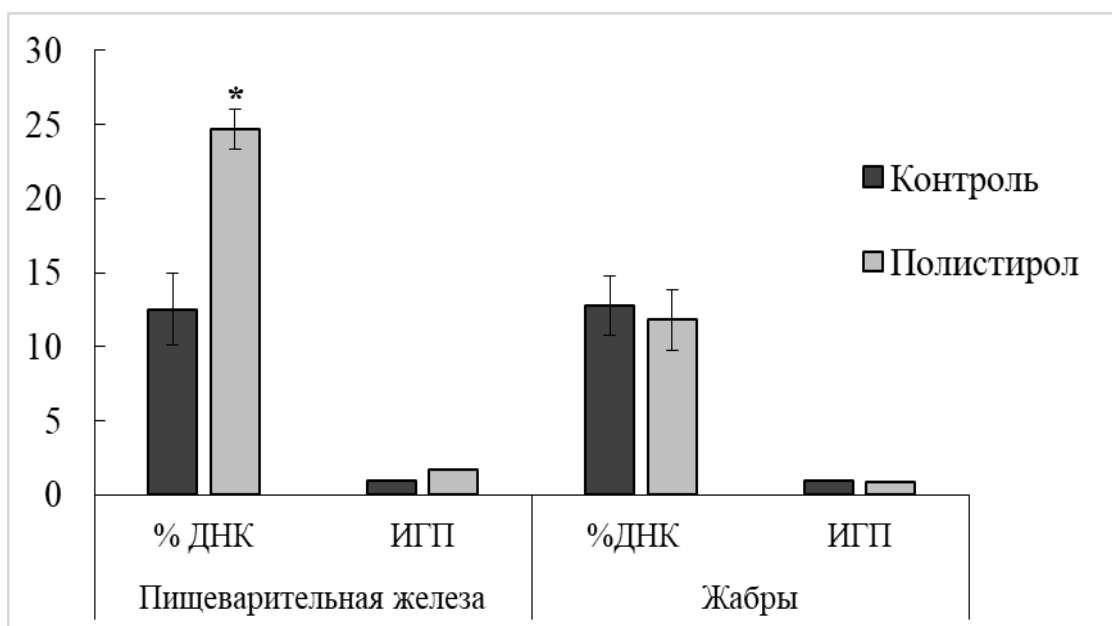


Рисунок 13 – Оценка повреждения ДНК в клетках жабр и пищеварительной железы мидий из контрольной и экспериментальной групп (N = 12; n = 600) * – достоверное отличие ($p < 0.05$)

У контрольных моллюсков в клетках жабр и пищеварительной железы наблюдается небольшой уровень (~12 %) фрагментации ядерной ДНК, который образуется в нормальных клетках в процессе функционирования жизнеобеспечивающих систем за счет накопления щелочнолабильных участков разрывов.

Анализ распределения комет по классам показал, что у контрольных моллюсков в клетках пищеварительной железы преобладали кометы C_0 (0–5% ДНК в хвосте кометы) и C_1 (5–20%) классов, характерные для неповрежденных и жизнеспособных клеток. Общая сумма комет этих классов ($C_0 + C_1$) составила порядка 88%, тогда как на долю комет с уровнем повреждения ДНК более 20% (C_2 класс) приходилось не более 12% (рис. 14).

Экспозиция мидий в среде, содержащей микрочастицы ПС, привела к тому, что уровень повреждения ДНК существенно вырос только в клетках пищеварительной железы (~25%) и практически в 2 раза превысил контрольные значения, что свидетельствует о повреждении целостности

генома (Рис.13). У экспериментальных мидий в отличие от контрольных в клетках пищеварительной железы резко снизилось содержание неповрежденных клеток (менее 30%), и большая часть комет была представлена классом C_2 (~60%). Кроме того, появляются кометы с высокой долей повреждения ДНК, относящиеся к классу C_3 (40–75%), доля которых

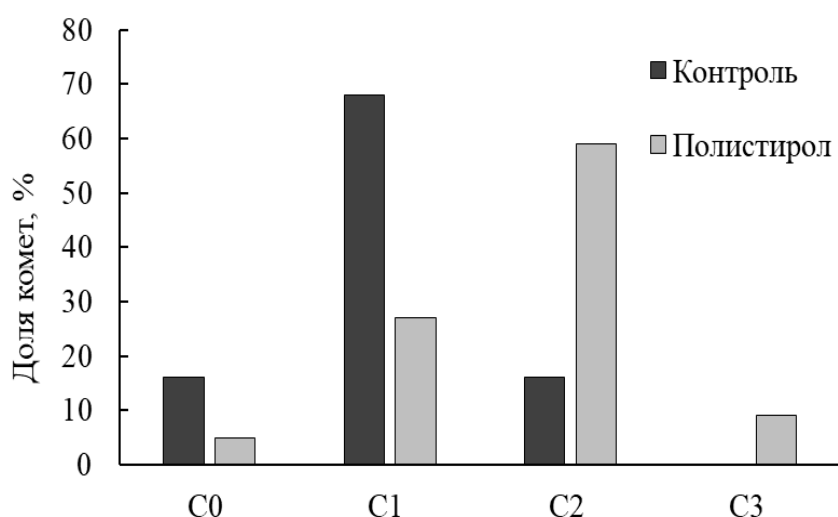


Рисунок 14 – Распределение повреждения ДНК по классам комет в клетках пищеварительной железы мидий из контрольной и экспериментальной групп (N = 12; n = 600) составила около 10% (рис. 14).

Для наглядности полученные экспериментальные данные были представлены в виде диаграммы, более детально характеризующей распределение клеток по степени повреждения ДНК ядер с интервалом в 3% (рис.15).

Из анализа этих диаграмм следует, что у контрольных моллюсков наибольшее количество клеток имели диапазон повреждения от 6 до 18%, при этом максимальное содержание ДНК (около 30%) в хвосте кометы наблюдалось только у 5% клеток. После воздействия микрочастиц полистирола около половины клеток пищеварительной железы мидий имели повреждения в ДНК в диапазоне от 25 до 35%. Кроме того, порядка 5% клеток, формировали кометы с повреждением около 50%, что характерно для существенного генотоксического воздействия.

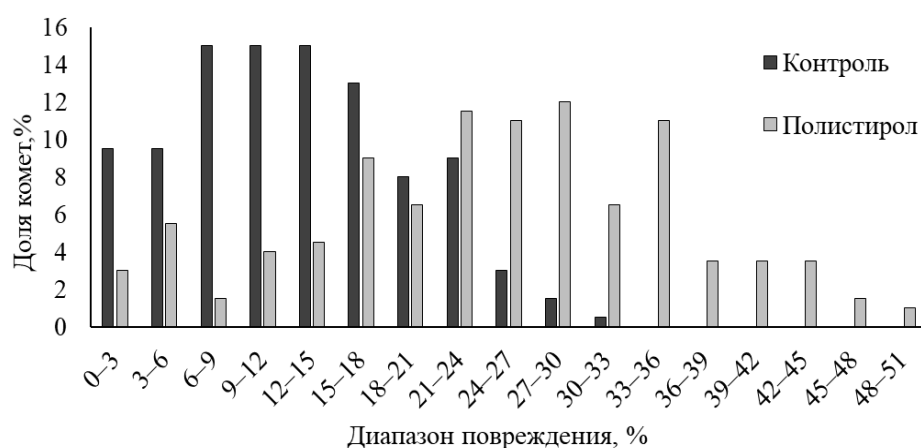


Рисунок 15 – Распределение ДНК-комет при интервале 3% повреждения в клетках пищеварительной железы исследуемых моллюсков

Литературные сведения о генотоксических свойствах синтетических полимеров пока немногочисленны. Первые свидетельства о генотоксичности микрочастиц пластика, основанные на методе ДНК-комет, были представлены в экспериментальных работах с использованием морских двустворчатых моллюсков.

Установлено, что в гемоцитах мидии *M. galloprovincialis* и *Scrobicularia plana* da Costa, 1778 после поглощения микрочастиц пластика (ПС и ПЭ) возрастало число разрывов цепей ДНК (Avio et al., 2015; Ribeiro et al., 2017). В хронических экспериментах Гонсалец-Сото с коллегами (Gonzalez-Soto et al., 2019) наблюдали двухфазную реакцию генома гемоцитов мидии на поглощение микрочастиц ПС: в начале эксперимента (7 дн.) уровень повреждения ДНК по сравнению с контролем снижался, но в конце эксперимента (26 дней) авторы зарегистрировали резкое увеличение деструкции генома. Подтверждением этому может служить работа Ревеля с коллегами (Revel et al., 2019), в которой показано, что в присутствии низких концентраций смеси микрочастиц полиэтилена (ПЭ) и полипропилена (ПП) в гемоцитах мидий *Mytilus spp.* наблюдается увеличение деструкции молекулы ДНК. В качестве другого интересного примера можно привести экспериментальные данные Бербера с коллегами (Berber et al., 2019), согласно которым при воздействии микросфер ПС в течение 24 часов на креветок *Neocaridina davidi* Bouvier, 1904 наблюдали повреждение молекул ДНК и

достоверное увеличение длины хвоста комет по сравнению с контрольными значениями.

Сан с коллегами (Sun et al., 2021) обобщили имеющиеся в литературе данные и на основе мета-анализа представили убедительные доказательства, что микрочастицы пластика в экологически реальных концентрациях (<1 мг/л, средняя $\sim 0,5$ мг/л) проявляют выраженные генотоксические свойства при взаимодействии с водными организмами. Особенно отчетливо это проявлялось не только по данным метода ДНК-комет, но и по увеличению числа микроядрышек.

В то же время, в экспериментах с двустворчатыми моллюсками - морским гребешком *Chlamys farreri* Jones & Preston, 1904 (Xia et al., 2020) и устрицей *C. gigas* (Revel et al., 2020), получены данные, свидетельствующие об отсутствии генотоксичных повреждений в гемоцитах после воздействия микрочастиц ПС. Установлено также, что микрочастицы полиэтилена низкой плотности и поливинилхлорида (ПВХ) не проявляли генотоксичность при воздействии на моллюсков *M. galloprovincialis* и *P. perna* (Pittura et al., 2018; Santana et al., 2018).

Эти противоречивые данные не вызывают особого удивления, поскольку в этих работах модельные эксперименты проводились в разных условиях, включая различия в типах, форме, размерах и концентрации микрочастиц пластиков, температуры и продолжительности проведения экспериментов. Следует отметить, что авторы приведенных выше работ в своих исследованиях ограничивались анализом генотоксических свойств микропластика на клетках гемолимфы – гемоцитах, ключевых компонентах иммунной и детоксикационной систем.

Отличительной особенностью полученных нами результатов является то, что мы определили факт нарушения целостности ДНК, указывающий на проявление генотоксических свойств микроразмерных частиц полистирола, используя ядерную ДНК клеток пищеварительной железы, органа непосредственно аккумулирующего микропластик.

Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что в ходе обработки данных наших экспериментов обнаружено, что клетки пищеварительной

железы оказались более чувствительны к воздействию исследуемого микропластика в сравнении с клетками жабр мидий. Если к заключительному этапу у экспериментальных мидий в клетках пищеварительной железы уровень повреждения ДНК существенно возростал, практически, в 2 раза, то в клетках жабр достоверных изменений не наблюдалось (Рис.13). По всей вероятности, столь существенные различия в реакции клеток этих двух типов тканей на воздействие микрочастиц ПС обусловлены особенностями физиолого-биохимических систем питания и усвоения разноразмерных частиц, характерных для моллюсков-фильтраторов и мидий, в частности.

Несмотря на то, что мы не исследовали локализацию микрочастиц ПС в наших экспериментах, мы опирались в этом вопросе на обширные литературные данные. Обобщенные литературные данные на примере мидий *M. edulis* и *M. galloprovincialis* позволяют полагать, что в поглощении микропластика основная роль принадлежит жабрам и пищеварительной системе. Установлено, что частицы полимеров, контактируя с жаберными поверхностями мидий, адсорбируются слизью, а затем с помощью движения ресничек транспортируются к ротовому отверстию и проникают в пищеварительную систему и гемолимфу, где происходит транслокация этих частиц в клетки. Было показано, что в пищеварительной железе микросферы ПС с помощью эндоцитоза проникают в клетки и захватываются лизосомами (Von Moos et al., 2012; Avio et al., 2015; Paul-Pont et al., 2016).

Подтверждением этому служат экспериментальные данные о биоаккумуляции микрочастиц пластика в мидиях, главным образом, в пищеварительной железе и, в существенно меньшей степени, в жабрах и гемолимфе мидий (Pittura et al., 2018; Wang et al., 2021). Подобного рода исследования на другом представителе двустворчатых моллюсков-фильтраторов устрице *C. gigas*, также подтверждают эту тенденцию – микрочастицы флуоресцентного ПС были обнаружены только в пищеварительной железе у экспериментальных моллюсков (Sussarellu et al., 2016).

Описанные выше факты в совокупности с результатами настоящего исследования указывают на то, что именно клетки пищеварительной железы становятся первичной мишенью для воздействия микрочастиц пластика. Также важно, что увеличение повреждения ДНК клеток при действии микропластика является в хронологическом отношении одним из ранних этапов каскада биохимических изменений, приводящих к негативным последствиям для гидробионтов.

Стоит отметить, что наши исследования были проведены в контролируемых лабораторных условиях с использованием концентраций микрочастиц ПС во много раз превышающие реальные. Однако, существует обоснованная точка зрения, что опасные последствия токсикологического характера определяются не только уровнем загрязнения, временем жизни и процессов рассеяния частиц, но и обусловлены возможностью аккумуляцией микропластика в морских организмах. Поэтому, полученные результаты позволяют полагать, что клетки пищеварительной железы фильтрующих воду моллюсков, способных накапливать микропластик при относительно низких концентрациях этих частиц во внешней среде, могут подвергаться опасности со стороны неуклонно растущего загрязнения морской среды пластиковыми отходами.

ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ МИКРОСФЕР ПОЛИСТИРОЛА И НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ НА ТИХООКЕАНСКУЮ МИДИЮ

В настоящее время, кроме «традиционных загрязнителей» (т. к. нефтеуглеводороды, полициклические углеводороды, поверхностно-активные вещества, пестициды, тяжелые металлы и др.) в морскую среду стали стремительно поступать продукты нанотехнологии (в частности, наночастицы оксидов металлов) и фрагменты искусственных полимеров различного размера и состава (микропластик).

Хотя общий уровень наночастиц в морской среде в настоящее время очень трудно оценить (Bundschuh et al. 2018; Sun et al. 2016), а концентрации микропластика редко превышают уровень несколько мкг/л, необходимо исходить из того, что морские организмы их поглощают, аккумулируют и переносят по пищевым цепям, угрожая здоровью человека. Кроме того, согласно экспериментальным данным, наночастицы и микрофрагменты искусственных полимеров различной природы способны преодолевать биологические барьеры (в частности, биологические мембраны) и накапливаться в клетках гидробионтов различного уровня организации (Von Moos et al., 2012) что ставит под угрозу их выживание и сохранение как пищевых ресурсов для человека.

В то же время, механизмы такого разнообразного проявления токсичности обоих видов поллютантов далеко не изучены. Есть основания полагать, что молекулярной основой выявленных физиолого-биохимических сдвигов является способность наночастиц оксидов металлов и микрочастиц пластика индуцировать продукцию активных форм кислорода, вызывая тем самым окислительный стресс, который может разрушить мембраны, липиды, белки и ДНК. В экспериментальных условиях наночастицы оксидов металлов (CuO, TiO₂, ZnO), вызывали у морских беспозвоночных на молекулярно-биохимическом уровне различные сублетальные эффекты, которые были следствием развития окислительного стресса и влияли на оплодотворение, развитие личинок, иммунные реакции, метаболизм, рост и выживание

различных морских организмов (Von Moss et al., 2012). Также, было показано, что даже при кратковременном воздействии фрагменты микропластика приводят к серьезным нарушениям физиологических процессов гидробионтов, включая, нарушения секреции ферментов и снижение скорости фильтрации, изменение поведения, снижение дыхания и репродуктивной функции. Кроме того, и наночастицы и микропластик оказывают влияние на антиоксидантную систему и активность различных ферментов, индуцируют образование АФК и стресс-белков, а также стимулируют развитие окислительного стресса (перекисное окисление липидов, дестабилизация мембран лизосом) и воспалительных процессов (Avio et al., 2015; Detree et al., 2018).

Однако, несмотря на бурный рост публикаций, раскрывающих механизмы взаимодействия отдельных видов поллютантов с представителями морской фауны и определенных достижений в этом вопросе, реальная ситуация в морской среде диктует необходимость изучения ответных реакций биологических систем на комплексное воздействие приоритетных (по крайней мере) загрязнителей.

В морской среде, особенно в прибрежной части, гидробионты подвергаются воздействию сложных смесей ксенобиотиков, где многие из компонентов взаимодействуя друг с другом, изменяют их биодоступность и токсичность для организма (Santos et al., 2021). Эти взаимодействия в смесях ксенобиотиков могут способствовать либо снижению, либо увеличению токсичности по сравнению с отдельными компонентами. Учитывая физико-химические особенности наночастиц оксидов металлов, в частности наночастиц оксида меди (склонность к агрегации, низкая растворимость в воде, сорбционная активность) и микросфер полистирола (относительная гидрофобность, сорбционная активность), влияющие на биодоступность, неизбежно возникает комплекс проблем. По мнению ряда авторов совместное воздействие микропластика и тяжелых металлов приводит к существенным изменениям в биохимических ответных реакциях и отражается на физиологическом состоянии гидробионтов (Santos et al., 2021). Анализ

немногочисленных экспериментальных работ показывает, что фрагменты микропластика способны сорбировать на своей поверхности наночастицы, тяжелые металлы и органические поллютанты, оказывая влияние на их токсичность (Gonzalez-Soto et al., 2019; Santos et al., 2021).

5.1. Стабильность мембран лизосом

Одномембранные органеллы - лизосомы в эукариотических клетках осуществляют многочисленные функции утилизации, изоляции и расщепления органелл, поврежденных или неправильно функционирующих, макромолекул и прочих частиц, и веществ органического и неорганического происхождения. Исследование повреждений мембранной оболочки лизосом положено в основу оценки токсических эффектов на клеточном уровне (Martinez-Gomez et al., 2015). Нарушение целостности одинарной оболочки данных клеточных структур приводит к высвобождению содержащихся в лизосомах гидролитических ферментов, а также накопленных токсичных веществ. Данный процесс провоцирует развитие необратимых патологических сдвигов в клетке и как итог ее гибель (Kurz et al., 2008).

Результаты проводимой оценки стабильности мембран лизосом (СМЛ) ранжируются в соответствии с представленной далее классификацией, основанной на времени удерживания красителя клетками мембраной. При СМЛ более или равной 120 мин исследованные особи считаются здоровыми; при СМЛ от 50 до 120 мин организмы пребывают в состоянии компенсаторной адаптации; при СМЛ менее 50 мин фиксируются патологические изменения в

Проведение оценки СМЛ как биомаркерного показателя прописано в протоколах европейских региональных биомониторинговых исследований. В дополнение к этому СМЛ является обязательным показателем, включенным в программу комплексного анализа воздействия токсичных веществ в странах Европейского Союза (Martinez-Gomez et al., 2015).

В ходе проведенного анализа были получены данные о влиянии исследуемых частиц на стабильность мембран лизосом. Так, у особей

контрольной группы время удержания красителя у 50% клеток препарата составило $77,14 \pm 8,56$ минут. У мидий, находящихся в воде, содержащей 10^5 микросфер полистирола на литр, исследуемый показатель снизился до $65 \pm 9,56$. Достоверные отличия от контрольных значений наблюдалось в экспериментальных группах, подвергшихся воздействию наночастиц оксида меди и при сочетанном воздействии исследуемых токсикантов. При этом, у мидий, экспонирующихся при внесении в воду и наночастиц и микропластика значение СМЛ составило $42 \pm 4,26$ минуты, что указывает на патологическое состояние особей (рис. 16).

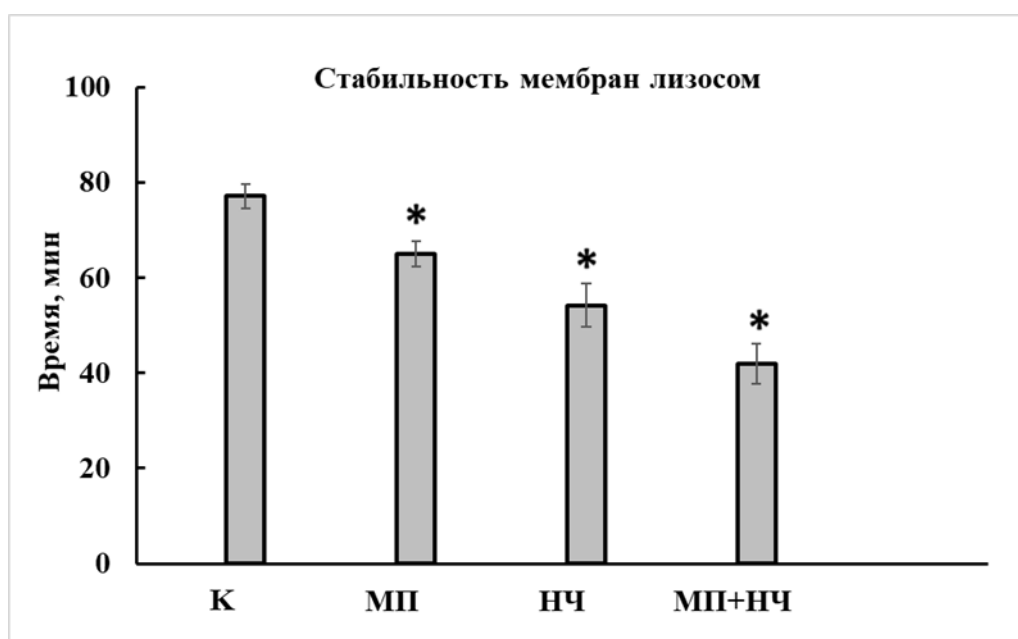


Рисунок 16 – Изменение стабильности мембран лизосом *M. trossulus* при воздействии микросфер полистирола (МП) и наночастиц оксида меди (НЧ) (среднее $\pm$ станд. откл, $n=20$)

* – отличие от контроля достоверно при $p < 0.05$

Полученные данные свидетельствуют о том, что как микроразмерные частицы полистирола, так и наночастицы оксида меди способны проникать в гемолимфу мидии и оказывать токсическое влияние на тканевый и клеточный уровень. При этом наблюдается увеличение токсического воздействия при сочетанном влиянии этих материалов.

Согласно общепринятым представлениям, представители семейства митилид, к которым, в частности, относится моллюск *M. trossulus*, использованный в наших экспериментах, способны поглощать и аккумулировать в тканях склонные к агрегации НЧ оксидов металлов (TiO_2 , CuO) и МП (Browne et al., 2008; Von Moos et al., 2012). Считается, что агломераты различного размера могут попадать в пищеварительную систему моллюсков, перемещаться в гемолимфу и, в дальнейшем, проникать в гемоциты и клетки пищеварительной железы (Browne et al., 2008; Avio et al., 2015). При этом, наночастицы и частицы МП имеют общий путь проникновения в клетки через эндоцитоз с последующим депонированием в лизосомах (Moore, 2006; Avio et al., 2015)

Установлено, что даже при кратковременном воздействии микрогранул полиэтилена высокой плотности у мидий наблюдается достоверное увеличение дестабилизации мембран лизосом (Von Moss et al., 2012). В определенной мере результаты наших исследований, представленные на рисунке 16, подтверждают это. Мидии, экспонированные с НЧ CuO и микросферами ПС по-отдельности, проявляют схожий (одинаковый) ответ, проявляющийся в дестабилизации мембран лизосом. Более того, при их совместном воздействии этот эффект усиливался. При объяснении причин синергизма в ответной реакции следует принять во внимание, что ведущим фактором окислительной дестабилизации мембран лизосом являются АФК, которые генерируются прямыми и косвенными механизмами. В случае НЧ CuO генерация АФК может быть инициирована ионами Cu^{2+} , которые образуются при растворении наночастиц в кислой среде лизосом (Studer et al., 2010). Учитывая химическую инертность различных полимеров и ПС, в частности, можно предположить, что окислительная деструкция мембран лизосом индуцируется как на химические, так и на физические воздействия. Косвенным подтверждением этому могут служить результаты исследования (Bhattacharya et al., 2010), из которых следует, что физическая адсорбция МП на клетках микроводорослей сопровождалась подавлением фотосинтеза и генерацией АФК.

5.2. Интегральная антиоксидантная активность

Предрасположенность или, говоря другими словами, чувствительность особей к воздействию окислительного стресса может быть оценена с помощью индекса интегральной антиоксидантной активности (ИАА). Кроме того, с помощью расчета ИАА можно проанализировать состояние антиоксидантной системы в целом. Высокие значения данного показателя свидетельствуют о том, что организм обладает выраженной устойчивостью к воздействию радикалов окислительного стресса (Довженко и др., 2005). Снижение данного показателя указывает на общее подавление антиоксидантной активности у организмов, подверженных воздействию тестируемых веществ.

В результате эксперимента было установлено, что у всех мидий всех экспериментальных групп уровень ИАА в клетках пищеварительной железы был выше, чем в жабрах (рис. 17).

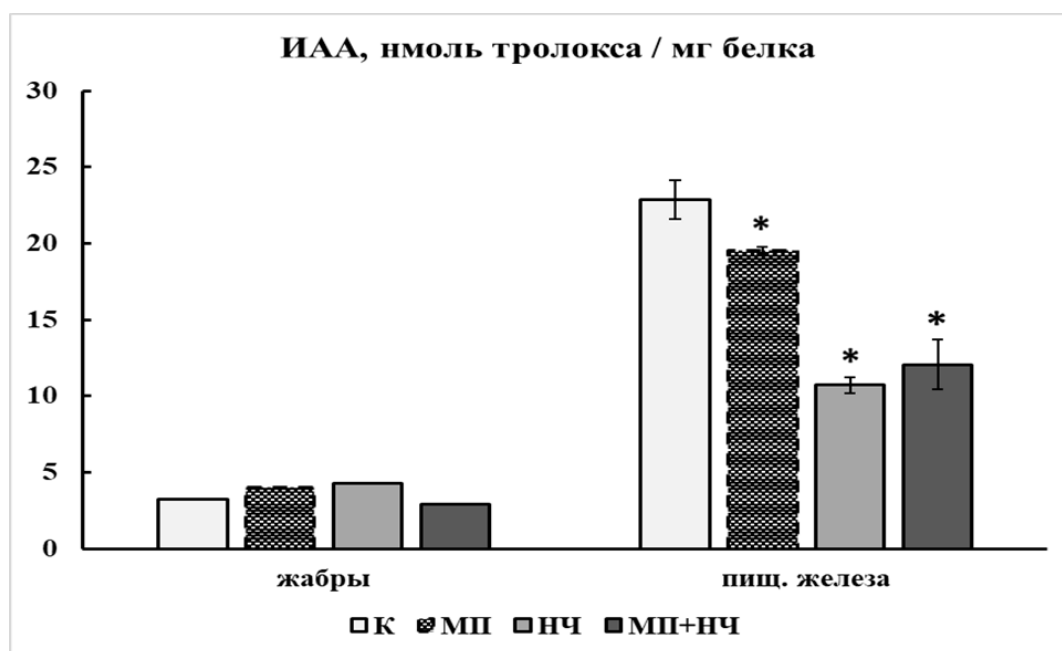


Рисунок 17 – Уровни интегральной антиоксидантной активности в тканях *M. trossulus* при воздействии микросфер полистирола (МП) и наночастиц оксида меди (НЧ) (среднее $\pm$ станд. откл, n=15). * – отличие от контроля достоверно при $p < 0.05$

Отмечено, что в клетках жабр двустворчатых моллюсков уровень ИАА при воздействии исследуемых частиц достоверно не изменился. Однако, в клетках пищеварительной железы, особей, подвергшихся воздействию микросферами полистирола показатель ИАА достоверно снизился с 22,87 до 19,55 единиц тролокса / мг белка. При воздействии наночастиц оксида меди интегральная антиоксидантная активность снизилась в 2,2 раза, такое снижение данного биомаркера свидетельствует о снижении активности низкомолекулярного звена антиоксидантной системы и выраженном токсическом воздействии с развитием окислительного стресса в организме. При сочетанном воздействии исследуемых частиц уровень ИАА также существенно снизился.

5.3. Уровень продуктов перекисного окисления липидов

Для анализа выраженности окислительного стресса у водных организмов, для липидного состава которых характерно высокие концентрации полиненасыщенных жирных кислот, используют критерии уровня продуктов перекисного окисления липидов на основе содержания малонового диальдегида в тканях особей (Chelomin, Belcheva, 1992; Lushchak, 2011). Одним из наиболее физиологически значимых способов изменения фосфолипидной клеточной мембраны у живых организмов при разнообразных патологических состояниях (старение, возрастные патологии, канцерогенез и апоптоз) и воздействиях неблагоприятных факторов среды, является реакция перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Продукты ПОЛ способны вызвать воспалительные реакции в организме и нарушение хемотаксиса, кроме того, подавлять синтез белков и влиять на проницаемость сосудов (Владимиров и др., 1991). Конечным продуктом ПОЛ является малоновый диальдегид. Благодаря способности вступать в разнообразные реакции с макромолекулами с последующим формированием аддуктов, содержание данного эндогенного альдегида выступает в качестве биомаркера окислительного стресса (Marnett, 1999; Bains et al., 2000).

При анализе уровня малонового диальдегида в тканях моллюсков было установлено, что концентрация данного продукта распада ПОЛ больше в пищеварительной железе, нежели в жабрах (рис. 18). Содержание МДА в жабрах двустворчатых моллюсков в результате воздействия анализируемых частиц достоверно не отличалось от контрольных значений.

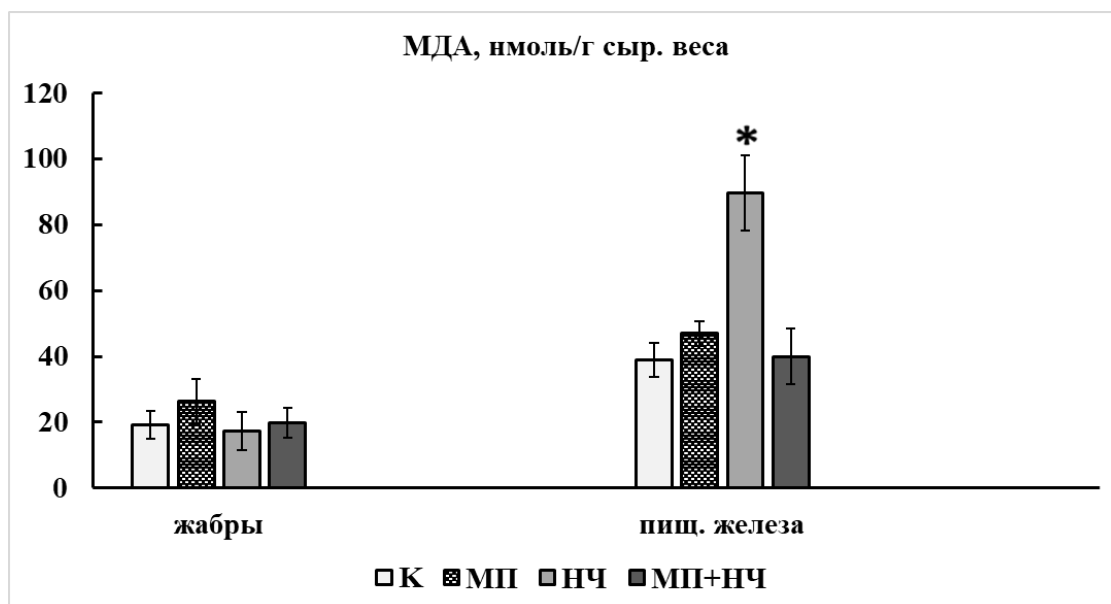


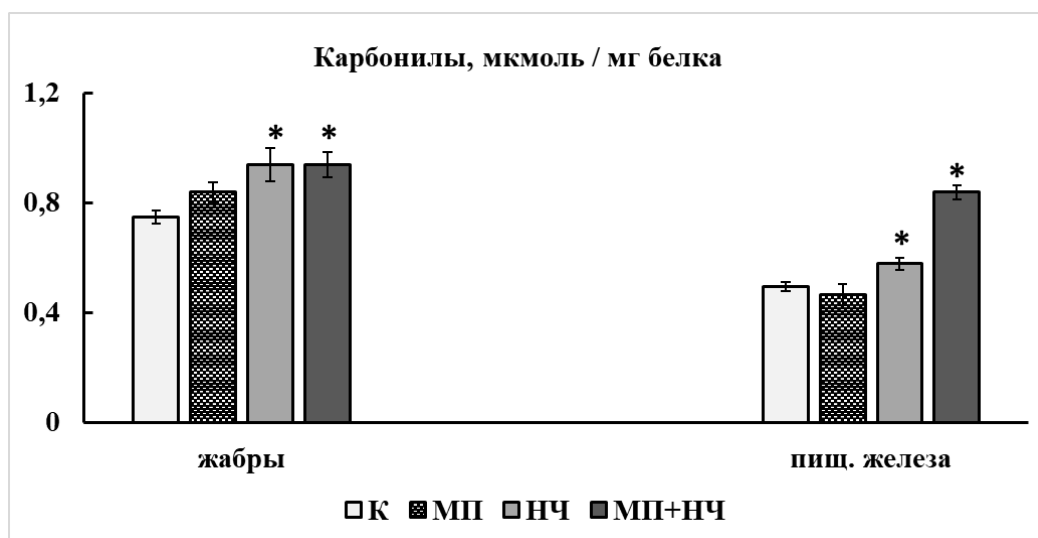
Рисунок 18 – Изменение концентрации малонового диальдегида в тканях *M. trochus* при воздействии микросфер полистирола (МП) и наночастиц оксида меди (НЧ) (среднее $\pm$ станд. откл, $n=15$). * – отличие от контроля достоверно при $p<0.05$

Важно отметить, что в тканях пищеварительной железы при воздействии наночастиц оксида меди был отмечен наибольший уровень МДА (89,74 нмоль/г сыр. веса), который в значительной степени отличался как от контроля (38,94 нмоль/г сыр. веса), так и от значений, полученных в результате оценки влияния микропластика (47,01 нмоль/г сыр. веса), а также смеси полистирольных микросфер и наноразмерных частиц оксида меди (40 нмоль/г сыр. веса). Данный факт может свидетельствовать о том, что моллюски, подверженные воздействию нанодисперсных частиц, находились в состоянии выраженного окислительного стресса.

5.4. Карбонилы белков

Накопление карбонильных групп белков (карбонилов белков), образующихся в тканях организмов в результате окислительных модификаций, является одним из широко применяемых биомаркеров окислительного стресса. Этот биохимический параметр часто используют для оценки уровня воздействия факторов среды или разнообразных поллютантов на организм.

В ходе нашего исследования было установлено, что в исследуемых тканях мидий, подвергшихся воздействию только микросфер полистирола, концентрация окисленных форм белков достоверно не отличалась от контрольных значений (рис. 19). Однако было выявлено токсическое воздействие наночастиц оксида меди на жабры и пищеварительную железу исследуемых моллюсков. Кроме того, стоит отметить тот факт, что в отличие от уровня МДА концентрация карбонилов белков в пищеварительной железе достоверно увеличилась в 1,5 раза по отношению к контрольным значениям



при

Рисунок 19 – Изменение концентрации карбонилов белков в тканях *M. trossulus* при воздействии микросфер полистирола (МП) и наночастиц оксида меди (НЧ) (среднее $\pm$ станд. откл, n=15). * –отличие от контроля достоверно при $p<0.05$)

совместном воздействии исследуемых частиц.

В литературе имеются данные о том, что мидий способны поглощать частицы микропластика. Так в ходе лабораторных исследований, было выявлено, при воздействии пластиковых микрочастиц, мидии захватывают полимерные микрочастицы, которые находятся непосредственно в воде вблизи жаберных пластинок, липкой слизью, образующейся на жабрах. Затем посредством ресничного эпителия захваченные частицы транспортируются в пищеварительную систему. Ток воды создается действием ресничного эпителия, покрывающего внутреннюю поверхность мантии, окологотовые выросты и жаберные пластинки, которые располагаются по обеим сторонам тела и являются своеобразным ловчим аппаратом. Мидии могут часами поглощать и накапливать микропластики размером до 80 мкм. Более мелкие частицы поглощаются и удерживаются мидиями легче, чем крупные. (Lin et al., 2019).

Кроме того, пластиковые частицы могут оставаться в пищеварительной системе бентосных организмов длительное время. Так, было установлено, что полное очищение у мидий от микрогранул полистирола размером 2,6 мкм не было достигнуто после семидневного пребывания в чистой воде (Paul-Pont et al., 2016). В лабораторных условиях установлено, что мидии способны поглощать микрогранулы полистирола размером 3–10 мкм, которые затем попадают в их кровеносную систему. Перемещение мелких частиц происходило быстрее, чем больших, и они оставались в гемолимфе съедобной мидии *Mytilus edulis* в течение 48 суток после непрерывного воздействия (Browne et al., 2008).

При этом, у мидий в ходе воздействия микропластиками отмечаются гистологические изменения в жабрах и тканях пищеварительной железы, сильное воспаление и дестабилизация мембран лизосом. Было установлено, что при 96-часовом пребывании мидий в воде, с добавлением 2,5 г/л первичных микрочастиц полиэтилена высокой плотности размером до 80 мкм происходит достоверное увеличение дестабилизации лизосомальных мембран, сопровождающееся образованием гранулоцитов, уже после 6 часов экспозиции (Von Moss et al., 2012).

Изменение окислительно-восстановительного баланса было обнаружено у мидий при воздействии экологических значимых концентраций первичного микропластика. Исследователи отмечают, что при воздействии смеси полиэтилена и полипропилена в концентрациях 0,008 (низкая), 10 (средняя) и 100 (высокая) мкг/л в течение 10-дневного воздействия наблюдался ответ антиоксидантной системы. При влиянии средней и высокой концентраций значительно увеличивался уровень таких биомаркеров как супероксиддисмутаза и каталаза в жабрах и пищеварительной железе голубой мидии (Revel et al., 2019).

Накопление и токсичность наноразмерных частиц оксидов металлов также ранее описано в научных работах. Так, например, в литературе имеются данные о достоверном накоплении меди в мягких тканях двустворчатого моллюска *S. plana* при нахождении этих моллюсков в течение 7 дней в морской воде с добавлением наночастиц меди (Buffet et al., 2011).

Еще одним примером, показывающим способность гидробионтов аккумулировать наночастицы из воды, является исследование на двустворчатых моллюсках *M. edulis*. Авторы этой работы показали, что при содержании мидии в воде с добавлением наночастиц оксида меди на протяжении 5 дней, произошло увеличение концентрации меди в тканях моллюска в 7 раз превышающее концентрацию у контрольных особей (Hu et al, 2014).

5.5. Оценка повреждения ДНК

В ходе проведенного исследования были получены данные о генотоксичности микросфер полистирола и наноразмерных частиц оксида меди. Анализ целостности ДНК при воздействии на *M. trossulus* (табл. 7) показал, что в клетках жабр экспериментальной группы моллюсков, содержащихся в воде с добавлением микропластика, происходило достоверное увеличение доли ДНК, мигрирующей из ядра кометы. В клетках жабр количество ДНК в хвосте кометы увеличилось в 2,5 раза относительно контрольных значений. В клетках пищеварительной железы также произошло

увеличение повреждения ДНК, однако относительно контроля количество ДНК в хвосте кометы достоверно не изменилось. Отсутствие достоверных отличий связано с высокой вариабельностью значений, что в свою очередь объясняется гетерогенностью всех выборок комет.

Таблица 7 – Оценка повреждения ДНК в эксперименте с *M. trossulus*. (среднее $\pm$ стандартное отклонение, n=200) * - отличие от контроля достоверно (p<0.05)

Токсикант	% ДНК в хвосте	
	жабры	пищеварительная железа
Контроль	2,17 $\pm$ 0,39	1,43 $\pm$ 0,52
Микропластик	5,60* $\pm$ 0,85	3,29 $\pm$ 0,37
Наночастицы	12,67* $\pm$ 3,52	16,24* $\pm$ 2,14
Микропластик +наночастицы	8,44* $\pm$ 2,67	10,83* $\pm$ 2,53

Наибольший уровень повреждения структуры ДНК был обнаружен в клетках мидий, содержащихся в воде с добавлением 20 мкг/л нанодисперсных частиц оксида меди. Так, доля ДНК в хвосте кометы составила 12,67* $\pm$ 3,52 в клетках жабр и 16,24* $\pm$ 2,14 в клетках пищеварительной железы исследуемых моллюсков. Стоит отметить, что в клетках особей, подвергшихся воздействию и частицами микропластика и наночастицами, произошло значительное уменьшение повреждения структуры молекул ДНК относительно значений, полученных при воздействии только наночастиц. Скорее всего, снижение генотоксического эффекта при сочетанном воздействии исследуемых токсикантов связано с тем, что микросферы полистирола, сорбируя на своей поверхности нанодисперсный оксид меди, снижали его биодоступность.

При анализе распределения повреждения ДНК в зависимости от классов комет было обнаружено, что в клетки исследуемых тканей моллюсков формировали кометы с незначительным повреждением, принадлежащие к классам C₀ и C₁ (рис. 20).

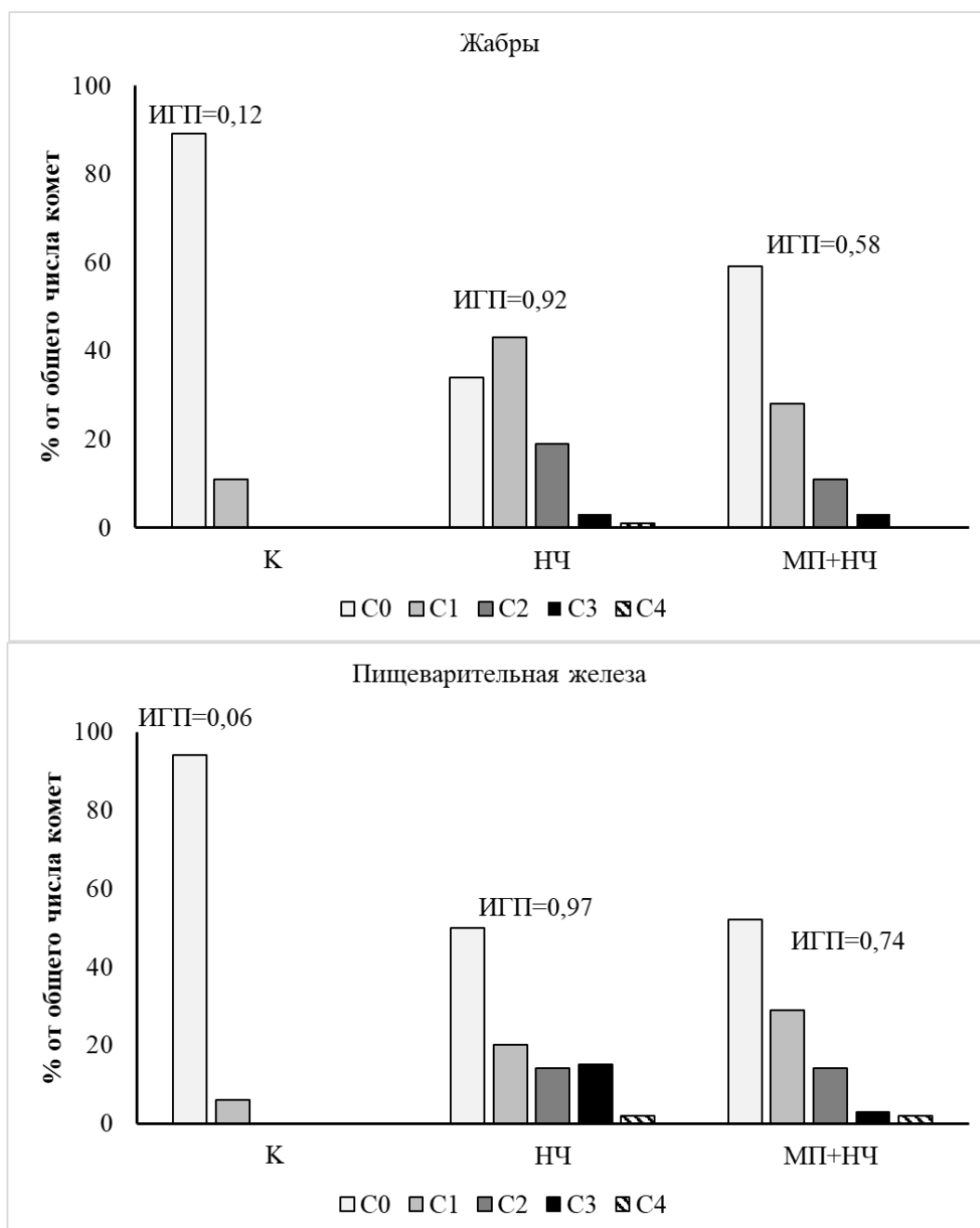


Рисунок 20 – Распределение ДНК-комет по классам в клетках жабр и пищеварительной железы *M. trochus*

При экспозиции моллюсков в воде с добавлением 20 мкг/л наночастиц оксида меди доля комет с неповрежденной или мало поврежденной ДНК уменьшилась до 77% в жабрах и до 70% в пищеварительной железе. Кроме того, отмечено появление комет с критическим уровнем повреждения ДНК (C₄), соответствующие апоптозно/некротическому уровню распада. При

воздействии всех токсикантов, исследуемых в эксперименте, значения ИГП превосходили уровень контроля.

Научные исследования возможной генотоксичности микропластика на разные живые организмы только начинают появляться. Ранее в литературных источниках сообщалось о генотоксическом эффекте микроразмерных частиц полистирола. Так, например, было показано, что при 48-часовом воздействии 10, 50 и 100 мг / л полистирольных флуоресцентных микрочастиц размеров 5 мкм на кончики корней садового боба *Vicia faba* L. происходило сильное генотоксическое повреждение клеток корня (Jiang et al., 2019).

Кроме того, было проведено исследование подтверждающее генотоксичность полистирольных микрогранул по отношению к водным беспозвоночным. Установлено, что при воздействии полистирольных микросфер диаметром 1 мкм в течение 24 часов на креветок *N. davidi* в концентрациях 800 мкг/мл и 1600 мкг/мл происходило повреждение молекул ДНК и достоверное увеличение длины хвоста комет по сравнению с контрольными значениями (Berber, 2019).

Также есть данные, свидетельствующие о генотоксическом воздействии наноразмерных частиц на клетки водных организмов. Так, эксперименты с *Danio rerio* Hamilton, 1822 показали, что при 24-часовой экспозиции сперматозоидов в растворах с микро- и наночастицами цинка происходит дозозависимое увеличение повреждения ДНК, было отмечено появление кометного хвоста и наличие микронуклеуса, что указывает на непоправимое повреждение ДНК в клетках (Xiong et al., 2011).

В другом исследовании было описано увеличение индекса генотоксического повреждения сперматозоидов пресноводной рыбы *Labeo rohita* Hamilton, 1822 при содержании взрослых особей в воде с добавлением сублетальных концентраций (25% от LC₅₀) мышьяка, меди и цинка на протяжении 30 дней. Было установлено, что при содержании взрослых особей в воде с сублетальной концентрацией цинка произошло увеличение ИГП

сперматозоидов до значения $1,6 \pm 0,8$, характерного для выраженного повреждения ДНК (Kousar, 2015).

Генотоксичность наночастиц оксидов металлов, в том числе и оксида меди, также ранее изучалась, тем не менее стоит отметить немногочисленность данных о генотоксичности, полученных с помощью метода ДНК-комет. Известно, что наноразмерные частицы оксида меди инициировали повреждение ДНК в клеточных культурах человека и лабораторных млекопитающих (Ahamed et al., 2010), в клетках крови радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 (Isani et al., 2013), а также в клетках гемолимфы мидии *M. galloprovincialis*. При объяснении причин возможного генотоксического эффекта меди стоит обратить внимание на его способность запускать процессы перекисного окисления липидов. Считается, что именно высокореакционные оксирадикалы являются главной причиной окислительного повреждения ДНК, что в свою очередь вызывает разрыв цепей молекулы ДНК (Buffet et al., 2011).

Известно, что у мидий биоаккумуляция микрочастиц пластика сосредоточена, главным образом, в пищеварительной железе и, в меньшей степени, в жабрах и гемолимфе (Wang et al., 2021). Вероятно, реакция клеток пищеварительной железы на воздействие микрочастиц полистирола и наночастиц оксида меди обусловлена особенностями физиолого-биохимических систем питания и усвоения разноразмерных частиц, характерных для моллюсков-фильтраторов и мидий, в частности. Обобщенные результаты по изучению биомаркеров окислительного стресса указывают, что кратковременное воздействие микропластика, наночастиц оксида меди и их совместных комбинаций вызывает серьезные изменения в антирадикальном звене антиоксидантной системы, в дестабилизации мембран лизосом и сопровождается деструкцией ядерной ДНК.

Несмотря на то, что механизмы проникновения, аккумуляции и места локализации основных биохимических нарушений в биологических системах при воздействии наночастиц и фрагментов микропластика в последние годы

стали предметом интенсивного изучения, роль этих компонентов в токсичности для гидробионтов остается предметом дискуссий и нуждается в дополнительных исследованиях. В интересах дальнейшего развития этого направления следует признать, что опасные последствия токсического характера зависят не только от уровня загрязнения, но и обусловлены возможностью взаимодействия отдельных токсикантов друг с другом, что существенно может влиять на их биодоступность, аккумуляцию и механизмы токсичности. В этом отношении важен, но относительно слабо изучен вопрос о возможных последствиях совместного воздействия фрагментов микропластика и наночастиц. Принимая во внимание уникальные сорбционные свойства этих поллютантов, развитие синергических и антагонистических эффектов с их участием представляется наиболее реальным, подтверждением чему служат исследования последних лет (Avio et al., 2015; Oliveira et al., 2018). Показано, что совместное воздействие фрагментов микропластика и химических загрязняющих веществ на рыб способствует усилению неблагоприятных последствий, вызываемые компонентами по-отдельности (Peda et al., 2016). В тоже время, эффект воздействия смесей микропластика с поллютантами может варьировать в зависимости от химического состава. Так, фрагменты пластика изменяли острую токсичность ионов Cr^{6+} (Luis et al., 2015), но не влияли на токсичность наночастиц Au (Ferreira et al., 2016). На примере морского двустворчатого моллюска-фильтратора *Mytilus edulis* Авио с коллегами (Avio et al., 2015) выявили способность микропластика усиливать проникновение пирена в пищеварительную железу. Однако, в случае совместного воздействия полимерных частиц и ионов ртути у моллюска *Corbicula fluminea* наблюдали антагонистические реакции по таким показателям как скорость фильтрации, активность ферментов холинэстеразы и глутатион-S-трансферазы, уровень ПОЛ (Oliveira et al., 2018).

Наглядным примером служат исследования интенсивности роста микроводорослей в присутствии смесей различных микропластиков и

поллютантов. Ли с коллегами (Li et al., 2020) наблюдали антагонистическую реакцию у микроводоросли *Chlorella pyrenoidosa* при воздействии низких концентраций смеси полистирольных микрогранул (мПС) и дибутилфталата (ДБФ), но при относительно повышенных концентрациях ответ был синергический. При комбинированном воздействии мПС и трифенилоловохлорида (ТФОХ) у *C. pyrenoidosa* наблюдали синергический ответ, тогда как у микроводоросли *Skeletonia costatum* реакция на эту же комбинацию была антагонистической (Yi et al., 2019).

На основании приведенных примеров можно с большой вероятностью утверждать, что фрагменты различных микропластиков оказывают существенное влияние на токсичность сопутствующих химических загрязнителей. В подобного рода немногочисленных (малочисленных, редких) исследованиях с участием мПл и наноразмерных частиц прослеживается такая же тенденция. Экспериментально показано, что по-отдельности НЧ-Au и мПл слабо влияли на интенсивность роста морской микроводоросли *Tetraselmis chuii*, но в смеси они резко подавляли рост этой микроводоросли (Davarpanah, Guilhermino, 2019). Вместе с тем имеются достаточно убедительные данные, показывающие, что токсичность наночастиц TiO₂ и CuO для микроводорослей снижалась в присутствии мПл (Zhu et al., 2020). При этом авторы считают, что причиной наблюдаемого эффекта является образование гетероагрегатов между наночастицами оксидов металлов и фрагментами мПл, снижающими взаимодействие наночастиц с поверхностью микроводорослей. Очевидно, образование гетероагрегатов не влияет на их поглощение морской нематодой *Caenorhabditis elegans*, поэтому наночастицы полистирола даже при низких концентрациях, реально присутствующих в окружающей среде, способствовали усилению токсичности НЧ-TiO₂ (Dong et al., 2018).

ВЫВОДЫ

1. В экспериментальных условиях присутствие в морской среде неиспользованных фрагментов полиэтилена вызывает у двустворчатого моллюска *M. trossulus* снижение интегральной антиоксидантной активности и усиление окислительной деструкции ядерной ДНК клеток жабр и пищеварительной железы.

2. В присутствии в воде фрагментов полиэтилена, извлеченных из загрязненной акватории (б. Золотой Рог, зал. Петра Великого), в клетках исследованных тканей мидий наблюдается существенное усиление процессов окислительного стресса и фрагментации генома (по данным метода ДНК-комет).

3. Установлено, что микросферы полистирола при воздействии на сперматозоиды плоского морского ежа *S. mirabilis* проявляют дозо-зависимые генотоксические свойства (в концентрациях 10^4 , 10^5 и 10^6 частиц/л), что выражается в значительном увеличении повреждений ДНК сперматозоидов. Однако, независимо от уровня повреждения ДНК, спермии сохраняют способность оплодотворять яйцеклетки с эффективностью до 97%.

4. Частицы полистирола индуцируют усиленную фрагментацию ядерной ДНК клеток пищеварительной железы *M. trossulus*. У особей экспериментальной группы 50% клеток пищеварительной железы мидий формировали кометы класса C_2 с повреждением ДНК в диапазоне от 25 до 35%. Доля клеток апоптотического характера с существенными повреждениями ДНК (C_3) составила 8%.

5. Показано, что при совместном воздействии микросфер полистирола и наночастиц оксида меди у экспериментальных моллюсков *M. trossulus* наблюдается синергический эффект в индукции процессов окислительного стресса. Так, при воздействии полистирола и наночастиц по отдельности стабильность мембран лизосом в гемоцитах моллюска снизилась более чем на 15% и 30%, соответственно, тогда как при совместном воздействии этот показатель снизился практически в два раза. В клетках

пищеварительной железы опытных групп достоверно снизился уровень интегральной антиоксидантной активности и увеличилась концентрация окисленных форм белков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

МП – микропластик

НЧ – наночастицы

ПЭ – полиэтилен

ПС – полистирол

ПНД – полиэтилен низкого давления

ПП – полипропилен

ПВХ – поливинилхлорид

ПММА – полиметилметакрилат

ПХБ – полихлорированные бифенилы

НУ – нефтеуглеводороды

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

СМЛ – стабильность мембран лизосом

ИАА – интегральная антиоксидантная активность

МДА – малоновый диальдегид

КБ – карбонилы белков

ИГП – индекс генетического повреждения

АФК – активные формы кислорода

ПЖ – пищеварительная железа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бузников Г.Н., Подмарев В.К. Морские ежи *Stroglyocentrotus drobachensis*, *S. nudus*, *S. intermedius* // Объекты биологии развития. 1975. С. 179–216.
2. Ващенко М. А. Биотестирование донных осадков залива Петра Великого (Японское море) с использованием половых клеток, эмбрионов и личинок морского ежа // Океанология. 2003. Т. 33. № 1. С. 121–125.
3. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. «Биофизика». 1991. Т. 29. 249 с.
4. Довженко Н.В., Куриленко А.В., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Окислительный стресс, индуцируемый кадмием, в тканях двустворчатого моллюска *Modiolus modiolus* // Биология моря. 2005. Т. 31, № 5. С. 358-362.
5. Доронин Ю. К., Глазер В.М., Евсеева Т.И., Гераськин С.А. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие. – М.: Академия, 2008. – 254 с.
6. Дроздов А. Л., Бойко Э. В., Сергеева О. С., Тюрин С. А. Методические указания к учебной практике по биологии для студентов I курса отделения биоорганической химии и биотехнологии института химии и прикладной экологии ДВГУ: учеб. пособи. – Владивосток: изд-во ДВГУ, 2006. – 64 с.
7. Журавель Е. В., Подгурская О. В. Влияние углеводов водорастворимой фракции дизельного топлива на раннее развитие плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* // Гидробиологический журнал. 2013. Т. 49. № 3. С. 74–81.
8. Зубцова А.С., Петухов В.И., Вах Е.А., Зубцова И.Л. Анализ экологического состояния бухты Золотой Рог залива Петра Великого// Процессы в геосредах. 2018. № 3 (17). С. 96-97.
9. Ляшенко О. А. Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды: учеб. пособие – СПб.: ГТУРП, 2012. – 67 с.

10. Пелех (Кобзарь) А.Д., Абрамова Е.А. Оценка токсичности грунтов бухты Золотой Рог (Японское море) методом биотестирования // Утилизация отходов производства и потребления: инновационные подходы и технологии. Сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции. - Киров, 2020. - С. 132-138.
11. Репина Е. М., Седова Д. А., Соколенко Л. Г. Плоские морские ежи в прибрежье Приморья (Японское море): Распределение и ресурсы // Известия ТИНРО. 2012. Т. 171. С. 121–132.
12. Слободскова В.В., Кукла С.П., Челомин В.П. Анализ качества морской среды на основе определения генотоксичности ДНК клеток жабр приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1856) // Биология моря. 2015. Т. 41, № 6. С. 457–460.
13. Томилина И.И., Гремячих В.А., Мыльников А.П., Комов В.Т. Влияние металлооксидных наночастиц (CeO₂, TiO₂, ZnO) на биологические параметры пресноводных нанофлагеллят и ракообразных // Доклады Академии наук. 2011. Т. 436. С. 715–717.
14. Шунтов В. П. Биология дальневосточных морей России: учеб. пособие – Владивосток: Изд-во ТИНРО-Центра, 2001. – 580 с.
15. Abbasi S., Soltani N., Keshavarzi B., Moore F., Turner A., Hassanaghahi M. Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa estuary, Persian gulf // Chemosphere. 2018. Vol. 205. P. 80–87.
16. Abreu A., Pedrotti M. L. Microplastics in the oceans: the solutions lie on land // Field Actions Science Reports. 2019. Vol. 19. P. 62–67.
17. Ahamed M., Siddiqui M. A., Akhtar M. J. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2010. Vol. 396. P. 578–583.
18. Akcha F., Spagnol C., Rouxel J. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos // Aquatic Toxicology. 2012. Vol. 106–107. P. 104–113.

19. Alimi O. S., Budarz J. F., Hernandez L. M., Tufenkji N. Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport // *Environmental Science & Technology*. 2018. Vol. 52. P. 1704–1724.
20. Almroth B. M. C., Åström L., Roslund S., Petersson H., Johansson M., Persson N. K. Quantifying shedding of synthetic fibers from textiles; a source of microplastics released into the environment // *Environmental Science and Pollution Research*. 2018. Vol. 25. P. 1191–1199.
21. Al-Oufi H., McLean E., Kumar A. S., Claereboudt M., Al-Habsi M. The effects of solar radiation upon breaking strength and elongation on of fishing nets // *Fisheries Research*. 2004. Vol. 66. №.1. P. 115–121.
22. Ananthaswamy, A. Junk food – a diet of plastic pellets plays havoc with animals' immunity // *New Scientist*. 2001. Vol. 169. P. 1–18.
23. Andrady A. L. Assessment of environmental biodegradation of synthetic polymers: a review // *Journal of Macromolecular Science, Part C*. 1994. Vol. 34. №. 1. P. 25–75.
24. Andrady A. L. Biodegradation of plastics: monitoring what happens // *Plastics Additives*. 1998. P. 32–40.
25. Andrady A. L. Microplastics in the marine environment // *Marine Pollution Bulletin*. 2011. Vol. 62. P. 1596–1605.
26. Andrady A. L. The plastic in microplastics: A review // *Marine Pollution Bulletin*. 2017. Vol. 119. №. 1. P.12–22.
27. Araújo P. H. H., Sayer C., Giudici R., Poço J. G. R. Techniques for reducing residual monomer content in polymers: A review // *Polymer Engineering & Science*. 2002. Vol. 42. P. 1442–1468.
28. Arthur C., Baker J., Bamford H. Proceedings of the international research workshop on the occurrence, effects and fate of micro-plastic marine debris // *NOAA Technical Memorandum*. 2009.

29. Ashton K., Holmes L., Turner A. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment // *Marine Pollution Bulletin*. 2010. Vol. 60. №. 11. P. 2050–2055.
30. Auta H. S., Emenike C. U., Jayanthi B., Fauziah S. H. Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus sp.* and *Rhodococcus sp.* isolated from mangrove sediment // *Marine Pollution Bulletin*. 2018. Vol. 127. P. 15–21.
31. Avio C. G., Gorbi S., Regoli F. Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat // *Marine Environmental Research*. 2017. Vol. 128. P. 2–11.
32. Avio C.G., Gorbi S., Milan M., Benedetti M., Fattorini D., Errico G., Pauletto M., Bargelloni L., Regoli F. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels // *Environmental Pollution*. 2015. Vol. 198. P. 211–222.
33. Backhurst M. K., Cole R. G. Subtidal benthic marine litter at Kawau Island, north-eastern New Zealand // *Journal of Environmental Management*. 2000. Vol. 6. P. 227–237.
34. Bainy A.C.D., Almeida E.A., MuÈ ller I.C., Ventura E.C., Medeiros I.D. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil // *Marine Environmental Research*. 2000. Vol. 50. P. 411-416
35. Balbi T., Camisassi G., Montagna M., Fabbri R., Franzellitti S., Carbone C. Impact of cationic polystyrene nanoparticles (PS-NH₂) on early embryo development of *Mytilus galloprovincialis*: Effects on shell formation // *Chemosphere*. 2017. Vol. 186. P. 1–9.
36. Barnes D. K. A., Galgani F., Thompson R. C., Barlaz M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments // *Philosophical transactions of the Royal Society B*. 2009. Vol. 364. P. 1985-1998.

37. Bartosz G., Janaszewska A., Ertel D., Bartosz M. Simple determination of peroxy radical-trapping capacity // *Biochemistry and molecular biology international*. 1998. Vol. 46. P. 519–528.
38. Bayo J., Martinez A., Guillen M., Olmos S., Roca M. J., Alcolea A. Microbeads in commercial facial cleansers: threatening the environment // *CLEAN - Soil Air Water*. 2017. Vol. 45. P. 1–11.
39. Bejgarn S., MacLeod M., Bogdal C., Breitholtz M. Toxicity of leachate from weathering plastics: An exploratory screening study with *Nitocra spinipes* // *Chemosphere*. 2015. Vol. 132. P. 114–119.
40. Belcheva N.N., Zakhartsev M.V., Silina A.V., Slinko E.N., Chelomin V.P. Relationship between shell weight and cadmium content in whole digestive gland of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay) // *Marine Environmental Research* 2006. Vol.61. P. 396-409.
41. Berber A. A. Genotoxic evaluation of polystyrene microplastic // *SAUJS*. 2019. Vol. 23. P. 358–367.
42. Berlino M., Mangano M., De Vittor C., Sara G. Effects of microplastics on the functional traits of aquatic benthic organisms: A global-scale meta-analysis // *Environmental Pollution*. 2021. Vol. 285. №. 117174.
43. Besseling E., Quik J. T. K., Sun M., Koelmans A. A. Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: A modeling study // *Environmental Pollution*. 2017. Vol. 220. P. 340–548.
44. Betts K. Why small plastic particles may pose a big problem in the oceans // *Environmental Science & Technology*. 2008. Vol. 42. P. 8995.
45. Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I. L. N., Schøyen, M. Blue mussels (*Mytilus edulis spp.*) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review // *Marine Environmental Research*. 2017. Vol. 130. P. 338–365.
46. Bhattacharya P., Lin S., Turner J.P., Ke P.C. Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis // *The Journal of Physical Chemistry*. 2010. Vol. 114. P. 16556–16561.

47. Boerger C. M., Lattin G. L., Moore S. L., Moore C. J. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North pacific central gyre // Marine Pollution Bulletin. 2010. Vol. 60. P. 2275-2278.
48. Bondarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M., Kahru A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review // Archives of Toxicology. 2013. Vol. 87. P. 1181–1200.
49. Botterell Z. L. R., Beaumont N., Dorrington T., Steinke M., Thompson R. C., Lindeque P. K. Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review // Environmental Pollution. 2019. Vol. 245. P. 98–110.
50. Bowmer T., Kershaw P. Proceedings of the GESAMP international workshop on micro-plastic marticles as a vector in transporting persistent, bio-accumulating and toxic substances in the oceans // UNESCO-IOC Paris. 2010. 69 pp.
51. Brate I. L. N., Hurley R., Iversen K., Beyer J., Thomas K. V., Steindal C. C., Green N. W. , Olsen M., Lusher A. *Mytilus spp.* as sentinels for monitoring microplastic pollution in Norwegian coastal waters: A qualitative and quantitative study // Environmental Pollution. 2018. Vol. 243. P. 383–393.
52. Browne M. A., Dissanayake A., Galloway T. S., Lowe D. M., Thompson R. C. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L) // Environmental Science & Technology. 2008. Vol. 42. P. 5026-5031.
53. Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., Thompson, R. C., Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity // Current Biology. 2013. Vol. 23. P. 2388–2392.
54. Buege J. A., Aust S. D. Microsomal lipid peroxidation // Methods in Enzymology. 1978. P. 302–310.
55. Buffet P., Tankoua O., Pan J., Berhanu D., Herrenknecht C., Poirier L., Amiard-Triquet C., Amiard J., Risso C., Guibbolini M., Reip P., Valsami-Jones

E., Mouneyrac C. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hedistodiversi color* to copper oxide nanoparticles // Chemosphere. 2011. Vol. 84. P. 166–174.

56. Bugoni L., Krause L. Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil // Marine Pollution Bulletin. 2001. Vol. 42. №. 12. P. 1330–1334.

57. Bundschuh M., Filser J., Luderwald S., McKee M.S., Metreveli G., Schaumann G.E., Schulz R., Wagner S. Nanoparticles in the environment: Where do we come from, where do we go to? // Environmental Sciences Europe. 2018. Vol. 30. № 6.

58. Camargo P. H. C., Satyanarayana K. G., Wypych F. Nanocomposites: synthesis, structure, properties and new application opportunities // Materials Research. 2009. Vol. 12. №. 1. P. 1–39.

59. Carpenter E. J., Anderson S. J., Harvey G. R., Miklas H. P., Peck B. B. Polystyrene spherules in coastal water // Science. 1972. Vol. 178. P. 749–750.

60. Castillo A. B., Al-Maslamani I., Obbard J. P. Prevalence of microplastics in the marine waters of Qatar // Marine Pollution Bulletin. 2016. Vol. 111. №.1–2. P. 260–267.

61. Cavas T., Konen S. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay // Aquatic Toxicology. 2008. Vol. 90. P. 154–159.

62. Cesa F. S., Turra A., Baruque-Ramos J. Synthetic fibers as microplastics in the marine environment: A review from textile perspective with a focus on domestic washings // Science of The Total Environment. 2017. Vol. 598., P. 1116–1129.

63. Chatel A., Bruneau M., Lièvre C., Goupil A., Mouneyrac C. Spermatozoa: A relevant biological target for genotoxicity assessment of contaminants in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana* // Marine Pollution Bulletin. 2017. Vol. 116. P. 488–490.

64. Chelomin V.P., Belcheva N.N. The effect of heavy metals on processes of lipid peroxidation in microsomal membranes from the hepatopancreas of the bivalve mollusc *Mizuhopecten yessoensis* // Comparative Biochemistry and Physiology. 1992. Vol. 103C. № 2. P. 419-422.
65. Cho Y., Shim W. J., Jang M., Han G. M., Hong S. H. Abundance and characteristics of microplastics in market bivalves from South Korea // Environmental Pollution. 2019. Vol. 245. P. 1107–1116.
66. Chua, E. M., Shimeta, J., Nugegoda, D., Morrison, P. D., Clarke, B.O. Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, *Allorchestes compressa*. // Environmental Science & Technology. 2014. Vol. 48. P. 8127–8134.
67. Clapham P. J., Young S. B., Brownell J. R. Baleen whales: conservation issues and the status of the most endangered populations // Mammal Review. 1999. Vol. 29. P. 35–60.
68. Cole M., Galloway T. S. Ingestion of nanoplastics and microplastics by pacific oyster larvae // Environmental Science & Technology. 2015. Vol. 49. P. 14625–14632.
69. Cole M., Lindeque P. K., Halsband C., Galloway T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment // Marine Pollution Bulletin. 2011. Vol. 62. P. 2588–2597.
70. Colton J. B., Knapp F. D. Plastic particles in surface waters of the northwestern Atlantic // Science. 1974. Vol. 185. P.491–497.
71. Conley K., Clum A., Deepe J., Lane H., Beckingham B. Wastewater treatment plants as a source of microplastics to an urban estuary: removal efficiencies and loading per capita over one year // Water Research X. 2019. Vol. 3. №. 100030.
72. Corradini F., Meza P., Eguiluz R., Casado F., Huerta-Lwanga E., Geissen V. Evidence of microplastic accumulation in agricultural soils from sewage sludge disposal // Science of the Total Environment. 2019. Vol. 671. P. 411–420.

73. Costa M. F., da Costa J. P., Duarte A. C. “Sampling of micro(nano)plastics in environmental compartments: How to define standard procedures?” // *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 2018. Vol. 1. P. 36–40.
74. Coyle R., Hardiman G., O’Driscoll K. Microplastics in the marine environment: a review of their sources, distribution processes, uptake and exchange in ecosystems. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*. 2020. Vol. 2. №. 100010.
75. Dai Z., Zhang H., Zhou Q., Tian Y., Chen T., Tu C., Fu C., Luo Y. Occurrence of microplastics in the water column and sediment in an inland sea affected by intensive anthropogenic activities // *Environmental Pollution*. 2018. Vol. 242. P. 1557–1565.
76. Davarpanah E., Guilhermino L. Are gold nanoparticles and microplastics mixtures more toxic to the marine microalgae *Tetraselmis chuii* than the substances individually? // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2019. Vol.181. P. 60–68
77. Davison P., Asch R. G. Plastic ingestion by mesopelagic fishes in the North pacific subtropical gyre // *Marine Ecology-Progress Series*. 2011. Vol. 432, P. 173-180.
78. De Falco F., Gullo M.P ., Gentile G., Pace E. D., Cocca M., Gelabert L., Brouta-Agnésa M., Rovira A., Escudero R., Villalba R., Mossotti R., Montarsolo A., Gavignano S., Tonin C., Avella M. Evaluation of microplastic release caused by textile washing processes of synthetic fabrics // *Environmental Pollution*. 2018. Vol. 236. P. 916–925.
79. De Witte B., Devriese L., Bekaert K., Hoffman S., Vandermeersch G., Cooreman, K., Robbens, J. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types // *Marine Pollution Bulletin*. 2014. Vol. 85. P. 146–155.
80. Dehghani S., Moore F., Akhbarizadeh R. Microplastic pollution in deposited urban dust, Tehran metropolis, Iran // *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. Vol. 24. P. 20360–20371.

81. Della Torre C., Bergami E., Salvati A., Faleri C., Cirino P., Dawson K. A., Corsi I. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus* // Environmental Science & Technology. 2014. Vol. 48. P. 12302–12311.
82. Desforges J. P. W., Galbraith M., Ross P. S. Ingestion of microplastics by zooplankton in the northeast Pacific Ocean // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2015. Vol. 69. P. 320–330.
83. Detree C., Gallardo-Escarate C. Single and repetitive microplastics exposures induce immune system modulation and homeostasis alteration in the edible mussel *Mytilus galloprovincialis* // Fish and Shellfish Immunology. 2018. Vol. 83. P. 52–60.
84. Devaux Y., Zangrando J., Schroen B., Creemers E. E., Pedrazzini T., Chang C. P., Dorn G. W., Thum T., Heymans S. Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing // Nature Reviews Cardiology. 2015. Vol. 12. P. 415–425.
85. Dong S., Qu M., Rui Q., Wang D. Combinational effect of titanium dioxide nanoparticles and nanopolystyrene particles at environmentally relevant concentrations on nematode *Caenorhabditis elegans* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2018. Vol. 161. P. 444–450.
86. Dris R., Gasperi J., Saad M., Mirande C., Tassin B. Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment? // Marine Pollution Bulletin. 2016. Vol. 104. № 1. P. 290–293.
87. Duis K., Coors A. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects // Environmental Sciences Europe. 2016. Vol. 28. P. 1–25.
88. Duran I., Nieto O. Water characterization in three industrialized harbours (Vigo, Bilbao and Parajes) in North Coast of Spain // Marine Pollution Bulletin. 2011. Vol. 64. № 2. P. 410–415.

89. Eriksen M., Maximenko N., Thiel M., Cummins A., Lattin G., Wilson S., Hafner J., Zellers A., Rifman S. Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre // *Marine Pollution Bulletin*. 2013. Vol. 68. P. 71–76.
90. Erikson, C., Burton, H. Origins and biological accumulation of plastic particles in fur seals from Macquarie Island // *Ambio*. 2003. Vol. 32. P. 380–384.
91. Eubeler J. P., Zok S., Bernhard M., Knepper T. P. Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures // *Trends in Analytical Chemistry*. 2009. Vol. 28. №. 9. P. 1057–1072.
92. Faggio C., Tsarpali V., Dailianis S. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview // *Science of the Total Environment*. 2018. Vol. 636. P. 220–229.
93. Fahrenfeld N. L., Arbuckle-Keil G., Beni N. N., Bartelt-Hunt S. L. Source tracking microplastics in the freshwater environment // *Trends in Analytical Chemistry*. 2019. Vol. 112. P. 248–254.
94. Fairbairn E.A., Keller A.A., Mädler L., Zhou D., Pokhrel S., Cherr G.N. Metal oxide nanomaterials in seawater: linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development // *Journal of Hazardous Materials*. 2011. Vol. 192. P. 1565-1571.
95. Fendall L. S., Sewell M.A. Contributing to marine pollution by washing your face. Microplastics in facial cleansers // *Marine Pollution Bulletin*. 2009. Vol. 58. №. 8. P. 1225–1228.
96. Fernandez B., Albentosa M. Insights into the uptake, elimination and accumulation of microplastics in mussel. *Environmental Pollution*. 2019. Vol. 249. P. 321–329.
97. Ferreira P., Fonte E., Soares M.E., Carvalho F., Guilhermino L. Effects of multi-stressors on juveniles of the marine fish *Pomatoschistus microps*: Gold nanoparticles, microplastics and temperature // *Aquatic Toxicology*. 2016. Vol. 170. P 89–103.

98. Foley C. J., Feiner Z. S., Malinich T. D., Hook T. O. A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. *Science of the Total Environment*. 2018. Vol. 631–632. P. 550–559.
99. Friedman C. L., Burgess R. M., Perron M. M., Cantwell M. G., Ho K. T., Lohmann K. Comparing polychaete and polyethylene uptake to assess sediment resuspension effects on PCB bioavailability // *Environmental Science & Technology*. 2009. Vol. 43. №. 8. P. 2865–2870.
100. Gall S. C., Thompson R. C. The impact of debris on marine life // *Marine Pollution Bulletin*. 2015. Vol. 92. P. 170–179.
101. Galloway T. S., Cole M., Lewis C. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem // *Nature Ecology & Evolution*. 2017. Vol. 1. №. 116.
102. Geyer R., Jambeck J. R., Law K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made // *Science Advances*. 2017. Vol. 3. P. 1–6.
103. Gigault J., ter Halle A., Baudrimont M., Pascal P.-Y., Gauffre F., Phi T.-L., Hadri H.E., Grassl B., Reynaud S. Current opinion: What is a nanoplastic? // *Environmental Pollution*. 2018. Vol. 235. P. 1030–1034.
104. Gilan I., Hadar Y., Sivan A. Colonization, biofilmformation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004. Vol. 65. P. 97–104.
105. Gonzalez-Soto N., Hatfield J., Katsumiti A., Duroudier N., Lacave J. M., Bilbao E., Orbea A., Navarro E., Cajaraville M. P. Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo[a]pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis* // *Science of the Total Environment*. 2019. Vol. 684. P. 548–566.
106. Gouin T., Roche N., Lohmann R., Hodges G. A Thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic // *Environmental Science & Technology*. 2011. Vol. 45. P. 1466–1472.

107. Gregory, M.R. Plastic 'scrubbers' in hand cleansers: A further (and minor) source for marine pollution identified // *Marine Pollution Bulletin*. 1996. Vol. 32. №. 12. P. 867–871.
108. Hamlin H. J., Marciano K., Downs C. A. Migration of nonylphenol from food-grade plastic is toxic to the coralreef fish species *Pseudochromis fridmani* // *Chemosphere*. 2015. Vol. 139 P. 223–228.
109. Heindler F. M., Alajmi F., Huerlimann R., Zeng C., Newman S. J., Vamvounis G., van Herwerden L. Toxic effects of polyethylene terephthalate microparticles and Di(2-ethylhexyl)phthalate on the calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017. Vol. 141. P. 298–305.
110. Helm P. A. Improving microplastics source apportionment: a role for microplastic morphology and taxonomy? // *Analytical Methods*. 2017. Vol. 9. P.1328–1331.
111. Hermabessiere L., Dehaut A., Paul-Pont I., Lacroix C., Jezequel R., Soudant D. G. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review // *Chemosphere*. 2017. Vol. 182. P. 781–793.
112. Hernandez E., Nowack B., Mitrano D. M. Polyester textiles as a source of microplastics from households: A mechanistic study to understand microfiber release during washing // *Environmental Science & Technology*. 2017. Vol. 51. P. 7036–704.
113. Horn D., Miller M., Anderson S., Steele C. Microplastics are ubiquitous on California beaches and enter the coastal food web through consumption by Pacific mole crabs // *Marine Pollution Bulletin*. 2019. Vol. 139. P. 231–237.
114. Hu W., Culloty S., Darmody G., Lynch S., Davenport J., Ramirez-Garcia S., Dawson K. , Lynch I., Blasco J. , Sheehan D. Toxicity of copper oxide nanoparticles in the blue mussel, *Mytilus edulis*: a redox proteomic investigation // *Chemosphere*. 2014. Vol. 25. P 112-116.

115. Imhof H. K., Rusek J., Thiel M., Wolinska J., Laforsch C. Do microplastic particles affect *Daphnia magna* at the morphological, life history and molecular level? // PLoS ONE. 2017. Vol. 12. №. 0187590.
116. Inoue K., Waite H. J., Matsuoka M., Odo S., Harayama S. Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus* // Biology Bulletin. 1995. Vol. 189. P. 370-375.
117. Ioakeimidis C., Fotopoulou K. N., Karapanagioti H. K., Geraga M., Zeri C., Papathanassiou E., Galgani F., Papatheodorou G. The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. №. 23501.
118. Isani G., Falcioni M. L., Barucca G., Sekar D., Andreani G., Carpenè E., Falcioni G. Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO₄ in rainbow trout // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2013. Vol. 97. P. 40–46.
119. Istomina A., Chelomin V., Kukla S., Zvyagintsev A., Karpenko A., Slinko E., Dovzhenko N., Slobodskova V., Kolosova L. Copper effect on the biomarker state of the *Mizuhopecten yessoensis* tissues in the prespawning period // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2019. Vol. 70. №. 103189.
120. Jambeck J. R., Andrady A., Geyer R., Narayan R., Perryman M., Siegler T., Wilcox C., Lavender Law K. Plastic waste inputs from land into the ocean // Science. 2015. Vol. 347. P. 768–771.
121. Jeong C. B., Won E. J., Kang H. M., Lee M. C., Hwang D. S., Hwang U., Zhou B., Souissi S., Lee S. J., Lee J. S. Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-p38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). Environmental Science & Technology. 2016. Vol. 50. P. 8849–8857.
122. Jha A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay // Mutagenesis. 2008. Vol. 23. P. 207–221.
123. Jiang X., Chen H., Liao Y., Ye Z., Li M., Klobučar G. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba* // Environmental Pollution. 2019. Vol. 250. P. 831-838.

124. Julshamn K., Andersen K. J. Subcellular distribution of major and minor elements in unexposed molluscs in western Norway-I. The distribution and binding of cadmium, zinc and copper in the liver and the digestive system of the oyster *Ostrea edulis* // Comparative Biochemistry and Physiology. 1983. Vol. 75A. P. 9–12.
125. Kalcikova B. G., Skalar A. T., Bundschuh M., Gotvajn A. Ž. Wastewater treatment plant effluents as source of cosmetic polyethylene microbeads to freshwater // Chemosphere. 2017. Vol. 188. P. 25–31.
126. Kaposi K. L., Mos B., Kelaher B. P., Dworjanyn S. A. Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva // Environmental Science & Technology. 2014. Vol. 48. P. 1638–1645.
127. Karlsson T. M., Vethaak A. D., Almroth B. C., Ariese F., van Velzen M., Hasselov M., Leslie H. A. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: method development and microplastic accumulation. Marine Pollution Bulletin. 2018. Vol. 122. P. 403–408.
128. Katsanevakis S., Verriopoulos G., Nicolaidou A., Thessalou-Legaki M. Effect of marine litter on the benthic megafauna of coastal soft bottoms: a manipulative experiment // Marine Pollution Bulletin. 2007. Vol. 54. P. 771–778.
129. Kazama M., Hino A. Sea urchin spermatozoa generate at least two reactive oxygen species; the type of reactive oxygen species changes under different conditions // Molecular Reproduction and Development. 2012. Vol. 79. P. 283–295.
130. Klaeger F., Tagg A. S., Otto S., Bienmüller M., Sartorius I., Labrenz M. Residual monomer content affects the interpretation of plastic degradation // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. №. 2120.
131. Kobayashi N. Marine ecotoxicological testing with echinoderms // Ecotoxicological Testing for the Marine Environment. 1984. Vol. 1. P. 341–350.
132. Kousar S. Diagnosis of metals induced DNA damage in fish using comet assay // Pakistan Veterinary Journal. 2015. Vol. 35. P. 168–172.

133. Kurz T., Terman A., Gustafsson B., Brunk U. T. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2008. Vol. 1780. P. 1291-1303.
134. Lacaze E., Geffard O., Goyet D., Bony S., Devaux A. Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay // *Environmental Research*. 2011. Vol. 111. P. 626–634.
135. Laist D. W. Impacts of marine debris: entanglement of marine life in marine debris including a comprehensive list of species with entanglement and ingestion records. In: Coe, J.M., Rogers, D.B. (Eds.) // *Marine Debris: Sources, Impacts and Solutions*. 1997. P. 99–139.
136. Lambert S., Wagner M. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene // *Chemosphere*. 2016. Vol. 145. P. 265–268.
137. Lee J., Hong S., Song Y. K., Hong S. H., Jang Y. C., Jang M., Heo N. W., Han G. M., Lee M. G., Kang D., Shim W. J. Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea // *Marine Pollution Bulletin*. 2013. Vol. 77. P. 349–354.
138. Lee J., Lee J. S., Jang Y. C., Hong S. Y., Shim W. J., Song Y. K., Hong S. H., Jang M., Han G. M., Kang D., Hong S. Distribution and size relationships of plastic marine debris on beaches in South Korea // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2015. Vol. 69. P. 288–298.
139. Leslie H. A., Brandsma S.H., van Velzen M. J. M., Vethaak A. D. Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota // *Environment International*. 2017. Vol. 101. P. 133–142.
140. Lewis C., Galloway T. S. Genotoxic damage in Polychaetes: A study of species and cell-type sensitivities // *Mutation Research*. 2008. Vol. 654. P. 69–75.
141. Li L., Su L., Cai H., Rochman C. M., Li Q., Kolandhasamy P., Peng J., Shi H. The uptake of microfibers by freshwater Asian clams (*Corbicula*

fluminea) varies based upon physicochemical properties // Chemosphere. 2019. Vol. 221. P.107–114.

142. Li W. C., Tse H. F., Fok L. Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects // Science of The Total Environment. 2016. Vol. 566–567. P. 333–349.

143. Li Z., Yi X., Zhou H., Chi T., Li W., Yang, K. Combined effect of polystyrene microplastics and dibutyl phthalate on the microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. Environ. Pollut. **2020**, Vol. 257, 113604;

144. Lin W., Jiang R., Xiong Y., Wu J., Xu J., Zheng J., Zhu F., Ouyang G. Quantification of the combined toxic effect of polychlorinated biphenyls and nano-sized polystyrene on *Daphnia magna* // Journal of Hazardous Materials. 2019. Vol. 364. P. 531–536.

145. Lithner D., Larsson A., Dave G. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition // Science of the Total Environment. 2011. Vol. 409. P. 3309–3324.

146. Liu M., Lu S., Song Y., Lei L., Hua J., Lv W., Zhou W., Cao C., Shi H., Yang X., He D. Microplastic and mesoplastic pollution in farmland soils in suburbs of Shanghai, China // Environmental Pollution. 2018. Vol. 242. P. 855–862.

147. Liu P., Qian L., Wang H., Zhan X., Lu K., Gu C., Gao S. New insights into the aging behavior of microplastics accelerated by advanced oxidation processes // Environmental Science & Technology. 2019. Vol. 53. P. 3579–3588.

148. Lo H. K. A., Chan K. Y. K. Negative effects of microplastic exposure on growth and development of *Crepidula onyx* // Environmental Pollution. 2018. Vol. 233. P. 588–595.

149. Long M., Hégaret H., Lambert C., Le Goic N., Huvetm A., Robbens J. Can phytoplankton species impact microplastic behaviour within water column? Platform presentation, International workshop on fate and impact of microplastics in marine ecosystems // MICRO 2014. Plouzane (France). 2014. 48 pp.

150. Lonnstedt O. M., Eklov P. Environmentally relevant concentrations of microplastic particles influence larval fish ecology // *Science*. 2016. Vol. 352. P. 1213–1216.
151. Luís L.G., Ferreira P., Fonte E., Oliveira M., Guilhermino L. Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium(VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations. *Aquat. Toxicol.* 2015. Vol. 164. P. 163–174
152. Lushchak V. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals // *Aquatic Toxicology*. 2011. Vol. 101. P. 13-30.
153. Lusher A. Microplastics in the marine environment: Distribution, interactions and effects. In *Marine Anthropogenic Litter*; Springer: Cham, Switzerland, 2015; pp. 245–308.
154. Lusher A., McHugh M., Thompson R. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel // *Marine Pollution Bulletin*. 2012. Vol. 67. P. 94-99.
155. Magni S., Gagné F., André C., Della Torre C., Auclair J., Hanana H., Parenti C. C., Bonasoro F., Binelli A. Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia) // *Science of the Total Environment*. 2018. Vol. 631–632. P. 778–788.
156. Mallory M. L. Marine plastic debris in northern fulmars from the Canadian high Arctic // *Marine Pollution Bulletin*. 2008. Vol. 56. P. 1501–1504.
157. Manzo S., Miglietta M., Rametta G., Buono S., Francia G. Embryotoxicity and spermotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* // *Journal of Hazardous Materials*. 2013. Vol. 254. P. 1-9.
158. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples // *Analytical Biochemistry*. 1978. Vol. 87. P. 206–210.

159. Marnett L.J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde // Mutation Research. 1999. Vol. 424. P. 83-95.
160. Martinez-Gomez C., Bignell J., Lowe D. Lysosomal membrane stability in mussels. ICES Tech. Marine Environmental Research. 2015. № 56, 41 pp.
161. Martínez-Gómez C., León V. M., Calles S., Gomáriz-Olcina M., Vethaak A. D. The adverse effects of virgin microplastics on the fertilization and larval development of sea urchins // Marine Environmental Research. 2017. Vol. 130. P. 69–76.
162. Mascarenhas R., Santos R., Zeppelini D. Plastic debris ingestion by sea turtle in Paraiba, Brazil // Marine Pollution Bulletin. 2004. Vol. 49. №. 4. P. 354–355.
163. Mato Y., Isobe T., Takada H., Kanehiro H., Ohtake C., Kaminuma T. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment // Environmental Science & Technology. 2001. Vol. 35. P. 318–324.
164. Maynard A. Nanotechnology: a research strategy for addressing risk // Woodrow Wilson International Center for Scholars Project on Emerging Nanotechnologies. 2006.
165. Mazur A. A., Zhuravel E. V., Slobodskova V. V., Mazur M. A., Kukla S. P., Chelomin V. P. Waterborne exposure of adult sand dollar, *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1864), to zinc ions and zinc oxide nanoparticles affects early development of its offspring // Water, Air, & Soil Pollution. 2020. Vol. 231. №. 115.
166. Mesquita C. S., Oliveira R., Bento F., Geraldo D., Rodrigues J. V., Marcos J. C. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins // Analytical Biochemistry. 2014. Vol. 458. P. 69–71.
167. Miao A.J., Zhang X.Y., Luo Z., Chen C.S., Chin W.C., Santschi P.H., Quigg A. Zinc oxide engineered nanoparticles: dissolution and toxicity to marine

phytoplankton // Environmental Toxicology and Chemistry. 2015. Vol. 29. P. 2814-2822.

168. Mitchelmore C. L., Birmelin C., Livingstone D. R., Chipman J. K. Detection of DNA strand breaks in isolated mussels (*Mytilus edulis*) digestive gland cells using the “comet” assay // Ecotoxicology and Environmental Safety. 1998. Vol. 41. P. 51–58.

169. Moore C. J. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat // Environmental Research. 2008. Vol. 108. №. 2. P. 131–139.

170. Moron M. S., Depierre J. W., Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione s-transferase activities in rat lung and liver // Biochimica et Biophysica Acta. 1979. Vol. 582. P. 67–78.

171. Murphy F., Ewins C., Carbonnier F., Quinn B. Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment // Environmental Science & Technology. 2016. Vol. 50. P. 5800–5808.

172. Muthukumar T., Aravinthan A., Lakshmi K., Venkatesan R., Vedaprakash L., Doble M. Fouling and stability of polymers and composites in marine environment // International Biodeterioration & Biodegradation. 2011. Vol. 65. №. 2. P. 276–284.

173. Napper I. E., Bakir A., Rowland S. J., Thompson R. C. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics // Marine Pollution Bulletin. 2015. Vol. 99. P. 178–185.

174. Napper I. E., Thompson R. C. Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: effects of fabric type and washing conditions // Marine Pollution Bulletin. 2016. Vol. 112. P. 39–45.

175. Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak, Sigg N. L., Behra R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii* // Environmental Science & Technology. 2008. Vol. 42. P. 8959–8964.

176. Newman S., Watkins E., Farmer A., Ten Brink P., Schweitzer J. P. The economics of marine litter // Marine anthropogenic litter. 2015. P. 371–398.

177. Nobre C. R., Santana M. F. M., Maluf A., Cortez F. S., Cesar A., Pereira C. D. S., Turra A. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) // Marine Pollution Bulletin. 2015. Vol. 92. P. 99–104.
178. Oliveira, P.; Barboza, L. G. A.; Branco, V.; Figueiredo, N.; Carvalho, C.; Guilhermino L. Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2018. Vol.164.P.155–163.
179. Paul-Pont I., Lacroix C., Fernández C. G., Hégaret H., Lambert C., Le Goïc N., Frère L., Cassone A. L., Sussarellu R., Fabioux, C. Exposure of marine mussels *Mytilus spp.* to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation // Environmental Pollution. 2016. Vol. 216. P. 724–737.
180. Paul-Pont I., Tallec K., Gonzalez-Fernandez C., Lambert C., Vincent D., Mazurais D., Zambonino-Infante J. L., Brotons G., Lagarde F., Fabioux C. Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics // Frontiers in Marine Science. 2018. Vol. 252. P. 1–22.
181. Pinsino A., Bergami E., Della Torre C., Vannuccini M. L., Addis P., Secci M., Dawson K. A., Matranga V., Corsi I., Amino-modified polystyrene nanoparticles affect signalling pathways of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) embryos. Nanotoxicology. 2017. Vol. 11. P. 201–209.
182. Pirc U., Vidmar M., Mozer A., Kržan A. Emissions of microplastic fibers from microfiber fleece during domestic washing // Environmental Science and Pollution Research. 2016. Vol. 23. P. 22206–22211.
183. Pittura L., Avio C. G., Giuliani M. E., d'Errico G., Keiter S. H., Cormier B., Gorbi S., Regoli F. Microplastics as vehicles of environmental PAHs to marine organisms: Combined chemical and physical hazards to the Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis* // Frontiers in Marine Science. 2018. Vol. 5. №. 103.

184. PlasticsEurope. Plastics - the facts 2019: an analysis of european plastics production, demand and waste data // Brussels, Belgium. 2019. 44 pp.
185. Porter N.A., Nolon Y., Ramdas L. Cyclic peroxides and thiobarbituric assay // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1976. Vol. 441. P. 506-512
186. Prokic M., Radovanovic T. B., Gavric J. P., Faggio C. Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019. Vol. 111. P. 37–46.
187. Qu X., Su L., Li H., Liang M., Shi H. Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels // *Science of the Total Environment*. 2018. Vol. 621. P. 679–686.
188. Rehse S., Kloas W., Zarfl C. Microplastics reduce short-term effects of environmental contaminants. part I: effects of bisphenol A on freshwater zooplankton are lower in presence of polyamide particles // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018. Vol. 15. P. 1–15.
189. Restrepo-Flórez J. M., Bassia A., Thompson M. R. Microbial degradation and deterioration of polyethylene – A review // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014. Vol. 88. P. 83–90.
190. Revel M., Châtela A., Perrein-Ettajani H., Bruneau M., Akcha F., Sussarellu R., Rouxel J., Costil K., Decottignies P., Cognie, B. Realistic environmental exposure to microplastics does not induce biological effects in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* // *Marine Pollution Bulletin*. 2020. Vol. 150. №. 110627.
191. Revel M., Lagarde F., Perrein-Ettajani H., Bruneau M., Akcha F., Sussarellu R., Rouxel J., Costil K., Decottignies P., Cognie B. Tissue-specific biomarker responses in the blue mussel *Mytilus spp.* exposed to a mixture of microplastics at environmentally relevant concentrations // *Frontiers in Environmental Science*. 2019. Vol. 7. №. 33.
192. Rezania S., Park J., Din M. F. M., Taib S. M., Talaiekhosanni A., Yadav K. K., Kamyab H. Microplastics pollution in different aquatic environments

and biota: a review of recent studies // Marine Pollution Bulletin. 2018. Vol. 133. P. 191–208.

193. Ribeiro F., Garcia A. R., Pereira B. P., Fonseca M., Mestre N. C., Fonseca T. G., Ilharco L. M., Bebianno M. J. Microplastics effects in *Scrobicularia plana* // Marine Pollution Bulletin. 2017. Vol. 122. P. 379–391.

194. Ribic C., Sheavly S., Rugg D. J., Erdmann E. Trends and drivers of marine debris on the Atlantic coast of the United States 1997–2007 // Marine Pollution Bulletin. 2010. Vol. 60. P. 1231–1242.

195. Rios L. M., Moore C. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment // Marine Pollution Bulletin. 2007. Vol. 54. №. 8. P. 1230–1237.

196. Rist S. E., Assidqi K., Zamani N. P., Appel D., Perschke M., Huhn M., Lenz M. Suspended micro-sized PVC particles impair the performance and decrease survival in the Asian green mussel *Perna viridis* // Marine Pollution Bulletin. 2016. Vol. 111. P. 213–220.

197. Rochman C. M., Cook A. M., Koelmans A. A. Plastic debris and policy: Using current scientific understanding to invoke positive change // Environmental Toxicology and Chemistry. 2016. Vol. 35. №. 7. P. 1617–1626.

198. Rochman C. M., Tahir A., Williams S. L., Baxa D. V., Lam R., Miller, J. T., Teh F. C., Werorilangi S., Teh S. J. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption // Scientific Reports. 2015. Vol. 5. №. 14340.

199. Rossi G., Barnoud J., Monticelli L. Polystyrene nanoparticles perturb lipid membranes // The Journal of Physical Chemistry Letters. 2014. Vol. 5. P. 241–246.

200. Ryberg M. W., Hauschild M. Z., Wang F., Averous-Monnery S., Laurent A. Global environmental losses of plastics across their value chains // Resources, Conservation & Recycling. 2019. Vol. 151. №. 104459.

201. Santana M. F. M., Moreira F. T., Turra A. Trophic transference of microplastics under a low exposure scenario: Insights on the likelihood of particle

cascading along marine food-webs // Marine Pollution Bulletin. 2017. Vol. 121. P. 154–159.

202. Santana M. F., Moreira F. T., Pereira C. D., Abessa D. M., Turra A. Continuous exposure to microplastics does not cause physiological effects in the cultivated mussel *Perna perna* // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2018. Vol. 74. P. 594–604.

203. Santos D., Félix L., Luzio A., Parra S., Bellas J., Monteiro S.M. Single and combined acute and subchronic toxic effects of MPs and copper in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages // Chemosphere. 2021. Vol. 277. №.130262.

204. Santos R., Palos-Ladeiro M., Besnard A., Porcher J. M., Bony S., Sanchez W., Devaux A. Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. Reproductive Toxicology. 2013. Vol. 36. P. 6–11.

205. Schwaferts C., Niessner R., Elsner M., Ivleva N. P. Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2019. Vol. 112. P. 52–65.

206. Setälä O., Fleming-Lehtinen V., Lehtiniemi M. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. Environmental Pollution. 2014. Vol. 185. P. 77–83.

207. Siegfried M., Koelmans A.A., Besseling E., Kroeze C. Export of microplastics from land to sea. A modelling approach // Water Research. 2017. Vol. 127. P. 249–257.

208. Silva P. P. G., Norbe C. R., Resaffe P., Pereira C. D. S., Gusm O. Leachate from microplastics impairs larval development in brown mussels // Water Research. 2016. Vol. 106. P. 364–370.

209. Singh N., Manshian B., Jenkins G.J.S. et al. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials // Biomaterials. 2009. Vol. 30. P. 3891–3914.

210. Sivan A. New perspectives in plastics biodegradation // Current Opinion in Biotechnology. 2011. Vol. 22. №. 3. P. 422–426.

211. Smith M.A., Fernandez-Triana J., Roughley R., Hebert D.N. DNA barcode accumulation curves for understudied taxa and areas // *Molecular Ecology Resources*. 2009. Vol. 9. P. 208–216.
212. Steer M., Cole M., Thompson R. C., Lindeque P. K. Microplastic ingestion in fish larvae in the western English Channel // *Environmental Pollution*. 2017. Vol. 226. P. 250–259.
213. Straub S., Hirsch P. E., Burkhardt-Holm P. Biodegradable and petroleum-based microplastics do not differ in their ingestion and excretion but in their biological effects in a freshwater invertebrate *Gammarus fossarum* // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017. Vol. 14. P 1–16.
214. Studer A.M., Limbach L.K., Van Duc L., Krumeich F., Athanassiou E.K., Gerber L.C., Moch H., Stark W.J. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles // *Toxicology Letters*. 2010. Vol. 197. P. 169–174.
215. Su L., Cai H., Kolandhasamy P., Wu C., Rochman C. M., Shi H. Using the Asian clam as an indicator of microplastic pollution in freshwater ecosystems // *Environmental Pollution*. 2018. Vol. 234. P. 347–355.
216. Su L., Deng H., Li B., Chen Q., Pettigrove V., Wu C., Shi H. The occurrence of microplastic in specific organs in commercially caught fishes from coast and estuary area of east China // *Journal of Hazardous Materials*. 2019. Vol. 365. P. 716–724.
217. Su L., Xue Y., Li L., Yang D., Kolandhasamy P., Li D., Shi H. Microplastics in Taihu Lake, China. *Environmental Pollution*. 2016. Vol. 216. P. 711–719.
218. Sun T., Zhan J., Li F., Ji C., Wu H. Evidence-based meta-analysis of the genotoxicity induced by microplastics in aquatic organisms at environmentally relevant concentrations // *Science of the Total Environment*. 2021. Vol. 783. №. 147076.

219. Sun T.Y., Bornhöft N.A., Hungerbühler K., Nowack B. Dynamic probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials. // *Environmental Science & Technology*. 2016. Vol. 50. P. 4701–4711.
220. Sundt P., Syversen F., Skogesal O., Schulze P. Primary microplastic pollution: measures and reduction potentials in Norway // *Norwegian Environment Agency*. 2016. 117 pp.
221. Sussarellu R., Suquet M., Thomas Y., Lambert C., Fabioux C., Pernet M. E., Le Goïc N., Quillien V., Mingant C., Epelboin Y., Corporeau C., Guyomarch J., Robbens J., Paul-Pont I., Soudant P., Huvet A. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016. Vol. 113. P. 2430–2435.
222. Sutherland W. J., Clout M., Côté I. M., Daszak P., Depledge M. H., Fellman I. A horizon scan of global conservation issues for 2010 // *Trends in Ecology & Evolution*. 2010. Vol. 25. P. 1–7.
223. Tallec K., Huvet A., Di Poi C., González-Fernández C., Lambert C., Petton B., Le Goïc N., Berchel M., Soudant P., Paul-Pont I. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos // *Environmental Pollution*. 2018. Vol. 242. P. 1226–1235.
224. Teuten E. L., Saquing J. M., Knappe D. R. U., Barlaz M. A., Jonsson S., Bjorn A., Rowland S. J., Thompson R. C., Galloway T. S., Yamashita R., Ochi D., Watanuki Y., Moore C., Viet P. H., Tana T. S., Prudente M., Boonyatumanond R., Zakaria M. P., Akkhavong K., Ogata Y., Hirai H., Iwasa S., Mizukawa K., Hagino Y., Imamura A., Saha M., Takada H. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife // *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 2009. Vol. 364. P. 2027–2045.
225. Thomas P. J., Oral R., Pagano G., Tez S., Toscanesi M., Ranieri P., Trifuoggi M., Lyons D. M. Mild toxicity of polystyrene and polymethylmethacrylate microplastics in *Paracentrotus lividus* early life stages // *Marine Environmental Research*. 2020. Vol. 161. №. 105132.

226. Thompson R. C., Moore C. J., vom Saal F. S., Swan S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends // Philosophical transactions of the Royal Society B. 2009. Vol. 364. P. 2153–2166.
227. Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., McGonigle, D., Russell, A.E. Lost at sea: where is all the plastic? // Science. 2004 Vol. 304. P.
228. Tomas J., Guitart R. Marine debris ingestion in loggerhead sea turtles, // Marine Pollution Bulletin. 2002. Vol. 44. №. 3. P. 211– 216.
229. Trifuoggi M., Pagano G., Oral R., Pavicic-Hamer D., Buric P., Kovacic I., Siciliano A., Toscanesi M., Thomas P. J., Paduano L. Microplastic-induced damage in early embryonal development of sea urchin *Sphaerechinus granularis*. Environmental Research. 2019. Vol. 179. №. 108815.
230. Tsang Y. Y., Mak C. W., Liebich C., Lam S. W., Sze E. T. P., Chan K. M. Microplastic pollution in the marine waters and sediments of Hong Kong // Marine Pollution Bulletin. 2017. Vol. 115. №. 1–2. P. 20–28.
231. UNEP (2016) Marine plastic debris and microplastic – Global lessons and research to inspire action and guide policy change. United Nations Environment Programme. Nairobi, 2016. 274 p.
232. Unice K. M., Weeber M. P., Abramson M. M., Reid R. C .D., van Gils J. A. G., Markus A. A., Vethaak A. D., Panko J. M. Characterizing export of land-based microplastics to the estuary - Part I: Application of integrated geospatial microplastic transport models to assess tire and road wear particles in the Seine watershed // Science of the Total Environment. 2019. Vol. 646. P.1639–1649.
233. Van Cauwenberghe L., Janssen C. R. Microplastics in bivalves cultured for human consumption // Environmental Pollution. 2014. Vol. 193. P. 65–70.
234. Vandenberg L. N., Hauser R., Marcus M., Olea N., Welshons W. V. Human exposure to bisphenol A (BPA) Reproductive Toxicology. 2007. Vol. 24. №. 2. P. 139–177.
235. Varo I., Perini D. A., Torreblanca A., Garcia Y., Bergami E., Vannuccini M. L., Corsi I. Time-dependent effects of polystyrene nanoparticles in

brine shrimp *Artemia franciscana* at physiological, biochemical and molecular levels // Science of the Total Environment. 2019. Vol. 675. P. 570–580.

236. Verschoor A., de Poorter L., Dröge R., Kuenen J., de Valk E. Emission of microplastics and potential mitigation measures: abrasive cleaning agents, paints and Tyre Wear // National Institute for Public Health and the Environment. 2016. 76 pp.

237. Vogelsang C., Lusher A. L., Dadkhah M. E., Sundvor I., Umar M., Ranneklev S. B., Eidsvoll D., Meland S. Microplastics in road dust-characteristics, pathway and measures // Institute of Transport Economics Norwegian Centre for Transport Research. 2019. 106 pp.

238. Von Moos N., Burkhardt-Holm P., Köhler A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure // Environmental Science & Technology. 2012. Vol. 46. P. 11327–11335.

239. Vroom R. J. E., Koelmans A. A., Besseling E., Halsband C. Aging of microplastics promotes their ingestion by marine zooplankton // Environmental Pollution. 2017. Vol. 231. P. 987–996.

240. Wagner M., Scherer C., Alvarez-Muñoz D., Brennholt N., Bourrain X., Buchinger S., Fries E., Grosbois C., Klasmeier J., Marti T., Rodriguez-Mozaz S., Urbatzka R., Vethaak A.D., Winther-Nielsen M., Reifferscheid G. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know // Environmental Sciences Europe. 2014. Vol. 26. № 12.

241. Wang S., Hu M., Zheng J., Huang W., Shang Y., Fang J. K. H., Shi H., Wang Y. Ingestion of nano/micro plastic particles by the mussel *Mytilus coruscus* is size dependent // Chemosphere. 2021. Vol. 263. №. 127957.

242. Wang T., Zou X., Li B., Yao Y., Zang Z., Li Y., Yu W., Wang W. Preliminary study of the source apportionment and diversity of microplastics: Taking floating microplastics in the South China Sea as an example // Environmental Pollution. 2019. Vol. 245. P. 965–974.

243. Ward J. E., Kach D. J. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves // Marine Environmental Research. 2009. Vol. 68. №3. P. 137–142.
244. Ward J. E., Zhao S. Y., Holohan B. A., Mladinich K. M., Griffin T. W., Wozniak J., Shumway S. E. Selective ingestion and egestion of plastic particles by the blue mussel (*Mytilus edulis*) and Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Implications for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution // Environmental Science & Technology. 2019. Vol. 53. P. 8776–8784.
245. Watts A. J. R., Urbina M. A., Goodhead R., Moger J., Lewis C., Galloway T. S. Effect of microplastic on the gills of the shore crab *Carcinus maenas* // Environmental Science & Technology. 2016. Vol. 50. P. 5364–5369.
246. Wegner A., Besseling E., Foekema E. M., Kamermans P., Koelmans A. A. Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) Environmental Toxicology and Chemistry. 2012. Vol. 31. P. 2490–2497.
247. Weinstein J. E., Crocker B. K., Gray A. D. From macroplastic to microplastic: Degradation of high-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene in a salt marsh habitat // Environmental Toxicology and Chemistry. 2016. Vol. 35. №. 7. P. 1632–1640.
248. Wesch C., Bredimus K., Paulus M., Klein R. Towards the suitable monitoring of ingestion of microplastics by marine biota: a review // Environmental Pollution. 2016. Vol. 218. P. 1200–1208.
249. Woodall L. C., Sanchez-Vidal A., Canals M., Paterson G. L. J., Coppock R., Sleight V., Calafat A., Rogers A. D., Narayanaswamy B. E., Thompson R. C. The deep sea is a major sink for microplastic debris // Royal Society Open Science. 2014. Vol. 1. P. 140317–140325.
250. Woods M. N., Stack M. E., Fields D. M., Shaw S. D., Matrai P. A. Microplastic fiber uptake, ingestion, and egestion rates in the blue mussel (*Mytilus edulis*) // Marine Pollution Bulletin. 2018. Vol. 137. P. 638–645.

251. Wright S. L., Thompson R. C., Galloway T.S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review // *Environmental Pollution*. 2013. Vol. 178. P. 483–492.
252. Xia B., Zhang J., Zhao X., Feng J., Teng Y., Chen B., Sun X., Zhu L., Sun X., Qu K. Polystyrene microplastics increase uptake, elimination and cytotoxicity of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in the marine scallop *Chlamys farreri* // *Environmental Pollution*. 2020. Vol. 258. №. 113657.
253. Xiong D., Fang T., Yu L., Sima X., Zhu W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage // *Science of The Total Environment*. 2011. Vol. 409. P. 1444–1452.
254. Yi X., Chi T., Li Z., Wang J., Yu M., Wu M., Zhou H. Combined effect of polystyrene plastics and triphenyltin chloride on the green algae *Chlorella pyrenoidosa* // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2019, Vol. 26. P. 15011–15018.
255. Yong C. J., Lee J., Hong S., Lee J. S., Shim W. J., Song Y. K. Sources of plastic marine debris on beaches of Korea: more from the ocean than the land // *Ocean Science Journal*. 2014. Vol. 49. P. 151–162.
256. Yu Q., Hu X., Yang B., Zhang G., Wang J., Ling W. Distribution, abundance, and risks of microplastics in the environment // *Chemosphere*. 2020. Vol. 249. №. 126059.
257. Zhu X., Zhao W., Chen X., Zhao T., Tan L., Wang, J. Growth inhibition of the microalgae *Skeletonema costatum* under copper nanoparticles with microplastic exposure // *Marine Environmental Research*. 2020. Vol. 158. 105005.