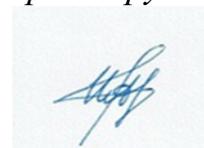


**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ И
АГРОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»**

На правах рукописи



ВЕРШИНИНА ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**Экологическая оценка действия наночастиц Zn, Cu и SiO₂ в системе
почва-живые организмы**

1.5.15. Экология (биологические науки)

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
С.В. Лебедев

Оренбург 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Наноматериалы в почве: источники поступления, пути миграции и транслокации.....	8
1.2 Современные проблемы биотестирования наноматериалов металлической природы.....	16
1.3 Адаптивные реакции живых организмов на внесение наночастиц в почву.....	31
1.3.1 Адаптивные реакции живых организмов на внесение в почву наночастиц меди.....	31
1.3.2 Адаптивные реакции живых организмов на внесение в почву наночастиц цинка.....	34
1.3.3 Адаптивные реакции живых организмов на внесение в почву кремниевых наночастиц.....	40
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
2.1 Объекты исследований.....	48
2.2 Препараты наночастиц металлов-микроэлементов.....	50
2.3 Биологическая оценка препаратов наночастиц Zn, Cu и SiO ₂ на модели бактериальной люминесцентной тест-системы (<i>in vitro</i>).....	51
2.4 Оценка действия препаратов наночастиц Zn, Cu и SiO ₂ на физиолого-биохимические показатели красного калифорнийского червя <i>E.fetida</i> (<i>in vivo</i>) и морфологические показатели <i>T. vulgare</i>	52
2.5 Статистическая обработка материалов.....	59
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	60
3.1 Изучение ингибирования наночастицами меди, цинка и кремния бактериальной биолюминесценции <i>in vitro</i>	60
3.2 Экологическая оценка действия наночастиц Zn при внесении в	

искусственный субстрат.....	62
3.3 Экологическая оценка действия наночастиц Zn в системе почва- живые организмы	69
3.4 Экологическая оценка действия наночастиц Cu при внесении в искусственный субстрат	77
3.5 Экологическая оценка действия наночастиц Cu в системе почва- живые организмы	83
3.6 Экологическая оценка действия наночастиц SiO ₂ при внесении в искусственный субстрат	91
3.7 Экологическая оценка действия наночастиц SiO ₂ в системе почва- живые организмы	96
ОБСУЖДЕНИЕ.....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время существует потребность в изучении приспособительных реакций компонентов биоты, на всех уровнях их биологической организации при поступлении в среду обитания наночастиц различной природы, что имеет значения для определения безопасных уровней в биоценозах.

Исследованию изменения биологических индикаторов при внесении наночастиц (НЧ) посвящены работы Diez-Ortiz M. et al., 2015; Wang F. et al., 2016; Gao X. et al., 2018; Bourdineaud J. P. et al., 2019, Rajput V. et al., 2020, 2022, Hui C. et al., 2021, Xie C. et al., 2022, Резниченко, 2017, Тереховой В.А., Гладковой М.М., 2014, 2021, и ряда других ученых. В тоже время в научных публикациях практически отсутствуют данные о влиянии наночастиц (в частности, меди, цинка и кремния) на почвенный биоценоз.

При производстве НЧ в промышленных масштабах неизбежным является их поступление в окружающую среду, через внесение удобрений и добавок с последующей контаминацией растений, почвы, сточных и канализационных вод (Rizwan et al., 2017). Учитывая уровень развития нанотехнологий, перед наукой стоит задача установить прямые и отдаленные последствия влияния наночастиц на живые системы, уникальные физико-химические характеристики которых позволяют проявлять не только положительное действие, но и иметь неожиданную токсичность для биологических объектов. Проводимые исследования, в целом, направлены на изучение действия наночастиц *in vitro*, что затрудняет понимание их воздействия на биологические системы в целом. Таким образом, складывается ситуация, свидетельствующая об актуальности изучения адаптивных реакций различных тест-объектов при внесении наночастиц в среду их обитания, а также выявления разнообразия обусловленных этим пределов толерантности живого организма.

Цель работы – исследовать биологические эффекты загрязнения среды

наночастицами Zn, Cu и SiO₂ на представителей агробиоценоза.

Задачи исследования:

1) Исследовать закономерности изменения биолюминесцентного отклика *Escherichia coli* K12 TG1 в ответ на внесение в среду НЧ Zn, Cu и SiO₂ *in vitro*.

2) Изучить изменения морфо-биохимических параметров *Triticum vulgare* и *E. fetida* в ответ на внесение в искусственный субстрат и почву НЧ Zn, Cu и SiO₂;

3) Оценить численность эколого-трофических групп микроорганизмов в почве и кишечнике *E. fetida* в ответ на внесение НЧ Zn, Cu и SiO₂ в почву;

4) Изучить скорость поглощения, биоаккумуляции и выведения химических элементов в почве при вермикультивировании в ответ на внесение НЧ Zn, Cu и SiO₂ в различных субстратах.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Впервые получены данные о комплексе адаптивных реакций и пределов толерантности представителей почвенного биоценоза при внесении наночастиц Zn, Cu и SiO₂ в искусственный субстрат и почву. Получены новые знания о биологическом действии различных доз НЧ Zn, Cu и SiO₂ *in vitro* и *in vivo* на физиолого-биохимические параметры тест-объектов *E. fetida* и *T. vulgare* в комплексе с показателями численности различных групп микроорганизмов. Получены новые данные, характеризующие дозозависимый эффект, определяющий биоаккумуляцию Zn, Cu и Si в тест-организме *E. fetida*. Установлено стимулирующее и/или ингибирующее влияние наночастиц на рост растений и активность ферментов в тест-организме *E. fetida*. Установлены средние пороги регуляции уровня металлов в организме червя: для Cu и Zn – 500 мг/кг; для Si – порог не установлен.

Научная новизна работы подтверждена патентами на изобретение (№ 2635103; бюл. № 31 от 09.11.2017, № 2700616. Бюл. № 26 от 18.09.2019).

Практическая значимость. Полученные результаты могут быть востребованы для разработки системы оценки, мониторинга и экологического прогнозирования допустимых уровней загрязнения химическими элементами агробиоценозов. Практическая ценность работы состоит в развитии и

совершенствовании методического аппарата для анализа адаптивных реакций живых организмов на воздействие НЧ с обоснованием оптимального алгоритма проведения исследований с использованием взаимодополняющих тестов. Результаты, изложенные в работе, могут быть использованы для развития системы мониторинга экологического состояния почвенных биоценозов; для прогнозирования прямых и отдаленных эффектов при нагрузке наночастицами, а также в научных организациях и высших учебных заведениях при преподавании дисциплин «Биохимия» и «Экология».

Защищаемые положения:

1) В исследованиях *in vitro* наиболее токсичным являются наночастицы Zn. Менее выраженный эффект наблюдался при внесении НЧ Cu.

2) Добавление в почву НЧ сопровождается развитием адаптационных реакций *E. fetida*, выражающихся в изменении морфо-биохимических показателей;

3) Положительное влияние на рост и развитие *T. vulgare*, численность азотфиксирующих и целлюлозолитических микроорганизмов в кишечнике *E. fetida* оказывало внесение НЧ SiO₂.

4) Организм червей способен к биоаккумуляции цинка и меди с последующим выведением при высоких концентрациях НЧ цинка и меди.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в планировании, подготовке и проведении исследований, их статистической обработке и подготовке материалов в печать в научных журналах.

Апробация работы. Результаты работы доложены и обсуждены на областной научно-практической конференции «Молодые ученые Оренбуржья – науке XXI века» (Оренбург, 2015), IV Международной научно-практической конференции «Биоэлементы» (Оренбург, 2016), VI Всероссийской конференции по наноматериалам с элементами научной школы для молодежи НАНО-2016 (Москва, 2016), 4-й Международной научно-практической конференции «Наноматериалы и живые системы» (Москва, 2016), I Всероссийском экологическом форуме им. проф. Б.С. Кубанцева (Волгоград, 2018),

Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 2018), Международной молодежной научной конференции «Студенческие научные общества – экономике региона» (Оренбург, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 12 публикаций в журналах, индексируемых в базе данных Web of science и Scopus, 2 – в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК МОН РФ для публикации результатов диссертационных исследований; 1 глава в монографии; получено 2 патента РФ на изобретение.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 174 страницах машинописного текста, включает 52 рисунка и 10 таблиц. Список литературы включает 282 наименования, в том числе 257 иностранных источника.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № №14-36-00023, фундаментального научного исследования по программам УрО РАН «Разработка теоретических основ и практических приемов повышения эффективности производства продукции растениеводства с использованием нанотехнологических решений» № 0761-2018-0032, премии Губернатора Оренбургской области для талантливой молодежи (2015 г.), областного гранта Оренбургской области в сфере научной и научно-технической деятельности (2018 г).

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. С.В. Лебедеву и руководителю центра «Нанотехнологий в сельском хозяйстве» ФНЦ БСТ РАН д.б.н, доценту Е.А. Сизовой.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Наноматериалы в почве: источники поступления, пути миграции и транслокации

В современной науке определенный интерес представляет исследование адаптационных реакций живых организмов к воздействию наночастиц. Обращаясь к истории изучения наночастиц, отметим, что начало развитию области наноиндустрии и нанотехнологий положил Ричард Филлипс Фейнман своим выступлением с лекцией «There is plenty of room at the bottom» («Там, внизу, много места!») в 1987 году на заседании Американского физического общества. В своем докладе он затронул перспективы поэтапной сборки различных продуктов (Feynman, 2011). Сама приставка «нано» обозначает 10^{-9} степень или 1/1000000000 часть. Ричард Фейнман полагал, что в скором времени, по мере развития наноиндустрии станет возможным управлять частицами на молекулярном, субмолекулярном или даже на атомном уровне, и, исходя из этого, создавать объекты с требуемыми свойствами (Фельдблюм, 2013).

Слово «нанотехнологии» (nanotechnology) было изначально придумано и введено в обращение Норио Танигучи в 1974 году. Ученый из японского университета обозначил так объекты, размерность которых была менее 1 микрона. Позже, в 1981 году в Германии, исследователь Герберт Глейтер обосновал возможность создания объектов наномасштаба. Также им были впервые употреблены такие термины, как «нанокристаллические материалы», «наноструктурные», «нанофазные» и т. д. (Gleiter, 2000).

Также весомый вклад в развитие нанотехнологий и наноиндустрии внес исследователь из США Ким Эрик Дрекслер. Во время своей работы в исследовательском институте, он ввел в научный лексикон такой термин как «нанотехнология» (nanotechnology). Это слово было употреблено им в его научном труде под названием «Engines of Creation: the Coming Era of

Nanotechnology» («Машина созидания: наступающая эра нанотехнологий») (Drexler, 1992). Все вышеупомянутые исследователи и их труды дали толчок для развития нанотехнологий и их применения в различных областях науки и техники.

Считается, что в нанотехнологиях могут применяться нанообъекты, которые хотя бы в одном из своих измерений не превышают значения в 100 нанометров (Hong, 2004).

Наноматериалы обладают следующими отличительными признаками:

- 1) объект в одном из своих измерений имеет нанометровый диапазон;
- 2) если объект достигает нанометрового диапазона, то у него появляются качественно новые свойства.

Также при характеристике наноматериалов принимают во внимание следующие свойства:

- 1) присутствие атомов на поверхности материала;
- 2) размеры наименьшего структурного элемента;
- 3) элемент, определяющий существование фазы.

Чаще всего наноматериалы классифицируют по природе нанофазы:

- 1) углеродные (фуллерены, нанотрубки);
- 2) полимерные – нанокомпозиты и древовидные (дендритные) структуры на полимерной основе;
- 3) органические и неорганические нанопленки;
- 4) металлические (НЧ, нанопорошки, нанокристаллы, нанопленки металлов, их соединений и сплавов);
- 5) на керамической основе (нанокомпозиты).

Сегодня на первое место выходят металлические наночастицы, имеющие неорганическое происхождение, среди которых выделяют:

- 1) полностью металлические наноматериалы (металлы и сплавы);
- 2) наноматериалы из химических соединений, содержащих частицы металлов (Buzea, Pacheco, 2017).

В литературе принято НЧ, содержащие металлы и имеющие неорганическую природу, которые находятся в устойчивом состоянии, характеризовать как нанопорошки (Годымчук и др., 2012).

Установлено, что наночастицы металлов обладают физико-химическими свойствами, отличающимися, как от свойств массивных металлических объектов, так и от свойств отдельных атомов (Liu et al., 2014). Так, способность НЧ активно взаимодействовать с биологическими структурами определяется крайне малыми размерами НЧ (размерность в одном из измерений должна быть менее 100 нм). Такие нанометровые размерности сближают наночастицы с клеточными (10-100 мкм), субклеточными и молекулярными структурами (вирус – 20-450 нм), белками (5-50 нм) и ДНК (шириной 2 нм, длиной 10-100 нм) (Годымчук и др., 2014). Наночастицы воздействуют на живой организм на уровне клетке, субклеточном и молекулярном уровне, а также их воздействие обусловлено нахождением в биологических жидкостях и средах организма (Liu et al., 2014).

Материал в наномасштабе демонстрирует уникальные физико-химические свойства, которые обусловлены их сверхмалым размером, высоким отношением поверхности к объему, составом, присутствием биохимических фрагментов на поверхности (периферийные покрытия или функциональные группы), гидрофильной или гидрофобной природой, физическим внешним видом (форма или морфология) и агрегацией (Patil-Sen, 2021), как показано на рисунке 1.

Наноразмерные материалы имеют большое значение и все чаще используются в коммерческих целях в различных секторах, где некоторые из передовых наноматериалов находятся на переднем крае зарождающихся областей нанобиотехнологии и наномедицины (Garbayo et al. 2020).

Из-за вышеупомянутых необычных физико-химических свойств наноматериалы значительно отличаются от такого же материала аналогичного состава, что позволяет им выполнять новые уникальные функции, улучшая функциональность, чувствительность, эффективность и специфичность с точки зрения их терапевтического или биомедицинского применения (Boisselier, Astruc, 2009; Pareek et al., 2018).

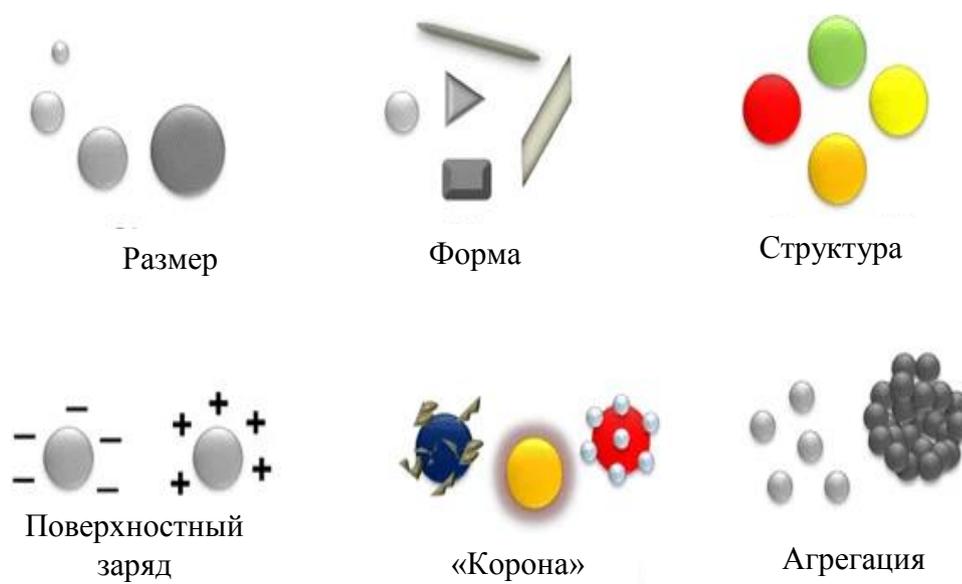


Рисунок 1 – Схематическое изображение различных физико-химических свойств наноматериалов, влияющих на возможность их практического применения

Кроме того, современный прогресс в области нанотехнологий дал возможность рационально разрабатывать различные наноматериалы и управлять их химическими, физическими и потенциальными биологическими свойствами для скрининга лекарств (маркировка), доставки генов (трансфекция), диагностики/мониторинга (устройства и маркировка), доставки лекарств (терапия), обнаружения (визуализация), тканевой инженерии и других биомедицинских приложений (Yarza et al., 2018).

Очевидно, что наномедицина эквивалентна традиционной медицине, но с лучшими перспективами точной и быстрой диагностики, эффективного лечения болезней без побочных эффектов или с минимальными побочными эффектами. Например, манипулируя терапевтическими агентами и другими материалами на наноразмерном уровне, можно изменить их основные свойства и биологическую активность (Starsich F. et al., 2018). Такие трансформированные характеристики могут позволить управлять терапевтическими агентами/лекарствами с точки зрения их растворимости, времени удерживания пула крови, контролируемого высвобождения в течение короткого или длительного периода времени,

контролируемого высвобождения, инициируемого окружающей средой, или доставки по определенному месту назначения (Lammers, Ferrari, 2020).

Наночастицы, ввиду своих уникальных свойств, по-разному влияют на живые объекты. В этой связи важность исследования вопроса влияния наночастиц на живые объекты в почве, во многом, обусловлено тем, что почва – это сложная, изменчивая и живая система, по сути рассматриваемая как невозобновляемый ресурс. Устойчивое использование почвы определяется временной и пространственной гармонизацией в использовании ее экологических (производство биомассы, защита людей и окружающей среды и генный резервуар) и неэкологических функций (физическая основа человеческой деятельности, источник сырья и геогенное и культурное наследие (Hou et al., 2020)). Эти функции связаны с экосистемными услугами, предоставляемыми почвой, и определяются типом почвы, состоянием и функциональным биоразнообразием.

Устойчивость к загрязнителям в почвах намного выше, чем в других природных средах, но загрязнение почвы, по-видимому, происходит практически постоянно (Barsova et al., 2019). После более чем 200-летней индустриализации загрязнение почвы стало широко распространенным явлением, которое оказывает негативное воздействие на здоровье человека и природные экосистемы, а также на экономику (Li et al., 2019). В этом случае почва становится более уязвимой, и некоторые ее функции оказываются нарушенными.

Антропогенные наночастицы (НЧ) выбрасывались в окружающую среду на протяжении веков в результате процессов горения, а также горнодобывающей, промышленной и строительной деятельности, но в настоящее время существует озабоченность исследователей в отношении преднамеренно изготовленных или изготовленных наночастиц (Zhang et al., 2020.). За последние десятилетия наблюдается чрезвычайно быстрое расширение нанотехнологий с широким спектром применений и преимуществ в различных областях. В настоящее время на рынке представлено более 800 продуктов на основе нанотехнологий, и

ождается, что в ближайшие годы их число увеличится (Грачева, Каменский, 2021).

Несмотря на быстрый рост нанотехнологий, существуют серьезные пробелы в знаниях относительно потенциальных токсикологических рисков воздействия антропогенных наночастиц (Missaoui, 2018). Одна из основных задач заключается в разработке стандартизированной методологии для изучения последствий для здоровья человека и окружающей среды. Это особенно верно в почвенной среде, где особенно заметно небольшое количество исследований. Экологические риски НЧ в различных экологических отсеках, включая почвы, были определены количественно (Gottschalk et al., 2013).

Из научных источников (2006–2023 годы) было обнаружено меньше исследований токсичности, относящихся к окружающей среде, для почвенных сред, из этого следует вывод, что уровни риска в почвах должны постоянно контролироваться из-за непрерывного осаждения инженерных наночастиц в сочетании с их растущим объемом производства.

Оценка риска химических веществ часто основана на соотношении прогнозируемой концентрации в окружающей среде (PEC) к прогнозируемой концентрации без воздействия (PNEC; Frische et al., 2003). Mueller и Nowack (2008) сообщили, что данное соотношение была меньше 1 (то есть риск не предполагается) для nano-TiO₂, углеродных нанотрубок (УНТ) и nano-Ag.

Однако модели часто пренебрегают поведением инженерных наночастиц в окружающей среде (например, трансформация, деградация, растворение и биоаккумуляция) и учетом того, что ключевую роль играют фактическая и потенциальная биодоступность.

Внимание к поведению наночастиц в почве обусловлено тем, что почва – это матрица окружающей среды, наиболее богатая природными НЧ как в виде первичных частиц, так и агломератов/агрегатов. В то же время существуют риски для почвенной экосистемы, связанные с НЧ. Поведение НЧ в почве сложно предсказуемо, так как оно состоит из различных физико-химических и биологических процессов, которые могут неблагоприятно влиять на экосистему.

Поэтому были разработаны различные подходы к моделированию для прогнозирования присутствия НЧ в почве. Свойства почвы, особенно содержание глины и органического вещества, а также рН, текстура, структура, компактность или содержание органических веществ, а также микробное сообщество почвы влияет на биодоступность НЧ (Fierer, Jackson, 2006). Rajput V. D. с соавторами (Rajput et al., 2018) сообщили, что НЧ влияют на свойства почвы (наблюдаются изменения в гуминовых веществах, пористости, гидравлической проводимости, ионах). Анализ при помощи сканирующей электронной микроскопии показал изменения поверхности частиц почвы. Следовательно, данный факт является важным, так как НЧ способны мобилизовать другие загрязнители почвы. Подвижность загрязняющих веществ в почвенном профиле зависит от формы, размера, заряда и типа минерального вещества почвы, а также от свойств почвы (Petosa et al., 2010).

Известно, что НЧ ZnO могут прочно связываться с коллоидами почвы. Они проявляют низкую подвижность при различной ионной силе (Zhao et al., 2012) и демонстрируют более высокую сорбцию по сравнению с ионным Zn^{2+} . Сорбция обеих форм металла увеличивается с увеличением значений рН. рН также влиял на токсичность как НЧ ZnO, так и ионного Zn^{2+} для почвенных червей *Folsomia candida*, причем цинк в виде ионов более токсичен (Waalewijn-Kool et al., 2012). Шен с соавторами (Shen et al., 2015) сообщили, что токсичность НЧ ZnO была выше в кислой почве, чем в нейтральной почве, и что токсичность в щелочной нефти самая низкая. Miglietta с соавторами (Miglietta et al., 2015) исследовали токсическое действие НЧ ZnO, Zn в виде соли и ионного Zn на кресс-салате *Lepidium sativum* с различными способами добавления в субстрат и пришли к выводу, что сухое добавление приводит к наибольшей растворимости ZnO, тогда как добавление дисперсии ZnO в воде и в экстрактах водного масла приводит к наименьшей его растворимости. Waalewijn-Kool с соавторами (Waalewijn-Kool et al., 2012) отметили, что токсичность НЧ ZnO не связана с размером и не способствует значительному различию в эффекте, наблюдаемом на развитие *Folsomia candida*, независимо от способа внесения (с помощью процедур сухого

внесения, либо суспензий в естественной почве). Анализ различных форм Zn показал изменения в почвенных бактериальных сообществах. Воздействие частиц Zn в виде частиц нанометрового или микрометрового диапазона вело к сходным реакциям бактериальных сообществ и отличалось от ответа на ионный Zn (Read et al., 2016). Предполагается, что морфология НЧ ZnO может влиять на их токсичность не только за счет эффективности интернализации, но и за счет различий в растворении в ионных формах внутри клеток и в продукции активных форм кислорода (АФК) (Sirelkhatim et al., 2015). Сообщается, что НЧ влияют на скорость процесса самоочищения почвы (при её загрязнении) и нарушают баланс питательных веществ в почве, что является основой для регулирования процессов питания растений и улучшения их плодородия.

В почве присутствует твердая матрица, с которой могут взаимодействовать НЧ, а также водная фаза, которая может содержать значительные количества природного коллоидного/дисперсного материала. Большинство методов для характеристики поведения НЧ ограничены водной фазой. НЧ ZnO, диспергированные в водном растворе, образуют и агрегируют в широком диапазоне размеров частиц, иногда почти в 10 раз больше, чем первичные NP (Tourinho et al., 2012). В почве растворенные или дисперсные органические вещества могут сорбироваться на поверхности почвенных частиц.

Gimbert с соавторами (Gimbert et al., 2007) изучили распределение частиц НЧ ZnO по размерам в суспензиях размером менее 1 мкм, извлеченных из почвы с высоким рН через 0, 7 и 14 дней после добавления, и обнаружили, что они быстро уравнивают водную и твердую фазы. Концентрация фракции менее 1 мкм была стабильной в течение экспериментального периода. Другое исследование, проведенное на НЧ ZnO Kool с соавторами (Kool et al., 2011) предполагает, что при подходящих условиях органическое вещество дестабилизируется дисперсией частиц. В почве НЧ переносятся броуновским движением и гравитационной силой, увеличивая шансы их взаимодействия с поверхностью частиц почвы (Tourinho et al., 2012). Сложные водные матрицы способствуют стабилизации НЧ ZnO при высокой ионной силе, условиях, которые усиливают агрегацию и

седиментацию НЧ ZnO (Peng et al., 2017). Однако растворение НЧ ZnO увеличивается с повышением кислотности и щелочности, хотя и несколько ограничено в диапазоне pH от 8 до 12 (Peng et al., 2017).

1.2 Современные проблемы биотестирования наноматериалов металлической природы

Сегодня существует потребность в изучении биологических свойств НЧ, поскольку их крупнотоннажное производство сопряжено с риском и потенциальной опасностью для окружающей среды. При этом пыль как результат выбросов промышленных предприятий может формировать определенные области (аномалии) в атмосферном воздухе, в водных и почвенных средах. В дальнейшем происходит рассеивание данной пыли и попадание во все известные сферы жизни, в том числе и живые объекты. На структуру и массу данных выбросов большое влияние имеет производственный цикл, функционирование очистных сооружений предприятия и технология, на них применяемая (Maher et al., 2020).

Согласно МР 1.2.2639-10 «Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях nanoиндустрии» во всех обитаемых сферах (вода, воздух, почва) могут встречаться НЧ, которые созданы искусственным путем. Попадают наночастицы в окружающую среду как результат протекания целого ряда процессов: использование на фабриках и заводах, применение НЧ как агентов в рекультивации земель и очистке стоков, использование наночастиц в сельском хозяйстве, автомобильной промышленности, в отходах (жидких и твердых) с предприятий, использующих НЧ.

Загрязнение (контаминация) природных объектов наноматериалами может происходить как результат изготовления и применения различных веществ в повседневной деятельности человека, например, средств, наносимых для кожу

для защиты от ультрафиолетового излучения, в лакокрасочной продукции, текстильных изделиях и т.д. Немаловажно при этом для мониторинга нахождения НЧ в тех или иных местах окружающей среды опираться на то, какими путями НЧ попадают в окружающую среду, их распространением и миграцией в первоначальной или измененной форме (Lespes et al., 2020). Существует мнение, что наноматериалы в почвах, попавшие в неё извне, не несут существенного ущерба для функционирования почвы и организмов, в ней обитающих (Kibbey, Strevett, 2019; Galdames et al., 2020; Pérez-Hernández H. et al., 2020).

Однако проблемным вопросом остается поведение НЧ в почве и воде. Так, при изменении состава воды может изменяться и степень фильтрации НЧ через грунт. Немаловажен вопрос, когда и при каких условиях образуются НЧ. Предполагается, что большой вклад вносит промышленность, так как в процессе технологической цепочки получения металлов образуется пыль, содержащая взвешенные частицы металлов. В результате промышленных процессов образуются отвалы и газообразные вещества. Промышленные предприятия являются источником выбросов, что является основным путем попадания техногенных загрязнителей в природные среды (Васильев и др., 2020; Клименти и др., 2021).

Взвешенная пыль, газообразные вещества существенно снижают качество воздуха на предприятиях и вокруг них (Манжилевская и др., 2020). Пыль, в которой находятся ультра- и мелкодисперсные вещества может существенно влиять на показатели жизнедеятельности человека. При этом наибольший вред наносят самые мелкие пылевые частички. Так, чрезвычайная экологическая ситуация наблюдается в городе Магнитогорске Челябинской области, где функционирует крупное металлургическое предприятие – «Магнитогорский металлургический завод». В районе действия этого предприятия в воздухе была выявлена высокая приземная концентрация Fe, Si, Cd, Ni, Be, Pb, Cr (Боев и др., 2017; Бронский и др., 2020). Так, никель вызывает астму и раковые заболевания, влияет на репродуктивную систему (Соркина и др., 2020).

Сегодня наночастицы и вещества на их основе производятся в больших масштабах. Например, велик уровень производства титановых наночастиц и их соединений, кремниевых и серебряных наночастиц, углеродных наноматериалов. Всё это увеличивает риск возможного воздействия на человека наноматериалов как в результате контактирования с ними или веществами, где они входят в состав, а также нахождения НЧ в окружающей среде. В тоже время, складывается ситуация, когда наноматериалы, имеющие крайне узкую область применения, являются потенциальными источниками опасности лишь для исследователей, их изучающих (МР 1.2.2522-09 «Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека»).

Сегодня уже не оспаривается возможность того, что человек находится под воздействием наночастиц, как природного, так и искусственного происхождения. В этой связи необходимо четко представлять и понимать, по каким путям происходит миграция наночастиц в окружающей среде, а также происходит их поступление в организм человека. Это происходит опосредованно, через пищу (через продукцию, полученную сельским хозяйством, при выращивании которой использовали наночастицы или они находились в почве (Чурилов и др., 2020; Dang et al., 2021.)). Так как НЧ в организм человека поступают не напрямую, а через пищевые цепочки, данный путь миграции наноматериалов не вызывает такого опасения, как прямое воздействие НЧ на человека (Khoshnamvand et al., 2020). В этой связи говорят об «антропном» принципе, который выражает «удаленность» того или иного компонента биоты от человека, то есть в последовательности:

- 1) сельскохозяйственные животные и культурные растения;
- 2) массовые компоненты биоты - животные, растения и микроорганизмы;
- 3) малочисленные компоненты биоценозов, безразличные с точки зрения хозяйственной деятельности;
- 4) «вредные» виды (сорняки и животные - вредители сельскохозяйственных культур) (МР 1.2.2522-09 «Методические рекомендации по выявлению

наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека»).

Для создания целостной и научной системы в оценке воздействия наночастиц и технологий на их основе, в соответствии с государственным контрактом проведение тестирования неизвестных веществ регламентировано целым рядом нормативно-техническими актами. Среди них: Федеральный закон РФ от 30 марта 1999 года №52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»; Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 23 июля 2007 года №354 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащих наноматериалы»; МР 1.2.2522-09 «Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека»; и др. Ряд контролируемых объектов включает:

- 1) атмосферный воздух;
- 2) водные объекты;
- 3) почвы;
- 4) гидробионты;
- 5) водоросли, грибы;
- 6) ткани наземных растений;
- 7) ткани наземных животных.

Несмотря на большое количество нормативных актов, единого стандарта по оценке экологической безопасности наноматериалов нет, что привело к решению данной проблемы лишь на региональном уровне. Так, в Центре биотестирования безопасности нанотехнологий и наноматериалов «Биотест-Нано» на базе Томского государственного университета была выполнена модификация методик для оценки токсичности наноматериалов: ФР.1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний, ООО «Акварос»; ФР.1.39.2007.03221. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости

периодафний, ООО «Акварос»; ФР.1.39.2007.03223. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей, ООО «Акварос»; ФР.1.39.2006.02506; ПНД Ф Т 14.1:2:3.13-06 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.10-06) Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *PARAMECIUM CAUDATUM* Ehrenberg. ЛЭТАП, МГУ; ФР 1.39.2006.0250; ПНД Ф Т 14.1:2.14-06 (ПНД Ф Т 16.1:3.11-06) и др.

Сегодня, к сожалению, не существует экспресс-методов для точной идентификации наноматериалов в природных средах. В тоже время есть ряд методов, которые позволяют оценить присутствие наночастиц в окружающей среде количественно, однако большинство из них трудозатратны и требуют сложного аналитического оборудования и дорогостоящего обучения сотрудников. Так как не созданы документы, которые бы регламентировали содержание наночастиц в воде, воздухе и почве, существует назревшая необходимость в получении информации об их безопасном уровне в окружающей среде (Bundschuh et al., 2018). Имеются попытки создания приближенных моделей и экстраполяции данных согласно имеющимся данным о выбросах промышленных предприятий, однако эти данные должны быть пересчитаны с учетом их реального нахождения в окружающей нас среде (Mueller, Nowack, 2008). В тоже время, экстраполяция данных также сопряжено с определёнными трудностями, что связано с недостатком базового понимания нахождения наночастиц в природе. Необходимо выделение биомаркеров, что позволило бы применить их для мониторинга путей миграции и нахождения наночастиц в окружающей среде. Несмотря на наличие тестов на биотоксичность, требуется понимание того, какое количество наночастиц может быть находиться в атмосфере, воздухе, почве и воде (Handy et al., 2008).

Следует указать на проблему тестирования загрязнения окружающей среды наночастицами, связанную с отсутствием нормативов и ПДК, так как имеются

лишь ПДК для ионных форм металлов. Остается соблюдать ранее действующего Постановления «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» (от 31 октября 2007 г. № 79), согласно которому токсичность НЧ не может быть выведена по сравнению с аналогами в макродисперсной форме или в виде сплошных фаз. Имеющиеся токсикологические методологии для металлов в макроформе основаны на определении токсичности вещества относительно массовой концентрации, что не приемлемо для наноматериалов, для которых одним из основных определяющих свойств будет величина площади поверхности или число НЧ.

Другой немаловажной проблемой в тестировании наноматериалов является то, что существующие способы в основном применимы для определения НЧ металлов в чистом виде и не позволяют их распознавать в сложных смесях и в окружающей среде. В настоящее время стандартных методов для быстрого обнаружения и мониторинга наночастиц в окружающей среде не существует (Maurer-Jones et al., 2013). Имеющиеся доступные технологии еще не позволяют нам правильно количественно определять уровни наночастиц в окружающей среде и по-прежнему существуют значительные пробелы в этой области (Nowack, 2009).

Тяжело обнаружить небольшие изменения в концентрации таких редких элементов, как Ag, Au, Se и т. д. даже посредством химических анализов (например, масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой) в образцах, где их фоновые уровни очень низкие, и такие методы не дифференцируют содержание наночастиц от растворенных ионов (независимо от того, происходят ли они из НЧ или других источников). Для квантовых точек или ароматических структур, таких как фуллерены и УНТ, которые имеют собственный флуоресцентный сигнал, обнаружение основано на аутофлуоресценции (Cherukuri et al., 2006; Park et al., 2019). В тоже время, присутствие большого количества других соединений, которые также имеют флуоресценцию, во время обнаружения может препятствовать использованию таких методов в сложных матрицах.

Фуллерены могут быть извлечены из экологических матриц с использованием органических растворителей и количественно определены с помощью хроматографии и спектроскопии ультрафиолетового излучения или высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Известно, что изотопная маркировка НЧ в лабораторных экспериментах - мощный инструмент для отслеживания и их количественного определения. Метод можно использовать для описания поведения определенных НЧ в естественных водах, осадках и почвах, а также поглощения организмами. На примере фуллеренов показано использование радиоактивных изотопов (Fortner et al., 2007; Wang et al., 2015), а затем последующий анализ с применением газовой хроматографии-масс-спектрометрии и подсчете сцинтилляции. Для минеральных НЧ можно использовать стабильные изотопы таких элементов, как Ag, Fe, Si, Ti, W, или нейтронную активацию другого диапазона НЧ, что может использоваться в исследованиях поведения НЧ в сложных системах – почвах или отложениях (Oughton, 2011). НЧ с магнитными свойствами (содержащими, например, Fe, Ni, Co, Mn) могут быть экстрагированы, обнаружены или даже количественно определены с использованием сильного магнитометра. Определенные методы количественной оценки природных коллоидов также могут быть применены к НЧ, если они связаны с соответствующими детекторами, что было описано ранее (Nowack, Bucheli, 2007).

Имеющиеся доступные технологии еще не позволяют нам правильно количественно определять уровни наночастиц в окружающей среде (Nowack, 2009) и по-прежнему существуют значительные пробелы в этой области. Имеются единичные работы, посвященные моделированию последствий изменения концентрации наноматериалов в окружающей среде (Gottschalk et al., 2013). В 2009 году Gottschalk с соавторами смоделировали ожидаемые уровни наночастиц в Европе в воздухе ниже $0,0005 \text{ мкг/м}^3$. Напротив, другие авторы смоделировали более высокие значения в поверхностных водах ($0,010 \text{ мкг/л}$), заметное накопление в отложениях ($2,90 \text{ мкг/кг}$) и в осадках от городских очистных сооружений ($17,1 \text{ мкг/кг}$). Из-за потенциальных рисков и наличия значительных

пробелов в знаниях оценка эффектов, вызванных выбросами наночастиц в окружающую среду, представляет собой новый вызов для текущих экотоксикологических исследований (da Rocha et al., 2020; Du et al., 2020). Однако данных по уровням и воздействиям наночастиц в природных средах по-прежнему не хватает, и оценку рисков для целей охраны окружающей среды и здоровья человека трудно выполнить.

Nowack и Vucheli (2007) в ходе изучения данного вопроса считают, что тесты на биотоксичность с использованием наночастиц показывают их негативное влияние при определенных характеристиках природных сред. Но в таких исследованиях применялись увеличенные дозы наноматериалов. Исследователи полагают, что в последующих экспериментах необходимо применение не просто наночастиц, а их функционализированных аналогов, так как попадая в окружающую среду, наночастицы могут быть модифицированы, что меняет их поведение. Воздействие ультрафиолетового излучения, химических веществ и биологических объектов ведет к изменению первоначальных свойств наночастиц, их поверхность может быть изменена. Всё это является важными процессами, которые требуют более тщательного изучения (Azevedo C. et al., 2020; Kumar H. et al., 2020). Кроме того, большинство наночастиц выпускаются встроенными в матрицу, а не как одиночные наночастицы (Ramos-Guivar J. A., et al., 2020). Важно изучать наночастицы в том виде, в котором организмы в экосистеме могут быть подвергнуты их воздействию. Высокая сорбционная способность наночастиц, которая используется для удаления органических и неорганических загрязнителей из подземных вод, может также захватывать и переносить другие загрязняющие вещества в окружающую среду (Nowack, 2008).

Обратим внимание, что почвенный покров уже сегодня является основным местом для миграции наночастиц, которые попали в воздух, воду или почву, поэтому существует потребность в понимании путей воздействия наноматериалов на почвенные микро- и микроорганизмы, а также процессы, протекающие в почве. Определение биотоксичности наноматериалов на сегодня широко развито и имеет значимость для экологической науки: в исследованиях участвуют

прокариотические организмы, растительные объекты, простейшие и т.д. Наночастицы, поступающие в почву, неизменно воздействуют на живые организмы в ней, и могут вызывать различные последствия (Rajput V. et al., 2020; Ameen F. et al., 2021). Поэтому сегодня мировое сообщество исследователей широко изучают перспективы подобного взаимодействия, чтобы лучше понимать, как наночастицы влияют на живые объекты и среды их обитания. Особое внимание также приковано к данным исследованиям, так как для сельского хозяйства большое значение имеет качество почвенного покрова. Кроме того, подобные проекты позволят ранжировать наночастицы по их степени опасности и концентрациям в природе.

В этом аспекте учеными всего мира активно изучаются различные аспекты поведения наночастиц в различных субстратах, в т.ч. почве, как потенциальном поглотителе различных наноматериалов (Yusefi-Tanha E. et al., 2020; Asadishad B. et al., 2018). Экспериментально показано, что почва представляется надежным фильтром в процессе миграции НЧ, особенно если в ней имеется большое количество глины (Терехова, Гладкова, 2014; Schlich and Hund-Rinke, 2015). Отмечается, что на фоне НЧ наблюдается ослабление экологических функций почв (например, газообмена с атмосферой), что выражается в снижении их способности к самоочищению (Oyelami, Semple, 2015). Также имеется несколько сообщений о наиболее популярных и изученных наночастицах серебра (НЧ Ag), обладающих антимикробным свойством, которые ясно показали важность природы субстрата (почва, вода, сточные воды), pH, содержания органического вещества и способности к обмену катионами в проявлении токсичности и биодоступности металла (Pietrzak, Gutarowska, 2015; Topuz E., van Gestel C., 2017).

Было отмечено, что более низкий диапазон pH почвы (Read et al., 2016; Shah et al., 2016), повышенное содержание органического вещества (Simonin et al., 2015; Read et al., 2016) и катионообменной способности препятствует сорбции Ag в почве, что приводит к повышенному риску мобильности, токсичности и биодоступности НЧ (Shah et al., 2015; Tong et al., 2012). Напротив, более высокий

диапазон pH почвы, низкое содержание органического вещества и катионообменной способности облегчает сорбцию серебра в почве, которая предотвращает подвижность, биодоступность и дополнительную токсичность НЧ Ag (Mishra and Singh, 2015; Schlich and Hund-Rinke, 2015). Похожие исследования проведены Wang P. с соавторами (2013), на примере НЧ ZnO. Авторы предположили, что существенное снижение токсичности НЧ ZnO в почвенном субстрате в основном объясняется рядом его характеристик (pH и катионообменная способность). Сообщалось также, что в суглинистой песчаной почве с pH 5 НЧ ZnO в концентрации 2000 мг/кг не проявляет фитотоксичности в отношении *Cucumis sativus* (Kim et al., 2011), тогда как металл в концентрации 45,45 мг/кг в суглинистой почве с pH 7,36 проявил заметную токсичность на *Triticum aestivum* (Du et al., 2011). Кроме того, Zhao с соавторами (2013) выявили положительный эффект альгината в концентрации 400-800 мг/кг в снижении токсичности НЧ ZnO к *Zea mays*. Отмечено максимальное проявление фунгицидной активности, характерное для НЧ, находящихся в почвенных образцах (Pietrzak, Gutarowska, 2015). Многими авторами также отмечается высокая токсичность почв в условиях долгосрочного эксперимента, что, безусловно, свидетельствует о потенциальной опасности НЧ (Tong et al., 2012). Как видно из этих данных, почвенная среда определяет экологические риски наночастиц, поэтому крайне важны исследования экотоксичности наночастиц в почве в целях оценки долгосрочных эффектов металлов.

Как отмечалось выше, наночастицы, вводимые в окружающую среду, в конечном счете, накапливаются в почве, и их судьба, транспорт и поведение в значительной степени зависят от характеристик почвы. В дополнение к этому, большинство из существующих литературных источников показывают, что научное сообщество также сосредоточилось на определении прямого воздействия наночастиц на структуру микробного сообщества почв (Hänsch and Emmerling, 2010; Simonin and Richaume, 2015). В этом отношении Ge et al. (2012) показали потенциальное влияние НЧ TiO₂ и НЧ ZnO на почвенный микробиоценоз в зависимости от дозы металлов. Исследователи наблюдали уменьшение

бактериального разнообразия, а именно таксонов *Rhizobiales*, *Bradyrhizobiaceae* и *Bradyrhizobium* (связанных с фиксацией азота) в ответ на обработку почвы наночастицами. Основываясь на результатах таких исследований, предполагается, что денитрифицирующие микроорганизмы являются очень восприимчивыми к присутствию наночастиц (VandeVoort и Arai, 2012). Несмотря на это, существует недостаток литературы, открывающей очевидную связь между почвенными факторами и токсическим поведением наночастиц по отношению к почвенной биоте (Chunjaturas et al., 2014; Shah et al., 2014).

Фитотоксичность наночастиц является еще одной распространенной темой обсуждения, поскольку растения обладают многочисленными возможностями взаимодействия с наночастицами из-за большой площади поверхности листьев и корневой системы. Кроме того, риск токсичности наночастиц выше у растений из-за небольшого размера НЧ, которые могут легко транслоцироваться внутри тканей. Считается, что наночастицы проникают в растения посредством поверхностной адсорбции или через их клеточную мембрану (Dietz and Herth, 2011). Данные литературы указывают на всевозможные последствия (положительные, отрицательные и нейтральные эффекты) наночастиц на растения. Важно учитывать, что фитотоксичность наночастиц в первую очередь зависит от их размера и концентрации. Ma et al. (2010) установили, что наночастицы размером менее 5 нм могут легко проникать через поры клеточной стенки, в то время как наночастицы размером до 20 нм перемещаются через плазмодесму. Кроме того, наночастицы небольшого размера могут быть фитотоксичны даже при более низкой концентрации за счет быстрого поглощения растениями и их дальнейшей транслокации внутри системы (Rico et al., 2015).

Многие растения являются устойчивыми к воздействию НЧ, например к кремниевым НЧ (Kalteh др. 2014), НЧ оксида титана (Rico et al., 2015), НЧ оксида церия (Giraldo et al., 2014), НЧ оксида железа (Ghafariyan др. 2013) и т.д.

Raliya и Tarafdar (2013) выявили, что НЧ оксида цинка (II) положительно влияют на рост растений, увеличивают содержание зеленых пигментов, повышают активность ферментов и повышают привлекательность корневой

системы для симбиотических азотфиксаторов. Исследователь Helaly с соавторами (2014) выяснил, что тот же изучаемый вид наночастиц положительно действует на рост и развитие проростков, повышает активность ферментов защиты от свободных радикалов. Sooyeon с коллегами при исследовании токсичности НЧ оксида цинка (II) показал, что цинк в ионной форме обладает большей токсичностью, чем наноформа того же элемента. В свою очередь, исследования Лебедева С.В. с соавторами показали, что для пшеницы мягкой более токсичны минеральные формы железа (в частности, сульфата железа II), чем наноформы того же элемента и его оксидов (Lebedev et al., 2014).

В тоже время, живые объекты под влиянием различных условий могут испытывать на себе токсическое действие наночастиц. Например, воздействие на *Cucurbita pepo* серебряными НЧ привело к тому, что растение снизило активность ферментативных процессов и замедлило рост. При этом минеральные формы серебра таким выраженным эффектом не обладали (Musante, White, 2011). В эксперименте с медными наночастицами было показано, что они вызывают целый каскад негативных последствий при их воздействии на растение: снижаются темпы роста, увеличивается продукция свободных радикалов, нарушается водный обмен и транспирация. При этом медные наночастицы способствовали дисфункции хлоропластов, что было связано с их структурными перестройками и нарушением процессов, в них протекающих (Sandalio et al., 2001).

Негативные последствия влияния НЧ металлов на живые объекты принято объяснять высоким окислительно-восстановительным потенциалом данных веществ и их способностью взаимодействовать с биологическими структурами (Huang et al., 2010). Для многих НЧ показано, что они могут вызывать избыточную продукцию активных форм кислорода: для железа, золота и серебра, в том числе и для металлических оксидов (цинка, никеля, меди, железа, титана, кремния) (Mocan et al., 2010; He et al., 2011; Toduka et al., 2012; Trujillo-Reyes et al., 2014; Korotkova et al., 2015). Имеются данные, что НЧ металлов способствуют нарушению функционирования антиоксидантной системы живого организма, что ведет к перекисному окислению липидов (Rogers et al., 2010; Lebedev et al., 2014).

Burello и Worth (2011) по результатам исследования создали модель, показавшую, что НЧ оксидов металлов могут вызывать генерацию свободных радикалов в организме, если край зоны проводимости этих частиц расположен в диапазоне от -4,12 до -4,84 эВ от уровня вакуума. Данный диапазон удовлетворяет критериям стандартных потенциалов основных окислительно-восстановительных реакций, которые могут происходить в клетках. Известно, что некоторые металлические наночастицы являются нестабильными и, попадая в клеточное пространство, претерпевают ряд последовательных структурных изменений, что ведет к высвобождению ионов. Это вызывает процесс запуска окислительно-восстановительных реакций и ведет к повреждению клеток и тканей. При этом к образованию свободных радикалов ведут реакции Фентона и Хабера-Вейса.

Известно, что некоторые оксиды металлических наночастиц (цинка, титана, железа, вольфрама) и других полупроводников, которые принимают участие в фотокатализе, могут способствовать образованию свободных радикальных форм кислорода. Данный процесс начинается при попадании кванта ультрафиолетового излучения, после чего валентные электроны переходят на более высокий энергетический уровень. Возбужденные электроны вступают в реакцию с молекулярным кислородом, поверхностными гидроксигруппами и адсорбированным H_2O , после чего происходит превращение до $OH\cdot$ и $O_2\cdot^-$ (Niazi, Gu, 2009). Годымчук с коллегами показал, что именно данный процесс протекает в случае с НЧ оксида титана, благодаря чему проявляется их токсичное воздействие на нуклеиновые кислоты (Годымчук, 2014). Rico с коллегами выявили противоположный эффект при применении НЧ оксида титана, который выражался в том, что в результате перехода Ti^{4+} в Ti^{3+} уменьшалась генерация АФК и перекисное окисление липидов в зеленых клетках растений (Rico et al., 2015).

Таким образом, понимание механизмов воздействия НЧ на растения на сегодня остается не до конца выясненным. При этом необходимо учитывать характерные особенности того или иного вида НЧ. Это происходит по целому ряду причин. Во многих исследованиях применяются высокие концентрации

наночастиц, которые в окружающей среде не обнаруживаются, что не отражает действительного положения дел. Если используются методы выращивания растения в эксперименте, основанные на гидропонике, то при условии токсичности больших доз НЧ, в естественной природной почве их потребуется ещё больше (El-Temsah, Joner, 2010; Ye Y. et al., 2019). Также, после некоторого периода экспозиции НЧ, растения могут восстанавливать исходные параметры своего функционирования, что говорит о преходящем характере воздействия нанометаллов. В тоже время, значимость небольших доз НЧ возрастает при развитии толерантности растений к неблагоприятным факторам среды. В этом случае избыток металлических НЧ, действуя в качестве кофактора многих ферментов, участвует в образовании промежуточных метаболитов. При этом реакция растений изменяется в зависимости от природы металла, типа растений и стадии роста (Aslani et al., 2014).

Таким образом, адаптивные реакции флоры на экспозицию наночастиц может определяться характером протекания окислительно-восстановительных процессов, уровнем окислительного стресса, активности защитных систем самого растения, которое подвергается воздействию того или иного токсиканта (Rizwan M. et al., 2019). Среди НЧ металлов существует много форм, которые вызывают образование свободно-радикальных форм кислорода, что ведет к изменению окислительно-восстановительного потенциала клетки. На генерацию АФК влияет как дозировка добавляемых нанометаллов, так и количество ионов, которое может быть высвобождено при этом (Kumar V. et al., 2018). Однако, точный механизм влияния НЧ на генерацию свободных радикалов и воздействия на антиоксидантную систему организма остаются невыясненными. Имеющиеся исследования зачастую противоречат друг другу, в тоже время существуют исследования, свидетельствующие о том, что сами НЧ могут быть превосходными антиоксидантами, что делает это направление исследований чрезвычайно перспективным. Как антиоксиданты, активно изучают НЧ серебра, оксида титана, оксида железа, оксида меди и др. (Radhakrishnan V. S. et al., 2018; Baranowska-Wójcik E. et al., 2020). При этом параметры изучения их воздействия на растения

зачастую сводятся к изучению морфометрических изменений и очень мало исследований, посвященных изучению клеточных, субклеточных и молекулярных механизмах такого воздействия (Rizwan M. et al., 2019).

В связи с изучением влияния НЧ на растения остро встает вопрос о исследовании реакции почвенных организмов и изменении свойств почвы под воздействием вносимых наночастиц. Для этого проводится экотоксикологическая оценка (Scott-Fordsmand et al., 2008; Lapied et al., 2010). Перспективным направлением при этом является использование красных калифорнийских червей *Eisenia fetida*, которые имеют кожный путь поступления веществ извне, чему способствует наличие высокой проницаемости тела (Jager et al., 2003; Vijver et al., 2003). Калифорнийские черви в почве пропускают через себя большой объем почвенного слоя и таким образом, постоянно подвергают себя влиянию различных веществ, которые находятся на почвенных агрегатах (Morgan, Morgan, 1999). Таким образом, черви являются наиболее подходящим объектом исследования в области экотоксикологии, чем другие организмы, обитающие в почве. Таким образом, изучение влияния НЧ на *E. fetida* представляется важным звеном в понимании безопасной концентрации поллютантов (Žaltauskaitė, 2010). Поэтому биодоступность и потенциальная экотоксичность наноматериалов по отношению к модели дождевого червя *Eisenia fetida* оценивается в контексте охраны окружающей среды, включая оценку некоторых модифицирующих воздействий окружающей их матрицы (основных катионов и анионов). В работе (Lebedev, Gavrish, 2017) установлено, что с увеличением концентрации наночастиц оксида молибдена от 10 до 500 мг/кг в субстрате с микрокристаллической целлюлозой накапливалось до 7 мг/кг молибдена, тогда как в субстрате с искусственной почвой – до 15 мг/кг. В свою очередь, концентрации 10 и 40 мг/кг НЧ MoO_3 на почвенном субстрате приводили к незначительному увеличению антиоксидантных ферментов (глутатионредуктазы и каталазы) и увеличению показателя при воздействии нанометалла в дозе 500 мг/кг (Lebedev et al., 2016). Отмечено, что наночастицы Zn в высоких концентрациях (от 500 до 1000 мг/кг) вызывают иммобилизацию 60% дождевых

червей в течение 24 ч, что было доказано поведенческими реакциями, характеристиками роста и показателями ферментативной активности в организме червей (Lebedev et al., 2015).

Таким образом, отсутствие инструментов для выявления и количественного определения НЧ в природных водах, почвах, отходах, осадков сточных вод, и т.д., является основным ограничением для описания степени воздействия и рисков, связанные с распространением НЧ в окружающей среде. Исследовательские работы в этой области являются приоритетными и крайне актуальными. Указанные пробелы в области исследования наноматериалов указывают на необходимость детального изучения трансформации наночастиц и их миграции по трофическим цепям в зависимости от вариабельности почвенных условий (рН, гранулометрического состава, состава органического вещества, влажности, биологической активности и др.). Необходимы дальнейшие исследования для разработки и понимания механизмов, влияющих на судьбу и транспортировку наночастиц в почве и отложениях; их взаимодействия друг с другом, с другими изготовленными наночастицами, взвешенными твердыми веществами и растворенным органическим материалом; и как на эти взаимодействия влияют различные переменные среды. Потенциал производства наночастиц в качестве носителей для других загрязнителей окружающей среды также требует дальнейшего изучения и внедрения подходов, соответствующих принципам безопасности НЧ для окружающей среды.

1.3 Адаптивные реакции живых организмов на внесение наночастиц в почву

1.3.1 Адаптивные реакции живых организмов на внесение в почву наночастиц меди

Медь (Cu) – важнейший элемент метаболических процессов, необходим для поддержания клеточных функций, входит в состав ряда медьсодержащих ферментов; этот металл попадает в водную среду из многих источников, включая

сточные воды промышленной и сельскохозяйственной деятельности. Сообщается, что при более высоких концентрациях этот элемент токсичен (Toth L. et al., 1996) из-за изменений внутриклеточного белкового механизма либо непосредственно за счет денатурации ферментов, либо косвенно за счет образования активных форм кислорода (Droge, 2002).

Медь была и до сих пор широко используется в разнообразных продуктах современного общества. Более того, наночастицы меди стали использоваться благодаря их специфическим свойствам, например, высокой электрической и термической проводимости (Lee et al., 2008). Эванс и соавт. (2008) (Evans et al., 2008), подчеркнули тот факт, что консерванты для древесины, содержащие НЧ Cu, конкурировали с консервантами на основе солей Cu, заняв уже 50% рынка. Годовой объем потребления меди в Северной Америке оценивается в 79 000 тонн (оценивается в 4,9 млрд. долл. США), что составляет 50% мирового рынка.

За последние несколько лет значительно увеличилось количество заявок на получение разрешений на применение нанопестицидов на основе меди, что подчеркивает необходимость получения информации о вероятных путях воздействия, дозах и неблагоприятных воздействиях на нецелевые организмы. Виды меди (0, I, II) используется для разработки наноматериалов с совершенно разными свойствами. Элементарная медь с высокой проводимостью (Cu (0) или nCu) может способствовать переносу электронов (Azizi et al., 2016; Hussain N. et al., 2015). Нестабильный Cu (I), обычно используемый в качестве НЧ Cu₂O, может циклически изменяться между Cu⁺ и Cu²⁺ и эффективно катализировать большое количество реакций (Jiang Y. et al., 2013). Нестабильный Cu (I) был изучен на предмет антимикробной активности (Khatami M. et al., 2017) и противоопрашающей активности.

В целом, токсичность соединений меди использовалась для защиты сельскохозяйственных культур от многих вредных организмов, включая тех, которые вызывают грибковые инфекции (Montes et al., 2016; Bramhanwade et al., 2016). Медные пестициды в настоящее время применяются к некоторым

«органическим» культурам (Winter, Davis, 2006). Их использование в качестве антимикробного агента также рассматривалась (Mjos et al., 2016).

Следовательно, прямое воздействие на почву весьма вероятно. Соответственно, существует насущная потребность в систематической оценке НЧ, связанной с их экологической судьбой, биодоступностью, высвобождением. Как и во всех организмах, Cu является как нейтральным, так и токсичным для олигохет, в зависимости от концентрации. Например, известно, что Cu вызывает окислительное повреждение в организмах посредством реакции Хабере-Вейса, катализируя образование мощного окислительного гидроксильного радикала (ОН) (Bremner, 1998). Для энхитреиды *Enchytraeus albidus* (*Oligochaete*) воздействие CuCl_2 -соли показало снижение выживаемости и параметров размножения при повышении концентрации исследуемого вещества (Amorim et al., 2008). В то время как было опубликовано несколько исследований о действии солей Cu, мало известно о потенциальных эффектах воздействия НЧ на энхитраид и других наземных видов. Для энхитреид (*Enchytraeus albidus*) Gomes с соавторами сообщили об окислительном стрессе и повреждениях, что подтверждается уровнями перекисного окисления липидов у *E. albidus* после воздействия НЧ Cu. Исследования на том же виде организма (Gomes et al., 2012) на уровне генов показали различия в способе действия между Cu-НЧ и Cu-солью. С другой стороны, Amorim с соавторами (Amorim et al., 2012) не наблюдали различий во внутреннем распределении энергии между организмами, подвергшимися воздействию соли Cu и НЧ. В отношении дождевых червей в двух исследованиях сообщалось о популяционных эффектах (Heckmann et al., 2011) после воздействия НЧ Cu. Опыты на дождевом черве *Eisenia fetida* (Unrine et al., 2010) не обнаружили никакого различия в уровне смертности или размножения при воздействии НЧ Cu или Cu-соли до 65 мг Cu/кг почвы; ученые проверили два размера частиц со средним диаметром 37 и 102 нм. Также при тестировании *E. fetida*, Heckmann с соавторами (2011) показал, что воздействие соли Cu снижает выживаемость и репродуктивный выход больше, чем воздействие тех же концентраций НЧ Cu. Другой тип реакции на воздействие

токсиканта/раздражителя – избегание. Реакции избегания соли Cu также наблюдались для *E. albidus* (Amorim et al., 2008), но пока не изучены для НЧ Cu. То, что наночастицы могут вызывать реакции избегания, было показано Coleman с соавторами (Coleman et al., 2010), который наблюдал реакции избегания *E. fetida* после воздействия наночастиц Al_2O_3 .

1.3.2 Адаптивные реакции живых организмов на внесение в почву наночастиц цинка

В исследовании García-Gómez с соавторами (2020) было показано, что дождевые черви эффективно регулировали содержание Zn в тканях независимо от концентрации Zn в почве и размера ZnO до 500 или 1000 мг/кг в известняковой и кислой почве, соответственно. Хотя способность регулирования позволяет поддерживать уровни Zn в тканях на «нормальных» уровнях, некоторые дождевые черви, обитавшие в кислой почве, демонстрировали негативные последствия, связанные с репродуктивными параметрами. Следовательно, содержание Zn у дождевых червей не является хорошим предиктором потенциальных долгосрочных эффектов. Среди биомаркеров в исследовании, ни те, которые измерены в тканях, ни те, которые оценивали цитотоксичность, не были подходящими для предложения механизма или связанными с токсическим действием. В конечных точках не было обнаружено различий, характерных для разноразмерных НЧ, но некоторые эффекты наночастиц наблюдались на биомаркерах. Результаты некоторых протестированных биомаркеров позволяют предположить интернализацию НЧ ZnO внутри клеток в кислой среде, но необходимы дальнейшие исследования для оценки специфического внутреннего распределения НЧ ZnO и массы ZnO в клетках.

НЧ оксида цинка являются одними из наиболее часто используемых наноматериалов (Waalewijn-Kool et al. 2013). Нано-ZnO применяется во многих продуктах, таких как пластик, резина, пигменты, цемент, смазочные материалы, керамика и стекло. ZnO в качестве поглотителя ультрафиолетового света

применяется в солнцезащитных кремах; в форме наночастиц он гораздо более эффективен по сравнению с солями Zn (Smijns and Pavel 2011). Согласно обзору Kahru и Dubourguier (2010), ZnO является одним из самых вредных наноматериалов, помимо наносеребра; он классифицирован как «чрезвычайно токсичный». Токсичность нано-ZnO изучали на нескольких живых организмах (характерный пример представлен в скобках для каждой группы): бактерии (*Staphylococcus aureus*; Kadiyala U. et al., 2018), водоросли (*Chlorella vulgaris*; Suman et al. 2015), высшие растения (кукуруза, *Zea mays*; Zhao et al. 2015), водные беспозвоночные (*Daphnia magna*; Xiao et al. 2015; карп, *Cyprinus carpio*; Zhao J. et al., 2011), наземные беспозвоночные (*Caenorhabditis elegans*; Khare et al. 2011).

Кроме того, исследователи обобщали накопленные знания о механизме токсичности нано-ZnO. Токсическое действие НЧ ZnO может быть исследовано также на уровне клеток с использованием животных (Jain A. K. et al., 2019) или человеческих клеток (Gilbert et al. 2012). Как упоминалось ранее, растворимость также влияет на токсичность НЧ. Хотя это создает сходные результаты, стоит дифференцировать этот эффект от случаев, когда токсичность напрямую связана с природой наночастиц. Например, если в случае данного наноматериала только свободные ионы, генерируемые раствором, вызывают токсичность, негативный эффект может быть уменьшен при использовании покрывающего агента, который снижает растворимость, в то время как полезные свойства НЧ могут сохраняться. Brunner с соавторами исследовали токсичность нескольких оксидных НЧ и обнаружили, что растворимость сильно влияет на цитотоксический ответ, тем не менее, специфический цитотоксический механизм был обнаружен для НЧ в виде оксидов железа без покрытия. Поскольку ZnO имеет относительно высокую растворимость, предположение о том, что токсические эффекты по меньшей мере частично вызваны ионным цинком, является очевидным. Franklin с соавторами (2007) обнаружили, что растворимость частиц определяет токсичность нано-ZnO для микроводоросли *Pseudokirchneriella subcapitata*. Токсичность НЧ ZnO не всегда можно объяснить исключительно растворением частиц (Manzo et al. 2011). Вероятно, специфическая токсичность для наночастиц обусловлена АФК-

опосредованным клеточным повреждением (Feris K et al., 2010). НЧ ZnO обладает фотокаталитической активностью, которая может вызывать дополнительную токсичность вследствие фотокаталитической генерации АФК. Ма и соавторы (2011) показали, что НЧ ZnO гораздо более токсичны при естественном солнечном свете, чем в случае лабораторного освещения или темных условий.

С экологической точки зрения, понимание токсичности НЧ ZnO для экологически важных видов бактерий имеет большое значение. Бактерии являются основными организмами, разлагающими органическое вещество и являются первым звеном для многих водных и наземных пищевых сетей, поэтому неблагоприятное воздействие на бактерии может оказывать влияние на более высокие трофические уровни. Кроме того, бактерии могут действовать как векторы для адсорбированных или ассимилированных НЧ, инициируя их движение (биоаккумуляция или биомагнификация) через пищевые цепи. Большинство исследований токсичности для экологически значимых видов бактерий были проведены на *E.coli*, за которой следует *Bacillus subtilis* (Sapkota A. et al., 2011), *Pseudomonas putida* (Li et al., 2011) и *Shewanella oneidensis* (Wu et al., 2010.). Ингибирование роста и жизнеспособность клеток обычно используются в качестве конечных точек.

В зависимости от вида испытуемого, физико-химической характеристики исследуемого материала, а также метода испытания, в этих исследованиях были представлены данные о сильно изменяющейся токсичности с IC50 (ингибирование роста) в диапазоне от менее 1 мг/л до нескольких сотен мг/л или выше. Эта высокая вариация существует даже в пределах одного и того же вида кишечной палочки. Например, наночастицы ZnO (20 нм), суспендированные в сверхчистой воде, были высокотоксичны для *E. coli* O111, с показателем LC50 в течение 3 часов менее 0,1 мг Zn/л (Li M. et al., 2011), тогда как НЧ ZnO с аналогичной частицей размер (10-30 нм) в среде для роста бактерий имели минимальную концентрацию ингибирования, равную 500 мг/л для *E.coli* дикого типа (Premanathan M. et al., 2011). На основании этих опубликованных данных по *E.coli* четкой взаимосвязи между размером частиц и токсичностью не выявлено.

Однако в нескольких исследованиях изучалось влияние размера частиц на антибактериальную активность ZnO и сообщалось о различных результатах. Сравнение антибактериальной активности ZnO трех разных размеров (67, 820, 44000 нм) показало, что декларируемый размер частиц не влияет на токсичность. Агрегация частиц в воде привела к тому, что их истинный размер в суспензии значительно отличался от размера сухих порошков, и полученные в результате взвешенные частицы имели одинаковый размер и проявляли аналогичную антибактериальную активность (Adams et al., 2006).

Другое исследование, однако, сообщило, что воздействие на бактерии более мелких частиц ZnO (7 нм) привело к усилению клеточной интернализации и бактериального повреждения клеток, по сравнению с более крупными частицами (260 и 800 нм) (Applerot G. et al., 2009). Единственное исследование, в котором изучалось влияние размера агломерата на антибактериальную активность НЧ ZnO, показало, что агломераты (230 нм) обладали лучшей бактериостатической активностью, чем крупные агломераты (2417 нм) (Zhang L. et al., 2007), вероятно, из-за большей площади поверхности, доступной для взаимодействия с бактериями в более мелких агломератах. Метод воздействия также оказывает существенное влияние на результат токсичности. Токсичность НЧ ZnO (20 нм) для *S. oneidensis* и *E. coli* в режиме аэрозольного воздействия была выше, чем в водном режиме, поскольку НЧ не эффективно взаимодействовали с бактериями в водной среде из-за агрегации частиц (Wu et al., 2010).

Lin и Xing (Lin, Xing, 2007) сообщили, что НЧ ZnO при концентрации 2000 мг/л ингибировали прорастание семян райграса и прекращали удлинение корня всех испытанных видов, а токсичность возникала как в результате растворения частиц в отношении ионов цинка, так и в зависимости от частиц. Напротив, Stampoulis с соавтором (Stampoulis et al., 2009) обнаружили, что НЧ ZnO или соль ZnO при концентрации НЧ 1000 мг/л в гидропонном растворе не оказывали влияния на прорастание семян, удлинение корней и биомассу цуккини. Было также обнаружено, что НЧ ZnO влияют на удлинение корней кресс-салата в саду и вызывают генотоксичность для бобов (Manzo et al., 2011). Сообщалось также о

снижении биомассы пшеницы в полевых условиях при обработке НЧ ZnO, а растворение НЧ с выходом ионов Zn усилило поглощение токсичного Zn пшеницей (Du W. et al., 2011). Единственное исследование, которое изучало поглощение и потенциальные механизмы фитотоксичности НЧ ZnO, изучало интернализацию клеток и восходящую транслокацию НЧ ZnO в корнях *Lolium perenne* (райграс) с помощью электронной микроскопии (Lin, Xing, 2008). Не было обнаружено значительного перемещения НЧ вверх от корня к побегу, и фитотоксичность была вызвана не растворением частиц в основном питательном растворе или ризосфере, а скорее адгезией частиц к поверхности корня.

Точно так же Du с соавторами (Du W. et al., 2011) сравнили влияние наночастиц TiO₂ и ZnO на пшеницу, и в побегах были обнаружены наночастицы TiO₂, тогда как НЧ ZnO не обнаружены. Они пришли к выводу, что это явление может быть связано с более высокой растворимостью наночастиц ZnO, чем наночастиц CuO и наночастиц TiO₂. Поэтому мы предполагаем, что поглощение Zn в тканях пшеницы при обработке НЧ ZnO происходит из-за растворения НЧ ZnO. Хотя Lv и соавторы (2015) сообщили, что внутри корней кукурузы присутствовали НЧ ZnO, но НЧ не были обнаружены в побегах, что может быть связано с интернализацией НЧ ZnO в корнях. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять путь поглощения НЧ ZnO у растений.

Zn может накапливаться во всех тканях через почву, как показали результаты исследования. Все органы растения показали повышенное содержание Zn с увеличением концентраций в опыте. Концентрация Zn в зернах увеличилась в 3,3 раза и в 2,4 раза для НЧ ZnO и ZnSO₄ при 1000 мг/кг. Напротив, ZnSO₄ был более эффективным в увеличении содержания Zn в листе, чем НЧ ZnO, который увеличился заметно с 41% до 356% и с 24% до 205%, показав среднюю скорость 147% и 95% для НЧ ZnSO₄ и ZnO, соответственно (Du W. et al., 2019).

Du с соавторами (2011) сообщили о сходных результатах, что накопление Zn были значительно увеличены в различных тканях, обработанных НЧ ZnO. В его эксперименте две формы Zn при всех типах обработках увеличивали урожай зерна за исключением концентрации 1000 мг/кг, где урожай зерна был снижен на

20% и 32% для НЧ ZnO и ZnSO₄, соответственно. Надземная биомасса и урожай показали в основном ту же тенденцию с увеличением ниже 200 мг/кг, тогда как ингибирование было выражено при концентрации с 1000 мг/кг, снижая показатель на 12% и 28% соответственно. Эти результаты совпали с данными Priester и соавторов (2012), который обнаружил, что количество стручков сои увеличивалось при обработке НЧ ZnO, в то время как размер и среднее количество семян на стручок сои не менялись между обработками. Du с соавторами (2011) также обнаружили более высокую концентрацию Zn в тканях пшеницы, особенно в стеблях и зернах, в то время как биомасса была снижена при концентрации 500 мг/кг, что, вероятно, было связано с более высоким содержанием Zn в почве в их исследовании.

Большинство исследований токсичности наземных беспозвоночных проводилось на нематоде *Caenorhabditis elegans* (Khare et al., 2011; Ma et al., 2011) и дождевого червя *Eisenia fetida* (Hu et al., 2009; Unrine et al., 2008). В двух исследованиях, проведенных на *C. elegans*, сообщалось о сильно изменчивых данных о токсичности. Ma и соавторы (Ma et al., 2009) сообщили об относительно низкой токсичности суспензии НЧ ZnO (диаметром 1,5 нм, стабилизированной в 1 М ацетате) для взрослых особей *C. elegans* с L(E)C50 для летальности, поведения, репродукции и экспрессии трансгена при нескольких сотнях мг/л. В отличие от работы Wang с соавторами (Wang et al., 2009) Ma и соавторы обнаружили, что непокрытый порошок ZnO (30 нм) обладает высокой токсичностью для личинок *C. elegans* с 24-часовым LC50, равным 2,2 мг/л. Это несоответствие, вероятно, связано с изменением состава материала, жизненного цикла организма и процедуры испытаний. Оба исследования показали, что растворение НЧ ZnO до ионного Zn сыграло свою роль в выявлении токсичности. Khare с соавторами (2011) сообщали, что значения LC50 для НЧ ZnO двух разных размеров (<25 нм против <100 нм) составляют 0,32 и 2,0 мг/л, соответственно.

Было также обнаружено, что НЧ ZnO биодоступны и могут вызывать токсичность для дождевых червей (*E. fetida*). Ху и соавторы (2010) сообщили, что НЧ ZnO были токсичны для *E. fetida* в дозах, превышающих 1,0 г/кг, что

подтверждается реакцией антиоксидантной системы и повреждением ДНК в организмах, подвергшихся воздействию искусственных почв с добавками суспензий НЧ ZnO. Воздействие на дождевых червей НЧ ZnO (60-100 нм) и соли ZnCl₂ привело к сходному пространственному и молекулярному распределению Zn, что предполагает биодоступность НЧ (Unrine et al., 2008). Токсичность НЧ ZnO для дождевых червей также зависит от пути воздействия. Увеличение смертности наблюдалось у животных, подвергшихся воздействию агара со 100% - ной смертностью при внесении 1,0 г НЧ ZnO/кг агара; тогда как на фильтровальной бумаге смертность была самой высокой при самой низкой концентрации воздействия (50 мг НЧ ZnO/л) (Li L. et al., 2011). Распределение цинка в организме животных также различалось между данными двумя путями воздействия.

1.3.3 Адаптивные реакции живых организмов на внесение в почву кремниевых наночастиц

Исследование Giese B. с соавторами (Giese B. et al., 2018) показало, что, по оценкам, ежегодное глобальное производство наночастиц диоксида кремния составляет от 10000 тонн до 100 000 тонн. НЧ SiO₂ используются для фотолюминесценции в электронной и ИТ-промышленности (Lee Y. K. et al., 2017). Хотя судьба и устойчивость наноматериалов в окружающей среде в настоящее время плохо изучены (Williams R. J. et al., 2019), согласно прогнозам, НЧ могут достигать почвенных систем через ряд маршрутов, включая применение органических отходов, таких как ил, в почвах (Dale et al., 2015) и использование растительных продуктов, которые используют активные НЧ (Awet T. T. et al., 2018).

Потенциальное загрязнение почвенных систем антропогенными НЧ вызывает особую обеспокоенность, поскольку было показано, что некоторые вещества в форме наночастиц *in vitro* обладают сильными антимикробными свойствами, включая диоксид кремния (McGee C. F. et al., 2017). Токсические

эффекты, связанные с этими НЧ, включают гибель клеток (Taha et al., 2020), снижение скорости роста (Schacht et al., 2013) и изменения в двигательном поведении (Ortega-Calvo et al., 2011). Также было показано, что НЧ оказывают отрицательное влияние на активность ферментов в почве и/или на общую микробную биомассу (Rahmatpour S. et al., 2017).

Микробные сообщества почвы играют важную роль в разложении органического вещества и биогеохимическом цикле в естественной среде (Rousk et al., 2009). Функциональные процессы, выполняемые микробными сообществами, являются неотъемлемой частью поддержания здоровой почвенной среды, и нарушение этих процессов может привести к нарушению функционирования экосистемы (Rincon-Florez et al., 2013). В частности, известно, что сообщества микроорганизмов в почвах изменяются в ответ на ряд факторов окружающей среды, включая pH (Rousk et al., 2010), температуру (Xiong J. et al., 2014), содержание влаги (Felsmann et al., 2015) и методы ведения сельского хозяйства (Bevivino A. et al., 2014).

Было показано, что загрязнение металлами и оксидами металлов почвенных систем изменяет структуры и функции микробного сообщества (Jiang W. et al., 2019), хотя в настоящее время мало что известно о влиянии форм наночастиц металлов на микробиоту почвы. Производство и включение наночастиц в промышленные продукты представляет собой серьезную экологическую проблему (Shahadat M. et al., 2020).

В исследовании было показано, что НЧ SiO₂ не влиял на дегидрогеназную или уреазную активность почвы. Хотя ни бактериальные, ни грибковые структуры сообщества не были затронуты значительно, небольшие (но незначительные) различия в относительном обилии доминантных бактериальных таксонов и грибных сообществ были обнаружены. Хотя воздействие НЧ SiO₂ на почвенные системы было исследовано, результаты были различными, и лишь немногие исследования рассмотрели влияние этих НЧ на сообщества почвенных бактерий. Было показано, что внесение в почву НЧ SiO₂ уменьшает длину корня *Arabidopsis thaliana* (Lee C. W. et al., 2010), в то время как другие исследования

сообщают, что НЧ SiO₂ оказывают положительное влияние на рост кукурузы (Karunakaran G. et al., 2013). Концентрации 130 и 660 мг/кг НЧ SiO₂ не влияли на сообщества микробных почв в эксперименте с почвенным микрокосмом, продолжавшемся 15 дней (Shah V., Belozeroва, 2009), но для концентрации в 660 мг/кг сообщалось о воздействии на микробные сообщества арктической почвы в эксперименте, продолжавшемся 176 дней. Различия в результатах этих двух исследований могут быть объяснены как влиянием различного типа почвы, свойств частиц, состава микробных сообществ или разницы в продолжительности экспериментов и подчеркивают различные факторы, которые могут влиять на воздействие таких загрязнителей, как НЧ на сложном сообществе почвы. Хотя изменения в бактериальных сообществах вызваны НЧ SiO₂, НЧ могут иметь и положительное влияние на процессы, протекающие в почве. Так, исследование Karunakaran с соавторами (Karunakaran G. et al., 2013) показало, что количество извлекаемых видов ризобактерий удвоилось в ответ на внесение в почву НЧ SiO₂. Это в некоторой степени подтверждается отсутствием каких-либо изменений, наблюдаемых в активности дегидрогеназы в этой почве, хотя дегидрогеназа почвы является мерой общей биологической активности в почве и, как таковая, представляет активность других групп в почвенной биоте.

Относительно низкая концентрация (50 мг/кг) НЧ SiO₂ оказывала незначительное влияние на биологическую активность в почве и почвенные структуры бактериальных, так и грибковых сообществ (McGee et al., 2017).

Кремний (Si) является вторым наиболее распространенным элементом на поверхности Земли и в почвах (Gong et al., 2006). Он считается необходимым элементом для роста и развития растений. Si также может улучшить устойчивость растений к биотическому и абиотическому стрессу, вызванному болезнями, высокой соленостью и токсичностью металлов (Etesami H., Jeong, 2018). Сообщалось, что Si повышает устойчивость растений к тяжелым металлам, таким как кадмий (Cd), хром (Cr), марганец (Mn) и цинк (Zn) (Imtiaz M. et al., 2016). Наблюдаемые эффекты могут быть объяснены активацией антиоксидантной системы, индуцированной Si, ослаблением фотосинтетического ингибирования и

комплексообразованием Si с металлами. Так, исследование показало, что применение кремниевых удобрений снижало усвоение металла и его перемещение в посевах (Jia-Wen W. U. et al., 2013). Поэтому применение кремния рекомендуется для уменьшения загрязнения тяжелыми металлами сельскохозяйственных культур и повышения устойчивости растений к воздействию тяжелых металлов.

Nwugo и Huerta обнаружили, что применение Si ингибирует поглощение и накопление Cd в растениях риса (Nwugo C. C., Huerta, 2008). Существует исследование (Liu J. et al., 2015), которое показывает, что применение Si в листьях мало влияло на накопление Pb в корнях риса, но концентрации Pb в побегах и зернах риса снизились после применения Si. Величина снижения наблюдалась в следующем порядке: обработка нано-Si > обычная обработка Si, сорт с высоким содержанием зерен-накоплением свинца (Yangdao 6) > сорт с низким содержанием зерен-накоплением свинца (Yu 44), тяжелый стресс Pb (1000 мг/кг) > умеренный стресс Pb (500 мг/кг) > нет стресса Pb. Si также подавлял перемещение Pb из корней риса в побеги и из побегов в зерно, особенно перенос из корней в побеги. Величина ингибирующих эффектов также соответствовала порядку, описанному выше.

Ингибирующее влияние Si на транспорт тяжелых металлов у растений, возможно, можно объяснить двумя механизмами:

1) Si вызывает отложение лигнина и связывание тяжелых металлов с клеточной стенкой, что приводит к снижению транспорта металлов от корней к побегам (Liu J. et al., 2016);

2) образование комплекса Si-металл или соосаждение металла с Si (Inal A. et al., 2009).

Меньше Mn было обнаружено в симпластах (<10%) и больше Mn было обнаружено в клеточной стенке (> 90%) в растениях, обработанных Si, чем в необработанных растениях (Mn, приблизительно 50% обнаружено в каждом из этих мест) (Rogalla H., Römheld, 2002). Тем не менее, другое исследование показало, что применение Si на кукурузе в условиях стресса Cd влияло на

развитие ламелл суберина, полос Каспара и сосудистых тканей корней. Si уменьшил транслокацию Cd из корня в побег на высоком уровне Cd (0,05 моль/л), но оказало небольшое влияние на этот параметр на низком уровне Cd (0,005 моль/л) (Vaculík M. et al., 2012). Применение Si не влияло на количество Cd в клеточной стенке растения, но уменьшало долю легко экстрагируемого Cd (Ye J. et al., 2012).

Синтетические аморфные диоксиды кремния используются в различных продуктах, таких как косметика, фармацевтика и продукты питания из-за их инертной природы. В 2018 году годовой расчетный объем производства синтетических аморфных кремнеземов и силикатов размером от одного до нескольких мкм составлял около 500 000 тонн (Giese V. et al., 2018). В этом контексте необходимо учитывать, что за последнее десятилетие спектр синтезированных частиц кремнезема расширился до еще меньших размеров. Частицы, так называемые наночастицы. Поскольку наночастицы имеют большую площадь поверхности по сравнению с их небольшим объемом, поведение поверхностных атомов доминирует в их химии и физике (Agarwal H. et al., 2018). Благодаря своей высокой поверхностной энергии наночастицы способны связывать, адсорбировать или переносить другие соединения, такие как лекарства, белки или химические вещества, и часто обладают необычными каталитическими свойствами. Это делает их не только привлекательно для коммерческой разработки, но может также вызывать цитотоксические эффекты, когда частицы контактируют с живыми существами. Поскольку наноразмерные частицы диоксида кремния нашли применение в химико-механической полировке, в качестве добавок к фармацевтическим препаратам, косметике, тонерам для принтеров, продуктам питания, а также в биомедицинских и биотехнологических областях, таких как биосенсоры, биомаркеры и терапия рака, контакта людей с НЧ диоксида кремния невозможно избежать (Lin W. et al., 2006).

Недавно было показано, что флуоресцентно меченые и немеченые аморфные НЧ кремния проникают в клетки в культуре, транслоцируются в ядро клетки и вызывают уникальные изменения структуры и функции ядра (Pluskota A.

et al., 2009). НЧ кремния вызывают образование ядерной белковой агрегации, которая точно повторяет белковый состав и биохимические свойства ядерных включений, которые возникают при заболеваниях нейродегенеративной агрегации, таких как хорея Хантингтона. В клетках, обработанных НЧ кремния, ингибирование ядерных процессов, таких как репликация и транскрипция, вызывает значительное снижение пролиферации клеток, тогда как жизнеспособность клеток остается неизменной (Chen L. et al., 2018). Известно, что кремнеземные НЧ вызывают снижение продукции потомства у нематодного червя *C. elegans*. В связи с этим важно отметить, что откладка яиц у *C. elegans* представляет собой установленный фенотип и функциональную конечную точку нервной системы червя (Schafer W., 2005). Рабочая модель НЧ-индуцированной нарушенной иннервации совпадает с предыдущими результатами, полученными в культуре клеток, где НЧ кремния индуцируют агрегацию белка, которая точно повторяет нейродегенерацию и нейродегенеративные заболевания, связанные с ядерными включениями (Chen et al., 2018). В настоящее время нельзя исключать, что кремниевые НЧ вызывают дефектную яйцекладку у *C. elegans* косвенно, например, без перемещения частиц в репродуктивные органы (Pluskota A. et al., 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Последние достижения в области нанотехнологий ведут к неизбежному соответствующему увеличению использования наноматериалов во многих отраслях индустрии, а также в производстве потребительских товаров, что способствует их рассеиванию в окружающей среде. Очевидно, что такое широкое внедрение в нашу жизнь и распространение наночастиц, накопление в природных средах, и прежде всего, почве, дает основание рассматривать их как особый вид загрязняющих веществ. Процессы переноса наночастиц с воздушными и водными потоками, их накопление в почве, воде, донных отложениях значительно отличаются от поведения частиц более крупного размера. Активное развитие

работ по анализу инженерных наноматериалов в природных средах способствует прояснению следующих вопросов: каковы пути их распространения, сохраняют ли искусственные наночастицы свои свойства (размер, оригинальную структуру, реакционную способность) в водных, воздушных, почвенных и осадочных объектах, как наночастицы воздействуют на живые объекты в окружающей среде.

Одними из наиболее часто встречающихся наночастиц являются наночастицы меди, цинка и оксида кремния. Они активно используются как в промышленности, так и могут быть использованы для создания препаратов для сельского хозяйства. В этой связи крайне важно знать пределы чувствительности и толерантности, а также адаптационно-приспособительные реакции почвенных организмов на данные вещества, с целью определения концентраций наночастиц для их возможного использования.

Наночастицы меди и цинка обладают бактерицидным и фунгицидным действием, наночастицы оксида кремния могут быть использованы в растениеводстве как микроудобрения, что увеличивает степень устойчивости растений к неблагоприятным средовым факторам и демонстрирует возрастание уровня урожайности сельскохозяйственных культур.

Проблемы обнаружения наночастиц в почве связаны не только с известными техническими сложностями, требующими дорогостоящего специального оборудования, высокого уровня технической квалификации специалистов, но и с тем, что в почве – сложной многофазной системе – присутствует великое множество минеральных и органических макро-и микрокомпонентов, а также природных наночастиц. В тоже время биотестирование наночастиц на различных тест-объектах и исследование их тест-функций позволяет говорить о том, что можно использовать данный метод как достоверный и позволяющий выявить ответные реакции организмов, в том числе и в почве.

Результаты анализа литературы свидетельствуют о все большем обострении проблемы распространения наноматериалов в окружающей среде. Наиболее уязвимой для разработки надежных методов анализа и выявления содержания

наночастиц представляется почва. Как очень специфическая часть биосферы она не только геохимически аккумулирует компоненты загрязнений, но и выступает в роли природного буфера, контролирующего перенос химических элементов и соединений в атмосферу, гидросферу и живое вещество. Поллютанты, поступающие из различных источников, в конечном итоге попадают на поверхность почвы, и их дальнейшая судьба зависит от ее химических и физических свойств.

Перспективное направление исследовательских работ для экологии, биологии, сельского хозяйства и медицины в настоящее время - разработки в области нанотехнологий, связанные главным образом с производством и использованием ультрадисперсных частиц металлов. При этом особое внимание исследователей направлено на исследование наночастиц металлов, которые имеют важное значение для функционирования организма (медь, железо, цинк, хром, кобальт, селен, молибден, марганец). Стабильность таких наночастиц, их поведение в организме, химические превращения значительно не совпадают с такими же критериями их минеральных или органических форм.

Сельское хозяйство сегодня – одно из главных мест применения наночастиц металлов, где они могут быть использованы для улучшения кормовой базы животных, увеличения урожайности растений. Также наночастицы металлов находят широкое применение в химической, медицинской, фармацевтической отраслях промышленности, а также в области охраны окружающей среды.

Однако нельзя не учитывать факт возможности биологических рисков, связанных с применением нанотехнологий, которые находят отклик в исследованиях в области нанотоксикологии.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследований

Для проведения исследований по воздействию наночастиц на живые объекты применялся генноинженерный люминесцирующий штамм *Echerichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующий *lux* CDABE-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiongnathi* 54D10, производство НВО «Иммунотех» (Россия, Москва) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколлом». Данный штамм обладает конститутивным типом свечения, то есть биолюминесценция регистрируется в постоянном режиме. Данный тип свечения коррелирует и отражает протекание основных энергетических процессов в прокариотическом организме. Если на клетку негативно влияют какие-либо факторы, например, наночастицы, уровень регистрируемой биолюминесценции уменьшается.

Для проведения исследования флакон с высушенным в инертной атмосфере штаммом восстанавливали, добавляя деионизированную воду, которая была охлаждена до +4 С. Помещали в термостат при температуре 3 ± 1 С на 30 минут. Далее вынимали суспензию из термостата и оставляли при комнатной температуре до достижения комнатной температуры полученной суспензии. Далее с помощью серии последовательных разведений оптическую плотность суспензии бактерии доводили до 0,3 единиц.

Для исследования воздействия наночастиц в качестве тест-объектов использовались красные калифорнийские черви, которые были выращены в питомнике ФГБНУ Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН. Черви были получены от ООО «БиОЭра-Пенза», (www.bioeragrup.ru). Черви находились при выращивании в конском навозе без добавления химикатов и лекарственных препаратов Червей культивировали в конском навозе без каких-либо лекарственных препаратов при 22 ± 1 °С.

Исследования по изучению токсического действия наночастиц проводили согласно руководящему документу OECD guidelines for the testing of chemicals (ОЭСД, 1984; 2004) на лабораторных культурах дождевых червей - *Eisenia fetida* Andrei Bouche.

Данные тест-организмы являются высокоинформативными, так как у них преобладает кожный путь поступления веществ, находящихся в почве (Wallwork, 1983; Jajer, 2003, Vijver, 2003). Находясь в почвенном окружении, калифорнийские черви пропускают через свой желудочно-кишечный тракт большое количество почвенных частиц, то есть постоянно подвергаются влиянию веществ, которые на них могут быть (Morgan and Morgan, 1999). Черви более чувствительны к воздействию металлов, чем другие почвенные беспозвоночные, поэтому изучение адаптивных реакций червей и выяснение диапазона толерантности червей, что необходимо для оценки безопасных уровней металлов и других загрязнителей в почве (Zaltauskaite, 2010).

Токсикологическая оценка проводилась на искусственном субстрате и природной почве. Стандартизированную искусственную почву (OECD, 1984) получали путем смешивания 70% кварцевого песка (сухой вес), 20 % каолина и 10% измельченного торфа сфагнома (органический азот – 5,8%), рН была скорректирована до $6,0 \pm 0,5$ порошкообразным карбонатом кальция (CaCO_3).

Тщательно перемешанную искусственную почву помещали в емкости и увлажняли дистиллированной водой до предварительной влажности 45%.

Образцы субстратов были предварительно протестированы на модели *E. fetida* в течении 30 суток, выживаемость составила 100% при оптимальном развитии червей.

Используемая для исследований почва имела следующие характеристики: рН 7,7, органическое вещество 3,9%, N 0,24%. Подготовка почв, представленных черноземом южным к модельному эксперименту, осуществлялась согласно общепринятой методике [Кауричев, И.С. Практикум по почвоведению / И.С. Кауричев. – М.: Колос. - 1980. - 272 с.].

2.2 Препараты наночастиц Zn, Cu и SiO₂

Материаловедческая аттестация препаратов включала: электронную сканирующую и просвечивающую микроскопию на приборах – JSM 7401F и JEM-2000FX («JEOL», Япония), а также на сканирующим зондовом микроскопе (СЗМ) Сертус Лайт V, (Россия).

В исследовании использовались коммерчески доступные наночастицы (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика препаратов наночастиц

НЧ	Производитель	Суд. пов., м ² /г	Размер, нм	Способ получения	Химический состав	Z-потенциал, мВ
Cu	«Плазмотерм», Россия	8,0±0,5	50-110	Плазмохимический синтез	Cu: 99,7%; O ₂ : менее 0,3%;	31±0,1
Zn	«Передовые порошковые технологии», Россия	5,34	90-150	Метод электрического взрыва проводника в атмосфере аргона	Содержание металлического цинка не менее 99,95 %	17±0,2
SiO ₂	«Плазмотерм», Россия	5±1,6	30-50	Плазмохимический синтез	SiO ₂ не менее 99 %	27±0,12

Используемые растворы НЧ были подготовлены по способу, описанному Scott-Fordsmand J. с соавторами (Scott-Fordsmand J. et. al., 2008). Согласно описанному методу сухую массу наночастиц взвешивали на аналитических весах и в необходимом количестве вносили в воду, которая была предварительно очищена и деионизирована (10 мл). После чего полученные лиозоли были подвергнуты ультразвуковой обработке на ультразвуковом диспергаторе (УЗДН, f-35 кГц, N-300 Вт, Россия), в течение 0,5 часа.

После чего, подготовленные опытные растворы с наночастицами были внесены в увлажненную почву (влажность 47±2 %) (искусственную или природную) и перемешаны с ней с помощью ручного миксера. Далее добавлением

деионизированной воды влажность почвы была повышена до 75-80 % и еще раз тщательно перемешана.

2.3 Биологическая оценка препаратов наночастиц Zn, Cu и SiO₂ на модели бактериальной люминесцентной тест-системы (*in vitro*)

Биологическое тестирование препаратов проведено с использованием штамма *Echerichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующий *luxCDABE*-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiongnathi* 54D10, производство НВО «Иммунотех» (Россия, Москва), по методике Д.Г. Дерябина с соавторами (2011).

Серия экспериментов *in vitro* включала: анализ биологической активности наночастиц Zn, Cu и SiO₂ в тесте ингибирования бактериальной люминесценции.

В качестве объекта воздействия использовался генно-инженерный люминесцирующий штамм *Echerichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующий *luxCDABE*-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiongnathi* 54D10, производство НВО «Иммунотех» (Россия, Москва) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм». Данный штамм обладает постоянным уровнем выявляемой биолюминесценции. При этом токсичные вещества ведут к уменьшению уровня выявляемой биолюминесценции и наблюдается обратная корреляция между уровнем свечения и уровнем токсичности вещества. Величина токсического воздействия различных веществ вычисляется по изменению величины интенсивности свечения бактериального штамма в опытном образце по сравнению с образцом, куда была добавлена только дистиллированная вода. Количественная оценка параметра тест-реакции выражается в виде безразмерной величины - индекса токсичности

Опытные пробы, содержащие наночастицы, последовательно разводили дистиллированной водой до получения требуемых концентраций, после чего они

были подвергнуты воздействию ультразвукового диспергатора в течении получаса.

Для изучения уровня тушения биолюминесцентного отклика бактериального штамма использовали планшеты с 96 непрозрачными лунками по 300 мкл. Опытные образцы, содержащие исследуемые наночастицы вносили к образцам бактерий, соблюдая пропорцию 1:1, после чего проводили измерения уровня биолюминесцентного отклика. Для этого использовали многофункциональный ридер (люминометр) (Tecan, Австрия), динамически регистрирующего интенсивность свечения полученных смесей. Измерение проводили в течении 3 часов, интервал измерения составил 5 минут.

Результаты влияния наноматериалов на интенсивность бактериальной биолюминесценции (I) оценивали с использованием формулы

$$I = (I_{k0} \times I_{on}) / (I_{kn} \times I_{o0}) \quad (1)$$

где I_k и I_o – интенсивность свечения контрольных и опытных проб на 0-й и n-й минутах измерения.

Учитывали 3 пороговых индекса токсичности:

- Равно или больше 1 - образец «не токсичен» (тушение люминесценции менее 20 %);
- от 0,5 до 0,8 - образец токсичен (тушение биолюминесценции от 50% до 80%);
- равно или меньше 0,5 - образец сильно токсичен (тушение биолюминесценции более 50%).

2.4 Оценка действия препаратов наночастиц Zn, Cu и SiO₂ на физиолого-биохимические показатели красного калифорнийского червя *E.fetida* (in vivo)

Червей помещали в пластиковые контейнеры (0,4×0,15×0,02 м) с приготовленным субстратом по 10 штук. Все контейнеры были закрыты

перфорированной крышкой для предотвращения потери влаги и выдерживались в темном месте (Тейлор и др., 2004).

Содержание белка в теле червей определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Stat fax 1904 Plus (производитель - Awareness Technology Inc, США) с использованием коммерческих наборов фирмы Randox (США).

Для этого готовились вытяжки из червей путем их гомогенизации в буферной (Tris 50 ммоль/л, DTT 1.0 ммоль/л, EDTA 1.0 ммоль/л, сахароза 250 ммоль/л, pH 7.5), которую добавляли в соотношении 1:9 (L.-Z. Li et al., 2011). Черви были гомогенизированы на гомогенизаторе тканей TissueLyser LT, QIAGEN («QIAGEN», Германия). Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 15000 об./мин. Полученный супернатант разбавляли буферной смесью до 10% гомогената.

Активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (кат), глутатионпероксидазы (ГПО)), а также перекисное окисление липидов осуществлялось на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Stat fax 1904 Plus (производитель - Awareness Technology Inc, США) с использованием коммерческих наборов фирмы Randox (США).

Для этого готовились вытяжки из червей путем их гомогенизации в буферной (Tris 50 ммоль/л, DTT 1.0 ммоль/л, EDTA 1.0 ммоль/л, сахароза 250 ммоль/л, pH 7.5), которую добавляли в соотношении 1:9 (Li L.-Z. et al., 2011). Черви были гомогенизированы на гомогенизаторе тканей TissueLyser LT, QIAGEN («QIAGEN», Германия). Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 15000 об./мин. Полученный супернатант разбавляли буферной смесью до 10% гомогената.

Активность супероксиддисмутазы определяли с помощью метода, основанного на способности супероксиддисмутазы ингибировать аутоокисление адреналина, которое инициируется супероксидными радикалами, возникающими при взаимодействии адреналина со следами металлов в щелочной среде.

Исследования проводят в термостатированной кювете при $t = 30^{\circ}\text{C}$.

К 0,1 мл эритроцитарной массы приливают 1 мл бидистиллированной воды, хорошо перемешивают и оставляют на 5-10 минут при комнатной температуре.

Определение Бк. К 2 мл карбонатного буфера рН 10,65 добавляют 100 мкл 0,1% раствора адреналина гидрохлорида, тщательно и быстро перемешивали, помещают в кювету спектрофотометра. Измерение величины оптической плотности проводят при длине волны 347 нм через каждые 60 секунд в течение 3 мин., считая от момента прибавления адреналина.

Определение Бо. К 2 мл буфера добавляют 100 мкл исследуемого раствора и затем 100 мкл 0,1% раствора адреналина, перемешивают и измеряют оптическую плотность как описано в п.5.2.

Расчет результатов.

О величине активности СОД судят по степени ингибирования скорости аутоокисления адреналина.

Процент ингибирования вычисляют по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = [1 - (D_0/D_k)] \times 100 \% \quad (2)$$

Где D_0 - оптическая плотность в присутствии гемолизата,

D_k - оптическая плотность в отсутствии гемолизата.

Активность СОД рассчитывают в условных единицах активности. За 1 усл. ед. акт. принимали 50 % ингибирование реакции.

Каталаза

Принцип метода. Метод основан на способности перекиси водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 410 нм.

Реактивы.

1. 0,04412 Н раствор перекиси водорода (Готовят примерно 0,08% раствор переки-си водорода и устанавливают точную концентрацию титрованием 0,01 Н раствором $KMnO_4$. На титрование 5 мл 0,04412 Н раствора перекиси водорода должно идти 22,06 мл 0,01 Н раствора перманганата калия. По результатам титрования раствор перекиси водо-рода доводят до нужной концентрации дистиллированной водой).

2. 4,5% раствор аммония молибденовокислого (4,5 г молибдата аммония растворяют в 9565 мл дистиллированной воды).

3. 0,1 М трис-НСl буфер, рН 7,4.

4. Буферно-субстратная смесь (10 мл трис-НСl буфера рН 7,4 смешивают с 30 мл 0,04412 Н раствора перекиси водорода).

Ход определения.

1. К 0,5 мл образца приливают 3,5 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают и оставляют на 5-10 минут при комнатной температуре. К 0,2 мл основного гемолизата прибавляют 3,8 мл воды и тщательно перемешивают.

2. В две химические пробирки наливают по 2,0 мл буферно-субстратной смеси и проинкубируют в водяной бане при 37 °С в течение 10 минут.

3. В одну из пробирок (опытную) добавляют 0,1 мл рабочего раствора, тщательно перемешивают и инкубируют в водяной бане при 37°С в течение 3 минут.

4. Реакцию останавливают добавлением в опытную пробу 2,0 мл молибдата аммония. Одновременно приливают в контрольную пробирку сначала 2,0 мл молибдата аммония, а затем 0,1 рабочего гемолизата.

5. Измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб при 410 нм в кювете с ходом луча 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь, состоящую из 1 мл буфера, 3 мл дистиллированной воды и 0,1 мл рабочего гемолизата.

Расчет результатов.

Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$$A = ((E_k - E_o) \times 4,1 \times 16 \times 10^5 \times 10^6) / (22,2 \times 10^6 \times 3) \quad (3)$$

где А – активность фермента, М.Е. (мкМ перекиси водорода/л×мин)

E_k – оптическая плотность контрольной пробы

E_o – оптическая плотность опытной пробы

4,1 – конечный объем пробы

16×10^5 – фактор разведения

10^6 – коэффициент пересчета на мкМ

$22,2 \times 10^6$ – коэффициент молярной экстинкции перекиси водорода

3 – время инкубации, мин

Малоновый диальдегид

Принцип метода. При высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид (МДА) реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметинового комплекса, имеющего максимум поглощения при 532 нм.

Реактивы.

1. 10% водный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

2. 0.8% водный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (2-ТБК). Готовится при нагревании в кипящей водяной бане в день исследования.

3. Вода дистиллированная.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.

2. Центрифуга лабораторная.

3. Водяная баня.

4. Весы аналитические.

5. Пробирки химические и центрифужные.

6. Колбы мерные.

7. Пипетки измерительные.

Ход определения.

1. К 2,5 мл образца, помещенной в центрифужную пробирку приливают 2,5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают.

2. Пробу центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин.

3. 3,0 мл надосадочной жидкости переносят в чистые центрифужные пробирки и прибавляют 1,5 мл 0,8% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты.

4. Пробу помещают в кипящую водяную баню ровно на 15 минут.

5. Пробу вынимают из кипящей водяной бани и охлаждают под струей холодной водопроводной воды. После охлаждения их центрифугируют в течение 5 минут при 3000 об/мин.

6. Ставят контрольную пробу, содержащую 2,5 мл дистиллированной воды, 2,5 мл 10% трихлоруксусной кислоты, 1,5 мл 0,8% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и обрабатывают аналогично опытной пробе.

7. Измеряют оптическую плотность опытных проб при 532 нм против контрольной пробы в 10 мм кюветах

Содержание малонового диальдегида рассчитывают по формуле:

$$C=(E \times 10^6 \times 3)/(1,56 \times 10^5) \quad (4),$$

где С – концентрация малонового диальдегида, мкМ/л;

Е – оптическая плотность пробы;

10^6 – коэффициент пересчета в мкМ;

$1,56 \times 10^5$ – коэффициент молярной экстинкции триметинового комплекса МДА с 2-ТБК;

3 – фактор разведения.

Концентрацию металлов в *E.fetida* определяли в начале, на 7 и 14 сутки эксперимента. Для этого проводили отбор 5-х червей из 5-и повторностей, очищение содержимого кишечника и проводили по вышеприведенной методике.

В конце эксперимента червей отбирали, промывали дистиллированной водой и затем взвешивали. Содержимое пищеварительной системы удаляли путем рассечения пищеварительного тракта. Затем биосубстраты доводили в сушильном шкафу до постоянного веса. Сушеные образцы почвы и тканей червей использовали для определения металла на масс-спектрометре Agilent ICP-MS 7500 («Agilent Technologies», USA). Оценивали содержание металлов на атомно-абсорбционном спектрофотометре Formula FM 400 (ООО "НТЦ "Лабист", Россия).

Биоаккумуляцию металла рассчитывали по формуле

$BSAF = \text{Содержание металла в черве} / \text{общее содержание металла в почве}$.

(Cortet et al., 1999) (5).

Поглощение металла:

$$R=(M_a-M_b)/M_e \times 100\%, \quad (6)$$

где М – масса, мг,

a – в конце эксперимента,

b – в начале,

e – масса червя.

Скорость накопления металла в течение периода экспозиции оценивалась с помощью следующего уравнения (Zhang et al., 2009):

$$S = \Delta C_{\text{червь}} / \Delta T = (C_{\text{червь}2} - C_{\text{червь}1}) / (t_{n2} - t_{n1}) \quad (7)$$

где $C_{\text{червь}}$ – концентрация вещества в черве в день выборки,

t_n – дни выборки

Для изучения адаптивных реакций бактериальных и грибковых сообществ кишечника червя и используемой почвы, на 28 день эксперимента проводили отбор проб. Для этого червей помещали на влажную фильтровальную бумагу и стерильным пинцетом вскрывали и отбирали кишечник вместе с его содержимым, который помещали в стерильную пробирку и передавали в лабораторию. Пробы почвы отбирали в стерильные контейнеры и доставляли на исследования.

Исследования бактериальных сообществ проводили методом посева на плотные питательные среды. Отобранные образцы содержимого кишечника и почвенные частицы направляли на исследования в течении 24 часов (Звягинцев, 1991). Анализ общего числа микроорганизмов в почве проводили посевом на мясо-пептонный агар (МПА). Микроорганизмы, которым для роста и развития необходимы минеральные формы N, высевали на крахмал-аммиачном агаре (КАА). Среда Чапека использовалась, чтобы определить число микроскопических грибковых форм. Для того, чтобы грибковые споры не прорастали на средах, предназначенных для выделения бактерий, применяли антибиотик нистатин в дозировке 40 мкг/мл среды. Для среды Чапека использовали антибиотик (бензилпенициллин в концентрации 50 мкг/мл среды), который предотвращал рост бактериальной флоры на чашках. Численность бактерий выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ) на грамм сухой почвы. Высевы проводили трехкратно.

2.5 Статистическая обработка материала

Применяли непараметрические процедуры обработки статистических совокупностей (U-критерий Манна-Уитни). Во всех процедурах статистического анализа рассчитывали достигнутый уровень значимости (p), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался меньшим или равным 0,05. Взаимосвязи между параметрами оценивали при помощи метода ранговых корреляций Спирмена. Для определения тесноты связи между изучаемыми признаками проводили вычисление коэффициента корреляции (r).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изучение ингибирования наночастицами меди, цинка и кремния бактериальной биолюминесценции *in vitro*

Биолюминесцентный отклик тест-системы Эколюм снижался на 50-80 % при контакте с НЧ Zn в диапазоне 0,00009-0,00002 М. Развитие эффекта происходило в течение 70 мин контакта. Это характеризует данные концентрации как токсичные. Концентрации НЧ Zn меньше 0,00001 М не влияла на биолюминесценцию (рисунок 1).

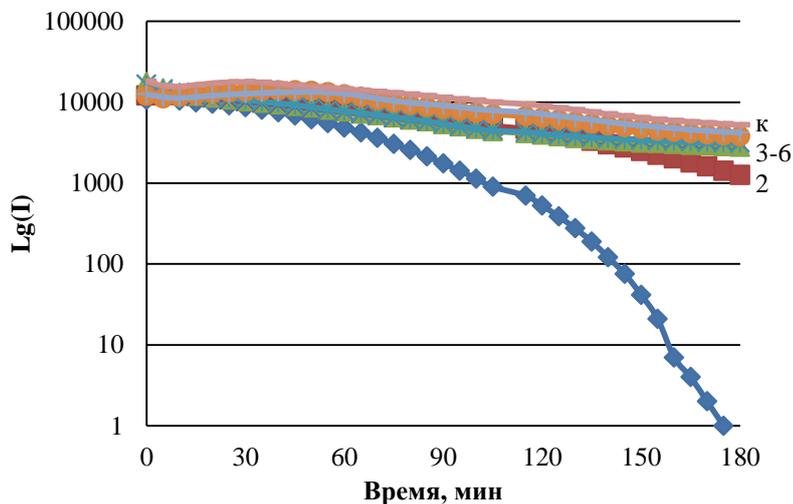


Рисунок 1 – Динамика свечения *E.coli* K12 TG1 при контакте с наночастицами цинка в концентрациях 0,000195 (1); 0,00009 (2); 0,00004 (3); 0,00002 (4); 0,00001 (5); 0,000006 (6); к - контроль.

Острую токсичность вызывали НЧ Cu в концентрациях от 4 до 0,05 М. Биолюминесцентный отклик тест-системы Эколюм снижался на 50-70 % в разведениях НЧ Cu от 0,025 до 0,000625 М. Развития данного эффекта происходило в течение 130...180 мин. 20%-тушение свечения биолюминесцентного штамма вызывали НЧ Cu в концентрации 0,003125 М; 30 % - через 175 мин, оказывая слаботоксичный эффект, а разведения от 0,00156 до 0,000195 М были не токсичны (рисунок 2).

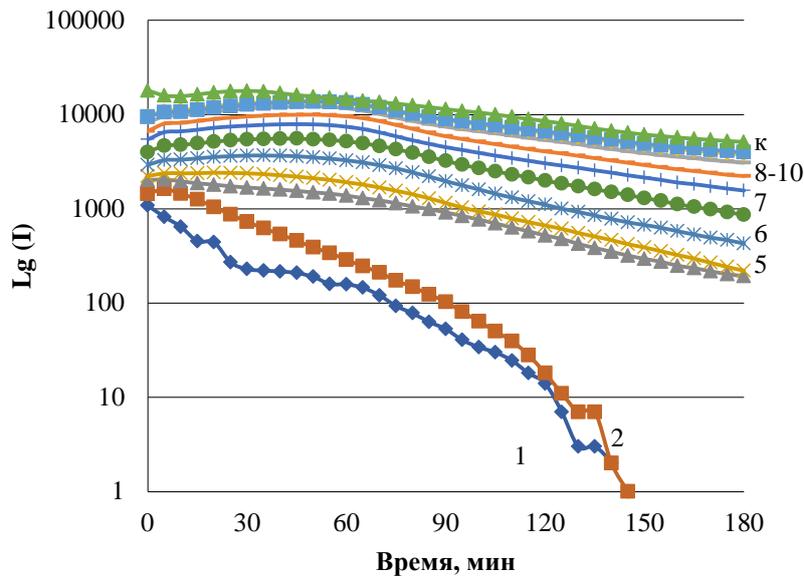


Рисунок 2 – Динамика свечения *E.coli* K12 TG1 при контакте с наночастицами Si в концентрациях 0,1 (1); 0,05 (2); 0,025 (3); 0,0125 (4); 0,00625 (5); 0,003125 (6); 0,001563 (7); 0,000781 (8); 0,000391 (9); 0,000195 (10); к - контроль.

Динамика биолюминесцентного отклика не изменялась при добавлении НЧ SiO₂ в концентрациях 0,1-0,00195 М (рисунок 3).

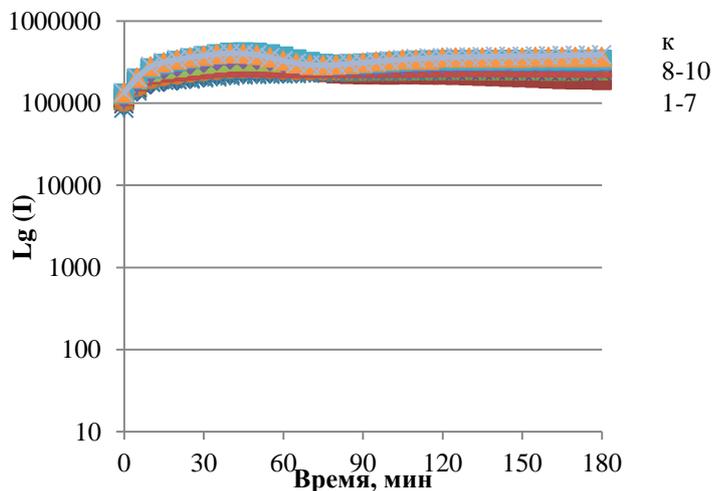


Рисунок 3 – Динамика свечения *E.coli* K12 TG1 при контакте с наночастицами SiO₂ в концентрациях 0,1 (1); 0,05 (2); 0,025 (3); 0,0125 (4); 0,00625 (5); 0,003125 (6); 0,001563 (7); 0,000781 (8); 0,000391 (9); 0,000195 (10); к - контроль.

Концентрации НЧ SiO₂ ≥ 4 М характеризовались как нетоксичные.

На основании параметра EC50 НЧ по степени токсичности были расположены следующим образом – Zn > Cu > SiO₂ (таблица 1).

Таблица 2 – Значения токсикологического параметра EC50 (М) при контакте тест-организма *E.coli* K12 TG1 с наночастицами

Наночастицы	Продолжительность контакта, мин		
	60	120	180
Cu	> 0,05	> 0,025	0,00625±0,0001
Zn	0,00009±0,000001	0,00004±0,000003	0,00002±0,000001
SiO ₂	NOEC	NOEC	NOEC

3.2 Влияние НЧ Zn на индикаторные показатели представителей агробиоценоза на искусственном субстрате

Сохранность червей при внесении НЧ Zn в I группе составила 100 % на протяжении всего эксперимента. На 14 сутки во всех опытных группах выживаемость находилась в диапазоне 95-100 % (рисунок 4).

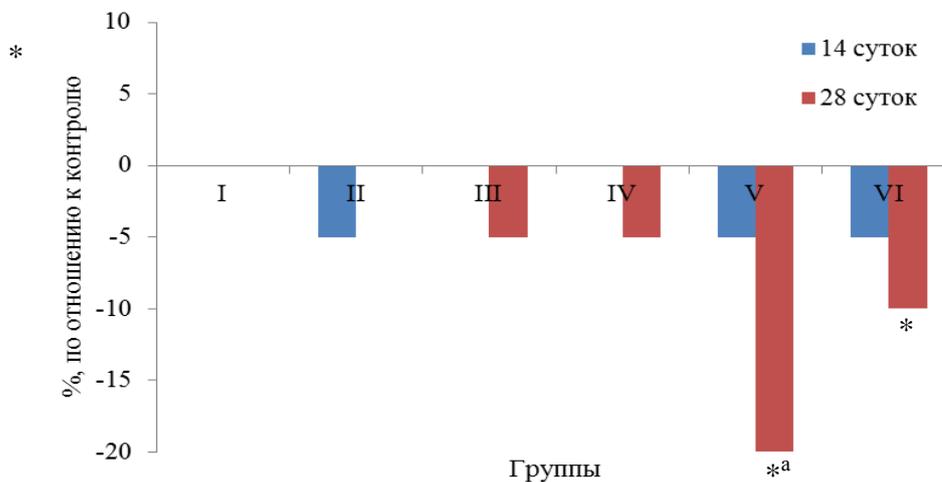


Рисунок 4 – Выживаемость червей *E. fetida* (Б) при внесении НЧ Zn в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 28 сутки эксперимента достоверным было снижение выживаемости червей на 20 % ($p \leq 0,05$) в V группе, по сравнению с контролем и на 15 %, по сравнению с 14 сутками ($p \leq 0,05$).

Масса червей на 14 сутки наблюдений была ниже контроля в III и V группе на 5,3 % и 7,0%, соответственно. На 28 сутки эксперимента в опытных группах по сравнению с контролем масса червей снижалась на всем протяжении эксперимента на 11,6-13,8 % ($p \leq 0,05$). Наиболее выражено было снижение массы червей в V группе (рисунок 5).

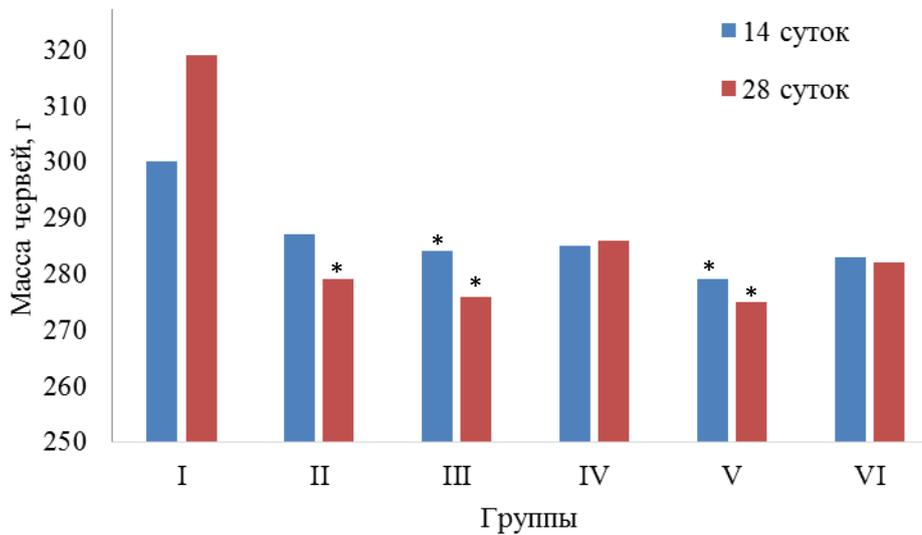


Рисунок 5 – Масса *E. fetida* при внесении НЧ Zn в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой)

Содержание белка в теле червей снижалось во всех опытных группах на протяжении всего времени эксперимента (рисунок 6). На 14 сутки содержание белка уменьшилось на 19,5-46,3 %. Наибольшее снижение наблюдали в концентрации 500-1000 мг/кг НЧ Zn. Наиболее низкое содержание белка отмечали в V (на 40 %, $p \leq 0,05$) и VI группе (на 46,6 %, $p \leq 0,05$) на 14 сутки. На 28 сутки эксперимента содержание белка снизилось в опытных группах на 22,2-46,6 %. Содержание белка на 14 сутки наблюдений в опытных группах не имела статистически значимых различий с показателями на 28 сутки.

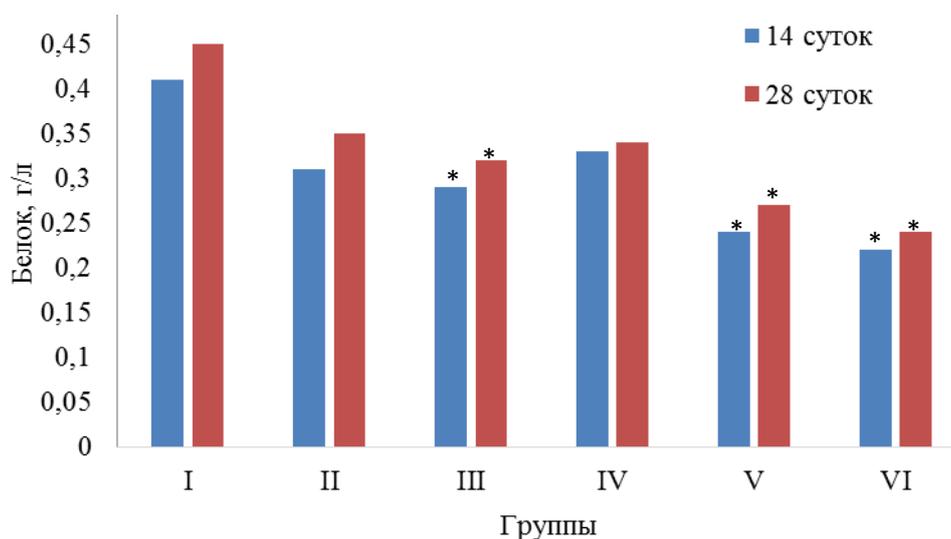


Рисунок 6 – Содержание белка в *E. fetida* (Б) при внесении НЧ Zn в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой)

Активность СОД достоверно изменялась на 28 сутки эксперимента при внесении в почву 100-1000 мг/кг НЧ Zn – понижалась на 16,9 % и 8,3 % во II и VI группе; повышалась на 14,7 % и 21,4 % в IV и V группе, соответственно. Активность каталазы была выше контроля на 28 сутки в диапазоне 100-500 мг/кг НЧ Zn (на 13,1-33,5%). Содержание МДА в теле *E. fetida* при внесении НЧ Zn в искусственную почву превышало контрольные значения во II (в 3,5 раза), в IV (в 2 раза) и V группе (в 3,75 раза).

Активность ферментов антиоксидантной защиты червей в IV и V группе была преимущественно выше контроля, что свидетельствует о возрастании экологического стресса и образования активных радикалов кислорода в организме (таблица 3). Также во всех группах, содержание МДА было выше контрольных значений, что свидетельствует о процессах перекисного окисления липидов на клеточном уровне.

Таблица 3 – Активность антиоксидантных ферментов и содержание МДА в теле *E. fetida* при внесении НЧ Zn в искусственную почву

Показатель	Группы					
	I	II	III	IV	V	VI
СОД, ингибирования аутоокисления адреналина, %	31,2±1,93	29,1±1,10	25,9±1,78*	35,8±2,63*	37,9±1,15*	28,6±2,28*
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /л×мин	15,2±0,97	16,4±0,86	19±0,72*	19,8±0,78*	20,3±1,21*	17,4±0,46
МДА, мкмоль/л	0,04±0,003	0,14±0,01*	0,06±0,005	0,08±0,003*	0,15±0,06*	0,06±0,002

Примечание: *различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой

На 14 сутки эксперимента отмечали накопление Zn в теле *E. fetida* в диапазоне концентраций 250-1000 мг/кг НЧ Zn (до 4,3 раза выше контроля в VI группе). На 28 сутки в IV группе накопление Zn было выше контроля в 1,3 раза, в V группе – в 1,4 раза, в VI группе – в 1,3 раза. По сравнению с 14 сутками накопление Zn выросло на 28 сутки в среднем в 1,1 раза во II и III группе, в то время как на 28 сутки в VI группе отмечали снижение концентрация Zn в теле *E.fetida* на 52,5% ($p \leq 0,05$) по сравнению с 7 днем (Рисунок 7).

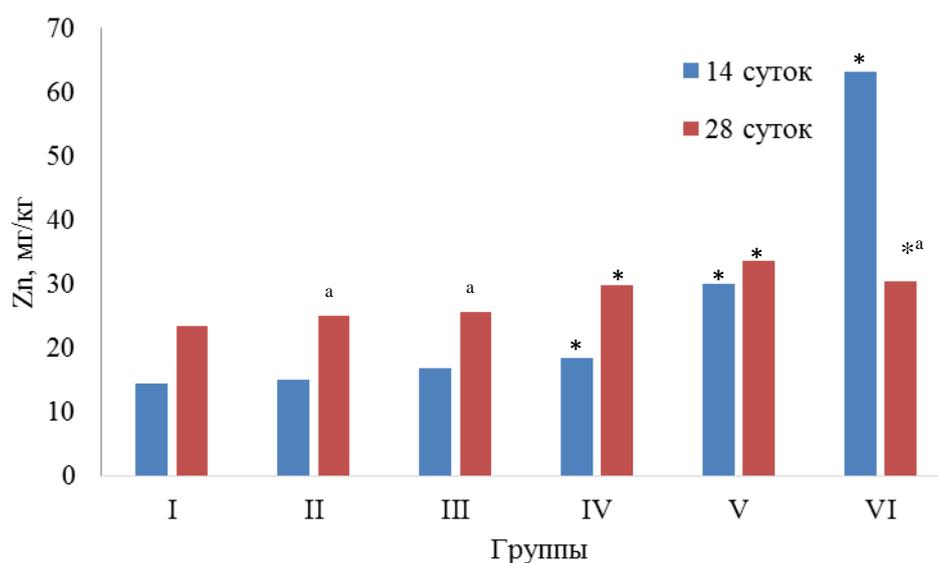


Рисунок 7 – Содержание Zn в теле *E.fetida* при внесении НЧ Zn в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Содержание Zn в почве при внесении в искусственную почву на 14 сутки во II-V группе было выше контрольных значений в 1,72-5,72 раза ($p \leq 0,05$), в VI группе – в 15,5 раза ($p \leq 0,05$). На 28 сутки превышение показателей в опытных группах по сравнению с контролем составило 1,5-5,9 раз ($p \leq 0,05$).

На 28 сутки в опытных группах концентрация Zn снижалась, по сравнению с 14 сутками. В максимальной концентрации снижение содержания Zn на 28 сутки составило 9,6 раза, по сравнению с 14 сутками ($p \leq 0,05$) (рисунок 8).

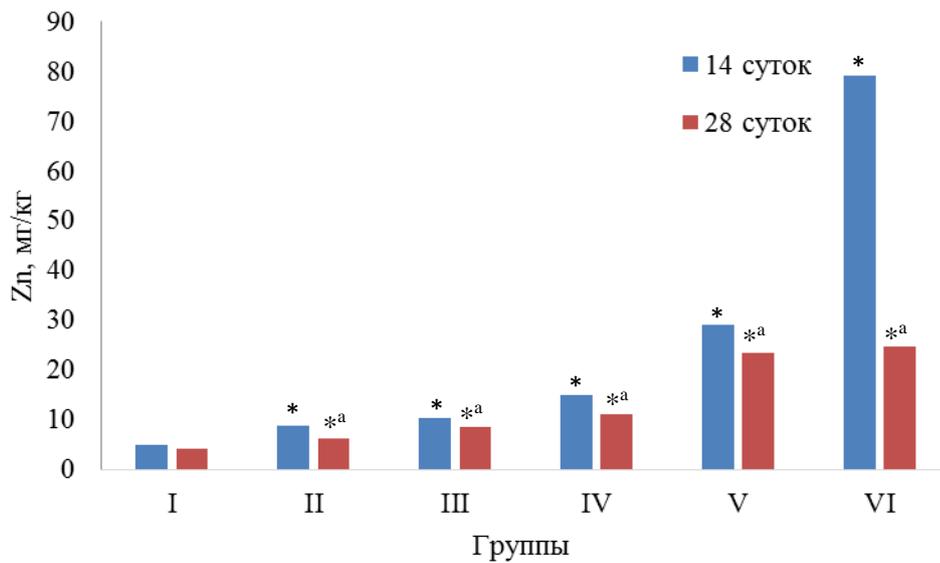


Рисунок 8 – Содержание Zn в почве при внесении НЧ Zn в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 14 сутки эксперимента скорость накопления Zn в концентрации 100-1000 мг/кг НЧ была в 1,9-21,4 раза выше, чем в контроле ($p \leq 0,05$) (рисунок 9). На 28 сутки скорость накопления Zn в теле *E.fetida* превышала контрольные значения при концентрации 250-500 мг/кг НЧ (в 1,5-1,9 раза, $p \leq 0,05$). При этом на 28 сутки скорость накопления была выше, чем на 14 сутки при концентрации 50-250 мг/кг НЧ (в 1,5-2,2 раза, $p \leq 0,05$), и в контроле (в 2,4 раза, $p \leq 0,05$). В V и VI группе скорость накопления металла снизилась, по сравнению с 14 сутками в 1,6 раза и 5,6 раза ($p \leq 0,05$).

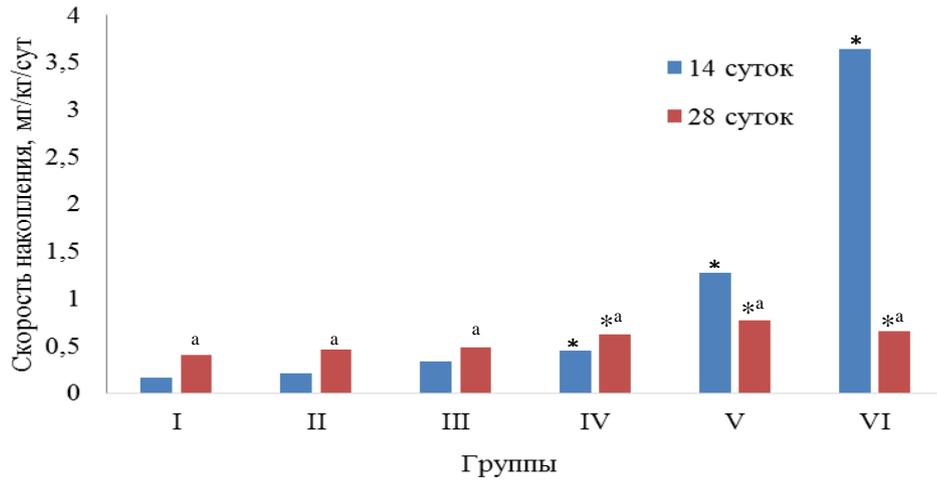


Рисунок 9 – Скорость накопления Zn в теле *E.fetida* при внесении НЧ Zn в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

В VI группе скорость накопления Zn в теле червя за период 14-28 суток характеризовалась выведением металла со скоростью 3,9 мг/кг/сут.

Организм *E. fetida* в опытных группах показал способность к биоаккумуляции Zn ниже, чем в контроле на 39,6-71,8 % и на 28,8-78,0 % в период 14 и 28 суток, соответственно (рисунок 10).

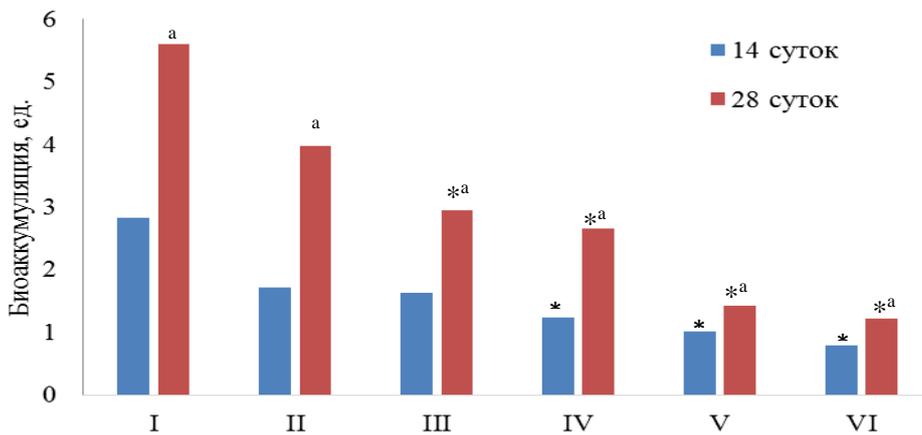


Рисунок 10 – Биоаккумуляция Zn в теле *E.fetida* при внесении НЧ Zn в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 28 сутки биоаккумуляция увеличилась в 1,8-2,3 раза ($p \leq 0,05$) при концентрации 50-250 мг НЧ Zn, по сравнению с 14 сутками (рисунок 10).

При анализе корреляционных зависимостей было показано, что имеется прямая корреляция между такими параметрами:

- масса червей с содержанием белка ($r=0,86$);
- масса червей с биоаккумуляцией ($r=0,85$);
- содержание белка с биоаккумуляцией ($r=0,94$);
- активность СОД с активностью КАТ ($r=0,50$);
- содержание металла в червях с содержанием металла в почве ($r=0,82$);
- содержание металла в червях с скоростью накопления металла ($r=0,78$);
- содержание металла в почве со скоростью накопления металла ($r=0,82$).

Обратная корреляция была обнаружена между:

- массой червей и активностью КАТ ($r=-0,74$);
- массой червей и содержанием металла в черве ($r=-0,51$);
- массой червей и содержанием металла в почве ($r=0,50$);
- массой червей и скоростью накопления ($r=-0,50$);
- содержанием белка и активностью КАТ ($r=-0,57$);
- содержанием белка и содержанием металла в черве ($r=-0,75$);
- содержанием белка и содержанием металла в почве ($r=-0,81$);
- содержанием белка и скоростью накопления ($r=-0,75$);
- между активностью КАТ и биоаккумуляцией ($r=-0,71$);
- между содержанием металла в черве и биоаккумуляцией ($r=-0,77$);
- между содержанием металла в почве и биоаккумуляцией ($r=-0,78$);
- между скоростью накопления и биоаккумуляцией ($r=-0,77$).

Снижение концентрации Zn в теле *E. fetida* на 28 сутки, по сравнению с 14 сутками является адаптивной реакцией педобионта на внесение НЧ в почву. Это, во-первых, связано с адаптацией червя к субстрату, и во-вторых, со способностью *E. fetida* регулировать содержание Zn в теле.

Черви, по мнению А. J. Morgan и В. Morris (1982) могут регулировать содержание в теле Zn до концентрации в почве до 560 мг/кг, выше этой концентрации происходит значительное накопление металла. Этими выводами объясняется многие полученные нами результаты, в частности высокая

смертность при концентрации 500 мг/кг и отсутствие адаптации к высоким концентрациям поллютантов.

Таким образом, наибольший токсический эффект среди тест-объектов был получен при дозе НЧ Zn 250-500 мг/кг, обоснованный поведенческими реакциями, ростовыми характеристиками и стимуляцией ферментативной активности в организме червя. Отсутствие эффекта при 1000 мг/кг НЧ может быть связано с формированием агрегатов наночастиц. Адаптивные реакции тест-объектов направлены на изменение активности ферментов антиоксидантной защиты и выведения металла из организма.

3.3 Влияние НЧ Zn на индикаторные показатели представителей агробиоценоза на почве, представленной черноземом южным

Выживаемость червей в контроле на протяжении всего эксперимента составила 100 %. В опытных группах показатель находился в диапазоне от 80 до 95% (рисунок 11).

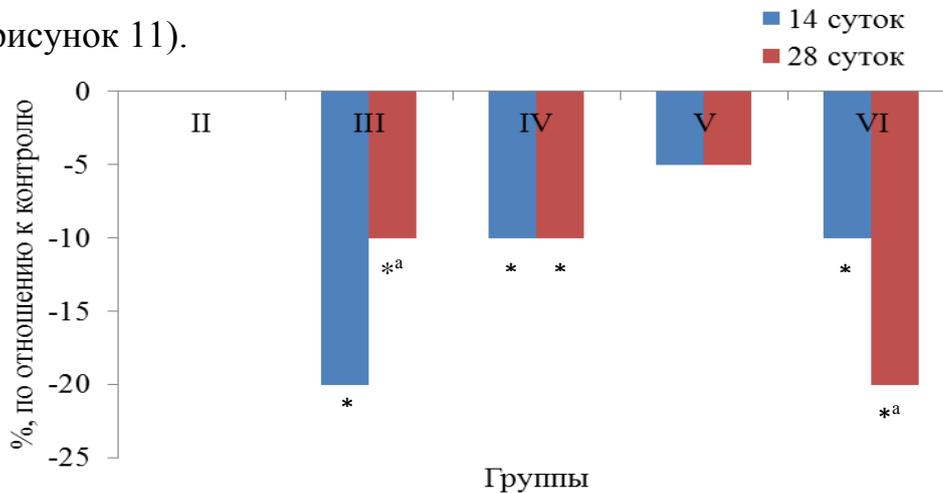


Рисунок 11 – Выживаемость *fetida* при внесении НЧ Zn в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Масса червей в опытных группах на протяжении всего эксперимента была ниже контрольных значений. На 14 сутки эксперимента статистически достоверным было снижение массы на 8,9% ($p \leq 0,05$), по сравнению с контролем,

в IV группе (рисунок 12). На 28 сутки достоверное снижение массы червей, по сравнению с контролем, отмечали при концентрации 250-1000 мг НЧ (на 6,3-7,0 %, $p \leq 0,05$).

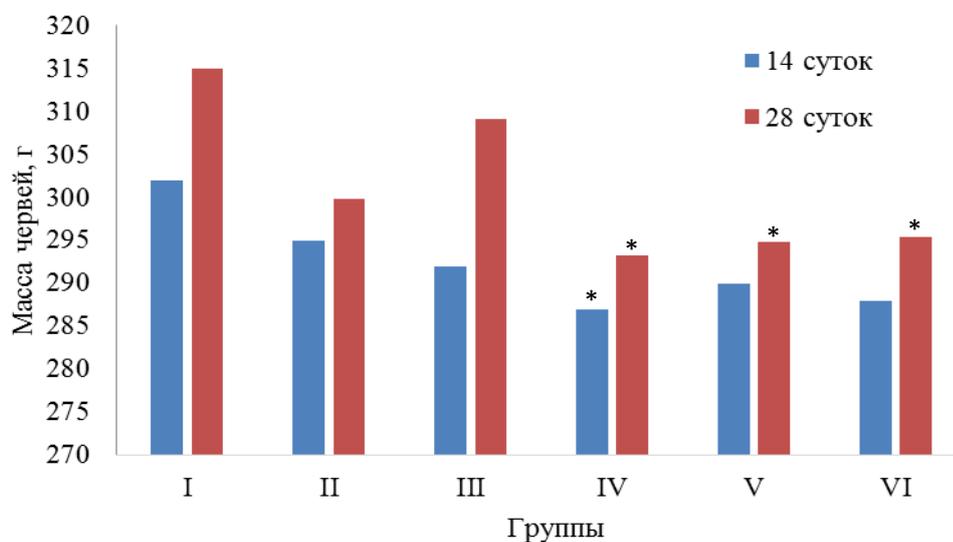


Рисунок 12 - Масса *E. fetida* при внесении НЧ Zn в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Содержание белка в организме червей было, преимущественно, ниже контрольных значений на протяжении всего эксперимента, кроме II группы на 28 сутки (содержание белка выше контроля на 51,6 %, $p \leq 0,05$) (рисунок 13).

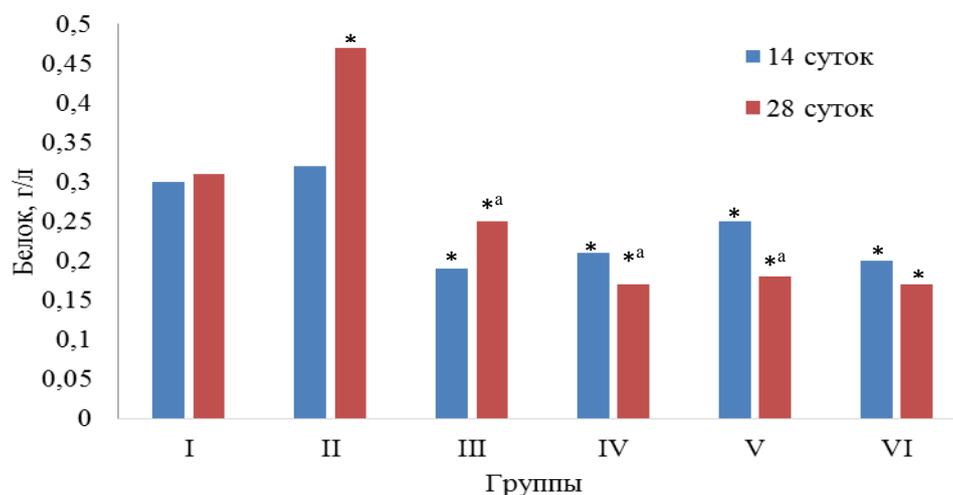


Рисунок 13 - Содержание белка в *E. fetida* при внесении НЧ Zn в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 14 сутки отмечали снижение массы червей в концентрации 100-1000 мг/кг НЧ (на 19,3 %-45,1 %, $p \leq 0,05$). По сравнению с 14 сутками, в концентрации 100-1000 мг кг НЧ, масса снизилась на 17,6-31,5 % ($p \leq 0,05$).

В ответ на добавление НЧ в среду обитания изменялась активность ферментов антиоксидантной защиты *E. fetida* (таблица 4).

Таблица 4 – Активность антиоксидантных ферментов и содержание МДА в теле *E. fetida* при внесении НЧ Zn в чернозем южный.

Показатель	Группы					
	I	II	III	IV	V	VI
СОД, ингибирования аутоокисления адреналина %	97,0±5,30	116,5±7,52*	106,3±7,76	93,3±5,47	92,1±6,10	85,6±5,82*
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /л×мин	8076±205,8	6166±312,1*	5384±213,7*	3283±158,4*	3151±127,3*	3112±179,4*
МДА, мкмоль/л	0,02±0,005	0,048±0,0024*	0,03±0,001*	0,025±0,0011	0,06±0,02*	0,021±0,0005

Примечание: *различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой

На 28 сутки эксперимента активность СОД во II группе была выше контроля на 20,1 % ($p \leq 0,05$), а при концентрации НЧ Zn 1000 мг/кг снизилась на 17,7 % ($p \leq 0,05$). Активность каталазы в теле *E. fetida* снижалась во всех опытных группах на 23,6-61,5 % ($p \leq 0,05$), относительно контроля. Было отмечено накопление малонового альдегида во II, III и V опытных группах (содержание МДА было выше контроля в 2,4 раза, в 1,5 раза и в 3 раза, соответственно, $p \leq 0,05$), что свидетельствуют о развитии окислительного стресса.

Содержание Zn в теле *E. fetida* превосходило контрольные значения в концентрации 100-1000 мг/кг НЧ на 14 сутки (в 1,6-3,1 раза, $p \leq 0,05$) и 28 сутки (в 1,6-2,3 раза, $p \leq 0,05$). На 28 сутки содержание Zn было выше содержания металла на 14 сутки во всех опытных группах, кроме VI (в 1,3-1,4 раза, $p \leq 0,05$) (Рисунок 14).

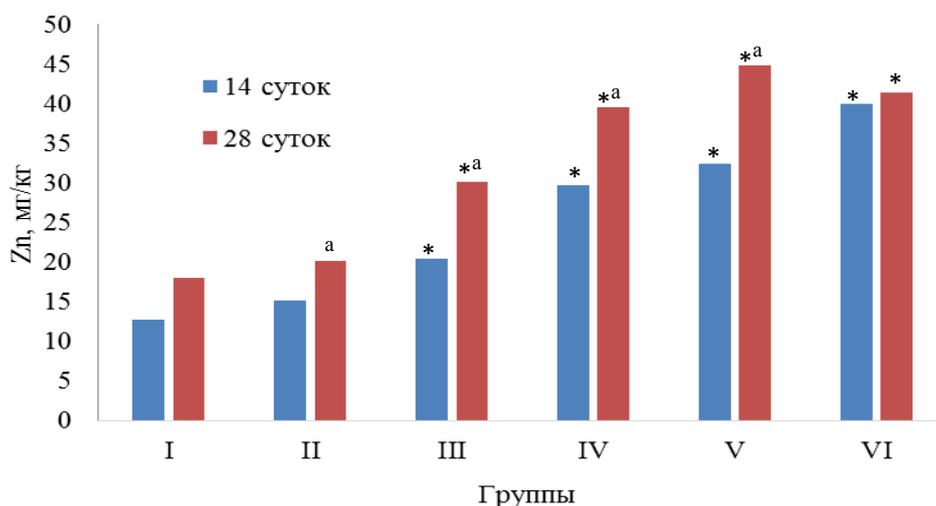


Рисунок 14 – Содержание Zn в теле *E.fetida* при внесении НЧ Zn в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

В почве содержание цинка возрастало на протяжении всего эксперимента (рисунок 15).

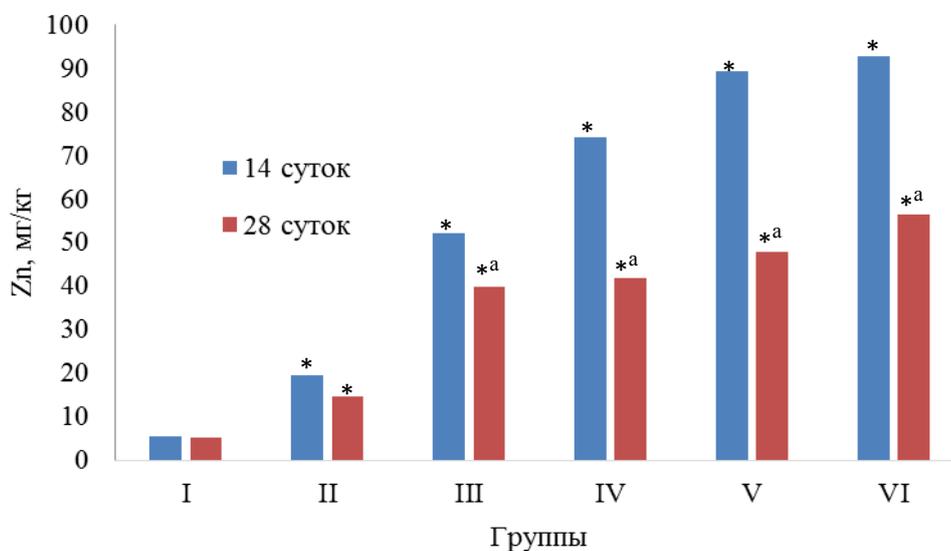


Рисунок 15 – Содержание Zn в почве при внесении НЧ Zn в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 14 сутки и 28 сутки показатель был выше контроля в 3,5-16,8 раза ($p \leq 0,05$) и 2,7-10,6 раза ($p \leq 0,05$), соответственно. На 28 сутки содержание цинка в почве при внесении НЧ Zn снижалось, по сравнению с 14 сутками опыта при концентрации НЧ 100-1000 мг/кг почвы (в 1,3-1,6 раза, $p \leq 0,05$). Скорость накопления цинка была выше контрольных значений в опытных группах на 14 сутки (в 2,3-16 раза, $p \leq 0,05$) и 28 сутки эксперимента (в 2,8-6,4 раза, $p \leq 0,05$). При этом на 28 сутки эксперимента имелись достоверные различия в показателях во II и III группах, по сравнению с 14 сутками (в 2,3 раза и 1,6 раза выше, соответственно, чем на 14 сутки, $p \leq 0,05$) (рисунок 16).

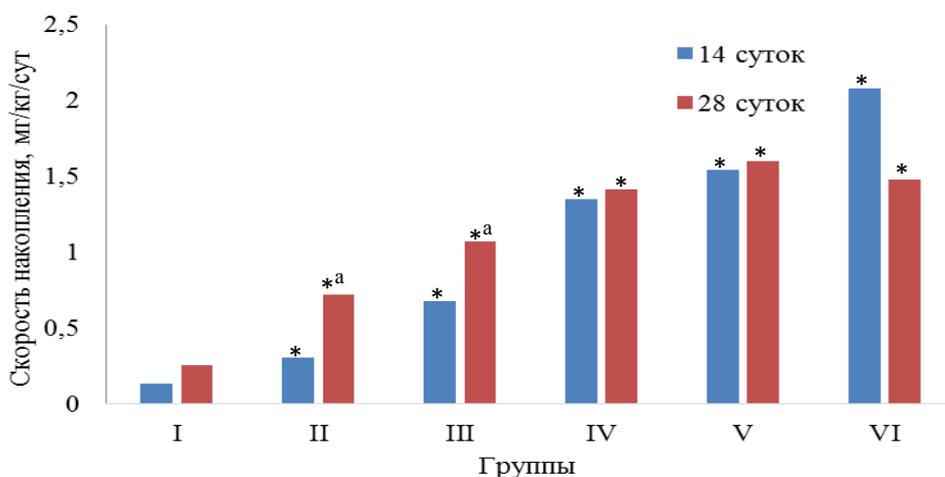


Рисунок 16 – Скорость накопления Zn в теле *E.fetida* при внесении НЧ Zn в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На рисунке 14 представлены данные о биоаккумуляции Zn. Биоаккумуляция цинка в опытных группах была ниже контроля на 14 и 28 сутки в 3-5,9 раза и в 2,4-4,6 раза, соответственно ($p \leq 0,05$) (рисунок 17). На 28 сутки биоаккумуляция в опытных группах была выше, чем на 14 сутки в 1,7-2,6 раза ($p \leq 0,05$).

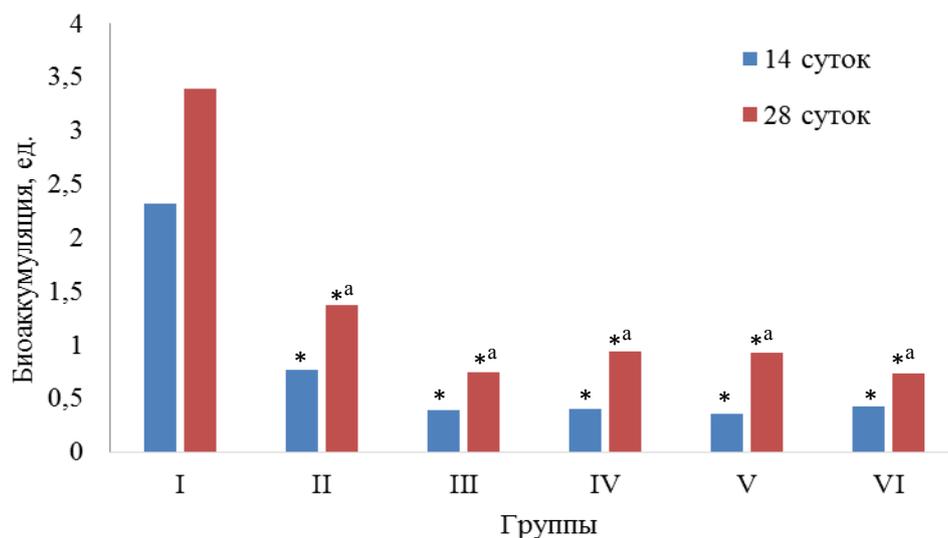


Рисунок 17 – Биоаккумуляция в теле *E.fetida* при внесении НЧ Zn в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Численность некоторых эколого-трофических групп почвенных микроорганизмов. НЧ Zn проявляли бактерицидное и фунгицидное действие на почвенную микрофлору (рисунок 18).

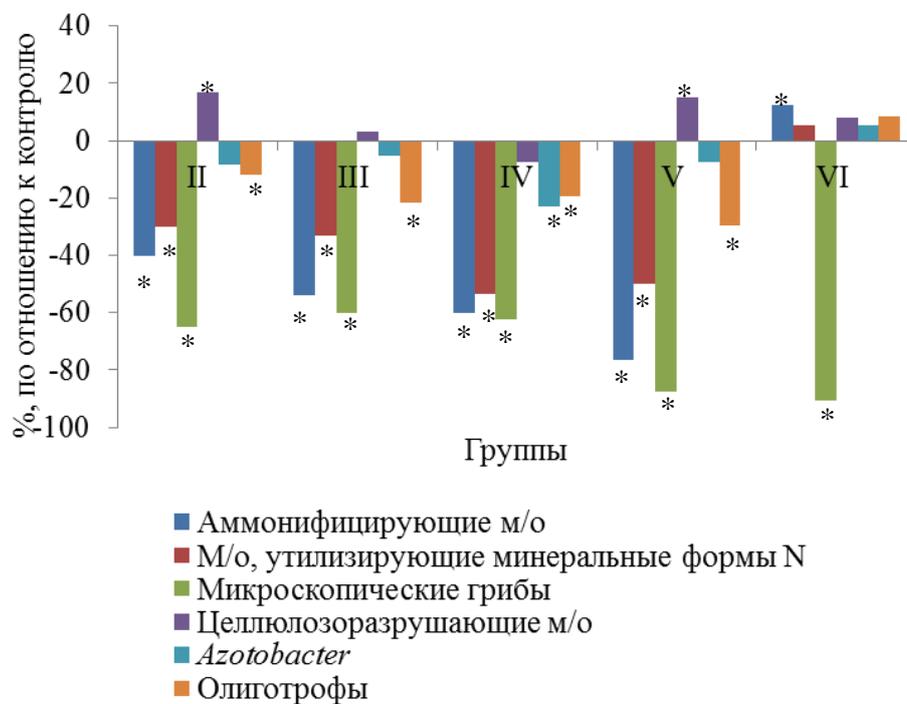


Рисунок 18 – Изменение состава микрофлоры кишечника *E.fetida* при внесении НЧ Zn в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Во II, III, IV и V группах в кишечнике червя снижалась численность аммонифицирующих и микроорганизмов, утилизирующих минеральные формы азота, бактерий рода *Azotobacter* и олиготрофов. Фунгицидное действие НЧ выражалась в уменьшении количества микроскопических грибов на 60-90 %. Во II и III группах НЧ Zn стимулировали рост численности целлюлозоразрушающих микроорганизмов (рисунок 18).

В почве наблюдалось снижение исследуемых групп микроорганизмов, кроме целлюлозолитических бактерий, чья численность в концентрации 50-100 мг/кг НЧ возросла на 5-25 % (рисунок 19).

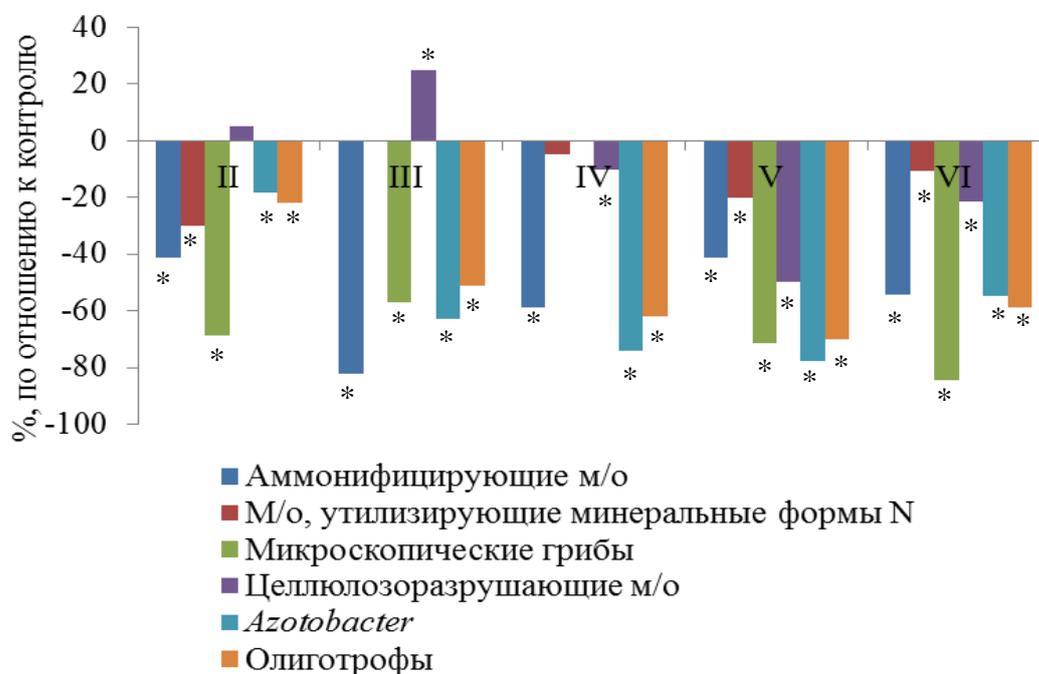


Рисунок 19 – Изменение состава микрофлоры почвы при внесении НЧ Zn в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Численность аммонифицирующих бактерий уменьшалась на 41,1-82,3 %; микроорганизмов, утилизирующих минеральный азот – на 5,0-30,0 %; микроскопических грибов – на 57,1-84,3 %; бактерий рода *Azotobacter* – на 18,5-77,7 %; олиготрофов – на 21,8-72,2 % (рисунок 19).

Действие НЧ Zn на растение *T. vulgare* выражалось в фитотоксическом действии, о чем свидетельствовал фитозэффект, который был менее 20 % во всем диапазоне концентраций. Наибольшая фитотоксичность была отмечена в III группе. Всхожесть семян была на 30-50 % ($p \leq 0,05$) ниже контроля в III и IV группе (рисунок 20).

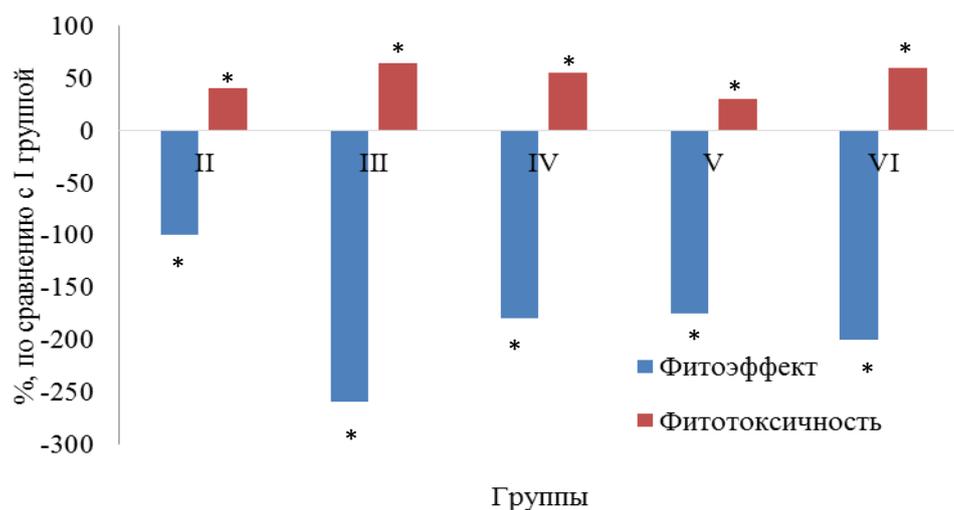


Рисунок 20 – Фитозэффект и фитотоксичность *T. vulgare* при внесении НЧ Zn в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

При анализе корреляционных зависимостей было показано, что имеется прямая корреляция между такими параметрами:

- масса червей с содержанием белка ($r=0,52$);
- масса червей с активностью КАТ ($r=0,92$);
- масса червей с биоаккумуляцией ($r=0,82$);
- содержание белка с активностью СОД ($r=0,69$);
- содержание белка с активностью КАТ ($r=0,68$);
- содержание белка с биоаккумуляцией ($r=0,52$);
- активностью СОД с активностью КАТ ($r=0,57$);
- активностью КАТ и биоаккумуляцией ($r=0,84$);
- содержанием металла в черве и содержанием металла в почве ($r=0,95$);

- содержанием металла в почве и скоростью накопления металла ($r=0,96$).

Обратная корреляция была отмечена между:

- массой червей и содержанием металла в черве ($r=-0,81$);
- массой червей и содержанием металла в почве ($r=-0,82$);
- массой червей и скоростью накопления ($r=-0,85$);
- содержанием белка и содержанием металла в черве ($r=-0,75$);
- содержанием белка и содержанием металла в почве ($r=-0,80$);
- содержанием белка и скоростью накопления ($r=-0,72$);
- активностью СОД и содержанием металла в черве ($r=-0,74$);
- активностью СОД и содержанием металла в почве ($r=-0,64$);
- активностью СОД и скоростью накопления ($r=-0,65$);
- активностью КАТ и содержанием металла в черве ($r=-0,94$);
- активностью КАТ и содержанием металла в почве ($r=-0,95$);
- активностью КАТ и скоростью накопления ($r=-0,95$);
- биоаккумуляцией и содержанием металла в черве ($r=-0,69$);
- биоаккумуляцией и содержанием металла в почве ($r=-0,80$);
- биоаккумуляцией и скоростью накопления металла ($r=-0,76$).

Таким образом, приспособительные реакции тест-объектов выразились в модулировании активности ферментов антиоксидантной защиты (так как НЧ могут генерировать активные формы кислорода), изменении содержания белка в теле и численности групп микроорганизмов в кишечнике червя, уменьшении всхожести растительных тест-объектов.

3.4 Влияние НЧ Си на индикаторные показатели представителей агробиоценоза на искусственном субстрате

Выживаемость червей в контроле на всем протяжении эксперимента была 100 %. На 14 сутки в V группе выживаемость составила 80 % ($p \leq 0,05$), а на 28 сутки –20 % ($p \leq 0,05$).

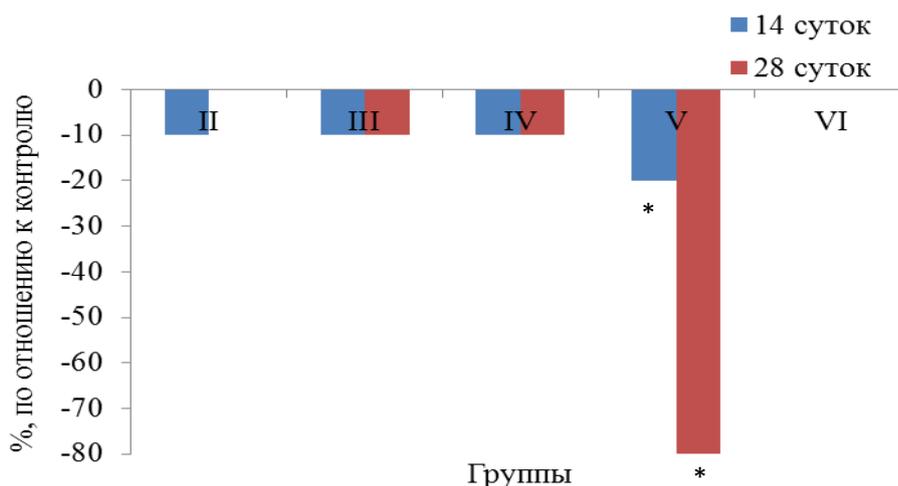


Рисунок 21 - Выживаемость *E. fetida* при внесении НЧ Си в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Масса червей снижалась под влиянием НЧ в искусственной почве на 14 сутки во II (на 12,1 %, $p \leq 0,05$) и IV группе (на 24,8 %, $p \leq 0,05$), на 28 сутки – в III-VI группе (на 25,3-50 %, $p \leq 0,05$), по сравнению с контролем. В V и VI группе на 28 сутки масса снизилась на 33,5-45,7 %, по сравнению с 14 сутками ($p \leq 0,05$) (рисунок 22).

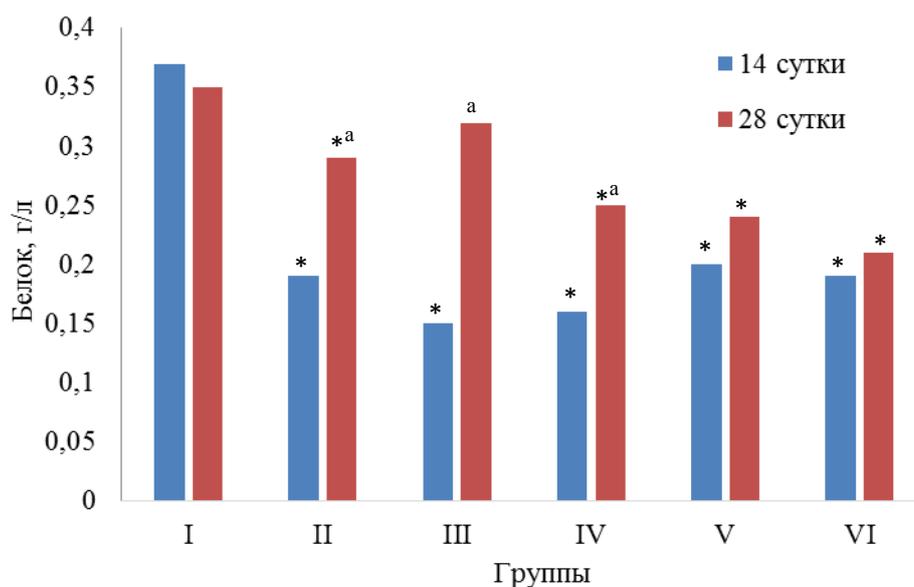


Рисунок 22 – Масса *E. fetida* при внесении НЧ Си в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Содержание белка в теле *E. fetida* при внесении НЧ Си в искусственную почву снижалось. На 14 сутки снижение составило 45,9-59,4 % ($p \leq 0,05$), по сравнению с контролем, на 28 сутки – 8,5-40 % ($p \leq 0,05$). Наиболее выраженным на 28 сутки было снижение содержание белка в VI группе (на 40 %, по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$) (рисунок 23). На 28 сутки содержание белка было выше, чем на 28 сутки воо II-IV группе в 1,5-2,1 раза ($p \leq 0,05$).

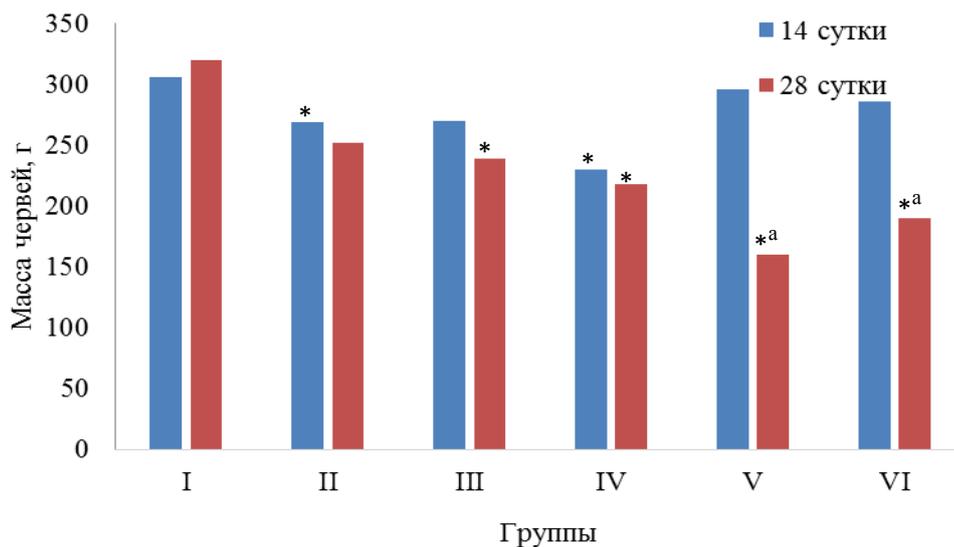


Рисунок 23 – Содержание белка в *E. fetida* при внесении НЧ Си в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Активность ферментов антиоксидантной защиты изменялась при внесении НЧ. Активность СОД снижалась на 58,3-69,5% ($p \leq 0,05$), по сравнению с контролем в концентрации НЧ 100-1000 мг/кг. Активность каталазы была выше в опытных группах. Наиболее выраженным было повышение во II (в 4,1 раза, $p \leq 0,05$), IV (в 1,65 раза, $p \leq 0,05$), V (в 2,7 раза, $p \leq 0,05$) и VI группе (в 2,02 раза, $p \leq 0,05$).

Содержание МДА было в 12 раз ниже контроля ($p \leq 0,05$) при концентрации 1000 мг/кг НЧ (таблица 5).

Таблица 5 – Активность антиоксидантных ферментов и содержание МДА в теле *E. fetida* при внесении НЧ Cu в искусственную почву

Показатель	Группы					
	I	II	III	IV	V	VI
СОД, % ингибирования аутоокисления адреналина	44,3± 2,30	44,2± 2,21	13,5± 0,65*	15,2±0,92 *	18,3±0,70*	18,4±0,49*
Каталаза, мкмоль Н ₂ О ₂ /л×мин	93,5± 4,21	386± 12,07*	98,4± 3,52	154±7,69*	253±11,18*	189±8,22*
МДА, мкмоль/л	0,12± 0,005	0,12± 0,001	0,16±0,0 01	0,14±0,00 1	0,14±0,001	0,01± 0,002*

Примечание: *различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой

Первоначальное содержание Cu в черве составило 6.25 мг/кг. На 14 сутки превышение показателя было отмечено во всех опытных группах (в 1,6-1,7 раза, $p \leq 0,05$), на 28 сутки - в 1,3-1,8 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

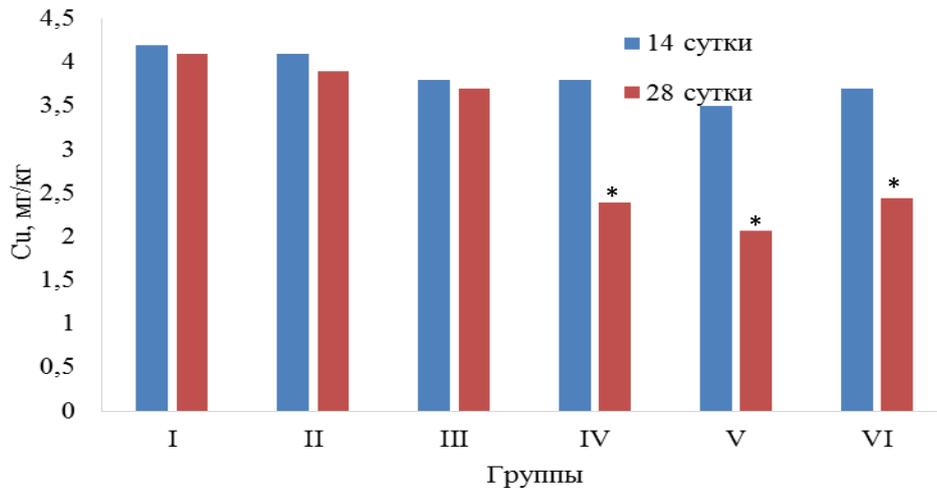


Рисунок 24 – Содержание Cu в теле *E. fetida* при внесении НЧ Cu в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Концентрация меди в почве при добавлении НЧ Cu на 28 сутки снизилась незначительно, по сравнению с контролем (Рисунок 25). Содержание Cu в почве снижалось на 28 сутки, по сравнению с 14 сутками, что было отмечено для IV, V

и VI группы – на 36,8 % ($p \leq 0,05$), 40,8 % ($p \leq 0,05$) и 33,7 % ($p \leq 0,05$), соответственно. При этом на 28 сутки в IV-VI группе содержание Cu снизилось в 1,5-1,7 раза ($p \leq 0,05$), по сравнению с 14 сутками эксперимента.

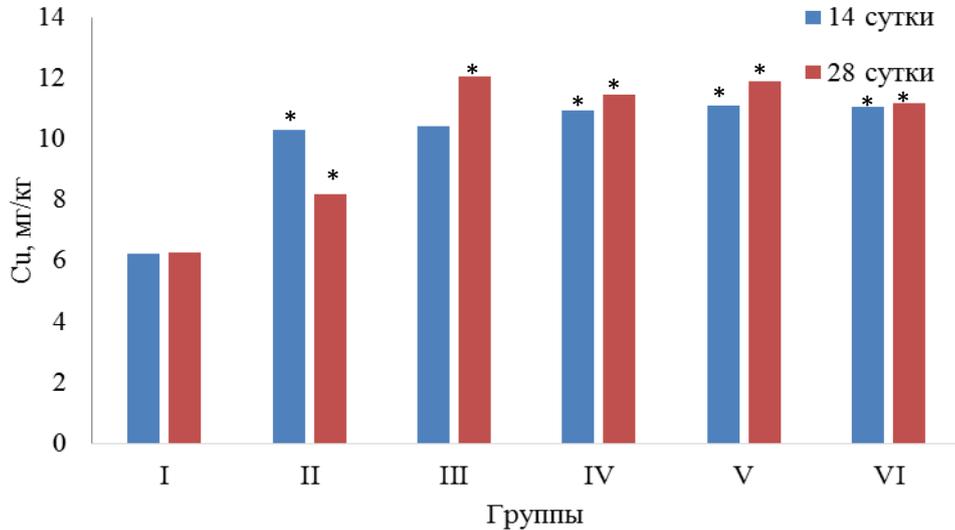


Рисунок 25 – Содержание Cu при внесении НЧ Cu в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Скорость накопления Cu в теле *E. fetida* на 14 и 28 сутки была выше контрольных значений в 2,8-4,2 раза и в 2-2,4 раза, соответственно ($p \leq 0,05$) (рисунок 26).

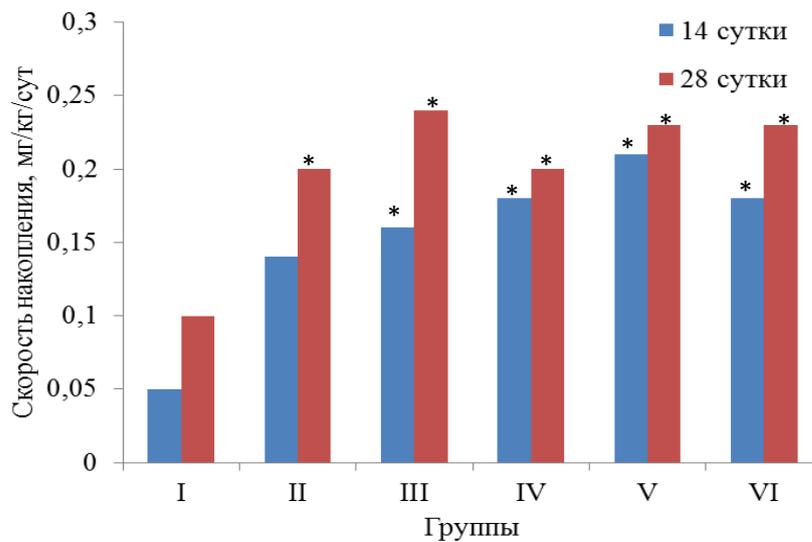


Рисунок 26– Скорость накопления Cu в теле *E. fetida* при внесении НЧ Cu в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 14 и 28 сутки биоаккумуляция металла в черве была выше контроля в 2,4-3,7 раза ($p \leq 0,05$) и в 1,9-2,3 раза ($p \leq 0,05$), соответственно (рисунок 27). На 28 сутки биоаккумуляция в опытных группах превышала таковые значения на 14 сутки в 1,8-2,6 раза ($p \leq 0,05$).

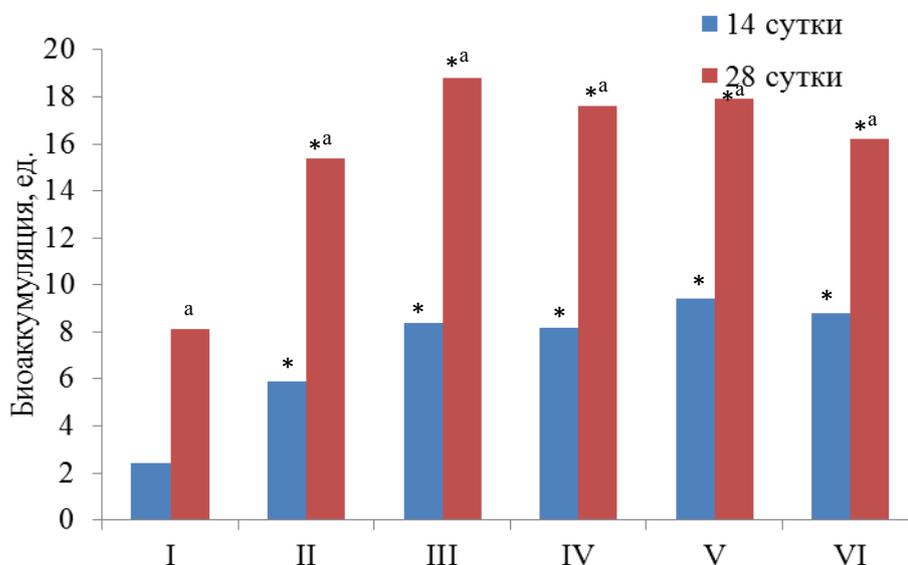


Рисунок 27 – Биоаккумуляция Cu в теле *E.fetida* при внесении НЧ Cu в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

При этом минимальная пороговая концентрация регуляции для Cu составила 29 мг/кг, что свидетельствует о способности червя контролировать обмен высвобожденной меди, и опосредованно может снижать токсическую нагрузку на почвенный биоценоз при определенной степени загрязнения.

При анализе корреляционных зависимостей было показано, что имеется прямая корреляция между такими параметрами как:

- масса червей и активность СОД ($r=0,55$);
- содержанием металла в черве и содержанием металла в почве ($r=0,77$);
- содержанием металла в черве и скоростью накопления ($r=0,82$);
- содержанием металла в почве ($r=0,84$) и скоростью накопления ($r=0,79$);
- биоаккумуляцией и содержанием металла в почве ($r=0,89$).

Обратная корреляция была отмечена между:

- массой червей и содержанием металла в черве ($r=-0,65$);
- содержанием белка и содержанием металла в почве ($r=-0,57$);
- активностью СОД и содержанием металла в черве ($r=-0,83$).

Различная степень аккумуляции меди в организме червя оказала влияние на активность антиоксидантных ферментов, в зависимости от концентрации наночастиц Cu и сроков экспозиции.

Таким образом, адаптивная реакция тест-объектов к внесению НЧ выразилась в нарастании окислительного стресса в теле *E. fetida*, снижении жизнеспособности и массы тела, повышению содержания Cu в теле *E. fetida*.

3.5 Влияние НЧ Cu на индикаторные показатели представителей агробиоценоза на почве, представленной черноземом южным

Выживаемость червей составила 100 % в I и VI группе (рисунок 28), в то время в V группе на 14 и 28 сутки, выживаемость снизилась на 20 % и 80 %, соответственно ($p \leq 0,05$).

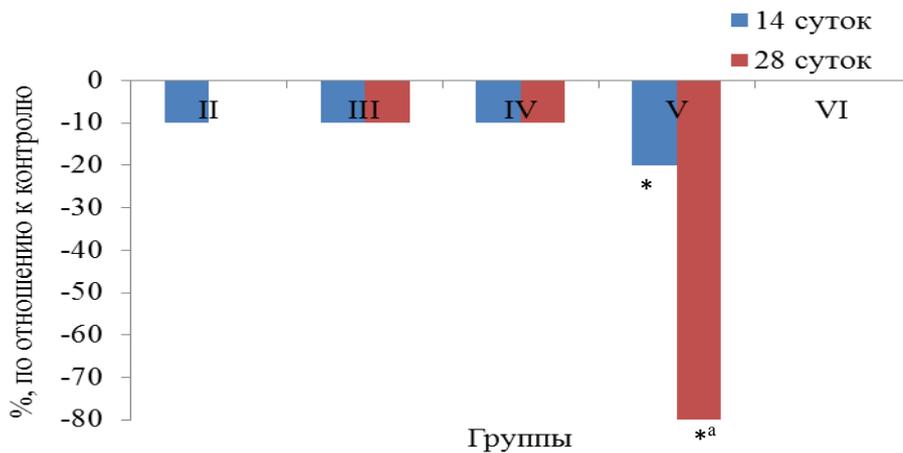


Рисунок 28 - Выживаемость *E. fetida* при внесении НЧ Cu в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Масса червей снижалась при внесении НЧ во II группе на 6,2 % на 14 сутки ($p \leq 0,05$) (Рисунок 29), по сравнению с контролем. На 28 сутки масса червей снижалась в IV и V группе (на 9,4 % и 8,7 %, соответственно, $p \leq 0,05$).

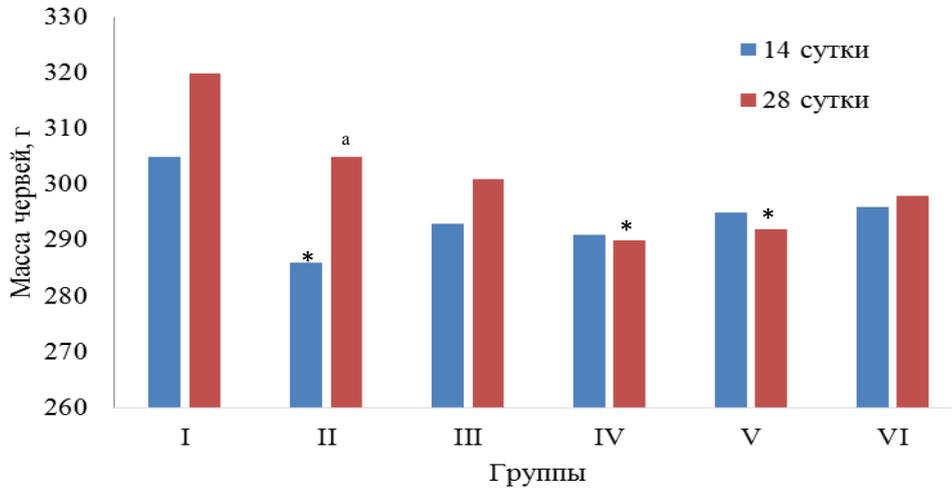


Рисунок 29 – Масса *E. fetida* при внесении НЧ Си в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Содержание белка в теле червей на 14 сутки имела достоверные различия с контролем при концентрации НЧ 1000 мг/кг (на 47,3 % ниже контроля, ($p \leq 0,05$) (рисунок 30).

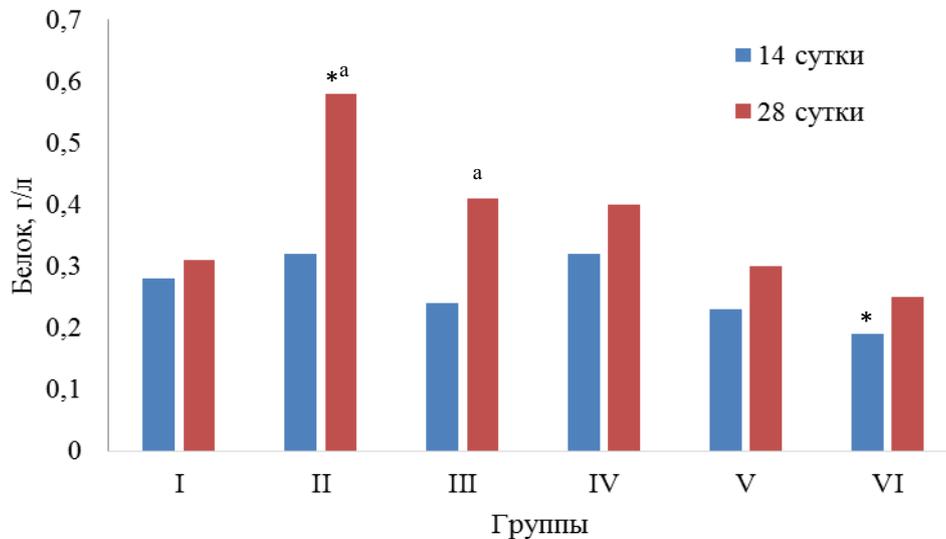


Рисунок 30 – Содержание белка в *E. fetida* при внесении НЧ Си в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 28 сутки содержание белка было выше, чем в контроле во II-IV группе (на 29,0-87,1 %, ($p \leq 0,05$)). По сравнению с 14 сутками, на 28 сутки во II и III группе содержание белка было выше на 70,8-82,1% ($p \leq 0,05$) (Рисунок 30).

Активность СОД была ниже контрольных значений в IV (на 13,9% , $p \leq 0,05$) и V группе (на 22,1 %, $p \leq 0,05$). Активность каталазы в концентрации НЧ 250 мг/кг была выше контроля на 15,5 %, ($p \leq 0,05$), при концентрации НЧ 500 мг/кг – ниже на 16,1 % ($p \leq 0,05$). Накопление МДА в теле *E. fetida* отмечалось в III, V и VI группе (на 37,5 %, 62,5 % и 62,5 % выше контроля, соответственно, $p \leq 0,05$) (таблица 6).

Таблица 6 – Активность антиоксидантных ферментов и содержание МДА в теле *E. fetida* при внесении НЧ Cu в чернозем южный

Показатель	Группы					
	I	II	III	IV	V	VI
СОД, % ингибирования аутоокисления адреналина	58,2±2,20	60,5±3,15	61,4±2,75	50,1±1,07*	45,3±1,78*	55,5±2,05
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /л×мин	65,1±2,12	70,5±4,02	71,6±3,55	75,2±2,98*	54,6±2,46*	61,7±3,71
МДА, мкмоль/л	0,08±0,001	0,09±0,003	0,11±0,010*	0,10±0,003	0,13±0,001*	0,13±0,005*

Примечание: *различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой

Содержание Cu в теле *E. fetida* при инкубации в черноземе южном на 14 сутки было выше контроля в 2,1-4,8 раза, на 28 сутки – в 1,3-1,72 раза ($p \leq 0,05$). На 28 сутки содержание металла было выше в теле червя, по сравнению с 14 сутками, в 1,8-3,1 раза ($p \leq 0,05$) (Рисунок 31).

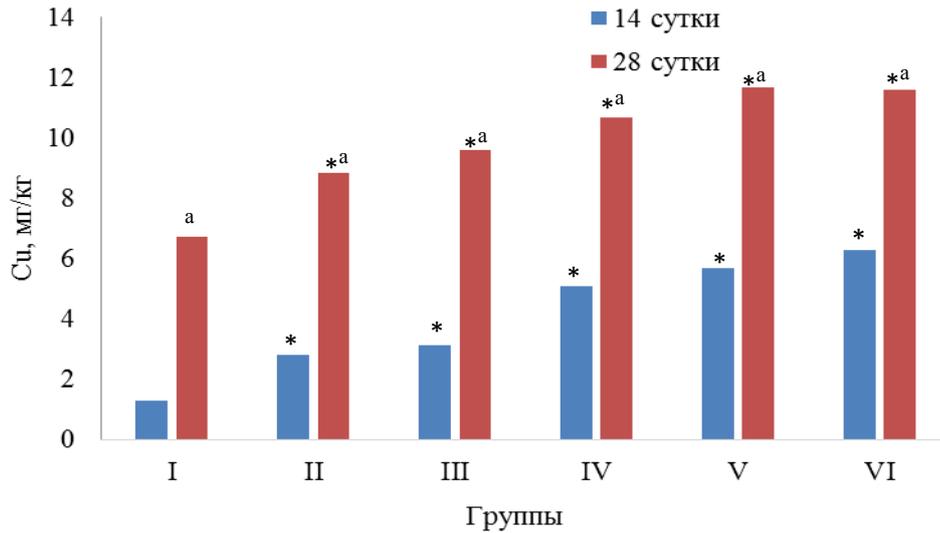


Рисунок 31 – Содержание Cu в теле *E.fetida* при внесении НЧ Cu в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Содержание Cu в почве на 14 сутки было выше контроля при концентрации 250-1000 мг/кг НЧ (в 5,1-9,4 раза, $p \leq 0,05$) (рисунок 32).

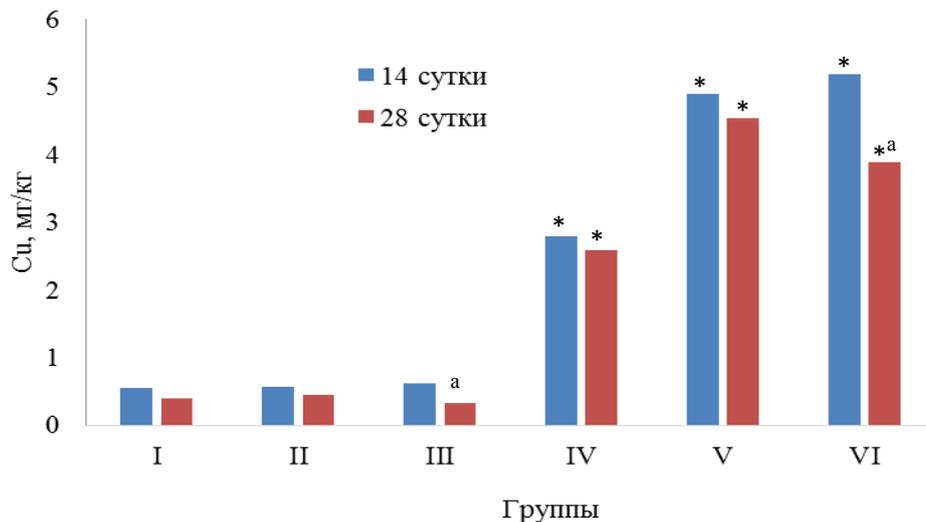


Рисунок 32 – Содержание Cu в почве при внесении НЧ Cu в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 28 сутки также содержание Cu в почве было выше контроля при концентрации 250-1000 мг/кг НЧ (в 6,5-11,4 раза, $p \leq 0,05$). На 28 сутки

содержание меди было ниже, чем на 14 сутки в III и VI группе на 46,8 % и 25,0 % ($p \leq 0,05$).

Скорость накопления Cu в теле *E. fetida* была выше контроля на 14 и 28 сутки при концентрации НЧ 250-1000 мг/кг (в 1,8-2,4 раза и в 1,5-1,8 раза, соответственно, $p \leq 0,05$) (рисунок 33).

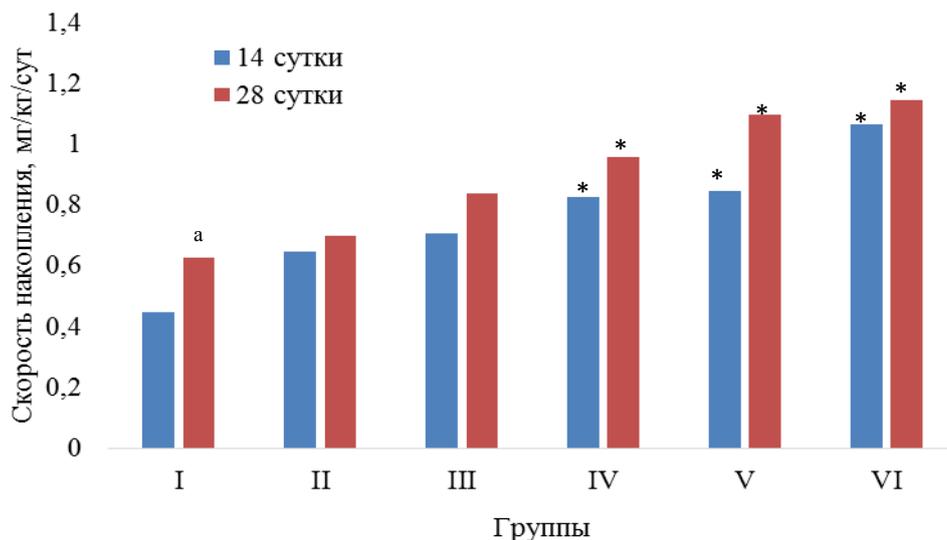


Рисунок 33 – Скорость накопления Cu в теле *E.fetida* при внесении НЧ Cu в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Максимальный уровень биоаккумуляции меди в 16,03 единиц был установлен в III группе на 28 сутки эксперимента. В опытных группах на 14 биоаккумуляция была выше контроля в 2,3-3,8 раза $p \leq 0,05$) (рисунок 34). На 28 сутки при концентрации НЧ 50 и 100 мг/кг, биоаккумуляция была выше контроля в 3,6 раза и 6,7 раза, соответственно ($p \leq 0,05$). По сравнению с 14 сутками эксперимента, на 28 сутки биоаккумуляция была выше контроля при концентрации НЧ 50-100 мг/кг (в 1,8-1,9 раза, $p \leq 0,05$) и ниже контроля при 250-1000 мг/кг (в 2,3-2,4 раза, $p \leq 0,05$).

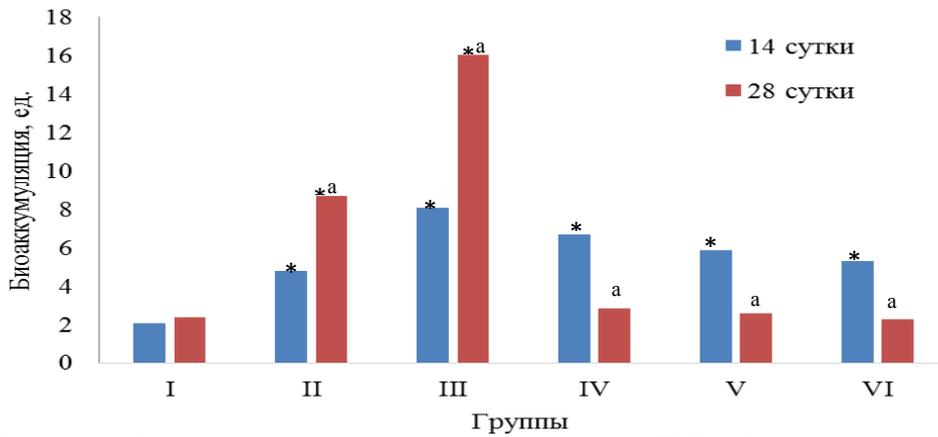


Рисунок 34 – Биоаккумуляция Cu в теле *E.fetida* при внесении НЧ Cu в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На рисунке 35 представлено изменение состава микрофлоры кишечника *E.fetida*.

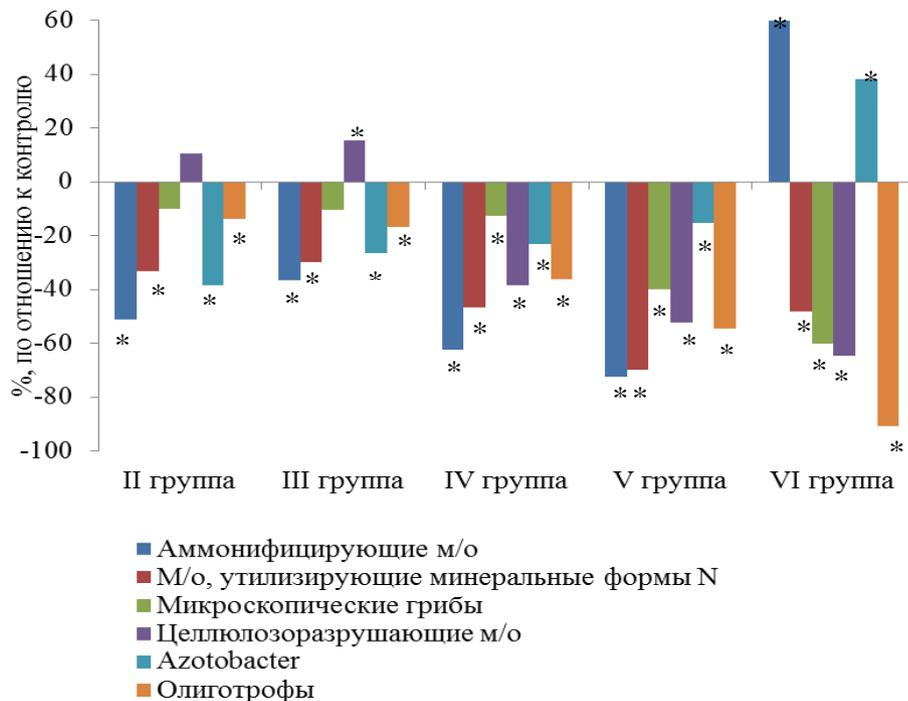


Рисунок 35 – Изменение состава микрофлоры кишечника *E.fetida* при внесении НЧ Cu в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Внесение НЧ вело к снижению численности микроскопических грибов (до 70 % в V группе) и олиготрофов (на 90 % в VI группе). Численность целлюлозоразлагающих микроорганизмов увеличивалась на 10,7 и 15,4 %, при внесении концентраций 50 и 100 мг/кг НЧ Cu,.

В почве отмечали стимулирование роста целлюлозоразлагающих микроорганизмов и бактерий рода *Azotobacter* при внесении концентраций от 50 до 250 мг/кг НЧ, и 100-500 мг/кг, соответственно (рисунок 36).

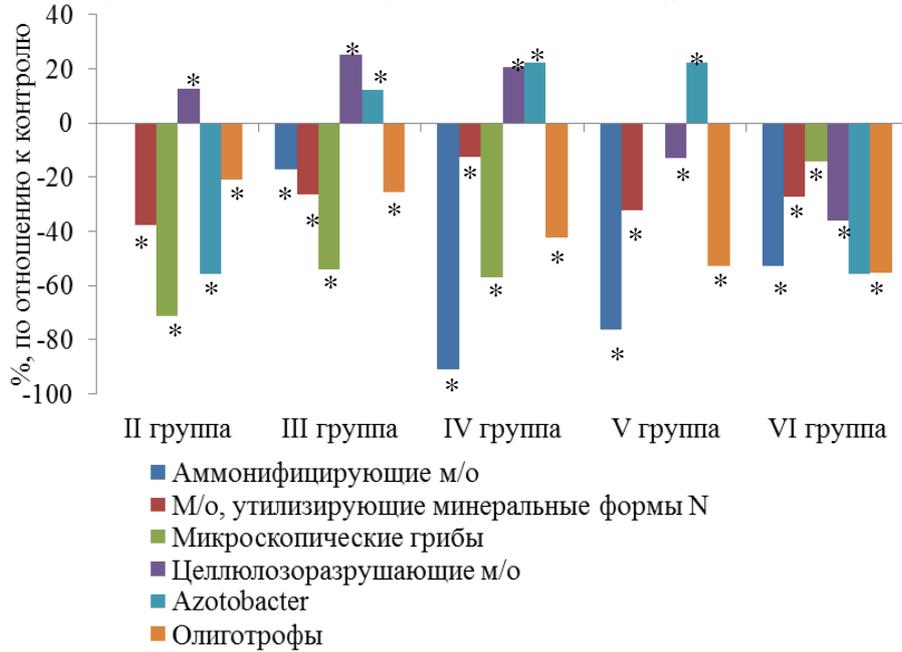


Рисунок 36 – Изменение состава микрофлоры почвы при внесении НЧ Cu в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Действие НЧ Cu на *T. vulgare* имело фитотоксическое действие, фитозффект был менее 20 % при 100-1000 мг/кг НЧ Cu (рисунок 37).

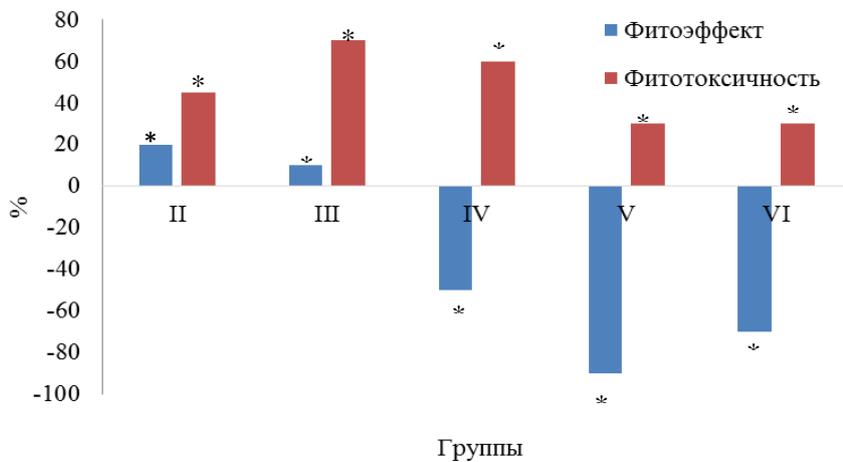


Рисунок 37 – Фитозффект и фитотоксичность *T. vulgare* при внесении НЧ Cu в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой)

Наибольшая фитотоксичность была отмечена для концентрации 100 мг/кг НЧ, что выражалось снижением всхожести семян была на 50 %, по сравнению с контролем (рисунок 37).

При анализе корреляционных зависимостей было показано, что имеется прямая корреляция между такими параметрами как:

- содержание белка и активность КАТ ($r=0,65$),
- содержание белка и биоаккумуляция ($r=0,50$);
- содержание белка и активность СОД;
- содержание белка и активность КАТ ($r=0,52$);
- содержание белка и биоаккумуляция ($r=0,82$);
- активность КАТ и биоаккумуляция ($r=0,53$);
- содержание МДА и содержание металла в черве ($r=0,90$);
- содержание МДА и содержание металла в почве ($r=0,85$);
- содержание МДА и скорость накопления ($r=0,90$);
- содержание металла в черве и содержание металла в почве ($r=0,88$);
- содержание металла в черве и скорость накопления ($r=0,97$);
- содержание металла в почве и скорость накопления ($r=0,89$).

Обратная корреляций была отмечена между:

- массой червей и содержанием МДА ($r=-0,50$);
- массой червей и содержанием металла в черве ($r=-0,60$);
- массой червей и содержанием металла в почве ($r=-0,50$);
- массой червей и скоростью накопления ($r=-0,61$);
- содержанием белка и содержанием МДА ($r=-0,55$),
- содержанием белка и содержанием металла в почве ($r=-0,60$);
- активностью СОД и содержанием МДА ($r=-0,54$);
- активностью СОД и содержанием металла в черве ($r=-0,65$);
- активностью СОД и содержанием металла в почве ($r=-0,8$),
- активностью СОД и скоростью накопления ($r=-0,65$);
- активностью КАТ и содержанием МДА ($r=-0,59$);
- активностью КАТ и содержанием металла в почве ($r=-0,64$);

- содержанием МДА ($r=$) и биоаккумуляцией ($r=-0,5$);
- содержанием металла в черве и биоаккумуляцией ($r=-0,62$);
- содержанием металла в почве и биоаккумуляцией ($r=-0,85$);
- скоростью накопления металл и биоаккумуляцией ($r=-0,62$).

Таким образом, адаптивные реакции тест-объектов выражались в изменении в теле *E. fetida* активности антиоксидантной системы под влиянием окислительного стресса при внесении НЧ в среду обитания, увеличении численности целлюлозоразлагающих микроорганизмов в кишечнике и снижении роста грибков. Также увеличилось содержание Cu в организме *E. fetida*. Семена *T. vulgare* в ответ на внесении НЧ в почву имели низкие показатели всхожести, по сравнению с контролем.

3.6 Влияние НЧ SiO_2 на индикаторные показатели представителей агробиоценоза на искусственном субстрате

Выживаемость червей во всем диапазоне концентраций была выше 95 %.

Масса червей при внесении НЧ SiO_2 в искусственную почву на 28 суток была выше контроля в IV и VI группе (на 10,8 % и 8,6 %, соответственно, $p \leq 0,05$) (Рисунок 38).

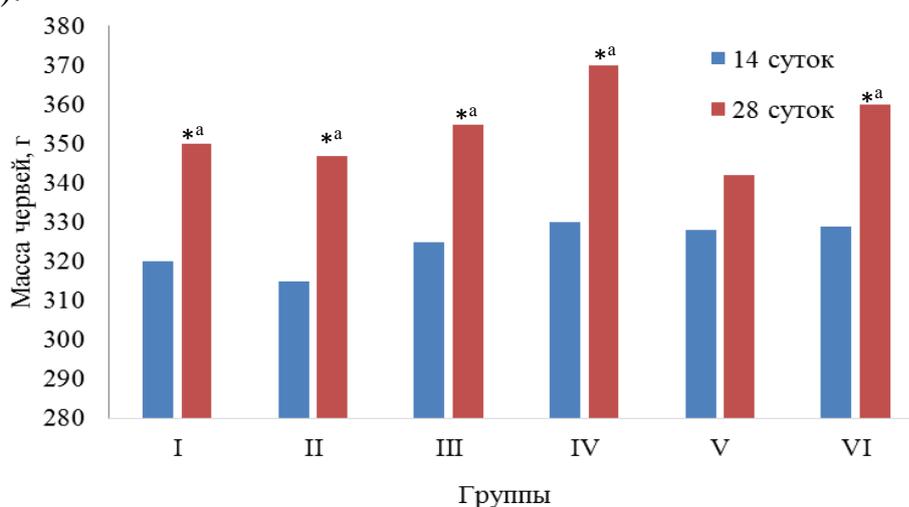


Рисунок 38 – Масса *E. fetida* при внесении НЧ SiO_2 в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Содержание белка в теле *E. fetida* было ниже контроля на 28 сутки в V группе (на 22,8 %, $\leq 0,05$) (Рисунок 39).

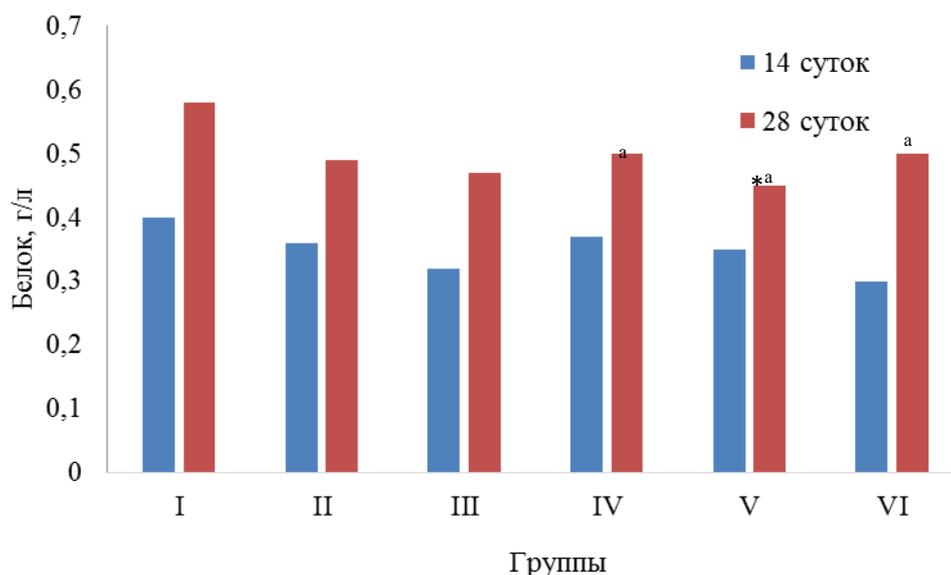


Рисунок 39 – Содержание белка в *E. fetida* при внесении НЧ SiO₂ в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 28 сутки содержание белка было выше, чем на 14 сутки при концентрации НЧ 250-500 мг/кг (на 28,5-66,7 %, $\leq 0,05$).

Активность СОД в теле *E. fetida* была на 15,9-45,3 % выше контроля ($p \leq 0,05$) (таблица 7).

Таблица 7 – Активность антиоксидантных ферментов и содержание МДА в теле *E. fetida* при внесении НЧ SiO₂ в искусственную почву

Показатель	Группы					
	I	II	III	IV	V	VI
СОД, % ингибирования аутоокисления адреналина	55,2±2,17	63,9±1,09*	69,2±3,11*	75,5±3,89*	80,2±4,10*	76,0±3,75*
Каталаза, мкмоль Н ₂ О ₂ /л×мин	2147±104,1	2037±96,3	1889±78,3*	1977±78,9	2028±69,1	2022±121,3
МДА, мкмоль/л	0,12±0,001	0,20±0,012*	0,14±0,036	0,14±0,012	0,13±0,005	0,13±0,011

Примечание: *различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой

Содержание Si в черве при внесении НЧ в искусственную почву на 14 сутки было выше контроля при концентрации НЧ 250-1000 мг/кг (на 8,7-19,0 %, $p \leq 0,05$), на 28 сутки – в концентрации НЧ 1000 мг/кг (на 8,2 %, $p \leq 0,05$) (рисунок 40).

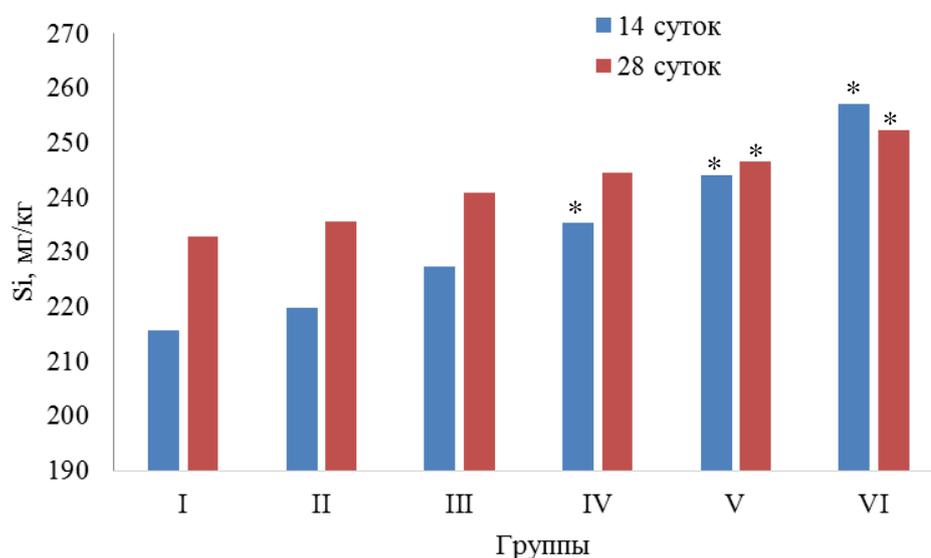


Рисунок 40 – Содержание Si в теле *E.fetida* при внесении НЧ SiO₂ в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Содержание Si в искусственной почве было выше контроля на 14 и 28 сутки в VI группе (на 10,2 % и 8,3 %, соответственно, $p \leq 0,05$) (рисунок 41).

Скорость накопления Si в опытных группах на 14 сутки была выше контроля в 1,8-8,8 раза ($p \leq 0,05$), а на 28 сутки – в 1,1-1,8 раза ($p \leq 0,05$).

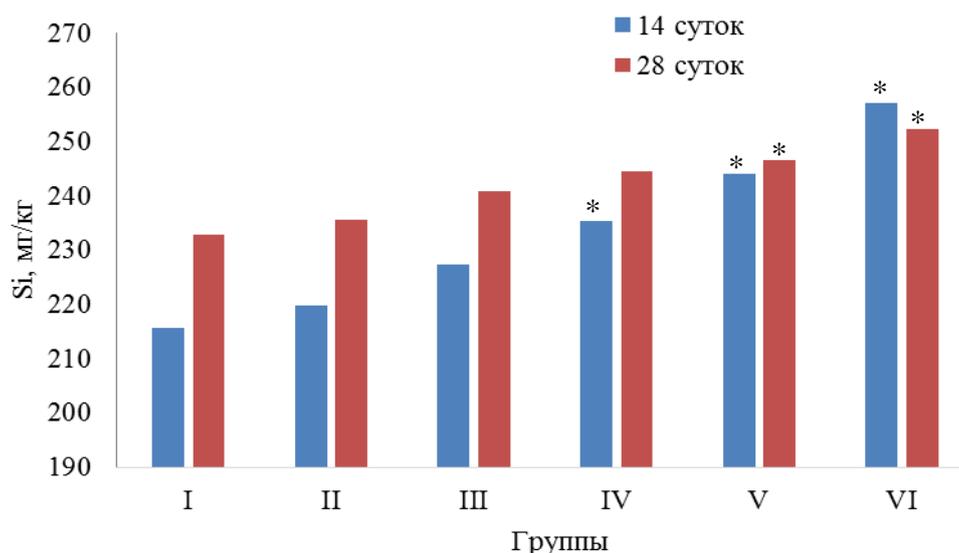


Рисунок 41 – Содержание Si в почве при внесении НЧ SiO₂ в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

По сравнению с 14 сутками, на 28 сутки накопление Si во II группе было выше контроля в 1,3 раза ($p \leq 0,05$), в то время как в III-VI группах – ниже в 1,12-2,2 раза ($p \leq 0,05$) (рисунок 42).

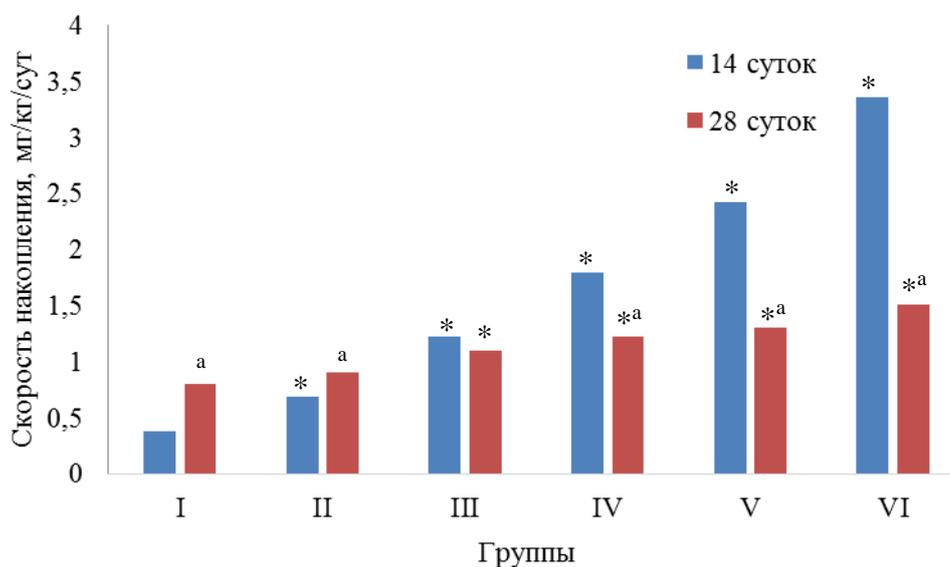


Рисунок 42 – Скорость накопления Si в теле *E. fetida* при внесении НЧ SiO₂ в искусственную почву (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Биоаккумуляция на всем протяжении эксперимента была в диапазоне 0,73-0,81 единиц и не имела достоверных различий с контролем (рисунок 43).

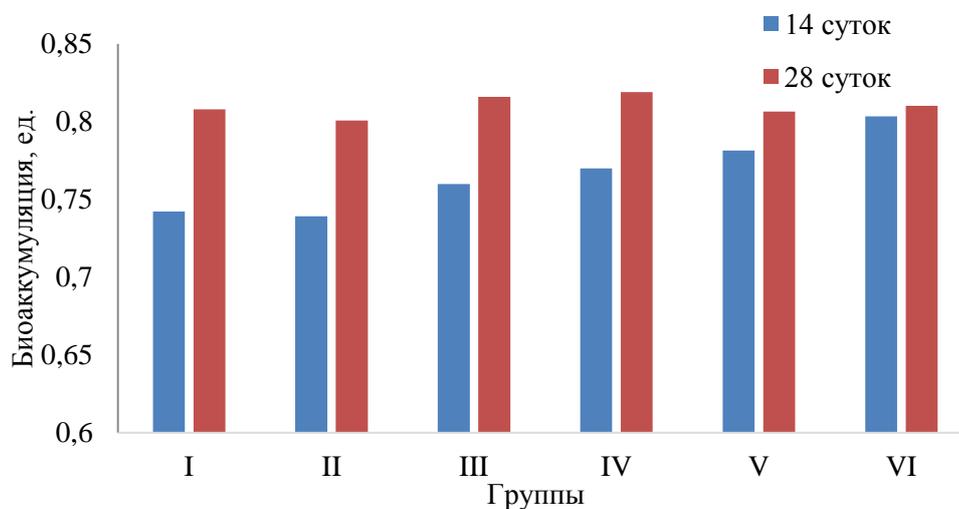


Рисунок 43 – Биоаккумуляция Si в теле *E.fetida* при внесении НЧ SiO₂ в искусственную почву

При анализе корреляционных зависимостей было показано, что имеется прямая корреляция между:

- массой червей и биоаккумуляцией ($r=0,0$);
- содержанием белка и активностью каталазы ($r=0,66$);
- активностью СОД и содержанием Si в черве ($r=0,87$);
- активностью СОД и содержанием Si в почве ($r=0,86$);
- активностью СОД и скоростью накопления ($r=0,87$);
- активностью СОД и биоаккумуляцией ($r=0,57$);
- содержанием Si в черве и содержанием Si в почве ($r=0,97$);
- содержанием Si в черве и скоростью накопления ($r=0,98$);
- содержанием Si в черве и биоаккумуляцией ($r=0,63$);
- содержанием Si в почве и скоростью накопления ($r=0,97$).

Обратная корреляция отмечалась между:

- содержанием белка и активностью СОД ($r=-0,68$);
- содержанием белка и содержанием Si в черве ($r=-0,61$);
- содержанием белка и содержанием Si в почве ($r=-0,63$);

- содержанием белка и скоростью накопления ($r=-0,61$);
- содержанием белка и биоаккумуляцией ($r=0,57$);
- активностью СОД и активностью КАТ ($r=-0,51$).

Таким образом, адаптивные реакции *E. fetida* выражались в изменении активности ферментов антиоксидантной защиты и повышения уровня перекисного окисления липидов, что свидетельствует об индукции НЧ окислительного стресса. В теле червя наблюдали увеличение содержание Si с повышением концентрации НЧ.

3.7 Влияние НЧ SiO₂ на индикаторные показатели представителей агробиоценоза на почве, представленной черноземом южным

При внесении НЧ SiO₂ выживаемость червей составила 100 %.

Масса червей на 14 и 28 сутки эксперимента имела разнонаправленную динамику (рисунок 44).

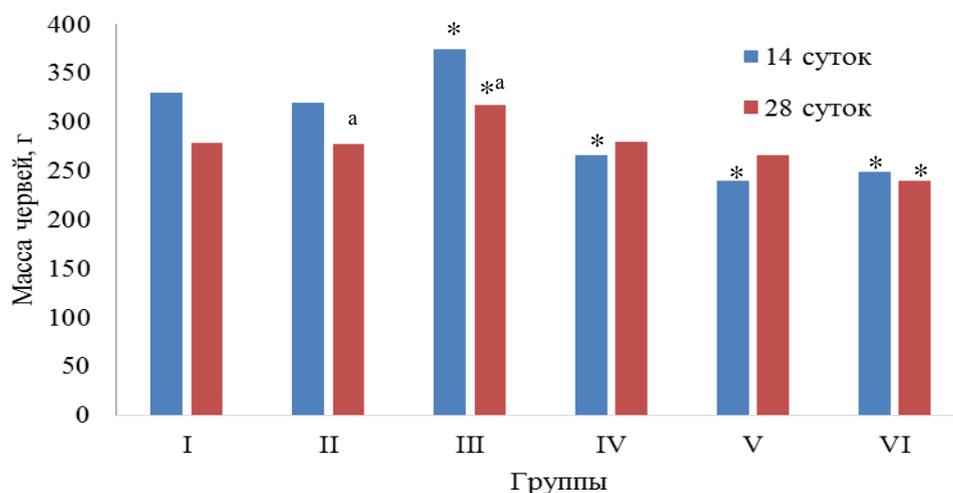


Рисунок 44 – Масса *E. fetida* при внесении НЧ SiO₂ в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 14 сутки в III группе масса была выше контроля на 13,6 % ($p \leq 0,05$), в то время как в IV-VI группе – ниже на 19,4-27,2 % ($p \leq 0,05$). На 28 сутки эксперимента в III группе масса была выше контроля на 14,0 % ($p \leq 0,05$), в то

время как в VI группе – ниже на 13,9 % ($p \leq 0,05$) (Рисунок 44). На 28 сутки масса червей была ниже, чем на 14 сутки во II и III группе (на 13,1 % и 15,2%, соответственно, $p \leq 0,05$).

На 14 сутки эксперимента содержание белка в теле *E. fetida* снижалось при концентрации НЧ 250-1000 мг/кг на 7,8%-15,5 % ($p \leq 0,05$) (Рисунок 45).

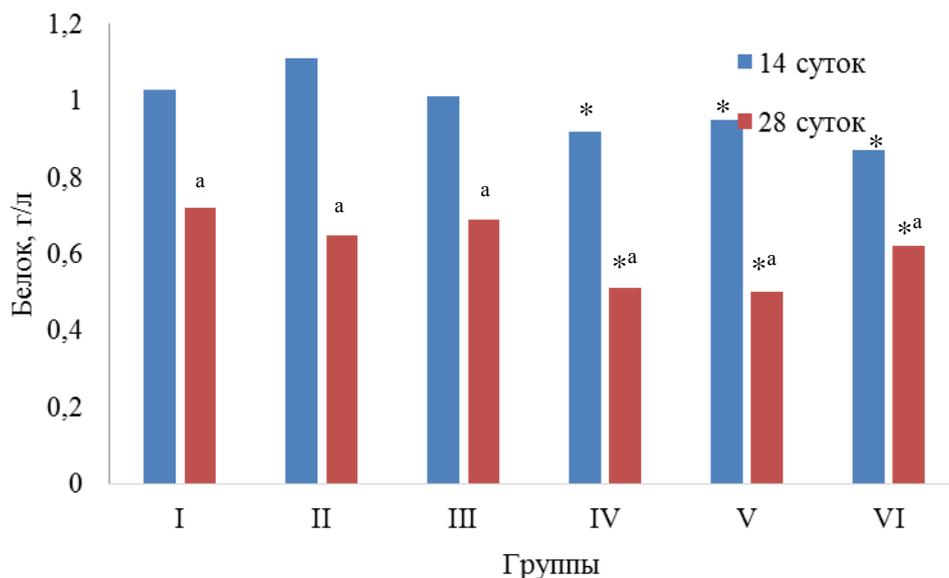


Рисунок 45 – Содержание белка в *E. fetida* при внесении НЧ SiO₂ в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 28 сутки содержание белка также снижалось в IV-VI группе, по сравнению с контролем (на 13,9-30,5 %, $p \leq 0,05$). На 28 сутки показатели в опытных группах были меньше, чем на 14 сутки, на 28,7-47,3 % ($p \leq 0,05$).

Активность СОД в теле *E. fetida* была выше контрольных значений во всех опытных группах на 17,1-38,7 % ($p \leq 0,05$). Активность каталазы уменьшалась, по сравнению с контролем, при внесении НЧ на 23,3-36,3 % ($p \leq 0,05$), кроме VI группы, где активность каталазы была выше на 65,1 % ($p \leq 0,05$) (таблица 8). Содержание МДА было ниже контроля на 39,9-73,2 % ($p \leq 0,05$) при внесении НЧ.

Таблица 8 – Активность антиоксидантных ферментов и содержание МДА в теле *E. fetida* при внесении НЧ SiO₂ в чернозем южный

Показатель	Группы					
	I	II	III	IV	V	VI
СОД, % ингибирования аутоокисления адреналина	54,8±2,32	64,2±1,87*	72,5±3,14*	76,0±3,45*	71,7±2,98*	74,7±2,73*
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /л×мин	6500±126,7	4136±174,9*	4984±212,1*	4787±254,3*	4530±156,9*	10736±316,5*
МДА, мкмоль/л	0,28±0,003	0,07±0,001*	0,15±0,001*	0,17±0,002*	0,13±0,002*	0,11±0,001*

Примечание: *различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой

Содержание Si в *Eisenia fetida* на 14 сутки было выше контроля в концентрации НЧ 250-500 мг/кг на 9,2-12,0 % ($p \leq 0,05$), на 28 сутки - при концентрации НЧ 500-1000 мг/кг - на 10,1-11,1 % ($p \leq 0,05$) (рисунок 46).

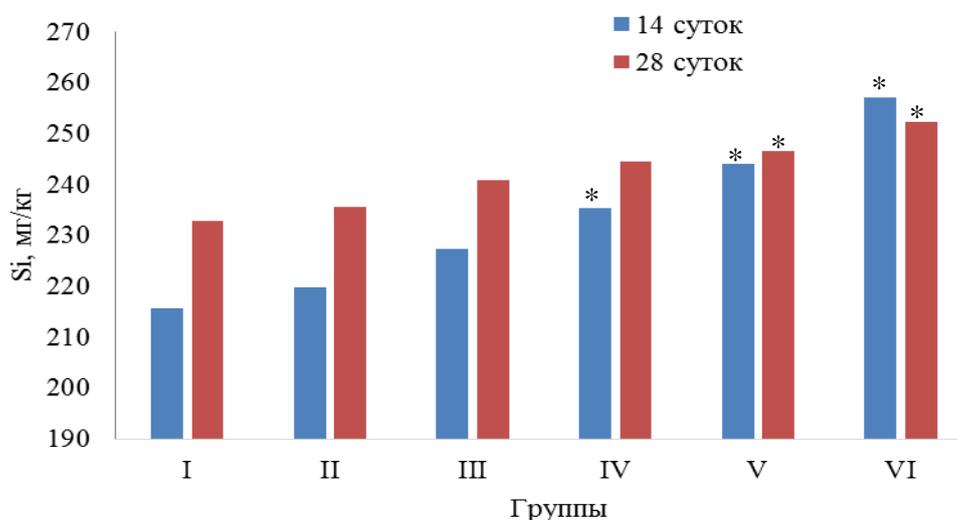


Рисунок 46 – Содержание Si в теле *E.fetida* при инкубации в черноземе южном (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

На 28 сутки при концентрации НЧ 250-1000 мг/кг содержание Si в *Eisenia fetida* было выше, чем на 14 сутки на 10,2-11,7 % ($p \leq 0,05$).

Содержание Si в почве на 14 суток было выше контроля в IV-VI группе на 11,-15,1 % ($p \leq 0,05$) (рисунок 47), на 28 суток – в V группе (на 8,3 %, $p \leq 0,05$). На 28 суток содержание Si в почве было ниже, чем на 14 суток в VI группе (на 13,5 %, $p \leq 0$)

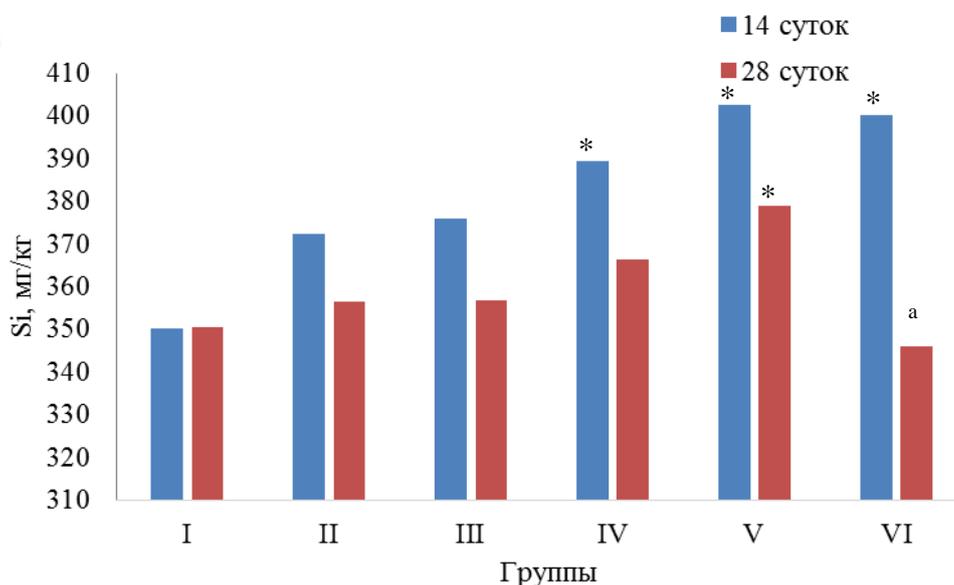


Рисунок 47 – Содержание Si в почве при инкубации в черноземе южном (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой, а – по сравнению с 14 сутками)

Скорость накопления Si в теле *E.fetida* на 14 суток была выше контроля в 13,0-31,5 раз в опытных группах ($p \leq 0,05$) (рисунок 48).

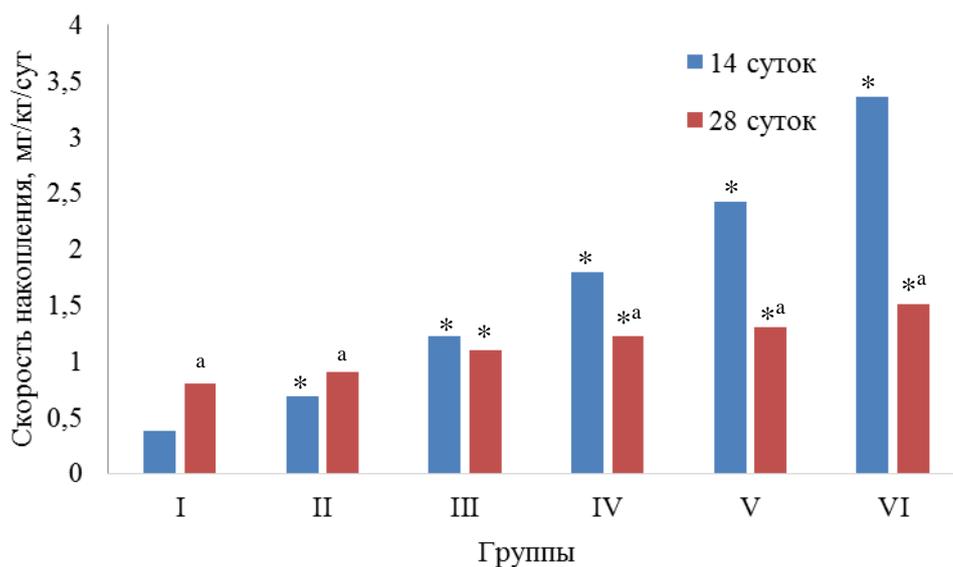


Рисунок 48 – Скорость накопления Si в теле *E.fetida* при инкубации в черноземе южном

На 28 сутки скорость накопления превышала контрольные значения при концентрации НЧ 100-1000 мг/кг в 1,7-2,1 раза ($p \leq 0,05$). По сравнению с 14 сутками, на 28 сутки при концентрации НЧ 100-500 мг/кг накопления превышала контрольные значения в 1,1-1,3 раза ($p \leq 0,05$).

Биоаккумуляция Si в теле *E.fetida* при внесении НЧ в чернозем южный на 28 сутки в VI группе была выше контроля на 12,6 % ($p \leq 0,05$). На 28 сутки, биоаккумуляция в опытных группах была выше по сравнению с 14 сутками на 12,8-27,1 % ($p \leq 0,05$) (рисунок 49).

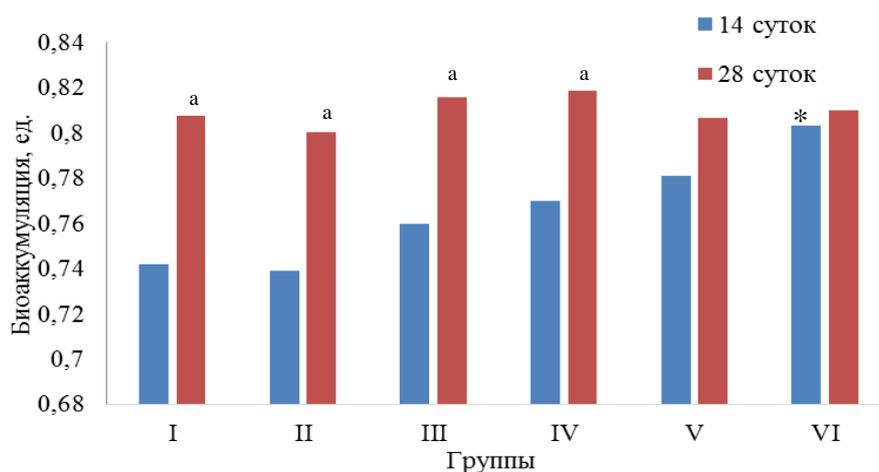


Рисунок 49 – Биоаккумуляция Si в теле *E.fetida* при инкубации на черноземе южном

Воздействие НЧ SiO₂ на рост и развитие пшеничных проростков отмечалось в концентрации 50-1000 мг/кг НЧ (рисунок 50). Увеличение фитотоксичности наблюдалась в IV и V группе. Модель *T. vulgare* только на начальных этапах исследования проявила признаки угнетения, но к концу экспозиции эксперимента отмечено достоверное стимулирование роста надземных и подземных органов растений при воздействии наноформы SiO₂. Снижение фитотоксического эффекта до 18,3% наблюдали в VI группе (рисунок 50).

Изменение состава микрофлоры почвы при внесении НЧ SiO₂ в чернозем южный выразилось в том, что во II группе в 2 раза увеличилась численность бактерий, утилизирующих органические формы азота. Численность

олиготрофных микроорганизмов снижалась при НЧ SiO₂ в концентрации 50-1000 мг/кг.

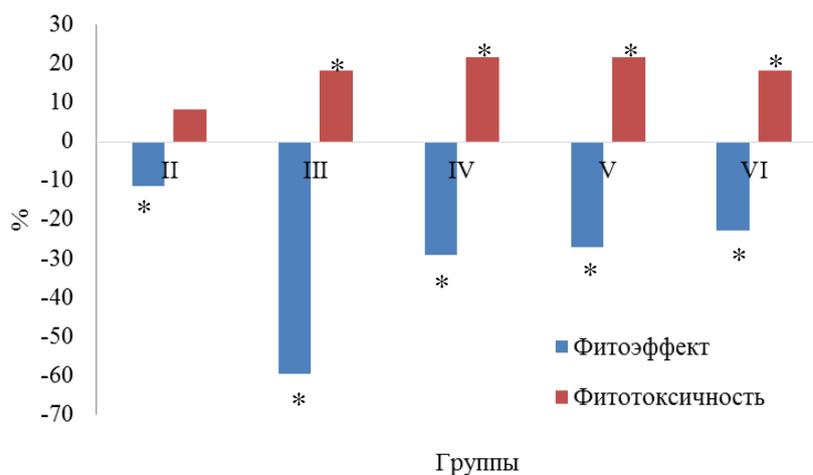


Рисунок 50 – Фитотоксичность и фитотоксичность при инкубации на черноземе южном (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой)

Угнетение роста целлюлозолитических микроорганизмов отмечено во всех вариантах опыта (рисунок 51).

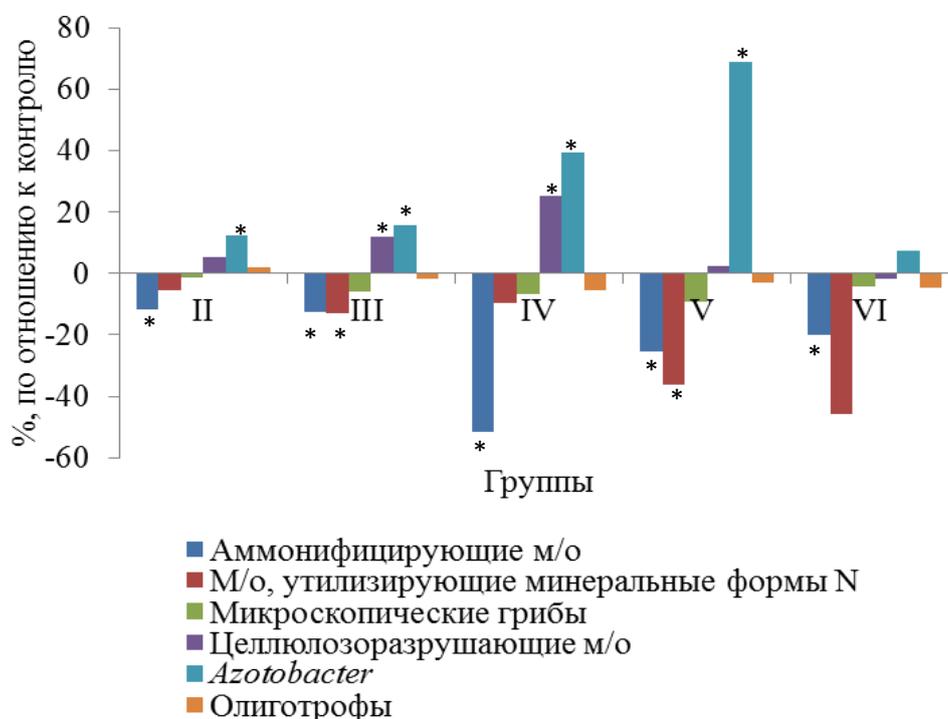


Рисунок 51 – Изменение состава микрофлоры кишечника *E. fetida* при внесении НЧ SiO₂ в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой)

В VI группе наблюдается увеличение показателя относительно всех вариантов опыта с внесением оксида, за исключением контрольного образца. Численность микроскопических грибов не изменялась. Численность *Azotobacter* обратно коррелировала с концентрацией НЧ, добавленных в почву (снижение составило < 41 %) (рисунок 51).

Изменение состава микрофлоры почвы при внесении НЧ SiO₂ в чернозем южный выразилось в том, что в VI группе снижалась численность бактерий-аммонификаторов. Наблюдалось стимулирование роста бактерий – амилолитиков на 20 % во II группе. Численность микроскопических грибов и олиготрофных микроорганизмов линейно снижалась при повышении концентрации НЧ SiO₂. Количество целлюлозолитических микроорганизмов увеличивалось в IV и V группе (рисунок 52).

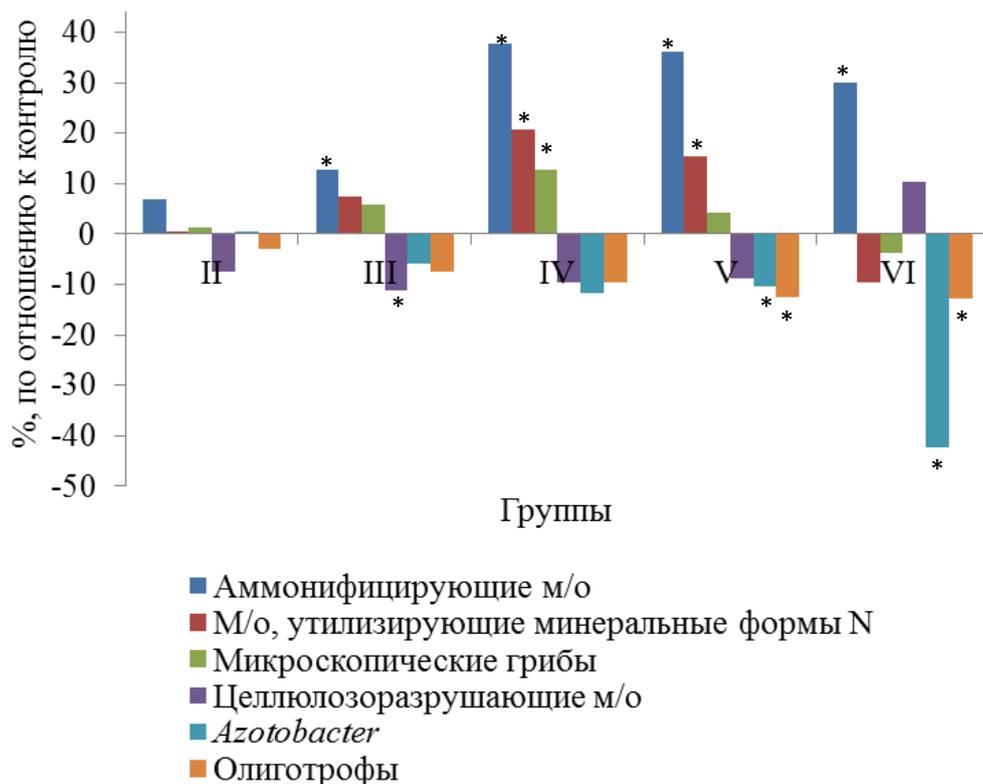


Рисунок 52 – Изменение состава микрофлоры почвы при внесении НЧ SiO₂ в чернозем южный (*различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с I группой)

Выявлена связь между изменением микробиального состава в кишечнике червя и почве. Однако, численность микроорганизмов в кишечнике червя

оказалась более чувствительной по отношению к вносимым НЧ, что проявлялось в большем снижении их численности по сравнению с почвенными микроорганизмами.

Адаптивная реакция *T. vulgare* проявилась в увеличении темпов роста надземных и подземных органов.

При анализе корреляционных зависимостей была выявлена прямая корреляция между:

- массой червей и содержанием белка ($r=0,69$);
- активностью СОД и содержанием Si в черве ($r=0,91$);
- активностью СОД и содержанием Si в почве ($r=0,86$);
- активностью СОД и скоростью накопления ($r=0,91$);
- содержанием Si в черве и скоростью накопления ($r=0,95$);
- содержанием Si в почве и скоростью накопления ($r=0,91$).

Обратная корреляция наблюдалась между:

- массой червей и содержанием Si в черве ($r=-0,58$);
- массой червей и скоростью накопления ($r=-0,61$);
- содержанием белка и активностью СОД ($r=-0,66$);
- содержанием белка и содержанием Si в черве ($r=-0,73$);
- содержанием белка и содержанием Si в почве ($r=-0,71$);
- содержанием белка и скоростью накопления ($r=-0,72$);
- активностью СОД и содержанием МДА ($r=-0,57$).

Таким образом, адаптивные реакции *E. fetida* выражались в изменении активности ферментов антиоксидантной защиты и повышения уровня перекисного окисления липидов, что свидетельствует об индукции НЧ окислительного стресса. Адаптивная реакция *T. vulgare* проявилась в увеличении темпов роста надземных и подземных органов. Увеличение численности целлюлозолитиков, *Azotobacter* в кишечнике червя; аммонификаторов и микроорганизмов, использующих минеральные формы азота в почве проявилось в ответ на внесение средних доз НЧ.

Интегральные показатели токсического действия исследуемых НЧ представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Величины, характеризующие биологическое действие НЧ

Тест-система	Показатель	НЧ Zn	НЧ Cu	НЧ SiO ₂
<i>E. coli</i> (экспозиция 60 мин)	EC ₂₀ , М	1×10^{-5}	$3,1 \times 10^{-3}$	> 4
	EC ₅₀ , М	9×10^{-5}	$> 5 \times 10^{-2}$	-
<i>E. fetida</i>	LC ₂₀ , мг/кг почвы	500 (иск. субстрат, 14 сут)	500 (иск. субстрат, 7 сут)	-
		100 (7 сут); 1000 (14 сут) (почва)	100 (7 сут); 250 (7 и 14 сут) (почва)	-
	LC ₈₀ , мг/кг почвы	-	500 (иск. субстрат, 14 сут)	-
<i>T. vulgare</i>	Фитозэффект	50-1000 (почва)	250; 500 (почва)	-

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования моделей *Eisenia fetida* и *Triticum aestivum* для экспресс-диагностики токсичности НЧ и необходимости более детального изучения его влияния на биотический компонент экосистем и круговорот биогенных элементов в условиях долгосрочного полевого опыта.

На искусственном субстрате было показано наличие прямой корреляционной связи между содержанием Zn в черве и активностью каталазы ($r=0,75$); скоростью накопления Zn и активностью каталазы ($r=0,74$). Биоаккумуляция Zn отрицательно коррелировала с активностью каталазы ($r=-0,73$). Содержание Zn в черве, содержание Zn в почве и скорость накопления Sn отрицательно коррелировало с содержанием белка в черве ($r=-0,78$, $r=-0,88$ и $r=-0,78$, соответственно).

На природной почве было показано наличие прямой корреляционной связи между биоаккумуляцией Zn и активностью каталазы ($r=0,83$). Содержание Zn в черве, содержание Zn в почве и скорость накопления отрицательно коррелировало с содержанием белка в черве ($r=-0,85$, $r=-0,79$ и $r=-0,73$, соответственно).

На искусственной почве было показано наличие отрицательной корреляции между содержанием Cu в черве и активностью СОД ($r=-0,96$), между содержанием Cu в почве и активностью СОД ($r=-0,82$).

На природной почве содержание Cu в черве, содержание Cu в почве и скорость накопления Cu положительно коррелировало с содержанием МДА в теле червя ($r=0,92$, $r=0,84$, $r=0,92$). Биоаккумуляция положительно коррелировала с активностью СОД ($r=0,83$), а содержание металла в почве – отрицательно ($r=-0,85$).

На искусственной почве содержание Si в черве, содержание Si в почве и скорость накопления Si отрицательно коррелировала с содержанием белка в теле червя ($r=-0,73$; $r=-0,72$; $r=-0,73$, соответственно). Также содержание Si в черве, содержание Si в почве и скорость накопления Si положительно коррелировала с активностью СОД ($r=0,89$; $r=0,85$; $r=0,89$, соответственно).

На природной почве содержание Si в *E. fetida* и скорость накопления Si положительно коррелировало с активностью СОД ($r=0,89$ и $r=0,88$, соответственно). Биоаккумуляция прямо коррелировала с активностью каталазы ($r=0,83$).

Таким образом, адаптивные реакции *E. fetida* выражались, преимущественно, в изменении регулирования содержания Zn, Cu и Si в теле *E. fetida* при внесении соответствующих НЧ, активности ферментов антиоксидантной защиты и содержания продуктов перекисного окисления липидов под влиянием окислительного стресса, вызванного НЧ. Адаптивные реакции *T. vulgare* проявилось в изменении показателей всхожести, роста и развития побегов. Изменение численности целлюлозолитических микроорганизмов и бактерий рода *Azotobacter* в почве и в кишечнике *E. fetida* стали результатом внесения НЧ в почву. То есть, показатели содержания металлов и активность СОД, каталазы, накопление малонового диальдегида в теле *E. fetida*, всхожесть *T. vulgare*, фитозэффект и фитотоксичность почвы, численность численности целлюлозолитических микроорганизмов и бактерий рода *Azotobacter* в почве и в кишечнике *E. fetida* могут быть использованы как индикаторы при

проведении экологического мониторинга биоценозов, испытывающих воздействие наночастиц.

Таким образом, адаптивные реакции живых организмов имели разнонаправленный характер под воздействием наночастиц, исследованных в работе.

Выводы:

1) Наночастицы Zn способствовали 50%-ному снижению биолюминесценции *E. coli* K12 TG1 в концентрации 9×10^{-5} М. Менее выраженный эффект наблюдался при внесении НЧ Cu.

2) Положительное влияние на морфо-биохимические параметры *T. vulgare* оказывали НЧ SiO₂ в концентрации 50 и 100 мг/кг почвы. Отрицательный эффект на показатели *E. fetida* оказывали НЧ Zn и НЧ Cu на искусственной почве при внесении 250-500 мг/кг; НЧ Zn - при внесении в почву 250-500 мг/кг, НЧ Cu – 100 и 500 мг/кг, НЧ SiO₂ – 250-1000 мг/кг.

3) Численность *Azotobacter* и целлюлозолитических микроорганизмов в кишечнике червей увеличивалась при внесении НЧ SiO₂ в почву. Численность всех эколого-трофических групп в кишечнике червей и в почве снижалась при внесении НЧ Zn и НЧ Cu.

4) На искусственной почве и в черноземе накопление меди, цинка и кремния являлось дозозависимым параметром. Организм червей способен к биоаккумуляции меди и цинка с последующим выведением при высоких концентрациях НЧ цинка и меди. На искусственном субстрате и в почве НЧ Cu способствовали наибольшему накоплению металла в черве и почве при концентрации 500 мг/кг (11,91 и 11,7 мг/кг Cu, соответственно). Биоаккумуляция Cu отрицательно коррелировало с концентрацией НЧ в почвенном субстрате (от $r=-0,73$ до $r=-0,83$). Пороги регуляции уровня исследуемых элементов в организме червя: для Cu на искусственной почве – 500 мг/кг, на природной почве – 500 мг/кг НЧ; для Zn на искусственной и природной почве – 500 мг/кг НЧ; для Si – порог не установлен.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее существенным фактором для нормального хода развития и функционирования любых биологических систем можно назвать их обеспеченность минеральными веществами, в первую очередь макро- и микроэлементами. Минеральные вещества могут являться составной частью органических макромолекул, быть представленными в виде минеральных солей или хелатных соединений. Помимо прочего, микроэлементы присутствуют в окружающей среде и в наноразмерной форме.

Микроэлементам как катализаторам обмена веществ отводится основополагающая роль в реализации данных процессов. Поэтому на сегодняшний день огромный научный интерес состоит в изучении уникальных свойств наночастиц металлов-микроэлементов, их биологических эффектов и, что немаловажно, токсикологических свойств.

Перспективное направление исследовательских работ для экологии, биологии, сельского хозяйства и медицины в настоящее время - разработки в области нанотехнологий, связанные главным образом с производством и использованием ультрадисперсных частиц металлов. Особое научное значение уделяется исследованиям наночастиц из числа физиологически значимых металлов: меди, железа, цинка, хрома, кобальта, селена, молибдена и марганца. Их стойкость, накопление, растворимость и общая химическая активность существенно отличаются от подобных параметров для частиц более крупных размеров.

Одна из главных областей применения наноразмерных форм микроэлементов - сельское хозяйство, а именно их внедрение в сектор производства кормовых и пищевых добавок для сельскохозяйственных животных, удобрений и средств защиты культурных растений. Широкие перспективы для использования нанопродуктов есть в медицине и фармацевтической промышленности, а также в области охраны окружающей среды.

Однако нельзя не учитывать факт возможности биологических рисков, связанных с применением нанотехнологий, которые находят отклик в исследованиях в области нанотоксикологии.

Для нормального развития и функционирования любой биологической системы в разных условиях обитания, важно присутствие минеральных веществ (Абрамян А. и др., 2007), которые могут являться составной частью органических макромолекул, а также могут быть представлены в виде минеральных солей, хелатных соединений и в наноразмерной форме отдельных химических элементов (Романова А. и др., 2018). Наночастицам (НЧ) характерны проявление высокого уровня биологической активности, иные физико-химические параметры и токсические свойства при сравнении с макрочастицами тех же элементов (Бабушкина И. и др., 2011).

Изучение уникальных свойств наночастиц металлов-микроэлементов (тепловых, магнитных, оптических, структурных и т. п.), их биологической активности и токсикологических свойств (Голохвост К. и др., 2009; Yildirimer L. et al., 2011; Naha P. et al., 2018) на сегодняшний день представляется актуальным, поскольку в мире сложилась ситуация, для которой характерно повышенное внимание к нанотехнологиям как к возможному решению многих экологических, продовольственных и пищевых проблем современности. Вместе с этим значительные масштабы производства наноматериалов повышают риски возможного токсического воздействия наночастиц, что требует разработки соответствующих решений для минимизации отрицательного воздействия на живые организмы и окружающую среду (Dhasmana A. et al., 2017).

Перспективным направлением деятельности для экологии, биологии сельского хозяйства в настоящее время служат разработки в области нанотехнологий, связанные с производством и использованием наночастиц металлов (Churilov G. I. et al., 2018).

В настоящее время помимо органических форм источников микроэлементов определённым интересом характеризуются наночастицы металлов, которые могут быть рассмотрены как их альтернатива (Dhasmana A. et al., 2017). Номенклатура

Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) определяет наночастицы как аморфные или полукристаллические структуры, которые имеют хотя бы один характерный размер в диапазоне 1-100 нм. Нужно отметить, что понятие наночастиц может не связываться с их размером, а предполагать проявления в этом размерном диапазоне новых свойств, отличных от свойств частиц большего размера одного и того же микроэлемента (Johnston L. J. et al., 2020).

Наночастицы микроэлементов относятся к классу неорганических, имеют ядро, а их внешняя оболочка формируется атомами металлов. Они обладают комплексом химических, биологических и физических свойств, сильно отличающихся от свойств сходных веществ в форме макроскопических дисперсий (Pfeiffer C. et al., 2014).

Нанотехнологии могут внести значительный вклад в охрану окружающей природной среды посредством разработки и внедрения высокоэффективных фильтров для различных видов отходов (бытовых, производственных), возможности обезвреживания особо опасных объектов сооружениями из сверхпрочных материалов, использования наночипов и наносенсоров, создания передовых технологий энергосбережения (Carrillo-Inungaray M. L. et al., 2018; Mohajerani A. et al., 2019). Но в связи с увеличением количества наночастиц в окружающей среде в виду возрастающего использования в коммерческих целях необходимо более тщательно вести контроль за их поступлением в биосферу. Наиболее существенно наночастицы аккумулируются в почвенной среде, оказывая токсическое действие на почвенные организмы. Поглощение наночастиц почвой может неблагоприятно сказываться на состоянии почвенной биоты и растений как её компонентов, представляя серьёзный риск для здоровья человека. Показано, что загрязнение почвы металлами в наноформе носит выраженный негативный характер, заключающийся в нарушении биоценоза, гибели её обитателей и снижении их воспроизводства. При этом степень негативного воздействия определяется видом нанометалла и составом почвенной фауны (Соседова Л. и др., 2020).

Нанопрепараты с частицами металлов размером до 100 нм применяются в растениеводстве как микроудобрения, что увеличивает степень устойчивости растений к неблагоприятным средовым факторам и демонстрирует возрастание уровня урожайности сельскохозяйственных культур. В исследовании механизмов прооксидантных эффектов наночастиц металлов на растениях выявлено, что значительные концентрации наночастиц, а именно 0,1 М, характеризуются токсическим эффектом наряду с появлением повреждений клеток растений (Волыхина В., Шафрановская Е., 2009). Орловой В. (2018) была проведена оценка токсичности наночастиц оксида кремния с использованием *Triticum aestivum L.* и выявлено стимулирующее действие наночастиц оксида кремния на рост и развитие культуры. Показано, что внесение в почву НЧ SiO₂ вызвало снижение всхожести семян при одновременном стимулировании роста надземных и подземных частей растений.

В настоящее время влияние наночастиц на свойства почвы и обитающих в ней организмов изучено недостаточно. Например, имеется работа, посвященная исследованию краткосрочного влияния наночастиц оксидов алюминия, титана, железа и кремния на биологическое состояние чернозема обыкновенного (Вардуни В. и др., 2019). В ней проанализировано изменение чувствительных и информативных биологических показателей состояния почвы (общая численность бактерий, обилие бактерий рода *Azotobacter*, активность каталазы, активность дегидрогеназ, всхожесть семян и длина корней редиса) после внесения в чернозем SiO₂ в качестве минерала и его наночастиц в концентрациях 100, 1000 и 10000 мг/кг. Результаты показывают, что загрязнение чернозема SiO₂ и его наночастицам приводит к ухудшению биологических свойств почвы - снижаются все исследованные показатели. Нанопорошок SiO₂ снижают биологические показатели чернозема обыкновенного в большей степени, чем «обычная» форма оксида. Стимулирующего действия исследуемых веществ на биологические свойства чернозема обыкновенного зафиксировано не было, что говорит о высокой токсичности исследуемых веществ. Наиболее чувствительным к загрязнению SiO₂ и их нанопорошками оказался показатель общей численности

бактерий, в наименьшей степени снижались всхожесть редиса и обилие бактерий рода *Azotobacter*. Загрязнение чернозема обыкновенного SiO_2 и их наночастицами приводит к ухудшению его биологических свойств: снижаются общая численность бактерий, обилие бактерий рода *Azotobacter*, активность каталазы, активность дегидрогеназ, всхожесть семян и длина корней редиса. Установлено, что нанопорошки SiO_2 снижают биологические показатели чернозема обыкновенного в большей степени, чем «обычные» формы оксидов.

В ранее опубликованной работе (Глущенко, Н. и др., 2006), были исследованы наночастицы меди в разных концентрациях. Установлены три зоны биологического действия наночастиц данного металла: предел доз от 0,01 мг/кг до 15 мг/кг – это зона биотического действия меди; от 15 мг/кг до 25 мг/кг – «зона безопасности», с 25 мг/кг начинается зона токсического действия.

Коллективом авторов (Радилов и др., 2009) была проведена серия токсикологических экспериментов по исследованию разных размеров частиц меди. Установлены токсикометрические параметры при пероральном введении: LD50 для наночастиц меди — 413 мг/кг; LD50 для иончастиц меди — 110 мг/кг; LD50 для микрочастиц меди — 5000 мг/кг/

Коллективом авторов (Бабушкина и др., 2012) показано влияние наночастиц цинка на бактериальные клетки. Наноразмерные частицы данного металла проявляют высокую биологическую активность в концентрациях от 1 до 10 мг/мл, оказывая при этом антимикробное действие в отношении штаммов золотистого стафилококка.

Паничкиным Л.А. и Райковой А.П. были проведены исследования по использованию нанопорошков металлов для предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур. При обработке семян смесью нанопорошков меди, цинка и железа, был получен положительный эффект в защите от листогрызущих вредителей, кроме того, отмечена значительная прибавка урожайности. Авторы утверждают, что применение металлов меди, железа и цинка как микроэлементов в виде наночастиц для обработки семян пшеницы, экологически безопасно, поскольку количество вносимых металлов значительно

снижается, по сравнению с рекомендуемыми тех же металлов в форме солей. При этом пропорции нанопорошков могут меняться, в зависимости от потребности в том или ином металле, либо от задачи исследования (Паничкин, Л.А., Райкова А.П., 2009).

Наличие большого количества исследований (Maher S. et.al., 2016; Krokowicz L. et.al., 2015; Planas et.al., 2015), демонстрирующих биогенность наночастиц оксида кремния подтверждается и нашими исследованиями. Полученные результаты открывают широкие возможности использования наночастиц оксида кремния в медицине и сельском хозяйстве. Тестирование НЧ оксида кремния на бактериях *E.coli* K12 TG1 с клонированными luxCDABE-генами *P.leiognathi* 54D10 показало наличие слабой токсичности в самой высокой дозировке (4 М), что может быть вызвана генерацией супероксидного радикала (Kosyan D. et al., 2017).

Испытание НЧ SiO₂ на *Eisenia fetida* свидетельствует об устойчивости величины биомассы с отрицательной корреляции с массой тела червя, что было показано и в работе Mosleh с соавторами (2003). В тоже время ряд исследователей подтверждает снижение содержания белка в червях как один из основных токсических эффектов различных поллютантов. Ismail и соавторами (1997b) в исследованиях пестицида хлорфлуазурона обнаружили, что снижение общего содержания белка в дождевом черве (*A. caliginosa*) может быть основным эффектом проявления токсичности. Но снижение содержания белка может быть приписано катаболизму белков в ответ на потребность в энергии червя, как это предлагается для другого пестицида – паратиона. По данным же Z hang с соавторами (2017), токсиканты оказывают отчетливое влияние на белковый профиль червей, выражающийся в снижении экспрессии генов, отвечающих за синтез белка.

В тоже время можно предположить, что увеличение массы связано не только с расходом белка на рост тканей, но и с накоплением воды в теле, адсорбированной из субстрата для снижения действия токсиканта.

Снижение численности микроорганизмов отрицательно влияло на ряд показателей физиолого-биохимического состояния червя, что связано с тем, что микроорганизмы кишечника выполняют важную функцию в переваривании и усвоении питательных веществ из почвы (Antisari et.al., 2015). Нарушение усвоения питательных веществ могло вести к нарушению защитных функций микроорганизмов и, в первую очередь, снижению концентрации антиоксидантных ферментов, аналогичные результаты получены в исследовании влияния НЧ Fe (II) на биохимические параметры и окислительный стресс *E. fetida* (Yirsaw et.al., 2016), что еще раз подчеркивает ценность дождевых червей как объекта для изучения загрязнения почвенной экосистемы наноматериалами и перспективных nanoscavengers (Gupta et.al., 2014; Gomes et.al., 2015).

Как известно, одним из главных механизмов повреждения биологических систем под воздействием наночастиц является возможность генерация ими активных форм кислорода и возникновение риска окислительного стресса и повреждения ДНК, что было уже показано в наших предыдущих исследованиях (Lebedev et al., 2016; Lebedev S. et al., 2015). SOD является первым ферментом процесса детоксикации, и катализирует реакцию дисмутации O_2^- путем перевода O_2^- в H_2O_2 . Во втором этапе цепочки детоксикации САТ катализирует разложение H_2O_2 , образующееся после конверсии O_2^- SOD в H_2O_2 и O_2 .

Снижение уровня СОД в первые 14 дней, по нашему мнению, является следствием репрессии активности фермента наночастицами и окислительным стрессом. Восстановление активности СОД на 28 же сутки также свидетельствует о наличии окислительного стресса и может являться следствием компенсаторно-приспособительных механизмов, происходящих в *E. fetida*. Также данная гипотеза имеет место и для каталазы, которая оказалась более чувствительным биомаркером. В тоже время, степень перекисного окисления липидов имела более выраженную динамику, демонстрирующую снижение уровня МДА на 14 сутки эксперимента при средних концентрациях до 11,2%, причем нарастание эффекта отмечалось при дозе 1000 мг/кг на 9,1%. Следует отметить, что на 28 сутки произошло выраженное снижение степени перекисного окисления липидов (на

87,5%) при концентрации по металлу 100 мг/кг, что свидетельствует, вкуче с данными по активности СОД и каталазы об окислительном стрессе. Однако на 28 сутки во всех группах показатели МДА были ниже контроля, что подтверждает нашу гипотезу о двухступенчатом ответе *E. fetida* в условиях окислительного стресса и коррелирует с данными, полученными Zhang с соавторами (2017).

Выявлена связь между изменением микробиального состава кишечника червя и почвы. Наблюдались сходные тенденции снижения и стимулирования роста различных физиологических групп. Однако, микроорганизмы в кишечнике червя были более чувствительны по отношению к вносимым НЧ, что проявлялось в большем снижении их численности по сравнению с почвенными микроорганизмами.

В параллельном исследовании на модели *Triticum aestivum* L. на фоне внесения в почву НЧ кремния наблюдается незначительное снижение всхожести семян, но к концу экспозиции опыта длина надземных и подземных частей растений превышала значения контрольного варианта, что свидетельствует о стимулирующем эффекте воздействия НЧ SiO₂ на морфометрические показатели *Triticum aestivum* L. Стимулирование развития надземных и подземных органов *Triticum aestivum* L. наночастицей SiO₂ связано с ролью кремния как биогенного макроэлемента в растениях. Аналогичные данные получены при изучении влияния НЧ и микрочастиц оксида кремния на кукурузу (Karunakaran G. et.al. 2016) и Mukherjee A. (2014) в тесте *Pisum sativum* с загрязнением почвы НЧ ZnO, в которых зафиксировано стимулирование роста корней при отсутствии значимых изменений в морфологии надземных органов. Стимулирующее и ингибирующее рост воздействие наночастиц связано с концентрацией наночастиц, их природой, а выяснение пороговых доз НЧ на сегодняшний день является актуальной и широко обсуждаемой темой в научных исследованиях (Pošćić et.al., 2016; Wang et.al., 2016).

Снижение фитотоксического эффекта до 18,3% при увеличении концентрации наночастицы элемента до 1000 мг/кг, вероятно, связано с агрегацией НЧ в почвенном растворе (Huynh K. et. al. 2011, Louie S.M. et. al., 2013). Значение

фитотоксичности почв менее 30% ряд авторов считает недостаточно высоким для однозначной оценки субстрата как токсичного (ISO 11269-1, 2012; ISO 11269-2, 2012).

Увеличение массы корней на фоне воздействия 50 и 100 мг/л нанooksида кремния Romero Aranda с соавторами (2006) объясняют облегчением поглощения и транспортировки воды в растения и это благоприятное воздействие оксида кремния может быть связано с его гидрофильностью.

Работами Chai и соавторов (2015) показано наличие стимулирующего действия НЧ SiO₂ по отношению к микробиологической активности почв. Анализируя динамику комплекса почвенных микроорганизмов при воздействии различных концентраций НЧ оксида кремния можно отметить наличие ярко выраженного стимулирующего эффекта по отношению к микроорганизмам, утилизирующим органические формы азота, а по отношению к другим группам наблюдается подавление роста.

В работах He S. и Hsueh Y.H. с соавторами отмечено снижение численности бактерий первой и второй стадии нитрификации, активное подавление патогенной микрофлоры, бактерий окисляющих метан (*Methylobacteriaceae*) и ризобактерии *Pseudomonas chlororaphis* (He S et al., 2016; Hsueh et al., 2015; Calder et al., 2012; Carbone et al., 2014). Приведенные в результатах исследования данные могут объяснить угнетение роста микроскопических грибов, олиготрофной микрофлоры и других групп микроорганизмов как прямым токсичным воздействием нанoформы SiO₂, так и химической природой вносимого вещества. Использование наночастиц оксида кремния без дополнительных факторов не приводит к токсическому действию на клетки, а в некоторых случаях, в частности при контакте с бактериальной клеткой, способствуют повышению микробной активности.

Аналогичные результаты были получены в работах по изучению Cu и ZnO, когда внесение нанoформ которых привело к изменению структуры микробного сообщества (Collins et al., 2012).

Численность бактерий, утилизирующих органические формы азота, на фоне культивирования *Eisenia fetida* и *Triticum aestivum* и внесения НЧ имеет различную динамику. Так выращивание *Triticum aestivum* привело и к снижению численности бактерий рода *Azotobacter*, в противоположность результатам, полученным при культивировании *Eisenia fetida*. Это может быть связано не с прямым воздействием наноформы соединения, а с ограниченностью доступных питательных веществ. Поскольку поступление в почву оксида кремния вызывает активное развитие корневой системы растений, а в условиях модельного эксперимента и ограниченности жизненного пространства между растениями и микроорганизмами возникает конкуренция за элементы питания (Kuzyakov et al., 2013; Hortal et al., 2017). И доказательством этого предположения является отрицательная корреляционная зависимость ($r=-0,71$, при $p<0,05$) показателя обогащенности почвы бактериями рода *Azotobacter* и длины корней для всех вариантов опыта.

Результаты, полученные Li с соавторами (2012), показали, что выращивание растений на фоне внесения в почву НЧ значительно снижало их токсический эффект, что связано с поглощением ионов цинка корневыми системами растений, улучшением условий минерального питания и сопротивляемости организма. Это связано с тем, что почвенные свойства, такие как pH, текстура, или содержание органического вещества, влияют на микробное сообщество (Fierer and Jackson 2006) и биодоступность различных классов загрязнителей (Simonin et al., 2015).

Почва - сложная матрица и экстраполяция результатов от одного загрязненной почвы другому трудно из-за большой изменчивости состава и структуры почвы (Simonin et al., 2015). Но использование в ходе эксперимента одного почвенного образца, максимально гомогенизированного и смешанного, позволяет сравнивать чувствительность показателей микробиологической и ферментативной активности почвы к НЧ оксида кремния.

Активность инвертазы не имела четкой зависимости от дозы поллютанта, но в целом активность фермента превышала значение контроля. Это могло быть связано с существенным увеличением длины и количества корней, активным

выделением ими продуктов жизнедеятельности и указывает на интенсивность процессов утилизации углеводов (которые поступают в почву, главным образом, в составе растительных остатков) почвенной микрофлорой. Проведенные исследования позволили еще раз подтвердить тезис о влиянии наноформы оксида кремния на круговорот соединений углерода и азота (Simonin et al., 2015) через изменение структуры почвенных микроорганизмов и ферментов (Vishnu D. Rajput, 2017).

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что наночастицы SiO_2 могут влиять на комплекс почвенной биоты (растения, беспозвоночные, почвенные микроорганизмы) и ферментативную активность почв, что, в свою очередь, требует дальнейшего углубленного изучения механизмов их биологического действия и поиска биомаркеров, отражающих данное воздействие.

Биотестирование наноматериалов приобретает все большее значение и включает разнообразные биологические модели: бактерии (*Photobacterium phosphoreum*), растения (*Lemna minor*, *Elodea canadensis*, *Lipidium sativum*), простейшие (*Tetrahimena pyriformis*, *Paramecium putrinum*, *Stylonychia*) и др. Интродукция наноматериалов в почву определяет перспективность модели дождевого червя *Eisenia fetida* и родственных видов для экотоксикологической оценки вновь создаваемых веществ и препаратов [Scott-Fordsmand J.J. et al., 2008].

Высокая информативность этой модели определяется биологическими особенностями *E. fetida*, такими, как высокой проницаемостью поверхности тела для поллютантов (Jajer T. et al., 2003).

Дождевые черви перерабатывают большое количество почвы, и поэтому постоянно находятся под воздействием веществ, адсорбированных на твердых частицах почвы (Morgan, J.E., 1999). Они более чувствительны к загрязнению металлами, чем другие почвенные беспозвоночные и определение токсичности на дождевых червях является важным звеном в оценке безопасных уровней металлов и других загрязнителей в почве (Žaltauskaitė J., Sodienė I., 2010).

В этой связи биодоступность и потенциальная экотоксичность наноматериалов на дождевого червя *Eisenia fetida* оценивается в контексте окружающей среды, включая оценку некоторых модифицирующих воздействий окружающей матриц (основных катионов и анионов). Все рассмотренные параметры должны попадать в диапазоны, часто встречающиеся в природных почвах.

В проведенном нами эксперименте острой токсичности, как и в исследованиях Li et al. (2011), были использованы дозы 0, 50, 200, 500, 1000 мг/кг, так как они моделируют фоновую, повышенную и пороговую концентрацию цинка в природных почве. Диапазон тестовых концентраций были выбраны для моделирования уровней, которые могут произойти в окружающей среде при определенных условиях.

В зависимости от степени воздействия металла на почвенные организмы (Neuhauser E.F. et al., 1985; Spurgeon, D. J. et al., 1994) определили значения 14-дневное значение LC50 662 мг/кг почвы для *E. fetida*, в то же время Panda с соавторами (1995), работая на тех же видах установил значение LC50 828-995 мг/кг почвы, аналогичный диапазон был получен Spurgeon (Spurgeon, D. J. et al., 1994).

Моделируя токсическую нагрузку на почвенные организмы, был использован субстрат из искусственной почвы. Использование данного субстрата основано на прогрессивном методе очистки кишечника, приведенные в методическом руководстве по исследованию структуры, функционированию и разнообразию детритных пищевых сетей, и на основании метода эвакуации содержимого желудка дождевых червей с помощью измельченной целлюлозы (Резниченко И., 2013). Этот метод нами был трансформирован для оценки токсического/или стимулирующего действия наночастиц путем замещения содержимого пищеварительного тракта на химически чистый субстрат с наночастицами

Рост - это интегральный показатель, и он объединяет набор биохимических и физиологических эффектов. Он представляет собой изменения в обмене энергии

при детоксикации загрязняющих веществ. Дополнительная потребность в энергии приводит к уменьшению роста. Рост и размножение дождевых червей при воздействии металла отрицательно коррелирует с размножением, т.е. если черви не растут они производят коконы, и наоборот, если они не производят коконы, они продолжают расти (Burgos M.G. et al., 2005).

С одной стороны, субстрат из микрокристаллической целлюлозы содержит более мелкие фракции, чем субстрат искусственной почвы и токсическое действие в основном связано с высокой степенью растворения ионов цинка (Li L.Z. et al., 2011) в субстрате и высокой проникающей способностью металла через пищеварительную систему. С другой стороны это противоречит выводам Vijver и соавторов [Vijver M.G. et al., 2003], которые показали, что у дождевых червей кожный маршрут является важным каналом забора водных ионов металлов из почвы, тогда как поглощение через прием пищи не способствует накоплению металлов, но согласуется с результатами Li и соавторов (Li L.Z. et al., 2011), которые установили, что токсическое действие в основном связано с дозой НЧ ZnO при попадании мелких частиц агара, но и водных ионов цинка через дермальное поглощение металла.

В тесте на выживаемость, выполненным в соответствии с рекомендациями OECD 207 OECD (1984), установлен факт гибели червей при высокой концентрации на искусственном субстрате, это согласуется с данными (Li L.Z. et al., 2011). Относительно высокая выживаемость в почве может быть объяснена связыванием цинка компонентами данного субстрата, а также цинк-связывающих металл-ионов (Morgan, J.E. et al., 1999; Sturzenbaum, S. R. et al., 2004).

Низкая смертность в почвенном субстрате объясняется и в исследованиях Honsi и соавторов (2003), где показано, что высокая концентрация металлов в почве (Cu, Zn, Cd и Pb) не влияет на выживание дождевых червей.

Мы согласны с выводами Moriarty (Moriarty, F., 1999), что смертность не очень чувствительный показатель для прогнозирования последствий на полевых популяциях, в тоже время испытания НЧ Zn на искусственной почве позволяет

установить прямое воздействие металла на организм червя и летальные и сублетальные эффекты на воздействие металла.

Биодоступность и биоаккумуляция металлов зависит от таких факторов, как его размерность и концентрация (Heikens, A. et al., 2001), типа почвы и его характеристик (Hendrickx F. et al., 2007), температуры (Olchawa E. et al., 2006), продолжительности времени экспозиции (Nahmani, J. et al., 2007).

Накопление Zn в *Eisenia fetida* происходило в зависимости от увеличения концентрации НЧ Zn в субстрате. На искусственной почве данный показатель соответствовал - 1000 мг/кг на 7 сутки экспозиции, и в эти интервалы был установлен максимальный токсический эффект.

Расчет коэффициента биоконцентрации (КБК) на 14 сутки экспозиции в субстратах с искусственной почвой показал, насколько с дозой НЧ Zn связано снижение КБК. Различное поглощение Zn на 28 сутки, т.е. снижение его концентрации в черве на наш взгляд, во-первых, связано с адаптацией червя к субстрату, и во-вторых, со способностью регулировать содержание Zn в теле.

Живые организмы, в частности дождевые черви, по сообщению (Morgan A. J., Morris B., 1982) способны связывать цинк в тканях, путем участия металлотионов в этом процессе, способствуя быстрому выведению Zn (Van Gestel, C.A., 1993). Van Gestel с соавторами (1993) также сообщил, что дождевые черви могут регулировать содержание в теле Zn до концентрации в почве до 560 мг/кг, выше этой концентрации происходит значительное накопление металла. Этими выводами объясняется многие полученные нами результаты, в частности, высокая смертность при концентрации 500 мг/кг.

Воздействие органических или неорганических загрязнителей, как известно, индуцируют окислительный стресс в клетках. Побочные продукты метаболизма – ксенобиотики – способствуют производству свободных радикалов, с другой стороны, воздействие металлов приводит к генерации активных форм кислорода (АФК), таких как перекись водорода (H_2O_2), супероксид (O_2^-) и гидроксильных (ОН) радикалы (Dazy, M. et al., 2009).

В качестве другого ключевого антиоксиданта стоит назвать фермент СОД, участвующий в удалении активных форм кислорода. Любые изменения в СОД отражают изменения окислительного стресса, который может быть вызван загрязняющими веществами. Часто эти изменения рассматриваются на ранних стадиях загрязнения окружающей среды (Brown P.J. et al., 2004). В нашем исследовании установлена тенденция увеличения активности СОД с максимальным эффектом при концентрации 500 мг/кг НЧ Zn, и снижением при дозе 1000 мг/кг.

Каталаза является важным ферментом в системе антиоксидантной защиты организмов, и таким образом, защищает клетки от повреждений.

Активность каталазы у *Eisenia fetida* возрастала при достижении концентрации наночастиц в искусственной почве Zn 500 мг/кг и снизилась при дозе 1000 мг/кг. Это возможно связано с высокой активностью каталазы в почвенном субстрате и высокой степенью оборота металла между субстратом и организмом червя (Chelikani, P. et al., 2004).

Таким образом, ткани червя способны связывать цинк (Morgan A. J., Morris B., 1982), путем участия металлотионенов в этом процессе, способствуя быстрому выведению Zn, а также дождевые черви могут регулировать содержание в теле Zn до концентрации в почве до 560 мг/кг, выше этой концентрации происходит значительное накопление металла (Van Gestel, C.A., 1993).

Возможной причиной наибольшего снижения массы при экспозиции на искусственном субстрате на наш взгляд стала высокая степень растворения ионов металлов (Li L.Z. et al., 2011), и как следствие высокая проникающей способностью металла через пищеварительную систему, а также адаптация к субстрату, тогда как при дозе 500 мг/кг, возможно произошла агрегация наночастиц, и как следствие снижение проникновения металла через пищеварительную систему и кожный маршрут.

Например, в ранних исследованиях, оценивая показатели смертности червей в тесте на токсичность наночастиц MoO₃ установлено, что черви в контрольных субстратах А и В выжили до конца периода тестирования. В субстрате А

наибольший токсический эффект продемонстрирован при концентрации НЧ MoO_3 500 мг/кг, смертность на 14 сутки составила – 73% ($p \leq 0,05$). На искусственной почве существенные показатели смертности были установлены при дозе 40 и 500 мг/кг MoO_3 , на 14 сутки экспозиции смертность составила 33% до 53% соответственно. Хотя по данным (Van Gestel, C.A. et al., 2009), смертность не была установлена даже при высоком уровне экспозиции 3200 мг/кг^{-1} сухой почвы. Эти данные были получены для почвы в естественных условиях, и определяя потенциальные риски экотоксичности на тестируемых субстратах можно согласится с выводами (Van Gestel, C. et al, 2011), что черви не очень хорошо способны регулировать концентрацию молибдена в теле, однако при загрязнении почвы молибденом в наноформе риски негативного воздействия на почвенные организмы возрастают.

Необходимо отметить, что в вышеприведённом исследовании снижение выживаемости червей, при концентрациях 40 и 500 мг/кг, свидетельствует о различных режимах воздействия или токсодинамики молибдена в двух субстратах. Так возможные причины смертности при 40 мг/кг является высокое освобождение молибдена из НЧ, тогда как при дозе НЧ MoO_3 500 мг/кг причиной смертности стало снижения двигательной активности и трофической деятельности червей.

Аналогичные зависимости биологической активности наночастиц описана Sun W. с соавторами (1988), который установил, что активность антиоксидантных ферментов у дождевых червей увеличивается при умеренном экологическом стрессе и уменьшается с тяжелой экологической напряженностью.

Чтобы установить токсическое воздействие металлов, они должны быть биологически доступными. Биодоступность металлов в почве включает по меньшей мере три динамические процесса, в том числе десорбцию почвы, поглощение в живых организмах, и токсодинамику перераспределения внутри тела организма (Hamelink J.L., 1994).

Возможно, в наших исследованиях краткосрочность экспозиции не раскрывает все стороны воздействия наночастиц на организм, при этом, если

учитывать биодоступность металла почвенными компонентами, то необходимо учитывать изменение ферментативной активности почвы.

Почвенные ферменты участвуют в разложении растительных, животных и микробных остатков, а также синтезе гумуса. Они отличаются исключительно высокой активностью, строгой специфичностью действия и большой зависимостью от различных условий внешней среды. Последняя особенность имеет большое значение в перспективности их использования для целей биоиндикации (Хазиев Ф., 2005).

Дождевые черви, в зависимости от дозы металла и времени экспозиции, проявляют ряд способностей в регуляции химических веществ в теле, тогда как для неспецифичных элементов экскреция происходит медленнее, а в ряде случаев отсутствует. Для Cr, Cu, Ni, Zn, в исследованиях Peijnenburg и соавторов (Peijnenburg W.J. et al., 1999) установлено быстрое поглощение и уравнивание в теле червя.

Нельзя пренебрегать и тем, что в условиях повышенного содержания токсического компонента, включаются приспособительные реакции, которые выражаются в снижении двигательной активности, снижения питания, и единственным путем поглощения, является кожный маршрут, который, по мнению M. G. Vijver (Vijver M.G. et al., 2003) является основным важным каналом забора водных ионов металлов из почвы. Поэтому, для достижения высокой степени токсичности металла на организм червя необходимо выполнения ряда условий, стимулирующих его накопление.

Согласно S. Suthar (Suthar S. et al., 2008), дождевые черви способны накопить значительное количество металла в тканях, что может служить полезным индикатором биологического загрязнения из-за довольно последовательных отношений между концентрацией веществ в дождевом черве и почве.

Как и в результатах (Malley C. et al., 2006) высокой гипераккумуляцией обладали НЧ Cu, суммарная скорость накопления достигала 5.08 и 3.69 мг/кг/сут при дозах 100 и 500 мг/кг соответственно.

Различия по данному показателю в разрезе дозозависимых величин доказывают мнения (van Straalen N.M. et al., 2001; Luoma S.N., Rainbow P.S., 2005), которые считают, что скорость накопления металлов, а не абсолютные концентрации являются ключевым показателем токсичности.

Различная степень аккумуляции меди в организме червя оказала влияние на активность антиоксидантных ферментов, в зависимости от концентрации наночастиц Cu и сроков экспозиции (Livingstone, D.R., 1993).

Каталаза является важным ферментом в системе антиоксидантной организмов. Его способность исключать свободный радикал защищает клетки от повреждений, и его изменение рассматривается как предвестник загрязнения окружающей среды (Brown P.J. et al., 2004). Аналогичные результаты были зарегистрированы в других исследованиях (Wang, M.E. Zhou Q.X., 2006; Lin D., et al., 2012). Это означает, что червь имеет способность переносить окислительный стресс и активировать антиоксидантную систему на первой стадии стресса при высоких концентрациях наночастиц.

Снижение активности каталазы после длительного воздействия высоких концентраций наночастиц превышает пропускную способность поглощать активные формы кислорода (АФК) каталазы, и они становятся ингибиторами H_2O_2 КПП. Это показывает, что защитные свойства антиоксидантных ферментов могут быть утеряны при увеличении токсического стресса в присутствии наночастиц меди.

В качестве другого ключевого фермента антиоксидантной защиты, супероксиддисмутаза (СОД) удаляет O_2^- , полученного при биологическом окислении и также является важным ферментом, участвующий в удалении АФК.

По мнению Sun и соавторов (1988), активность СОД в дождевых червях увеличивается с умеренным экологическим стрессом и уменьшается с тяжелой экологической напряженностью. Из этого следует, что НЧ Cu обладают пролонгированным действием, и процесс релаксации системы к нормальному состоянию может занять определенное время после исключения токсиканта.

Наличие большого количества исследований (Maher et.al., 2016; Krokowicz et.al., 2015), демонстрирующих биогенность наночастиц оксида кремния, подтверждается и нашими исследованиями. Полученные результаты открывают широкие возможности использования наночастиц оксида кремния в медицине и сельском хозяйстве. Тестирование НЧ оксида кремния на бактериях *E.coli* K12 TG1 с клонированными luxCDABE-генами *P.leiognathi* 54D10 показало наличие слабой токсичности в самой высокой дозировке (4 М), что может быть вызвана генерацией супероксидного радикала (Kosyan et al., 2017).

Испытание НЧ SiO₂ на *Eisenia fetida*, свидетельствует об устойчивости величины биомассы с отрицательной корреляции с массой тела червя, что было показано и в работе Mosleh et al. (2003). В тоже время ряд исследователей подтверждает снижение содержания белка в червях как один из основных токсических эффектов различных поллютантов. Ismail и др. (1997b) в исследованиях пестицида хлорфлуазурона обнаружили, что снижение общего содержания белка в дождевом черве (*A. caliginosa*) может быть основным эффектом проявления токсичности. По данным же Zhang et al. (2017), токсиканты оказывают отчетливое влияние на белковый профиль червей, выражающийся в снижении экспрессии генов, отвечающих за синтез белка.

В тоже время можно предположить, что увеличение массы связано не только с расходом белка на рост тканей, но и с накоплением воды в теле, адсорбированной из субстрата для снижения действия токсиканта.

Снижение численности микроорганизмов отрицательно влияло на ряд показателей физиолого-биохимического состояния червя, что связано с тем, что микроорганизмы кишечника выполняют важную функцию в переваривании и усвоении питательных веществ из почвы (Antisari et.al., 2015). Нарушение усвоения питательных веществ могло вести к нарушению защитных функций микроорганизмов и, в первую очередь, снижению концентрации антиоксидантных ферментов, аналогичные результаты получены в исследовании влияния НЧ Fe (II) на биохимические параметры и окислительный стресс *E. fetida* (Yirsaw et.al., 2016), что еще раз подчеркивает ценность дождевых червей как объекта для

изучения загрязнения почвенной экосистемы наноматериалами и перспективных nanoscavengers (Gupta et.al., 2014; Gomes et.al., 2015).

Как известно, одним из главных механизмов повреждения биологических систем под воздействием наночастиц является возможность генерация ими активных форм кислорода и возникновение риска окислительного стресса и повреждения ДНК, что было уже показано в наших предыдущих исследованиях (Lebedev et al., 2016; Lebedev S. et al., 2015). SOD является первым ферментом процесса детоксикации, и катализирует реакцию дисмутации O_2 - путем перевода O_2 в H_2O_2 . Во втором этапе цепочки детоксикации CAT катализирует разложение H_2O_2 , образующееся после конверсии O_2 -SOD в H_2O_2 и O_2 .

Снижение уровня СОД в первые 14 дней, по нашему мнению, является следствием репрессии активности фермента наночастицами и окислительным стрессом. Восстановление активности СОД на 28 же сутки также свидетельствует о наличии окислительного стресса и может являться следствием компенсаторно-приспособительных механизмов, происходящих в *E. fetida*. Также данная гипотеза имеет место и для каталазы, которая оказалась более чувствительным биомаркером. В тоже время, степень перекисного окисления липидов имела более выраженную динамику, демонстрирующую снижение уровня МДА на 14 сутки эксперимента при средних концентрациях до 11,2%, причем нарастание эффекта отмечалось при дозе 1000 мг/кг на 9,1%. Следует отметить, что на 28 сутки произошло выраженное снижение степени перекисного окисления липидов (на 87,5%) при концентрации по металлу 100 мг/кг, что свидетельствует, вкуче с данными по активности СОД и каталазы об окислительном стрессе. Однако на 28 сутки во всех группах показатели МДА были ниже контроля, что подтверждает нашу гипотезу о двухступенчатом ответе *E. fetida* в условиях окислительного стресса и коррелирует с данными, полученными Zhang, и соавторов (2017).

Выявлена связь между изменением микробиального состава кишечника червя и почвы. Наблюдались сходные тенденции снижения и стимулирования роста различных физиологических групп. Однако, микроорганизмы в кишечнике червя были более чувствительны по отношению к вносимым НЧ, что проявлялось

в большем снижении их численности по сравнению с почвенными микроорганизмами.

В параллельном исследовании на модели *Triticum aestivum* L. на фоне внесения в почву НЧ кремния наблюдается незначительное снижение всхожести семян, но к концу экспозиции опыта длина надземных и подземных частей растений превышала значения контрольного варианта, что свидетельствует о стимулирующем эффекте воздействия НЧ SiO₂ на морфометрические показатели *Triticum aestivum* L. Стимулирование развития надземных и подземных органов *Triticum aestivum* L. наночастицей SiO₂ связано с ролью кремния как биогенного макроэлемента в растениях. Аналогичные данные получены при изучении влияния НЧ и микрочастиц оксида кремния на кукурузу (Karunakaran G. et al. 2016) и Mukherjee A. (2014) в тесте *Pisum sativum* с загрязнением почвы НЧ ZnO, в которых зафиксировано стимулирование роста корней при отсутствии значимых изменений в морфологии надземных органов.

Снижение фитотоксического эффекта до 18,3% при увеличении концентрации наночастицы элемента до 1000 мг/кг, вероятно, связано с агрегацией НЧ в почвенном растворе (Louie S.M. et al., 2013). Значение фитотоксичности почв менее 30% ряд авторов считает недостаточно высоким для однозначной оценки субстрата как токсичного (ISO 11269-1, 2012; ISO 11269-2, 2012).

Увеличение массы корней на фоне воздействия 50 и 100 мг/л наночастицы кремния Romero Aranda et al. (2006) объясняют облегчением поглощения и транспортировки воды в растения и это благоприятное воздействие оксида кремния может быть связано с его гидрофильностью.

Работами Chai и соавторов (2015) показано наличие стимулирующего действия НЧ SiO₂ по отношению к микробиологической активности почв. Анализируя динамику комплекса почвенных микроорганизмов при воздействии различных концентраций НЧ оксида кремния можно отметить наличие ярко выраженного стимулирующего эффекта по отношению к микроорганизмам, утилизирующим органические формы азота, а по отношению к другим группам наблюдается подавление роста.

В работах He S. и Hsueh Y.H. с соавторами отмечено снижение численности бактерий первой и второй стадии нитрификации, активное подавление патогенной микрофлоры, бактерий окисляющих метан (*Methylobacteriaceae*) и ризобактерии *Pseudomonas chlororaphis* (Hsueh et al., 2015; Carbone et al., 2014). Приведенные в результатах исследования данные могут объяснить угнетение роста микроскопических грибов, олиготрофной микрофлоры и других групп микроорганизмов как прямым токсичным воздействием наночастиц SiO_2 , так и химической природой вносимого вещества. Использование наночастиц оксида кремния без дополнительных факторов не приводит к токсическому действию на клетки, а в некоторых случаях, в частности при контакте с бактериальной клеткой, способствуют повышению микробной активности.

Аналогичные результаты были получены в работах по изучению Cu и ZnO, когда внесение наночастиц которых привело к изменению структуры микробного сообщества (Collins et al., 2012).

Численность бактерий, утилизирующих органические формы азота, на фоне культивирования *Eisenia fetida* и *Triticum aestivum* и внесения НЧ имеет различную динамику. Так выращивание *Triticum aestivum* привело и к снижению численности бактерий рода *Azotobacter*, в противоположность результатам, полученным при культивировании *Eisenia fetida*. Это может быть связано не с прямым воздействием наночастиц соединения, а с ограниченностью доступных питательных веществ. Поскольку поступление в почву оксида кремния вызывает активное развитие корневой системы растений, а в условиях модельного эксперимента и ограниченности жизненного пространства между растениями и микроорганизмами возникает конкуренция за элементы питания (Kuzyakov et al., 2013; Hortal et al., 2017). И доказательством этого предположения является отрицательная корреляционная зависимость ($r=-0,71$, при $p<0,05$) показателя обогащенности почвы бактериями рода *Azotobacter* и длины корней для всех вариантов опыта.

Результаты, полученные Li с соавторами (2012), показали, что выращивание растений на фоне внесения в почву НЧ значительно снижало их токсический

эффект, что связано с поглощением ионов цинка корневыми системами растений, улучшением условий минерального питания и сопротивляемости организма. Это связано с тем, что почвенные свойства, такие как pH, текстура, или содержание органического вещества, влияют на микробное сообщество (Fierer and Jackson 2006) и биодоступность различных классов загрязнителей (Simonin et al., 2015).

Исследователи отмечают, что токсический стресс, вызванный наночастицами, остается не до конца изученным из-за ограничений по тщательному изучению его молекулярных механизмов. Li W. с соавторами исследовали влияние НЧ церия на дождевого червя *Eisenia fetida* на молекулярном уровне с использованием подходов на основе мультиомики (транскриптомика, метаболомика и секвенирование 16 S рРНК) (Li W. et al., 2022). Ими было показано, что НЧ Се значительно увеличивали содержание МДА, железа и калия в червях, что свидетельствует об окислительном повреждении и дисбалансе питательных веществ. Также НЧ Се снижали уровни определенных генов и метаболитов, связанных с метаболизмом глицеролипидов и глицерофосфолипидов, что свидетельствует о производстве активных форм кислорода и последующем окислительном стрессе. Кроме того, активировался ген ABCD3, принадлежащий к семейству переносчиков ABC, что облегчало поглощение железа червями. Более того, повышенное содержание МДА, Fe и K после воздействия НЧ тесно связано с дисбалансом кишечной флоры. В частности, была отмечена более высокая относительная численность *Actinobacteriota* и более низкая относительная численность *Proteobacteria*. Li W. с соавторами показали, что НЧ в концентрации 50 и 500 мг/кг вызывали окислительный стресс и дисбаланс питательных веществ у дождевых червей с точки зрения генов, метаболитов и нарушений кишечного микробиома, а также установили связь между кишечным микробиомом и общими физиологическими реакциями хозяина.

Было показано, что наночастицы металлов вызывают неблагоприятные последствия на различных уровнях, начиная от фенотипов и заканчивая генами и метаболитами (Ali et al., 2015; Zhao et al., 2016). Однако в большинстве этих

исследований рассматривались только некоторые аспекты этого биологического континуума (т. е. мРНК, белок и метаболит) организмов в ответ на наночастицы, что затрудняло целостный обзор сигнальных процессов и биологических путей, связанных с фенотипом. Кроме того, наночастицы могут перемещаться в эпителиальные клетки кишечника у почвенных животных (Pluskota et al., 2009) и вызывать последующее повреждение (Lahive et al., 2014).

Исследование состояния микрофлоры кишечного тракта в нашей работе червей обусловлено тем, что кишечный тракт как орган пищеварения, всасывания и иммунитета, играют решающую роль в защите животных от экзогенных раздражителей (Magalhaes et al., 2007). Кишечник животных всегда колонизированы микробиотой, которая оказывает решающее влияние на иммунитет, метаболизм и здоровье хозяина (Agamennone et al., 2015; Berg et al., 2016). Потенциальные загрязнители могут изменить структуру микробного сообщества кишечника и вызвать дисбактериоз кишечной флоры (Li et al., 2018; Ding et al., 2020; Zhu et al., 2018a, 2018b), что может иметь многочисленные потенциальные неблагоприятные последствия для кишечника и состояния организма, например, окислительный стресс и дисбаланс элементов. Кроме того, изменения в составе микробиоты кишечника может повлиять на рост организма (Chen et al., 2018; Ding et al., 2020). Поэтому необходимо изучать изменения микробиоты кишечника в ответ на воздействие наночастиц, что и было сделано в нашей работе. Это будет способствовать объяснению нанотоксичности для всего организма. Насколько нам известно, связь между кишечной микробиотой и конкретными биологическими конечными точками, связанными со здоровьем хозяина, устанавливается редко и поэтому заслуживает дальнейшего изучения.

Дождевые черви, известные как беспозвоночные почвенной экосистемы, являются ключевыми её представителями и репрезентативными тест-организмами для оценки экологического риска (Vijver et al., 2003). Например, было показано, что 12 284 мг/кг наноцерия не влияли на выживание или размножение дождевых червей, но вызывали некоторую потерю целостности стенок тела и кишечного эпителия. (Лажив и др., 2014). Учитывая, что акцент их исследования был

сосредоточен только на гистологических наблюдениях, всестороннего и подробного понимания токсикологического воздействия наночастиц на почвенные организмы все еще не хватает. Сегодня исследователи стремятся раскрыть механизмы, лежащие в основе токсикологического действия наночервей на дождевых червей (*E. fetida*), например, было проведено исследование по оценке параметров после 28-дневного воздействия несмертельных концентраций. Особое внимание было уделено: (1) определению того, могут ли наночастицы вызывать окислительный стресс и дисбаланс питательных веществ у дождевых червей; (2) получить подробную молекулярную информацию (т. е. мРНК, метаболиты и кишечную микробиоту) об этих реакциях дождевых червей на воздействие наночастиц; (3) установить связи между микробиотой кишечника и гомеостазом окислительно-восстановительного потенциала/питательных веществ. Интеграция экспрессии генов с метаболическим профилем и кишечной микробиотой была выполнена для подтверждения фенотипических изменений дождевых червей, подвергшихся воздействию наночастиц на примере наночервя.

Хотя не было очевидного воздействия наночервя на биомассы дождевых червей наблюдалось дозозависимое увеличение общего содержания Се в дождевых червях. Кроме того, некоторые фенотипические параметры, такие как содержание МДА, были значительно повышены у дождевых червей, подвергшихся воздействию наночервя, что свидетельствует о повышенном окислительном стрессе. Было доказано, что НЧ червя могут запускать генерацию гидроксильного радикала в присутствии пероксидов (Zhang et al., 2011). Кроме того, наночерви в просвете кишечника были окружены бактериальными остатками, которые могли продуцировать некоторые пероксидоподобные метаболиты при проглатывании почвы (Aw, 2005). В то же время воздействие наночервя увеличивало содержание Fe и K в дождевых червях. Сообщается, что повышенное содержание Fe полезно для снижения количества АФК в листьях салата, подвергшихся воздействию наночервей (Dai et al., 2020). Это может быть связано с тем, что Fe служит кофактором многих антиоксидантных ферментов, таких как каталаза и супероксид. Исследователи полагают, что АФК активируют

проницаемые через мембрану K^+ каналы и увеличивают содержание K у растений (Laohavisit et al., 2012). Таким образом, НЧ могут действовать как экзогенный источник АФК, стимулировать возникновение окислительного стресса и нарушать баланс питательных веществ Fe и K в дождевых червях при воздействии НЧ.

НЧ, как известно, могут приводить к появлению продуктов окисления жирных кислот. Так, на метаболическом уровне содержание арахидоновой кислоты, основной полиненасыщенной жирной кислоты, являющейся мембранным компонентом, было значительно снижено при воздействии наночастиц, в частности церия. Арахидоновая кислота может образовывать стабильный продукт, т. е. МДА, путем катализа фермента циклооксигеназы (de Gaetano et al., 1980). Таким образом, снижение содержания арахидоновой кислоты способствовало увеличению содержания МДА за счет реакции арахидоновой кислоты с АФК у дождевых червей. Кроме того, уровни некоторых антиоксидантных молекул, таких как глутатион, L-карнозин, L-гистидин и L-метионин, были значительно снижены при воздействии наночерия. Это можно объяснить дисбалансом между АФК и неферментными антиоксидантными системами, которые были нарушены непрерывно генерируемыми АФК, а затем перестали защищаться от АФК (Zhao et al., 2016). Кроме того, производные фосфохолина, фосфатидилхолина и фосфорилхолина были значительно подавлены в при воздействии НЧ, что указывает на нарушение целостности мембраны. Точно так же в предыдущем исследовании сообщалось, что перекисное окисление липидов полиненасыщенной жирной кислоты приводило к повреждению мембраны за счет снижения уровней фосфатидилхолина и фосфорилхолина, что впоследствии влияло на стабильность и целостность мембран в экспонированных наночастицах ZnO *Enchytraeus crypticus* (He et al., 2020). Снижение экспрессии этих мембранных компонентов может быть связано с тем, что НЧ снижают экспрессию некоторых генов (ALDH, PNPLA2, dgkA, LYPLA3 и CERT1), участвующих в метаболизме глицеролипидов и глицерофосфолипидов у дождевых червей, что было выявлено с помощью

транскриптомики. Что касается минеральных питательных веществ у дождевых червей, повышенное содержание Fe может быть связано с усилением экспрессии гена ABCD3, принадлежащего к семейству переносчиков ABC, что необходимо для поглощения Fe (Mathew et al., 2014). Значительная активация гена ABCD3 была обнаружена в группах наночерв с дозой 50 мг/кг, что, вероятно, объясняет наблюдаемые более высокие уровни железа. В целом, изменения в этих метаболитах и генах помогают обеспечить глубокое понимание молекулярных реакций окислительного стресса и нарушения питательных веществ Fe у дождевых червей, подвергшихся воздействию наночерв в несмертельных концентрациях. Однако несоответствие между метаболомикой и транскриптомикой обнаружено не было. Например, низкая концентрация (50 мг/кг) воздействия наночерв нарушала больше ДЭГ и функциональных путей, чем высокая концентрация (500 мг/кг) воздействия наночерв, в то время как эта тенденция не была обнаружена для метаболических ответов. Некоторые предыдущие исследования также показали, что относительно более низкая доза воздействия (60 мг НЧ Ag/кг сухой почвы, 0,3 мг наночерв на растение) вызывала более выраженную дифференциальную экспрессию в белках и метаболитах (Vicho et al., 2016; Maria et al., 2021; Чжан и др., 2019). Добавление большого количества наночастиц в почву может повысить вероятность их агрегации и агломерации, тем самым снижая их биодоступность (Vicho et al., 2016; Tourinho et al., 2012). Напротив, относительно низкий уровень наночастиц в почве может легче рассеиваться и проявлять наноразмерные эффекты (Vicho et al., 2016; Tourinho et al., 2012). Растворение частиц и высвобождение ионов также могут происходить при низких дозах воздействия. Таким образом, в нашем исследовании наблюдаемый токсический эффект может быть результатом как ионных, так и твердых частиц исследуемых металлов.

Кроме того, возможное объяснение состоит в том, что изменения некоторых ДЭГ уникальны для воздействия малых доз наночастиц (Zhang et al., 2019). Это несоответствие в дальнейшем отразилось на закономерностях биосинтеза метаболизма аминокислот. Например, в группах наночерв, получавших дозу 500

мг/кг, гены, связанные с биосинтезом аминокислот, активировались, в то время как уровни аминокислот снижались. Это явление может быть связано с повышенным уровнем белков, учитывая, что аминокислоты являются субстратом биосинтеза белка. Функциональный анализ транскриптомики, а не метаболомики, показал, что гликолиз/глюконеогенез, метаболизм фруктозы и маннозы и метаболизм жирных кислот были значительно усилены для удовлетворения энергетических потребностей в нормальном выживании, размножении и детоксикации дождевых червей, подвергшихся воздействию наночерв (рис. 2В и 3Е, F) (Ratnasekhar et al., 2015; Sancho et al., 2009). Это может частично объяснить, почему биомасса червей не пострадала после воздействия наночерв. В целом несоответствие между транскриптомикой и метаболомикой может быть связано с тем, что метаболиты как конечный продукт экспрессии генов регулируются множественными процессами KEGG, эпигенетической регуляцией и посттрансляционными модификациями (Li et al., 2021).

Неблагоприятное влияние наночерв можно дополнительно выявить по изменению состава и структуры микробного сообщества кишечника, влияющему на метаболизм и здоровье хозяина (Li et al., 2018; Ding et al., 2020; Zhu et al., 2018a, 2018b). Здесь наночерв существенно не уменьшили альфа-разнообразие микробного сообщества кишечника, но заметно изменили их структуры и дестабилизировали микробные экологические сети. Наиболее подверженными влиянию типами в кишечнике были *Proteobacteria*, *Patescibacteria* (тенденция к снижению) и *Actinobacteriota* (тенденция к увеличению). Объяснение состоит в том, что накопление наночерв может напрямую влиять на кишечные микробы. Другая причина заключается в том, что изменения микробного сообщества почвы могут вызвать изменения микробов кишечника. Прямой контакт может спровоцировать окислительное повреждение тканей кишечника, что неизбежно приведет к изменению микробного сообщества кишечника (Chen et al., 2018; Li et al., 2018). Большинство представителей *Proteobacteria* являются факультативно или облигатно анаэробными (Marín, 2014), чувствительными к аэробной среде. Филум *Patescibacteria* в основном встречается в анаэробной среде (Herrmann et al.,

2019), что указывает на то, что большинство микробов, принадлежащих к типу *Patescibacteria*, также чувствительны к аэробной среде (Castelle et al., 2018). Следовательно, АФК, индуцированные наночервями, могут снижать относительную численность протеобактерий и патесибактерий в кишечнике дождевых червей. Известно, что *Actinobacteriota* может уничтожать АФК (Ballard and Towarnicki, 2020; Sutherland et al., 2021). Таким образом, высокий уровень АФК может стимулировать рост *Actinobacteriota*. Кроме того, изменения в микробном сообществе почвы также повлияли на микробиоту кишечника почвенной фауны, например коллембол (Ding et al., 2020). Ранее исследователи обнаружили, что наночервь снижает относительную численность *Actinobacteriota* в почве (Li et al., 2022), что может быть причиной увеличения количества *Actinobacteriota* в кишечнике. Поэтому в будущих исследованиях следует учитывать влияние загрязняющих веществ как на микробное сообщество почвы, так и на кишечные микробы.

Типы *Proteobacteria*, *Actinobacteriota* и *Patescibacteria* играют важную роль в глобальном метаболизме углерода, азота, серы и железа из-за их большого метаболического разнообразия (Marín, 2014; Herrmann et al., 2019). Дисбактериоз кишечного микробного сообщества может повлиять на метаболизм и здоровье хозяина, поскольку большинство кишечных микробов взаимодействуют с тканями кишечника как полезный симбионт (Daisley et al., 2020). В исследовании было показано, что изменения в микробном сообществе кишечника, вероятно, были связаны с нарушениями метаболических профилей целых дождевых червей после воздействия наночервя). В частности, относительная численность актинобактерий имела отрицательную связь с органогетероциклическими соединениями (например, урацилом, тиминном, урокаиновой кислотой, цитозинном и т. д.), которые могли нарушать метаболизм пиримидина. В то время как относительная численность *Proteobacteria* и *Patescibacteria* имела положительную связь с органическими соединениями азота (например, фосфорилхолином, N-оксидом триметиламина и т. д.), вероятно, влияя на биосинтез фосфолипидов и оксидантно-антиоксидантный баланс хозяина (Gatarek, Kaluzna-Czaplinska, 2021).

Кроме того, известно, что некоторые кишечные микробы были тесно связаны с окислительным стрессом и элементарным питательным веществом дождевых червей. Например, *Proteobacteria* отрицательно коррелировали с MDA, Fe и K, тогда как *Actinobacteriota* имели положительную корреляцию с MDA ($p < 0,05$ или $p < 0,01$). Тип протеобактерий, такой как род *Huphomicrobium* с нормальным метаболизмом, отрицательно коррелировал с АФК (Chen et al., 2018). Повышение уровня АФК может повредить росту некоторых кишечных микробов и изменить их метаболическую активность, что еще больше повлияет на метаболизм питательных веществ хозяина. Например, *Patescibacteria*, участвующие в цикле железа, широко распространены в анаэробной среде (Herrmann et al., 2019), что указывает на то, что большинство *Patescibacteria* являются анаэробами и чувствительны к аэробной среде (Castelle et al., 2018). Таким образом, АФК, генерируемые наноцерией, могут нарушать рост патесцибактерий и метаболизм железа хозяина. Приведенные выше результаты показали, что наноцерии нарушают состав микробного сообщества кишечника и их метаболическую активность, вызывая дальнейшие нарушения метаболизма питательных веществ и здоровья всего хозяина.

Для выбранных экспозиционных концентраций наноцерия в исследовании церий мог немного накапливаться в дождевых червях, не влияя на их рост. Однако наблюдалось явное повышение уровней MDA, Fe и K, что позволяет предположить, что воздействие наноцерия вызывает окислительное повреждение и элементный дисбаланс у дождевых червей. Эти фенотипические изменения были также подтверждены на молекулярном уровне. В частности, после 28-дневного воздействия было выявлено соответствующее снижение содержания арахидоновой кислоты, ДЭГ, SCM и кишечных микробов (*Proteobacteria* и *Patescibacteria*) и соответствующее увеличение кишечных микробов (*Actinobacteriota*). Эти нарушения в метаболических путях (метаболизм глицеролипидов и глицерофосфолипидов и переносчик ABC) и микробиоте кишечника, вероятно, отражали окислительный стресс и дисбаланс питательных веществ, наблюдаемые на фенотипическом уровне у червей, подвергшихся

воздействию наночерий. В целом, наши результаты подчеркнули важность интегративного омического анализа в расшифровке противоречивых фенотипических реакций в окислительном статусе организмов при воздействии наночерия. Это исследование позволяет по-новому взглянуть на токсическое действие наночерия на дозорных почвенных беспозвоночных с помощью многогранной молекулярной диагностики, которая также может быть применена к другим типам загрязнителей.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что наночастицы, которые были исследованы в работе, могут влиять на комплекс почвенной биоты (растения, беспозвоночные, почвенные микроорганизмы) почв, что, в свою очередь, требует дальнейшего углубленного изучения механизмов их биологического действия и поиска биомаркеров, отражающих данное воздействие.

Стимулирующее и ингибирующее рост воздействие наночастиц связано с концентрацией наночастиц, их природой, а выяснение пороговых доз НЧ на сегодняшний день является актуальной и широко обсуждаемой темой в научных исследованиях (Pošćić et.al., 2016; Wang et.al., 2016).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интегральные показатели токсического действия исследуемых НЧ представлены в табл. 10.

Таблица 10 – Величины, характеризующие биологическое действие НЧ

Тест-система	Показатель	НЧ Zn	НЧ Cu	НЧ SiO ₂
<i>E. coli</i> (экспозиция 60 мин)	EC ₂₀ , М	1×10 ⁻⁵	3,1×10 ⁻³	> 4
	EC ₅₀ , М	9×10 ⁻⁵	> 5×10 ⁻²	-
<i>E. fetida</i>	LC ₂₀ , мг/кг почвы	500 (иск. почва, 14 сут)	500 (иск. почва, 7 сут)	-
		100 (7 сут); 1000 (14 сут) (почва)	100 (7 сут); 250 (7 и 14 сут) (почва)	
	LC ₈₀ , мг/кг почвы	-	500 (иск. почва, 14 сут)	-
<i>T. vulgare</i>	Фитоэффект	50-1000 (почва)	250; 500 (почва)	-

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования моделей *Eisenia fetida* и *Triticum aestivum* для экспресс-диагностики токсичности НЧ и необходимости более детального изучения его влияния на биотический компонент экосистем и круговорот биогенных элементов в условиях долгосрочного полевого опыта.

На искусственном субстрате было показано наличие прямой корреляционной связи между содержанием Zn в черве и активностью каталазы ($r=0,75$); скоростью накопления Zn и активностью каталазы ($r=0,74$). Биоаккумуляция Zn отрицательно коррелировало с активностью каталазы ($r=-0,73$). Содержание Zn в черве, содержание Zn в почве и скорость накопления Sn

отрицательно коррелировало с содержанием белка в черве ($r=-0,78$, $r=-0,88$ и $r=-0,78$, соответственно).

На природной почве было показано наличие прямой корреляционной связи между биоаккумуляцией Zn и активностью каталазы ($r=0,83$). Содержание Zn в черве, содержание Zn в почве и скорость накопления отрицательно коррелировало с содержанием белка в черве ($r=-0,85$, $r=-0,79$ и $r=-0,73$, соответственно).

На искусственной почве было показано наличие отрицательной корреляции между содержанием Cu в черве и активностью СОД ($r=-0,96$), между содержанием Cu в почве и активностью СОД ($r=-0,82$).

На природной почве содержание Cu в черве, содержание Cu в почве и скорость накопления Cu положительно коррелировало с содержанием МДА в теле червя ($r=0,92$, $r=0,84$, $r=0,92$). Биоаккумуляция положительно коррелировала с активностью СОД ($r=0,83$), а содержание металла в почве – отрицательно ($r=-0,85$).

На искусственной почве содержание Si в черве, содержание Si в почве и скорость накопления Si отрицательно коррелировала с содержанием белка в теле червя ($r=-0,73$; $r=-0,72$; $r=-0,73$, соответственно). Также содержание Si в черве, содержание Si в почве и скорость накопления Si положительно коррелировала с активностью СОД ($r=0,89$; $r=0,85$; $r=0,89$, соответственно).

На природной почве содержание Si в черве и скорость накопления Si положительно коррелировало с активностью СОД ($r=0,89$ и $r=0,88$, соответственно). Биоаккумуляция прямо коррелировала с активностью каталазы ($r=0,83$).

Таким образом, действие наночастиц, исследованных в работе, имеет разнонаправленный характер, а также вызывает различные приспособительные реакции червей

ВЫВОДЫ

1) Наночастицы Zn способствовали 50%-ному снижению биолюминесценции *E. coli* K12 TG1 в концентрации 9×10^{-5} М. Менее выраженный эффект наблюдался при внесении НЧ Cu.

2) Положительное влияние на морфо-биохимические параметры *T. vulgare*

оказывали НЧ SiO_2 в концентрации 50 и 100 мг/кг почвы. Отрицательный эффект на показатели *E. fetida* оказывали НЧ Zn и НЧ Cu на искусственной почве при внесении 250-500 мг/кг; НЧ Zn - при внесении в почву 250-500 мг/кг, НЧ Cu – 100 и 500 мг/кг, НЧ SiO_2 – 250-1000 мг/кг.

3) Численность *Azotobacter* и целлюлозолитических микроорганизмов в кишечнике червей увеличивалась при внесении НЧ SiO_2 в почву. Численность всех эколого-трофических групп в кишечнике червей и в почве снижалась при внесении НЧ Zn и НЧ Cu.

4) На искусственной почве и в черноземе накопление меди, цинка и кремния являлось дозозависимым параметром. Организм червей способен к биоаккумуляции меди и цинка с последующим выведением при высоких концентрациях НЧ цинка и меди. На искусственном субстрате и в почве НЧ Cu способствовали наибольшему накоплению металла в черве и почве при концентрации 500 мг/кг (11,91 и 11,7 мг/кг Cu, соответственно). Биоаккумуляция Cu отрицательно коррелировало с концентрацией НЧ в почвенном субстрате (от $r=-0,73$ до $r=-0,83$). Пороги регуляции уровня исследуемых элементов в организме червя: для Cu в искусственной почве – 500 мг/кг, в черноземе – 500 мг/кг НЧ; для Zn в искусственной и природной почве – 500 мг/кг НЧ; для Si – порог не установлен.

На искусственных и в естественных условиях поведение НЧ Cu сопровождалось максимальным накоплением металла в черве и почве при дозе 500 мг/кг (11,91 и 11,7 мг/кг Cu, соответственно). Биоаккумуляция Cu отрицательно коррелировало с дозой НЧ на искусственной почве и в естественных условиях ($r=-0,73$ и $r=-0,83$, соответственно). Максимум содержания Si в черве наблюдался при 1000 мг/кг НЧ на искусственной почве и в естественных условиях (252,4 мг/кг и 309 мг/кг, соответственно). Биоаккумуляция Si отрицательно коррелировало с дозой НЧ в почве в естественных условиях ($r=-0,4$). Пороги регуляции уровня металлов в организме червя: для Cu на искусственной почве – 29 мг/кг, на природной почве – 500 мг/кг НЧ; для Zn на искусственной и природной почве – 500 мг/кг НЧ; для Si – порог не установлен.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамян, А.Н. Биоактивные наноконпоненты для медицины и сельского хозяйства / А. Н. Абрамян [и др.] // Наноиндустрия. – 2007. – № 6. – С. 24–25.
2. Бабушкина, И. В. Влияние наночастиц цинка на бактериальные клетки / И. В. Бабушкина, Е. Г. Чеботарева, С. В. Орлов // Вестник РУДН. Серия Медицина. – 2012. – № 3. – С. 22–25.
3. Бабушкина, И. В. Наночастицы металлов в лечении экспериментальных гнойных ран / И. В. Бабушкина // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7. – № 2. – С. 530–533.
4. Боев, В.М. Оценка канцерогенного риска для здоровья населения моногородов и сельских поселений / В. М. Боев [и др.] // Анализ риска здоровью. – 2017. – №. 2. – С. 57-64.
5. Бронский, В. А. Влияние медно-серного комбината на повышение индекса загрязнения атмосферы (ИЗА) г. Медногорска / В. А. Бронский, В. А. Солопова, Э. Р. Хисанова // Инновационная наука. – 2020. – №. 4. – С. 13-15.
6. Васильев, А.Н. Исследование загрязнения мелкодисперсной пылью PM10 и PM2.5 воздушной среды города Волгограда / А. Н. Васильев [и др.] // Инженерный вестник Дона. – 2020. – №. 2 (62). – С. 34.
7. Волыхина, В. Е. Супероксиддисмутазы: структура и свойства / В.Е. Волыхина, Е. В. Шафрановская // Вестник ВГМУ. – 2009. – Т. 8. – №4. – С. 1–18.
8. Глущенко, Н. Н. Сравнительная токсичность солей и наночастиц металлов и особенности их биологического действия / Н. Н. Глущенко, О. А. Богословская, И. П. Ольховская // Известия Академии промышленной экологии. – 2006. – №3. – С. 46–47.
9. Годымчук, А. Ю. Экология наноматериалов: учебное пособие / А. Ю. Годымчук, Г. Г. Савельев, А. П. Зыкова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 272 с.

10. Голохваст, К.С. Токсикологические и антимикробные свойства минеральных наночастиц / К. С. Голохваст [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2009. – Т. 11. – №. 5-2.

11. Грачева, Д. О. Анализ рынка нанотехнологий в Российской Федерации / Д. О. Грачева, М. А. Каменский //Заметки ученого. – 2021. – №. 2. – С. 224-230.

12. Клименти, Н. Ю. Исследование опасных и вредных факторов технологического процесса производства силикатного кирпича / Н. Ю. Клименти, О. С. Власова, С. И. Голубева //Инженерный вестник Дона. – 2021. – №. 4 (76). – С. 334-346.

13. Колесников, С. Влияние наночастиц Al_2O_3 , TiO_2 , Fe_2O_3 и SiO_2 на биологическое состояние чернозема обыкновенного / С. Колесников [и др.] // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2019. – №. 3 (203). – С. 95-100.

14. Манжилевская, С. Е. Снижение влияния загрязнения частицами мелкодисперсной пыли PM₀, 5-PM₁₀ при строительстве на здоровье рабочих / С.Е. Манжилевская, Л. К. Петренко, И. С. Кобелева //Инженерный вестник Дона. – 2020. – №. 7 (67).

15. Орлова, В. А. Оценка токсичности загрязнения почв наночастицами оксида кремния в тесте *triticum aestivum l* / В. А. Орлова // Нанотехнологии в сельском хозяйстве: перспективы и риски: Материалы международной научно-практической конференции, Оренбург, 26–27 сентября 2018 года. – Оренбург: ФНЦ БСТ РАН, 2018. – С. 240-245.

16. Паничкин, Л. А. Использование нанопорошков металлов для предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур / Л. А. Паничкин, А. П. Райкова // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – Вып. 1 – 2009. – С. – 59–65.

17. Радилов, А. С. Экспериментальная оценка токсичности и опасности наноразмерных материалов / А. С. Радилов, А. В. Глушкова, С. А. Дулов //Нанотехнологии и наука. – 2009. – № 1. – С. 86–89.

18. Резниченко, И.С. Сравнительный анализ методик очищения пищеварительной системы дождевых червей для экотоксикологических исследований на *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) / И.С. Резниченко // Фундаментальные исследования. – 2013. – №. 6-5. – С. 1156-1159.

19. Романова, А. П. Особенности применения наноразмерных форм микроэлементов в сельском хозяйстве (обзор) / А. П. Романова, В. В. Титова, А. М. Макаева // Животноводство и кормопроизводство. – 2018. – Т. 101. – №. 2.

20. Соркина, Н. С. Патоморфоз заболеваний бронхолегочной системы у работающих в контакте с аэрозолями цветных металлов / Н. С. Соркина [и др.] // Пульмонология. – 2020. – №. 4. – С. 81-85. – DOI: 10.18093/0869-0189-2008-0-4-81-85

21. Соседова, Л. М. Воздействие наночастиц металлов на почвенный биоценоз (обзор литературы) / Л. М. Соседова, М. А. Новиков, Е. А. Титов // Гигиена и санитария. – 2020. – Т. 99. – №. 10. – С. 1061-1066.

22. Терехова, В. А. Инженерные наноматериалы в почве: проблемы оценки их воздействия на живые организмы / В. А. Терехова, М. М. Гладкова // Почвоведение. – 2014. № 1, с. 82–90.

23. Фельдблюм, В. «Нано» на стыке наук: нанообъекты, нанотехнологии, нанобудущее [Электронный ресурс] / В. Фельдблюм // Электронная библиотека Северного (Арктического) федерального университета им. М. В. Ломоносова. Ярославль, 2013. – Режим доступа: <http://narfu.ru/university/library/books/0706.pdf>.

24. Хазиев, Ф. Х. Методы почвенной энзимологии / Методы почвенной энзимологии / Ф. Х. Хазиев. – М.: Наука, 2005. – 251 с.

25. Чурилов, Д. Г. Экологически безопасные нормы при контакте наночастиц с биообъектами / Д. Г. Чурилов, В. В. Чурилова, Г. И. Чурилов // Будущее науки-2020. – 2020. – С. 397-401.

26. Adams, L. K. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions / L. K. Adams, D. Y. Lyon, P. J. Alvarez // Water research. – 2006. – Т. 40. – №. 19. – С. 3527-3532. – DOI: 10.1016/j.watres.2006.08.004

27. Agarwal, H. Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route / H. Agarwal [et al] // *Chemico-biological interactions*. – 2018. – T. 286. – C. 60-70. – DOI: 10.1016/j.cbi.2018.03.008
28. Ameen, F. A review on metal-based nanoparticles and their toxicity to beneficial soil bacteria and fungi / F. Ameen [et al] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2021. – T. 213. – C. 112027. – DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112027
29. Amorim, M. J. Avoidance test with *Enchytraeus albidus* (*Enchytraeidae*): effects of different exposure time and soil properties / M. J. Amorim [et al] // *Environmental Pollution*. – 2008. – T. 155. – №. 1. – C. 112-116. – DOI: 10.1016/j.envpol.2007.10.028
30. Amorim, M. J. Energy basal levels and allocation among lipids, proteins, and carbohydrates in *Enchytraeus albidus*: changes related to exposure to Cu salt and Cu nanoparticles / M. J. Amorim [et al] // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2012. – T. 223. – №. 1. – C. 477-482. – DOI: 10.1007/s11270-011-0867-9
31. Amorim, M. J. Toxicity of copper nanoparticles and CuCl₂ salt to *Enchytraeus albidus* worms: survival, reproduction and avoidance responses / M. J. Amorim, J. J. Scott-Fordsmand // *Environmental pollution*. – 2012. – T. 164. – C. 164-168. – DOI: 10.1016/j.envpol.2012.01.015Get rights and content
32. Antisari, L. V. Soil microbial biomass carbon and fatty acid composition of earthworm *Lumbricus rubellus* after exposure to engineered nanoparticles / L. V. Antisari [et al] // *Biology and fertility of soils*. – 2015. – T. 51. – №. 2. – C. 261-269. – DOI: 10.1007/s00374-014-0972-1
33. Applerot, G. Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury / G. Applerot [et al] // *Advanced Functional Materials*. – 2009. – T. 19. – №. 6. – C. 842-852. – DOI: 10.1002/adfm.200801081
34. Asadishad, B. Amendment of agricultural soil with metal nanoparticles: effects on soil enzyme activity and microbial community composition / B. Asadishad [et al] // *Environmental science & technology*. – 2018. – T. 52. – №. 4. – C. 1908-1918. – DOI: 10.1021/acs.est.7b05389

35. Aslani, F. Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview / F. Aslani [et al] // *The Scientific World Journal*. – 2014. – T. 75. – C. 28. – DOI: 10.1155/2014/641759
36. Awet, T. T. Effects of polystyrene nanoparticles on the microbiota and functional diversity of enzymes in soil / T. T. Awet [et al] // *Environmental Sciences Europe*. – 2018. – T. 30. – №. 1. – C. 1-10. – DOI: 10.1186/s12302-018-0140-6
37. Azevedo, C. Engineered albumin-functionalized nanoparticles for improved FcRn binding enhance oral delivery of insulin / C. Azevedo [et al] // *Journal of Controlled Release*. – 2020. – T. 327. – C. 161-173. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.08.005
38. Azizi, Z. Thermal performance and friction factor of a cylindrical microchannel heat sink cooled by Cu-water nanofluid / Z. Azizi, A. Alamdari, M. R. Malayeri // *Applied Thermal Engineering*. – 2016. – T. 99. – C. 970-978. – DOI: 10.1016/j.applthermaleng.2016.01.140
39. Baranowska-Wójcik, E. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on human health—A review / E. Baranowska-Wójcik [et al] // *Biological trace element research*. – 2020. – T. 193. – №. 1. – C. 118-129. – DOI: 10.1007/s12011-019-01706-6
40. Barsova, N. Current state and dynamics of heavy metal soil pollution in Russian Federation—A review / N. Barsova [et al] // *Environmental Pollution*. – 2019. – T. 249. – C. 200-207. – DOI: 10.1016/j.envpol.2019.03.020
41. Bevivino, A. Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region / A. Bevivino [et al] // *PloS one*. – 2014. – T. 9. – №. 8. – C. e105515. – DOI: 10.1371/journal.pone.0105515
42. Blechinger, J. Uptake kinetics and nanotoxicity of silica nanoparticles are cell type dependent / J. Blechinger [et al] // *Small*. – 2013. – T. 9. – №. 23. – C. 3970-3980. – DOI: 10.1002/smll.201301004
43. Boisselier, E. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity / E. Boisselier, D. Astruc // *Chemical society reviews*. – 2009. – T. 38. – №. 6. – C. 1759-1782. – DOI: 10.1039/B806051G

44. Bramhanwade, K. Fungicidal activity of Cu nanoparticles against *Fusarium* causing crop diseases / K. Bramhanwade [et al] //Environmental Chemistry Letters. – 2016. – T. 14. – №. 2. – C. 229-235. – DOI: 10.1007/s10311-015-0543-1
45. Bremner, I. Manifestations of copper excess / I. Bremner //The American journal of clinical nutrition. – 1998. – T. 67. – №. 5. – C. 1069S-1073S.
46. Brown, P. J. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon/ P. J. Brown [et al] // Chemosphere. – 2004. – V. 57. – N. 11. – P. 1675-1681. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.05.041
47. Brunner, T. J. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility / T. J. Brunner [et al] //Environmental science & technology. – 2006. – T. 40. – №. 14. – C. 4374-4381. – DOI: 10.1021/es052069i
48. Bundschuh, M. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? / M. Bundschuh [et al] //Environmental Sciences Europe. – 2018. – T. 30. – №. 1. – C. 1-17. – DOI: 10.1186/s12302-018-0132-6
49. Burello, E. A theoretical framework for predicting the oxidative stress potential of oxide nanoparticles / E. Burello, A. P. Worth // Nanotoxicology. – 2011. – T. 5. – №. 2. – C. 228-235. – DOI: 10.3109/17435390.2010.502980
50. Burgos, M. G. Cu and Cd effects on the earthworm *Lumbricus rubellus* in the laboratory: multivariate statistical analysis of relationships between exposure, biomarkers, and ecologically relevant parameters / M. G. Burgos [et al] // Environmental science & technology. – 2005. – V. 39. – N. 6. – P. 1757-1763. – DOI: 10.1021/es049174x
51. Buzea, C. Nanomaterials and their classification / C. Buzea, I. Pacheco // In: EMR/ESR/EPR Spectroscopy for Characterization of Nanomaterials. – Springer, New Delhi, 2017. – C. 3-45.
52. Carbone, S. Bioavailability and biological effect of engineered silver nanoparticles in a forest soil / S. Carbone [et al] //Journal of hazardous materials. – 2014. – T. 280. – C. 89-96. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.07.055

53. Carrillo-Inungaray, M. L. Use of nanoparticles in the food industry: advances and perspectives / M. L. Carrillo-Inungaray [et al] // Impact of nanoscience in the food industry. – 2018. – C. 419-444. – DOI: 10.1016/B978-0-12-811441-4.00015-7
54. Chai, H. The effect of metal oxide nanoparticles on functional bacteria and metabolic profiles in agricultural soil / H. Chai [et al] // Bulletin of environmental contamination and toxicology. – 2015. – T. 94. – №. 4. – C. 490-495. – DOI: 10.1007/s00128-015-1485-9
55. Chelikani, P. Diversity of structures and properties among catalases / P. Chelikani, I. Fita, P.C. Loewen // Cell Mol Life Sci. – 2004. – V. 61. – N 2. P.192-208. – DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5
56. Chen, L. The toxicity of silica nanoparticles to the immune system / L. Chen [et al] //Nanomedicine. – 2018. – T. 13. – №. 15. – C. 1939-1962. – DOI: 10.2217/nmm-2018-0076
57. Chen, M. Nuclear polyglutamine-containing protein aggregates as active proteolytic centers / M. Chen [et al] //The Journal of cell biology. – 2008. – T. 180. – №. 4. – C. 697-704. – DOI: 10.1083/jcb.200708131
58. Cherukuri, P. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence / P. Cherukuri [et al] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – T. 103. – №. 50. – C. 18882-18886. – DOI: 10.1073/pnas.0609265103
59. Chunjaturas, W. Shift of bacterial community structure in two Thai soil series affected by silver nanoparticles using ARISA / W. Chunjaturas [et al] //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2014. – T. 30. – №. 7. – C. 2119-2124. – DOI: 10.1007/s11274-014-1633-0
60. Churilov, G. I. Agroecological grounding for the application of metal nanopowders in agriculture / G. I. Churilov [et al] //International Journal of Nanotechnology. – 2018. – T. 15. – №. 4-5. – C. 258-279. – DOI: 10.1504/IJNT.2018.094786

61. Coleman, J. G. Assessing the fate and effects of nano aluminum oxide in the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida* / J. G. Coleman [et al] //Environmental toxicology and chemistry. – 2010. – T. 29. – №. 7. – C. 1575-1580. – DOI:
62. Collins, D. Assessing the impact of copper and zinc oxide nanoparticles on soil: a field study / D. Collins [et al] // PLoS One. – 2012. – №. 7. – e42663. – DOI: 10.1371/journal.pone.0042663
63. da Rocha, A. Ecotoxicological studies of ZnO and CdS nanoparticles on *Chlorella vulgaris* photosynthetic microorganism in Seine river water / A. da Rocha [et al] //Nanomaterials. – 2020. – T. 10. – №. 2. – C. 227. – DOI: 10.3390/nano10020227
64. Dale, A. L. Modeling nanomaterial environmental fate in aquatic systems / A. L. Dale [et al] // Environ Sci Technol. – 2015. № 49. C. 2587–2593. – DOI: 10.1021/es505076w
65. Dang, F. Transfer and toxicity of silver nanoparticles in the food chain / F. Dang [et al] //Environmental Science: Nano. –2021. – № 8. – C. 1519-1535. – DOI: 10.1039/D0EN01190H
66. Dazy, M. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica Hedw* / M. Dazy, J. F. Masfaraud, J. F. Ferard // Chemosphere. – 2009. – V. 75. – N. 3. – P. 297-302. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.045
67. Dhasmana, A. Nanoparticles: Applications, Toxicology and Safety Aspects / A. Dhasmana [et al] // Perspectives in Environmental Toxicology. – Springer, Cham, 2017. – C. 47-70.
68. Dietz, K. J. Plant nanotoxicology / K. J. Dietz, S. Herth // Trends in plant science. – 2011. – T. 16. – №. 11. – C. 582-589. – DOI: 10.1016/j.tplants.2011.08.003
69. Drexler, E. K. Engines of Creation: the Coming Era of Nanotechnology / E. K. Drexler. – Oxford: University Press Oxford, 1992. – 102 c.
70. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge //Physiological Reviews. – 2002. – T. 82. – №. 1. – C. 47-97. – DOI: 10.1152/physrev.00018.2001

71. Du, J. Do environmental concentrations of zinc oxide nanoparticle pose ecotoxicological risk to aquatic fungi associated with leaf litter decomposition? / J. Du [et al] //Water research. – 2020. – T. 178. – C. 115840. – DOI: 10.1016/j.watres.2020.115840
72. Du, W. Comparison study of zinc nanoparticles and zinc sulphate on wheat growth: From toxicity and zinc biofortification / W. Du [et al] //Chemosphere. – 2019. – T. 227. – C. 109-116. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.168
73. Du, W. TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil / W. Du [et al] // Journal of Environmental Monitoring. – 2011. – T. 13. – №. 4. – C. 822-828. – DOI: 10.1039/C0EM00611D
74. El-Temsah, Y.S. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil / Y. S. El-Temsah, E. J. Joner // Environmental Toxicity. – 2010. – № 10. – DOI: 10.1002/tox.20610.
75. Etesami, H. Silicon (Si): Review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants / H. Etesami, B. R. Jeong //Ecotoxicology and environmental safety. – 2018. – T. 147. – C. 881-896. – DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.063
76. Evans, P. Large-scale application of nanotechnology for wood protection / P. Evans, H. Matsunaga, M. Kiguchi // Nature Nanotechnology. – 2008. – T. 3. – №. 10. – C. 577-577. – DOI: 10.1038/nnano.2008.286
77. Feris, K. Electrostatic interactions affect nanoparticle-mediated toxicity to gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / K. Feris [et al] // Langmuir. – 2010. – T. 26. – №. 6. – C. 4429-4436. – DOI: 10.1021/la903491z
78. Feynman, R. P. There's plenty of room at the bottom / R. P. Feynman //Resonance. – 2011. – T. 16. – №. 9. – C. 890-905. – DOI:
79. Fierer, N. The diversity and biogeography of soil bacterial communities / N. Fierer, R. B. Jackson //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – T. 103. – №. 3. – C. 626-631. – DOI: 10.1073/pnas.0507535103

80. Fortner, J. D. Reaction of water-stable C60 aggregates with ozone / J. D. Fortner [et al] //Environmental science & technology. – 2007. – T. 41. – №. 21. – C. 7497-7502. – DOI:
81. Franklin, N. M. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility / N. M. Franklin [et al] //Environmental science & technology. – 2007. – T. 41. – №. 24. – C. 8484-8490. – DOI: 10.1021/es071445r
82. Galdames, A. Zero-Valent Iron Nanoparticles for Soil and Groundwater Remediation / A. Galdames [et al] //International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2020. – T. 17. – №. 16. – C. 5817. – DOI: 10.3390/ijerph17165817
83. Garbayo, E. Nanomedicine and drug delivery systems in cancer and regenerative medicine / E. Garbayo [et al] //Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. – 2020. – T. 12. – №. 5. – C. e1637. – DOI: 10.1002/wnan.1637
84. García-Gómez, C. Study of Zn availability, uptake, and effects on earthworms of zinc oxide nanoparticle versus bulk applied to two agricultural soils: Acidic and calcareous / C. García-Gómez [et al] //Chemosphere. – 2020. – T. 239. – C. 124814. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124814
85. Gazzi, A. Graphene, other carbon nanomaterials and the immune system: toward nanoimmunity-by-design / A. Gazzi [et al] //Journal of Physics: Materials. – 2020. – T. 3. – №. 3. – C. 034009. – DOI: 10.1088/2515-7639/ab9317
86. Ge, Y. Identification of soil bacteria susceptible to TiO₂ and ZnO nanoparticles / Y. Ge, J. P. Schimel, P. A. Holden //Applied and environmental microbiology. – 2012. – T. 78. – №. 18. – C. 6749-6758. – DOI: 10.1128/AEM.00941-12
87. Ghafariyan, M. H. Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll / M. H. Ghafariyan [et al] //Environmental science & technology. – 2013. – T. 47. – №. 18. – C. 10645-10652. – DOI: 10.1021/es402249b

88. Giese, B. Risks, release and concentrations of engineered nanomaterial in the environment / B. Giese [et al] //Scientific reports. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 1-18. – DOI: 10.1038/s41598-018-19275-4
89. Gilbert, B. The fate of ZnO nanoparticles administered to human bronchial epithelial cells / B. Gilbert [et al] //ACS nano. – 2012. – T. 6. – №. 6. – C. 4921-4930. – DOI: 10.1021/nn300425a
90. Giraldo, J. P. Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing / J. P. Giraldo [et al] //Nature materials. – 2014. – T. 13. – №. 4. – C. 400-408. – DOI: 10.1038/nmat3890
91. Gleiter, H. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure / H. Gleiter //Acta materialia. – 2000. – T. 48. – №. 1. – C. 1-29. – DOI: 10.1016/S1359-6454(99)00285-2
92. Gomes, S. I. Cellular energy allocation to assess the impact of nanomaterials on soil invertebrates (*Enchytraeids*): the effect of Cu and Ag / S. I. Gomes, J. J. Scott-Fordsmand, M. J. B. Amorim // International journal of environmental research and public health. – 2015. – T. 12. – №. 6. – C. 6858-6878. – DOI: 10.3390/ijerph120606858
93. Gomes, T. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* / T. Gomes [et al] //Aquatic toxicology. – 2012. – T. 118. – C. 72-79. – DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.03.017
94. Gong, H. J. Silicon deposition in the root reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by reducing bypass flow / H. J. Gong, D. P. Randall, T. J. Flowers // Plant, Cell & Environment. – 2006. – T. 29. – №. 10. – C. 1970-1979. – DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01572.x
95. Gottschalk, F. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies / F. Gottschalk, T. Y. Sun, B. Nowack //Environmental pollution. – 2013. – T. 181. – C. 287-300. – DOI: 10.1016/j.envpol.2013.06.003
96. Gottschalk, F. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions / F. Gottschalk

[et al] //Environmental science & technology. – 2009. – T. 43. – №. 24. – C. 9216-9222. – DOI: 10.1021/es9015553

97. Gupta, S. Earthworm coelomocytes as nanoscavenger of ZnO NPs / S. Gupta, T. Kushwah, S.Yadav //Nanoscale research letters. – 2014. – T. 9. – №. 1. – C. 1-10. – DOI: 10.1186/1556-276X-9-259

98. Hamelink, J.L. Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions / J.L. Hamelink. – Boca Raton, FL: Lewis Pub, 1994. – 258 p.

99. Handy, R. D. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis / R. D. Handy [et al] //Ecotoxicology. – 2008. – T. 17. – №. 5. – C. 396-409. – DOI: 10.1007/s10646-008-0205-1

100. Hänsch, M. Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil / M. Hänsch, C. Emmerling //Journal of Plant Nutrition and Soil Science. – 2010. – T. 173. – №. 4. – C. 554-558. – DOI: 10.1002/jpln.200900358

101. He, D. Silver nanoparticle– reactive oxygen species interactions: application of a charging– discharging model / D. He [et al] // The Journal of Physical Chemistry C. – 2011. – T. 115. – №. 13. – C. 5461-5468. – DOI: 10.1021/jp111275a

102. Heckmann, L. H. Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida* / L. H. Heckmann [et al] //Ecotoxicology. – 2011. – T. 20. – №. 1. – C. 226-233. – DOI: 10.1007/s10646-010-0574-0

103. Heikens, A. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates / A. Heikens, W.J. Peijnenburg, A.J. Hendriks // Environmental Pollution. – 2001. – V. 113. – N. 3. – P. 385-393. – DOI: 10.1016/S0269-7491(00)00179-2

104. Helaly, M. N. Effect of nanoparticles on biological contamination of 'in vitro' cultures and organogenic regeneration of banana / M. N. Helaly [et al] //Australian Journal of Crop Science. – 2014. – T. 8. – №. 4. – C. 612-624.

105. Hendrickx F. The impact of engineered cobalt, iron, nickel and silver nanoparticles on soil bacterial diversity under field conditions / V. Shah [et al] //Environmental Research Letters. – 2014. – T. 9. – №. 2. – C. 024001. – DOI: 10.1088/1748-9326/9/2/024001

106. Hendrickx, F. The importance of biological factors affecting trace metal concentration as revealed from accumulation patterns in co-occurring terrestrial invertebrates / F. Hendrickx [et al] // *Environmental Pollution*. – V. 127. – N. 3. – P. 335-341. – DOI: 10.1016/j.envpol.2003.09.001
107. Hong, S. Interaction of poly (amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport / S. Hong [et al] // *Bioconjugate chemistry*. – 2004. – T. 15. – №. 4. – C. 774-782. – DOI: 10.1021/bc049962b
108. Honsi, T. G. Lysosomal fragility in earthworms (*Eisenia veneta*) exposed to heavy metal contaminated soils from two abandoned pyrite ore mines in Southern Norway / T. G. Honsi [et al] // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 2003. – V.142. – C. 27-37. – DOI: 10.1023/A:1022003809634
109. Hortal, S. Plant-plant competition outcomes are modulated by plant effects on the soil bacterial community / S. Hortal [et al] // *Scientific reports*. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 1-9. – DOI: 10.1038/s41598-017-18103-5
110. Hou, D. Sustainable soil use and management: An interdisciplinary and systematic approach / D. Hou [et al] // *Science of the Total Environment*. – 2020. – T. 729. – C. 138961 – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138961
111. Hsueh, Y. H. The antimicrobial properties of silver nanoparticles in *Bacillus subtilis* are mediated by released Ag⁺ ions / Y. H. Hsueh [et al] // *PloS one*. – 2015. – T. 10. – №. 12. – C. e0144306. – DOI: 10.1371/journal.pone.0144306
112. Hu, X. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles / X. Hu [et al] // *Science of the Total Environment*. – 2009. – T. 407. – №. 8. – C. 3070-3072. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.01.033
113. Huang, Y. W. Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: recent insights from in vitro studies / Y. W. Huang, C. Wu, R. S. Aronstam // *Materials*. – 2010. – T. 3. – №. 10. – C. 4842-4859. – DOI: 10.3390/ma3104842
114. Hussain, N. Green synthesis of stable Cu (0) nanoparticles onto reduced graphene oxide nanosheets: a reusable catalyst for the synthesis of symmetrical biaryls from arylboronic acids under base-free conditions / N. Hussain [et al] // *Catalysis*

Science & Technology. – 2015. – T. 5. – №. 2. – C. 1251-1260 – DOI: 10.1039/C4CY01229A

115. Imtiaz, M. Silicon occurrence, uptake, transport and mechanisms of heavy metals, minerals and salinity enhanced tolerance in plants with future prospects: a review / M. Imtiaz [et al] //Journal of Environmental Management. – 2016. – T. 183. – C. 521-529. – DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.09.009

116. Inal, A. Silicon increases tolerance to boron toxicity and reduces oxidative damage in barley/ A. Inal, D. J. Pilbeam, A. Gunes //Journal of Plant Nutrition. – 2009. – T. 32. – №. 1. – C. 112-128. – DOI: 10.1080/01904160802533767

117. Ismail, S. M. Comparative toxicity, growth rate and biochemical effect of certain pesticides on earthworm *Aporrectodea caliginosa* / S. M. Ismail [et al] //7th National Congress on Pests and Diseases of Vegetables and Fruits in Egypt, Ismailia, Egypt. – 1997.

118. Jager, T. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (*Oligochaeta*) / T. Jager [et al] //Environmental science & technology. – 2003. – T. 37. – №. 15. – C. 3399-3404. – DOI: 10.1021/es0340578

119. Jiang, Y. $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: An efficient catalyst system that in situ generates Cu_2O nanoparticles and HOAc for Huisgen click reactions / Y. Jiang [et al] //RSC Advances. – 2013. – T. 4. – №. 2. – C. 1010-1014. – DOI: 10.1039/C3RA45437A

120. Jiang, B. Impacts of heavy metals and soil properties at a Nigerian e-waste site on soil microbial community / B. Jiang [et al] //Journal of hazardous materials. – 2019. – T. 362. – C. 187-195. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.08.060

121. Jia-Wen, W. U. Mechanisms of enhanced heavy metal tolerance in plants by silicon: a review / W. U. Jia-Wen [et al] //Pedosphere. – 2013. – T. 23. – №. 6. – C. 815-825. – DOI: 10.1016/S1002-0160(13)60073-9

122. Johnston, L. J. Key challenges for evaluation of the safety of engineered nanomaterials / L. J. Johnston [et al] //NanoImpact. – 2020. – T. 18. – C. 100219. – DOI: 10.1016/j.impact.2020.100219

123. Kadiyala, U. Unexpected insights into antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / U. Kadiyala [et al] //Nanoscale. – 2018. – T. 10. – №. 10. – C. 4927-4939. – DOI: 10.1039/C7NR08499D
124. Kahru, A., Dubourguier H. C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology[Текст] / A. Kahru, H. C. Dubourguier //Toxicology. – 2010. – T. 269. – №. 2-3. – C. 105-119. – DOI: 10.1016/j.tox.2009.08.016
125. Kalteh, M. Effect of silica nanoparticles on basil (*Ocimum basilicum*) under salinity stress / M. Kalteh [et al] // J. Chem. Health Risks. – 2014. – № 4. – P. 49-55. – DOI: 10.22034/jchr.2018.544075
126. Karunakaran, G. Effect of nanosilica and silicon sources on plant growth promoting rhizobacteria, soil nutrients and maize seed germination / G. Karunakaran [et al] //IET nanobiotechnology. – 2013. – T. 7. – №. 3. – C. 70-77. – DOI: 10.1049/iet-nbt.2012.0048
127. Karunakaran, G. Influence of ZrO₂, SiO₂, Al₂O₃ and TiO₂ nanoparticles on maize seed germination under different growth conditions / G. Karunakaran [et al] //IET nanobiotechnology. – 2016. – T. 10. – №. 4. – C. 171-177. – DOI: 10.1049/iet-nbt.2015.0007
128. Khare, P. Adverse effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil nematode, *Caenorhabditis elegans* / P. Khare [et al] //Journal of Biomedical Nanotechnology. – 2011. – T. 7. – №. 1. – C. 116-117. – DOI: 10.1166/jbn.2011.1229
129. Khatami, M. Copper/copper oxide nanoparticles synthesis using *Stachys lavandulifolia* and its antibacterial activity / M. Khatami [et al] //Iet Nanobiotechnology. – 2017. – T. 11. – №. 6. – C. 709-713. – DOI: 10.1049/iet-nbt.2016.0189
130. Khoshnamvand, M. Toxicity of biosynthesized silver nanoparticles to aquatic organisms of different trophic levels / M. Khoshnamvand [et al] //Chemosphere. – 2020. – T. 258. – C. 127346. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127346

131. Kibbey, T. C. G. The effect of nanoparticles on soil and rhizosphere bacteria and plant growth in lettuce seedlings / T. C. G. Kibbey, K. A. Strevett // *Chemosphere*. – 2019. – T. 221. – C. 703-707. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.091

132. Kim, S. Effects of Zn and ZnO nanoparticles and Zn²⁺ on soil enzyme activity and bioaccumulation of Zn in *Cucumis sativus* / S. Kim, J. Kim, I. Lee // *Chemistry and Ecology*. – 2011. – T. 27. – №. 1. – C. 49-55. – DOI: 10.1080/02757540.2010.529074

133. Korotkova, A. Influence of iron of nanoparticles on induction of oxidative damage in *Triticum vulgare* / A. Korotkova [et al] // *Ecology, Environment and Conservation*. 2015. – T. 21. – № S Nov. – C. 101-111.

134. Korotkova, A. M. Influence of NPs Ni⁰ on the induction of oxidative damage in *Triticum vulgare* / A. M. Korotkova [et al] // *Oriental journal of chemistry*. – 2015. – № 31. – C. 137-145. – DOI: 10.13005/ojc/31.Special-Issue1.17

135. Kosyan, D. B. Toxicity of SiO₂, TiO₂ and CeO₂ nanoparticles evaluated using the bioluminescence assay / D. B. Kosyan [et al] // *International Journal of GEOMATE*. – 2017. – T. 13. – №. 40. – C. 66-73. – DOI: 10.21660/2017.40.32064

136. Krokowicz, L. *In vitro* studies of antibacterial and antifungal wound dressings comprising H₂TiO₃ and SiO₂ nanoparticles / L. Krokowicz [et al] // *Polish journal of microbiology*. – 2015. – T. 64. – №. 2. – C. 137-142.

137. Kumar, H. Antioxidant functionalized nanoparticles: A combat against oxidative stress / H. Kumar [et al] // *Nanomaterials*. – 2020. – T. 10. – №. 7. – C. 1334. – DOI: 10.3390/nano10071334

138. Kumar, V. Impact of nanoparticles on oxidative stress and responsive antioxidative defense in plants / V. Kumar [et al] // *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*. – Academic Press, 2018. – C. 393-406. – DOI: 10.1016/B978-0-12-811487-2.00017-7

139. Kuzyakov, Y. Competition and mutualism between roots and rhizosphere microorganisms by nitrogen acquisition and their ecological consequences /

Y. Kuzyakov, X. L. Xu //New Phytologist. – 2013. – T. 198. – C. 656-669. – DOI: 10.1111/nph.12235

140. Lammers, T. The success of nanomedicine / T. Lammers, M. Ferrari //Nano Today. – 2020. – T. 31. – C. 100853. – DOI: 10.1016/j.nantod.2020.100853

141. Lapied, E. Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris (Oligochaeta)* / E. Lapied [et al] // Nanomedicine. – 2010. – T. 5. – №. 6. – C. 975-984. – DOI: 10.2217/nnm.10.58

142. Lebedev, S. Impact of Zn nanoparticles on growth, survival and activity of antioxidant enzymes in *Eisenia Fetida* / S. Lebedev [et al] //Modern Applied Science. – 2015. – T. 9. – №. 10. – C. 34. – DOI: 10.5539/mas.v9n9p34

143. Lebedev, S. Impact of molybdenum nanoparticles on survival, activity of enzymes, and chemical elements in *Eisenia fetida* using test on artificial substrata / S. Lebedev [et al] // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – T. 23. – №. 18. – C. 18099-18110. – DOI: 10.1007/s11356-016-6916-6

144. Lebedev, S.V. Influence of Fe^o nanoparticles, magnetite Fe₃O₄ nanoparticles, and iron (II) sulfate (FeSO₄) solutions on the content of photosynthetic pigments in *Triticum vulgare* / S. V. Lebedev, A. M. Korotkova, E. A. Osipova // Russian Journal of Plant Physiology. – 2014. – № 61(4). – C. 564-569. – DOI: 10.1134/S1021443714040128

145. Lebedev, S.V. Mineral composition of *Eisenia fetida* tissues in presence of MoO₃ nanoparticles / S.V. Lebedev, I.A. Gavrish // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2017. – № 41S. – C. 79. – DOI: 10.1016/j.jtemb.2017.03.322

146. Lee, C. W. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* / C. W. Lee [et al] //Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal. – 2010. – T. 29. – №. 3. – C. 669-675. – DOI: 10.1002/etc.58

147. Lee, Y. K. Kinetics and chemistry of hydrolysis of ultrathin, thermally grown layers of silicon oxide as biofluid barriers in flexible electronic systems / Y. K. Lee [et al] //ACS applied materials & interfaces. – 2017. – T. 9. – №. 49. – C. 42633-42638. – DOI: 10.1021/acsami.7b15302

148. Lee, Y. Large-scale synthesis of copper nanoparticles by chemically controlled reduction for applications of inkjet-printed electronics / Y. Lee [et al] //Nanotechnology. – 2008. – T. 19. – №. 41. – C. 415604. – DOI: 10.1088/0957-4484/19/41/415604
149. Lespes, G. Natural Nanoparticles, Anthropogenic Nanoparticles, Where Is the Frontier? / G. Lespes, S. Faucher, V. I. Slaveykova //Frontiers in Environmental Science. – 2020. – T. 8. – C. 71. – DOI: 10.3389/fenvs.2020.00071
150. Li, C. A review on heavy metals contamination in soil: effects, sources, and remediation techniques / C. Li [et al] //Soil and Sediment Contamination: An International Journal. – 2019. – T. 28. – №. 4. – C. 380-394. – DOI: 10.1080/15320383.2019.1592108
151. Li, L. Z. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn / L. Z. Li [et al] // Environment International. – 2011. – V. 37. – N. 6. – P. 1098-1104. – DOI: 10.1016/j.envint.2011.01.008
152. Li, W. Multiomics analyses uncover nanoceria triggered oxidative injury and nutrient imbalance in earthworm *Eisenia fetida* / W. Li [et al] //Journal of Hazardous Materials. – 2022. – T. 437. – C. 129354. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129354
153. Lin, D. Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests / D. Lin [et al] // Environmental toxicology. – 2012. – V. 27. – N. 7. – P. 385-392. – DOI: 10.1002/tox.20651
154. Lin, D. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth / D. Lin, B. Xing //Environmental pollution. – 2007. – T. 150. – №. 2. – C. 243-250. – DOI: 10.1016/j.envpol.2007.01.016
155. Lin, D. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles / D. Lin, B. Xing //Environmental science & technology. – 2008. – T. 42. – №. 15. – C. 5580-5585. – DOI: 10.1021/es800422x
156. Lin, W. *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells / W. Lin [et al] //Toxicology and applied pharmacology. – 2006. – T. 217. – №. 3. – C. 252-259. – DOI: 10.1016/j.taap.2006.10.004

157. Liu, J. Cadmium tolerance and accumulation in fifteen wetland plant species from cadmium-polluted water in constructed wetlands / J. Liu [et al] //Frontiers of Environmental Science & Engineering. – 2016. – T. 10. – №. 2. – C. 262-269. – DOI: 10.1007/s11783-014-0746-x

158. Liu, J. Effects of nano-silicon and common silicon on lead uptake and translocation in two rice cultivars / J. Liu [et al] //Frontiers of Environmental Science & Engineering. – 2015. – T. 9. – №. 5. – C. 905-911. – DOI: 10.1007/s11783-015-0786-x

159. Liu, Y. Nanoparticles in waste waters: hazards, fate and remediation / Y. Liu [et al] // Powder technology. – 2014. – №255. – P. 149-156. – DOI: 10.1016/j.powtec.2013.08.025

160. Livingstone, D.R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment / D. R. Livingstone // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 1993. – V. 57. – N. 3. – P. 195-211. – DOI: 10.1002/jctb.280570302

161. Louie, S. M. Effects of molecular weight distribution and chemical properties of natural organic matter on gold nanoparticle aggregation / S. M. Louie, R. D. Tilton, G. V. Lowry //Environmental science & technology. – 2013. – T. 47. – №. 9. – C. 4245-4254. – DOI: 10.1021/es400137x

162. Luoma, S. N. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept / S. N. Luoma, P. S. Rainbow // Environmental Science & Technology. – 2005. –V. 39. – N. 7. – P. 1921-1931. – DOI: 10.1021/es048947e

163. Ma H. Toxicity of manufactured zinc oxide nanoparticles in the nematode *Caenorhabditis elegans* / H. Ma [et al] //Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal. – 2009. – T. 28. – №. 6. – C. 1324-1330. – DOI: 10.1897/08-262.1

164. Ma, H. Comparative phototoxicity of nanoparticulate and bulk ZnO to a free-living nematode *Caenorhabditis elegans*: the importance of illumination mode and primary particle size / H. Ma [et al] //Environmental Pollution. – 2011. – T. 159. – №. 6. – C. 1473-1480. – DOI: 10.1016/j.envpol.2011.03.013

165. Ma, X. M. Interactions between engineered NPs (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation / X. M. Ma [et al] // Science of the total environment. – 2010. – №408. – P. 3053-3061. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2010.03.031
166. Maher, B. A. Iron-rich air pollution nanoparticles: An unrecognised environmental risk factor for myocardial mitochondrial dysfunction and cardiac oxidative stress / B. A. Maher // Environmental research. – 2020. – T. 188. – C. 109816. – DOI: 10.1016/j.envres.2020.109816
167. Maher, S. From the mine to cancer therapy: natural and biodegradable theranostic silicon nanocarriers from diatoms for sustained delivery of chemotherapeutics / S. Maher [et al] // Advanced healthcare materials. – 2016. – T. 5. – №. 20. – C. 2667-2678. – DOI: 10.1002/adhm.201600688
168. Malley, C. Impact of heavy metals on enzymatic activity of substrate and on composting worms *Eisenia fetida* / C. Malley, J. Nair, G. Ho // Bioresource technology. – 2006. – T. 97. – №. 13. – C. 1498-1502. – DOI: 10.1016/j.biortech.2005.06.012
169. Manzo, S. Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms / S. Manzo [et al] // Environmental Science and Pollution Research. – 2011. – T. 18. – №. 5. – C. 756-763. – DOI: 10.1007/s11356-010-0421-0
170. Maurer-Jones, M. A. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment / M. A. Maurer-Jones [et al] // Analytical chemistry. – 2013. – T. 85. – №. 6. – C. 3036-3049. – DOI: 10.1021/ac303636s
171. McGee, C. F. Soil microbial community responses to contamination with silver, aluminium oxide and silicon dioxide nanoparticles / C. F. McGee [et al] // Ecotoxicology. – 2017. – T. 26. – №. 3. – C. 449-458. – DOI: 10.1007/s10646-017-1776-5
172. Mishra, S. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture / S. Mishra, H. B. Singh // Applied microbiology and biotechnology. – 2015. – T. 99. – №. 3. – C. 1097-1107. – DOI: 10.1007/s00253-014-6296-0

173. Missaoui, W. N. Toxicological status of nanoparticles: what we know and what we don't know / W. N. Missaoui, R. D. Arnold, B. S. Cummings // *Chemico-biological interactions*. – 2018. – T. 295. – C. 1-12. – DOI: 10.1016/j.cbi.2018.07.015

174. Mjos, K. D. Synthesis, characterization, and evaluation of the antimicrobial potential of copper (II) coordination complexes with quinolone and p-xylenyl-linked quinolone ligands / K. D. Mjos [et al] // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2016. – T. 162. – C. 280-285. – DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2016.02.026

175. Mocan, T. Implications of oxidative stress mechanisms in toxicity of nanoparticles / T. Mocan [et al] // *Acta Physiologica Hungarica*. – 2010. – № 97. – P. 247-255. – DOI: 10.1556/aphysiol.97.2010.3.1

176. Mohajerani, A. Nanoparticles in construction materials and other applications, and implications of nanoparticle use / A. Mohajerani [et al] // *Materials*. – 2019. – T. 12. – №. 19. – C. 3052. – DOI: 10.3390/ma12193052

177. Montes, M. Properties of silver and copper nanoparticle containing aqueous suspensions and evaluation of their in vitro activity against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* biofilms / M. Montes [et al] // *Journal of Nano Research*. – Trans Tech Publications Ltd, 2016. – T. 37. – C. 109-121. – DOI: 10.4028/www.scientific.net/JNanoR.37.109

178. Morgan, A. J. The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil / A. J. Morgan, B. Morris // *Histochemistry*. – 1982. – V. 75. – N. 2. – P. 269-285. – DOI: 10.1007/BF00496017

179. Morgan, J. E. A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms *Dendrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus* / J. E. Morgan [et al] // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. – 1989. – V. 92. – N 1. – P. 15-21. – DOI: 10.1016/0742-8413(89)90195-3

180. Morgan, J. E. The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectode acaliginosa*): implications for ecotoxicological testing / J. E. Morgan, A. J. Morgan //

Applied Soil Ecology. – 1999. – T. 13. – №.1. – C. 9-20. – DOI: 10.1016/S0929-1393(99)00012-8

181. Morgan, J.E. The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): implications for ecotoxicological testing / J. E. Morgan, A. J. Morgan // Applied Soil Ecology. – 1999. – V. 13. – N. 1. – P. 9-20. – DOI: 10.1016/S0929-1393(99)00012-8

182. Moriarty, F. Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems / F. Moriarty. – London: Academic Press, 1999. – 347 p.

183. Mosleh, Y. Y. Effects of the herbicide isoproturon on survival, growth rate, and protein content of mature earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) and its fate in the soil / Y. Y. Mosleh [et al] // Applied Soil Ecology. – 2003. – T. 23. – №. 1. – C. 69-77. – DOI: 10.1016/S0929-1393(02)00161-0

184. Mueller, N. C. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment / N. C. Mueller, B. Nowack // Environmental science & technology. – 2008. – T. 42. – №. 12. – C. 4447-4453. – DOI: 10.1021/es7029637

185. Mukherjee, A. Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil / A. Mukherjee [et al] // Metallomics. – 2014. – T. 6. – №. 1. – C. 132-138. – DOI: 10.1039/c3mt00064h

186. Musante, C. Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles / C. Musante, J. C. White // Environ toxicol. – 2011. – № 11. – P. 60-67. – DOI: 10.1002/tox.20667

187. Naha, P. C. Toxicology of engineered nanoparticles: focus on poly (amidoamine) dendrimers / P. C. Naha, S. P. Mukherjee, H. J. Byrne // International journal of environmental research and public health. – 2018. – T. 15. – №. 2. – C. 338. – DOI: 10.3390/ijerph15020338

188. Nahmani, J. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms / J. Nahmani, M. E. Hodson, S. Black // Environmental pollution. – 2007. – V. 145. – N. 2. – P. 402-424. – DOI: 10.1016/j.envpol.2006.04.009

189. Neuhauser E. F. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida* / E. F. Neuhauser [et al] // *Biology and Fertility of Soils*. – 1985. – V. 1. – N. 3. – P. 149-152. – DOI: 10.1007/BF00301782
190. Niazi, J. H. Toxicity of metallic nanoparticles in microorganisms / J. H. Niazi, M. B. Gu // *Atmospheric and biological environmental monitoring*. – 2009. – №9. – P. 193-206. – DOI: 10.1007/978-1-4020-9674-7_12
191. Nowack, B. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment / B. Nowack, T. D. Bucheli // *Environmental Pollution*. – 2007. – №150. – P. 5-22. – DOI: 10.1016/j.envpol.2007.06.006
192. Nowack, B. The behavior and effects of nanoparticles in the environment / B. Nowack // *Environmental Pollution*. – 2009. – №157. – P. 1063-1064. – DOI: 10.1016/j.envpol.2008.12.019
193. Nwugo, C. C. Silicon-induced cadmium resistance in rice (*Oryza sativa*) / C. C. Nwugo, A. J. Huerta // *Journal of plant nutrition and soil science*. – 2008. – T. 171. – №. 6. – C. 841-848. – DOI: 10.1002/jpln.200800082
194. Olchawa, E. Heavy metals affect the coelomocyte-bacteria balance in earthworms: environmental interactions between abiotic and biotic stressors / E. Olchawa [et al] // *Environmental pollution*. – 2006. – V. 142. – N. 2. – P. 373-381. – DOI: 10.1016/j.envpol.2005.09.023
195. Ortega-Calvo, J. J. Bacterial tactic response to silver nanoparticles / J. J. Ortega-Calvo [et al] // *Environmental microbiology reports*. – 2011. – T. 3. – №. 5. – C. 526-534. – DOI: 10.1111/j.1758-2229.2011.00252.x
196. Oughton, D. H. Neutron activation of engineered nanoparticles as a tool for tracing their environmental fate and uptake in organisms / D. H. Oughton [et al] // *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. – 2008. – T. 27. – №. 9. – C. 1883-1887. – DOI: 10.1897/07-578.1
197. Oyelami, A. O. The impact of carbon nanomaterials on the development of phenanthrene catabolism in soil / A. O. Oyelami, K. T. Semple // *Environmental Science Process Impacts*. – 2015. – №17. – P. 1302-1310. – DOI: 10.1039/C5EM00157A

198. Pareek, V. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review / V. Pareek, R. Gupta, J. Panwar // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – T. 90. – C. 739-749. – DOI: 10.1016/j.msec.2018.04.093

199. Park, K. M. Fluorescent fullerene nanoparticle-based lateral flow immunochromatographic assay for rapid quantitative detection of C-reactive protein / K. M. Park [et al] // *Nano convergence*. – 2019. – T. 6. – №. 1. – C. 1-6. – DOI: 10.1186/s40580-019-0207-0

200. Patil-Sen, Y. Advances in nano-biomaterials and their applications in biomedicine / Y. Patil-Sen // *Emerging Topics in Life Sciences*. – 2021. – T. 5. – №. 1. – C. 169-176. – DOI: 10.1042/ETLS20200333

201. Pérez-Hernández, H. Effect of engineered nanoparticles on soil biota: Do they improve the soil quality and crop production or jeopardize them? / H. Pérez-Hernández [et al] // *Land Degradation & Development*. – 2020. – T. 31. – №. 16. – C. 2213-2230. – DOI: 10.1002/ldr.3595

202. Pfeiffer, C. Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles / C. Pfeiffer [et al] // *Journal of The Royal Society Interface*. – 2014. – T. 11. – №. 96. – C. 20130931. – DOI: 10.1098/rsif.2013.0931

203. Pietrzak, K. Influence of the silver nanoparticles on microbial community in different environments / K. Pietrzak, B. Gutarowska // *Acta Biochim Polonica*. – 2015. – №62(4). – P. 721-724. – DOI: 0.18388/abp.2015_1118

204. Planas, O. Synthesis, photophysical characterization, and photoinduced antibacterial activity of methylene blue-loaded amino- and mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles / O. Planas [et al] // *Molecules*. – 2015. – T. 20. – №. 4. – C. 6284-6298. – DOI: 10.3390/molecules20046284

205. Pluskota, A. In *Caenorhabditis elegans* nanoparticle-bio-interactions become transparent: silica-nanoparticles induce reproductive senescence / A. Pluskota

[et al] //PloS one. – 2009. – T. 4. – №. 8. – C. e6622. – DOI: 10.1371/journal.pone.0006622

206. Pošćić, F. Effects of cerium and titanium oxide nanoparticles in soil on the nutrient composition of barley (*Hordeum vulgare* L.) kernels / F. Pošćić [et al] //International journal of environmental research and public health. – 2016. – T. 13. – №. 6. – C. 577. – DOI: 10.3390/ijerph13060577

207. Premanathan, M. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation / M. Premanathan [et al] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2011. – T. 7. – №. 2. – C. 184-192. – DOI: 10.1016/j.nano.2010.10.001

208. Priester, J. H. Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption / J. H. Priester [et al] //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – T. 109. – №. 37. – C. E2451-E2456. – DOI: 10.1073/pnas.1205431109

209. Rahmatpour, S. Dose–response effects of silver nanoparticles and silver nitrate on microbial and enzyme activities in calcareous soils / S. Rahmatpour [et al] //Geoderma. – 2017. – T. 285. – C. 313-322. – DOI: 10.1016/j.geoderma.2016.10.006

210. Rajput, V. Accumulation of nanoparticles in the soil-plant systems and their effects on human health / V. Rajput [et al] //Annals of Agricultural Sciences. – 2020. – T. 65. – №. 2. – C. 137-143. – DOI: 10.1016/j.aos.2020.08.001

211. Rajput, V. D. Effect of nanoparticles on crops and soil microbial communities / V. D. Rajput [et al] //Journal of Soils and Sediments. – 2018. – T. 18. – №. 6. – C. 2179-2187. – DOI: 10.1007/s11368-017-1793-2

212. Rajput, V. D. Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil, plants, animals and soil organisms: a review / V. D. Rajput [et al] //Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management. – 2018. – T. 9. – C. 76-84. – DOI: 10.1016/j.enmm.2017.12.006

213. Raliya, R. ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorousmobilizing enzyme secretion and gum contents in cluster bean (*Cyamopsis*

tetragonoloba L.) / R. Raliya, J. C. Tarafdar // Agricultural Research. – 2013. – №2. – C. 48- 57. – DOI: 10.1007/s40003-012-0049-z

214. Ramos-Guivar, J. A. γ -Fe₂O₃ nanoparticles embedded in nanohydroxyapatite matrix for magnetic hyperthermia and in vitro osteoblast cell studies / J. A. Ramos-Guivar, M. A. Morales, F. J. Litterst // Ceramics International. – 2020. – T. 46. – №. 8. – C. 10658-10666. – DOI: 10.1016/j.ceramint.2020.01.072

215. Read, D. S. Soil pH effects on the interactions between dissolved zinc, non-nano-and nano-ZnO with soil bacterial communities / D. S. Read [et al] // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – T. 23. – №. 5. – C. 4120-4128. – DOI: 10.1007/s11356-015-4538-z

216. Rico, C.M. Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants / C. M. Rico, J. R. Peralta-Videa, J. L. Gardea-Torresdey // Nanotechnology and plant sciences: nanoparticles and their impact on plants. – New York: Springer, 2015. – C. 1-19. – DOI: 10.1007/978-3-319-14502-0_1

217. Rincon-Florez, V. A. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology / V. A. Rincon-Florez, L. C. Carvalhais, P. M. Schenk // Diversity. – 2013. – T. 5. – №. 3. – C. 581-612. – DOI: 10.3390/d5030581

218. Rizwan, M. Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat / M. Rizwan [et al] // Chemosphere. – 2019. – T. 214. – C. 269-277. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.120

219. Rogalla, H. Role of leaf apoplast in silicon-mediated manganese tolerance of *Cucumis sativus* L / H. Rogalla, V. Römheld // Plant, Cell & Environment. – 2002. – T. 25. – №. 4. – C. 549-555. – DOI: 10.1046/j.1365-3040.2002.00835.x

220. Rogers, N. J. Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nanoparticulate CeO₂ in freshwater / N. J. Rogers [et al] // Environmental Chemistry. – 2010. – №7(1). – P. 50-60. – DOI: 10.1071/EN09123

221. Romero-Aranda, M. R. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status / M. R. Romero-Aranda, O.

Jurado, J. Cuartero //Journal of plant Physiology. – 2006. – T. 163. – №. 8. – C. 847-855. – DOI: 10.1016/j.jplph.2005.05.010

222. Rousk, J. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization / J. Rousk, P. C. Brookes, E. Baath // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – T. 75. – №. 6. – C. 1589-1596. – DOI: 10.1128/AEM.02775-08

223. Rousk, J. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil / J. Rousk [et al] //The ISME journal. – 2010. – T. 4. – №. 10. – C. 1340-1351. – DOI: 10.1038/ismej.2010.58

224. Sandalio, L.M. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants / L.M. Sandalio, H.C. Dalurzo, M. J. Gómez // Journal of experimental botany. – 2001. – № 364. – C. 2115-2126. – DOI: 10.1093/jexbot/52.364.2115

225. Sapkota, A. Zinc oxide nanorod mediated visible light photoinactivation of model microbes in water / A. Sapkota [et al] // Nanotechnology. – 2011. – T. 22. – №. 21. – C. 215703. – DOI: 10.1088/0957-4484/22/21/215703

226. Schacht, V. J. Effects of silver nanoparticles on microbial growth dynamics/ V. J. Schacht [et al] // Journal of applied microbiology. – 2013. – T. 114. – №. 1. – C. 25-35. – DOI: 10.1111/jam.12000

227. Schafer, W. R. Genetics of egg-laying in worms / W. R. Schafer // Annual Review of Genetics. – 2006. – T. 40. – C. 487-509. – DOI: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090527

228. Schlich, K. Influence of soil properties on the effect of silver nanomaterials on microbial activity in five soils / K. Schlich, K. Hund-Rinke //Environmental Pollution. – 2015. – T. 196. – C. 321-330. – DOI: 10.1016/j.envpol.2014.10.021

229. Scott-Fordsmand, J. J. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms / J. J. Scott-Fordsmand [et al] // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2008. – V. 71. – N. 3. – P. 616-619. – DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.04.011

230. Shah, V. Fate and impact of zero-valent copper nanoparticles on geographically-distinct soils / V. Shah [et al] //Science of the Total Environment. – 2016. – T. 573. – C. 661-670. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.114

231. Shah, V. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds / V. Shah, I. Belozerova // Water, Air, and Soil Pollution. – 2009. – T. 197. – №. 1-4. – C. 143-148. – DOI: 10.1007/s11270-008-9797-6

232. Shahadat, M. Environmental Toxicity of Nanoparticles / M. Shahadat [et al] //Environmental Nanotechnology for Water Purification. – 2020. – C. 1-32. – DOI: 10.1002/9781119641353.ch1

233. Simonin, M. Impact of engineered nanoparticles on the activity, abundance, and diversity of soil microbial communities: a review / M. Simonin, A. Richaume //Environmental Science and Pollution Research. – 2015. – T. 22. – №. 18. – C. 13710-13723. – DOI: 10.1007/s11356-015-4171-x

234. Simon-Yarza, T. Nanoparticles of metal-organic frameworks: on the road to *in vivo* efficacy in biomedicine / T. Simon-Yarza [et al] //Advanced Materials. – 2018. – T. 30. – №. 37. – C. 1707365. – DOI: 10.1002/adma.201707365

235. Smijs, T. G. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness / T. G. Smijs, S. Pavel //Nanotechnology, science and applications. – 2011. – T. 4. – C. 95. – DOI: 10.2147/NSA.S19419

236. Sooyeon, L. Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant *Fagopyrum esculentum* / L. Sooyeon [et al] // Environmental Science and Pollution Research. – 2013. – №20(2). – P. 848-854. – DOI: 10.1007/s11356-012-1069-8

237. Spurgeon, D. J. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems / D.J. Spurgeon, S.P. Hopkin, D.T. Jones // Environmental Pollution. – 1994. – V. 84. – N. 2. – P. 123-130. – DOI: 10.1016/0269-7491(94)90094-9

238. Stampoulis, D. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants / D. Stampoulis, S. K. Sinha, J. C. White // *Environmental science & technology*. – 2009. – T. 43. – №. 24. – C. 9473-9479. – DOI: 10.1021/es901695c
239. Starsich, F. Nanoparticles for biomedicine: coagulation during synthesis and applications / F. Starsich, I.K. Herrmann, S.E. Pratsinis // *Annual review of chemical and biomolecular engineering*. – 2019. – T. 10. – C. 155-174. – DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-060718-030203
240. Stürzenbaum, S. R. Cadmium detoxification in earthworms: from genes to cells / S. R. Stürzenbaum [et al] // *Environmental science & technology*. – 2004. – V. 38. – N. 23. – P. 6283-6289. – DOI: 10.1021/es049822c
241. Suman, T. Y. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis / T. Y. Suman, S. R. R. Rajasree, R. Kirubakaran // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2015. – T. 113. – C. 23-30. – DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.11.015
242. Sun, Y. I. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase / Y. I. Sun, L. W. Oberley, Y. Li // *Clinical chemistry*. – 1988. – T. 34. – №. 3. – C. 497-500. – DOI: 10.1093/clinchem/34.3.497
243. Suthar, S. Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: is metal bioaccumulation affected by their ecological category? / S. Suthar, S. Singh, S. Dhawan // *Ecological Engineering*. – 2008. – V. 32. – N. 2. – P. 99-107. – DOI: 10.1016/j.ecoleng.2007.10.003
244. Taha, M. A. Biocompatibility, physico-chemical and mechanical properties of hydroxyapatite-based silicon dioxide nanocomposites for biomedical applications / M. A. Taha, R. A. Youness, M. Ibrahim // *Ceramics International*. – 2020. – T. 46. – №. 15. – C. 23599-23610. – DOI: 10.1016/j.ceramint.2020.06.132
245. Toduka, Y. Flow cytometric evaluation of nanoparticles using sidescattered light and reactive oxygen species – mediated fluorescence – correlation with genotoxicity / Y. Toduka, T. Toyooka, Y. Ibuki // *Environmental science & technology*. – 2012. – №46. – C. 7629-7636. – DOI: 10.1021/es300433x

246. Tong, Z. Impact of fullerene (C₆₀) on a soil microbial community / Z. Tong [et al] // Journal of Nanomaterials. – 2012. – №41(8). – C. 1-6. – DOI: 10.1021/es0619531

247. Topuz, E. The effect of soil properties on the toxicity and bioaccumulation of Ag nanoparticles and Ag ions in *Enchytraeus crypticus* / E. Topuz, C. van Gestel // Ecotoxicology and environmental safety. – 2017. – T. 144. – C. 330-337. – DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.037

248. Toth, L. Some effect of CuSO₄ on carp / L. Toth [et al] // Journal of Environmental Science & Health Part B. – 1996. – T. 31. – №. 3. – C. 627-635. – DOI: 10.1080/03601239609373029

249. Trujillo-Reyes, J. Exposure studies of core-shell Fe/Fe₃O₄ and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: are they a potential physiological and nutritional hazard? / J. Trujillo-Reyes [et al] // J. Hazard Mater. – 2014. – №267. – C. 255-263. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.11.067

250. Unrine J. M. Effects of particle size on chemical speciation and bioavailability of copper to earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to copper nanoparticles / J. M. Unrine [et al] // Journal of environmental quality. – 2010. – T. 39. – №. 6. – C. 1942-1953. – DOI: 10.2134/jeq2009.0387

251. Unrine, J. Spatial distribution and speciation of Au and Zn in terrestrial organisms exposed to Au and ZnO nanoparticles / J. Unrine [et al] // ACS, Division of Environmental Chemistry-Preprints of Extended Abstracts. – 2008. – T. 48. – №. 1. – C. 274-280.

252. Vaculík, M. Silicon modifies root anatomy, and uptake and subcellular distribution of cadmium in young maize plants / M. Vaculík [et al] // Annals of Botany. – 2012. – T. 110. – №. 2. – C. 433-443. – DOI: 10.1093/aob/mcs039

253. Van Gestel, C. A. The bioaccumulation of molybdenum in the earthworm *Eisenia andrei*: influence of soil properties and ageing / C. A. Van Gestel [et al] // Chemosphere. – 2011. – №. 11. – C. 1614-1619. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.11.047

254. Van Gestel, C.A. Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* (*Oligochaeta*, *Annelida*) / C.A. Van Gestel, E.M. Dirven-van Breemen, R. Baerselman // Science of the total environment. – 1993. – №. 134. – C. 585-597. – DOI: 10.1016/S0048-9697(05)80061-0

255. Van Gestel, C.A. Effects of metal pollution on earthworm communities in a contaminated floodplain area: Linking biomarker, community and functional responses / C. A. van Gestel, J. E. Koolhaas, T. Hamers, M. van Hoppe, M. van Roover, C. Korsman, S. A. Reinecke // Environmental Pollution. – 2009. – N. 3. – C. 895-903. – DOI: 10.1016/j.envpol.2008.11.002

256. van Straalen, N. M. Metal concentrations in soil and invertebrates in the vicinity of a metallurgical factory near Tula (Russia) / N. M. van Straalen [et al] // Pedobiologia. – 2001. – N. 5. – C. 451-466. – DOI: 10.1078/0031-4056-00099

257. VandeVoort, A. R. Effect of silver nanoparticles on soil denitrification kinetics / A. R. VandeVoort, Y. Arai // Industrial Biotechnology. – 2012. – T. 8. – №. 6. – C. 358-364. – DOI: 10.1089/ind.2012.0026

258. Vijver, M. G. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms / M. G. Vijver [et al] // Soil Biology and Biochemistry. – 2003. – №1. – C. 125-132. – DOI: 10.1016/S0038-0717(02)00245-6

259. Waalewijn-Kool, P. L. Effect of different spiking procedures on the distribution and toxicity of ZnO nanoparticles in soil / P. L. Waalewijn-Kool, M. D. Ortiz, C. A. M. Van Gestel // Ecotoxicology. – 2012. – T. 21. – №. 7. – C. 1797-1804. – DOI: 10.1007/s10646-012-0914-3

260. Wang, C. The isotopic effects of ¹³C-labeled large carbon cage (C 70) fullerenes and their formation process / C. Wang [et al] // RSC Advances. – 2015. – T. 5. – №. 94. – C. 76949-76956. – DOI: 10.1039/C5RA06588G

261. Wang, H. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans* / H. Wang, R. L. Wick, B. Xing // Environmental

Pollution. – 2009. – T. 157. – №. 4. – C. 1171-1177. – DOI: 10.1016/j.envpol.2008.11.004

262. Wang, M.E. Joint stress of chlorimuron-ethyl and cadmium on wheat *Triticum aestivum* at biochemical levels / M. E. Wang, Q. X. Zhou // Environmental Pollution. – 2006. – V. 144. – N. 2. – P. 572-580. – DOI: 10.1016/j.envpol.2006.01.024

263. Wang, P. Fate of ZnO nanoparticles in soils and cowpea (*Vigna unguiculata*) / P. Wang [et al] // Environmental science & technology. – 2013. – T. 47. – №. 23. – C. 13822-13830. – DOI: 10.1021/es403466p

264. Wang, Y. Probabilistic modeling of the flows and environmental risks of nano-silica / Y. Wang [et al] // Science of the Total Environment. – 2016. – T. 545. – C. 67-76. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.100

265. Williams, R. J. Models for assessing engineered nanomaterial fate and behaviour in the aquatic environment / R. J. Williams [et al] // Current opinion in environmental sustainability. – 2019. – T. 36. – C. 105-115. – DOI: 10.1016/j.cosust.2018.11.002

266. Wilson, N. Nanoparticles: environmental problems or problem solvers? / N. Wilson // BioScience. – 2018. – T. 68. – №. 4. – C. 241-246. – DOI: 10.1093/biosci/biy015

267. Winter, C. K. Organic foods / C. K. Winter, S. F. Davis // Journal of food science. – 2006. – T. 71. – №. 9. – C. R117. – DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00196.x

268. Wu, B. Comparative eco-toxicities of nano-ZnO particles under aquatic and aerosol exposure models / B. Wu [et al] // Environmental Science & Technology. – 2010. – T. 44. – №. 4. – C. 1484-1489. – DOI: 10.1021/es9030497

269. Xiao, Y. Toxicity and accumulation of Cu and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna* / Y. Xiao [et al] // Environmental science & technology. – 2015. – T. 49. – №. 7. – C. 4657-4664. – DOI: 10.1021/acs.est.5b00538

270. Xiong, J. Characterizing changes in soil bacterial community structure in response to short-term warming / J. Xiong [et al] // FEMS Microbiology Ecology. – 2014. – T. 89. – №. 2. – C. 281-292. – DOI: 10.1111/1574-6941.12289

271. Yausheva, E. Influence of zinc nanoparticles on survival of worms *Eisenia fetida* and taxonomic diversity of the gut microflora / E. Yausheva [et al] // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – № 13. – C. 13245-13254. – DOI: 10.1007/s11356-016-6474-y
272. Ye, J. Effects of silicon on the distribution of cadmium compartmentation in root tips of *Kandelia obovata* (S., L.) Yong / J. Ye [et al] // Environmental Pollution. – 2012. – №. 162. – C. 369-373. – DOI: 10.1016/j.envpol.2011.12.002
273. Ye, Y. Can abiotic stresses in plants be alleviated by manganese nanoparticles or compounds? / Y. Ye [et al] // Ecotoxicology and environmental safety. – 2019. – T. 184. – C. 109671. – DOI: /doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109671
274. Yildirimer, L. Toxicology and clinical potential of nanoparticles / L. Yildirimer [et al] // Nano today. – 2011. – T. 6. – №. 6. – C. 585-607. – DOI: 10.1016/j.nantod.2011.10.001
275. Yirsaw, B. D. Effect of zero valent iron nanoparticles to *Eisenia fetida* in three soil types / B. D. Yirsaw [et al] // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – T. 23. – №. 10. – C. 9822-9831. – DOI: 10.1007/s11356-016-6193-4
276. Yusefi-Tanha, E. Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) as a novel nanofertilizer: Influence on seed yield and antioxidant defense system in soil grown soybean (*Glycine max* cv. Kowsar) / E. Yusefi-Tanha [et al] // Science of The Total Environment. – 2020. – T. 738. – C. 140240. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140240
277. Žaltauskaitė, J. Effects of total cadmium and lead concentrations in soil on the growth, reproduction and survival of earthworm *Eisenia fetida* / J. Žaltauskaitė, I. Sodienė // Ekologija. – 2010. – T. 56. – №. 1-2. – C. 10-16. – DOI: 10.2478/v10055-010-0002-z
278. Zhang, L. Exposure to lethal levels of benzo [a] pyrene or cadmium trigger distinct protein expression patterns in earthworms (*Eisenia fetida*) / L. Zhang [et al] // Science of the Total Environment. – 2017. – T. 595. – C. 733-742. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.003

279. Zhang, L. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids) / L. Zhang [et al] // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2007. – T. 9. – №. 3. – C. 479-489. – DOI: 10.1007/s11051-006-9150-1

280. Zhang, Q. Separation and tracing of anthropogenic magnetite nanoparticles in the urban atmosphere / Q. Zhang [et al] // *Environmental Science & Technology*. – 2020. – T. 54. – №. 15. – C. 9274-9284. – DOI: 10.1021/acs.est.0c01841

281. Zhao, J. Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity / J. Zhao [et al] // *Journal of hazardous materials*. – 2011. – T. 197. – C. 304-310. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.09.094

282. Zhao, L. ZnO nanoparticle fate in soil and zinc bioaccumulation in corn plants (*Zea mays*) influenced by alginate / L. Zhao [et al] // *Environmental Science: Processes & Impacts*. – 2013. – T. 15. – №. 1. – C. 260-266. – DOI: 10.1039/C2EM30610G