

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

МИНЕРАЛЬНЫЙ СОСТАВ ТКАНЕЙ *EISENIA FETIDA* В ПРИСУТСТВИИ В СРЕДЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МОЛИБДЕНА (VI)

С.В. Лебедев^{1,2*}, И.А. Гавриш^{1,2}

¹ Оренбургский государственный университет, г. Оренбург

² Всероссийский НИИ мясного скотоводства, г. Оренбург

РЕЗЮМЕ. В последние годы перспективной областью научных исследований в области науки и техники стали нанотехнологии. Однако использование наночастиц, в том числе металлов, требует тщательного изучения их поведения в живых системах для оценки их применимости. Исследовано накопление и аккумуляция наночастиц оксида молибдена в тканях компостного червя *Eisenia fetida* при дозировке 10, 40 и 500 мг/кг сухой почвы. Использованы два субстрата – микрокристаллическая целлюлоза (А) и искусственная почва (В). Установлено, что степень аккумуляции молибдена в тканях червя зависела от дозы и субстрата, в частности, с увеличением концентрации наночастиц оксида молибдена в субстрате А накапливалось от 2 до 7 мг/кг молибдена, тогда как в субстрате В – до 15 мг/кг, со снижением концентрации при дозах 40 и 500 мг/кг на 14-е сутки на 64,8 и 57,4% соответственно. Полученные результаты дают возможность предполагать, что высокая степень аккумуляции молибдена в теле червя, находящегося на субстрате А, связана с пассивными процессами, что обусловлено доступными концентрациями молибдена в субстрате, а не активными процессами, которые регулируются дождевыми червями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: наночастицы оксида молибдена, *Eisenia fetida*, скорость накопления.

ВВЕДЕНИЕ

Биотестирование наноматериалов приобретает все большее значение и включает разнообразные биологические модели: бактерии (*Photobacterium phosphoreum*), растения (*Lemna minor*, *Lipidium sativum*), простейшие (*Tetrahimena pyriformis*, *Paramecium putrinum*) и др. Интродукция наноматериалов в почву определяет перспективность модели дождевого червя *Eisenia fetida* для экотоксикологической оценки вновь создаваемых веществ и препаратов (Lapied et al., 2010). Высокая информативность этой модели определяется биологическими особенностями *E. fetida* – высокой проницаемостью поверхности тела для поллютантов (Т. Jajer et al., 2003).

Дождевые черви перерабатывают большое количество почвы и поэтому постоянно находятся под воздействием веществ, адсорбированных на твердых частицах почвы (Morgan V., Morgan A., 1999). Они более чувствительны к загрязнению металлами, чем другие почвенные беспозвоночные, и определение токсичности на дож-

девых червях является важным звеном в оценке безопасных уровней металлов в почве (Žaltauskaitė et al., 2010).

Молибден является важным элементом для живых организмов, поскольку участвует во многих ферментативных реакциях (Mendel et al., 2006). Источниками интродукции молибдена в почву являются сплавы, антипирены, катализаторы, ингибиторы смазки и коррозии горных пород, осадки сточных вод и удобрения (Buekers et al., 2010). Молибден встречается в природной почве в различной концентрации от 0,2 до 100 мг/кг, при этом установлена фоновая концентрация от 0,2 до 6 мг/кг (He et al., 2005), пороговая – от 129 до 450 мг/кг, и токсичная – 2378 мг/кг для дождевых червей (Van Gestel et al., 2011).

Ц е л ь р а б о т ы – исследование процессов аккумуляции наночастиц оксида молибдена при их интродукции в почву червями *E. fetida*, а также влияние наночастиц оксида молибдена на содержание микроэлементов в тканях *E. fetida*.

* Адрес для переписки:

Лебедев Святослав Валерьевич

E-mail: lsv74@list.ru

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали наночастицы оксида молибдена (НЧ MoO_3) 99,7% чистоты («Плазмотерм», Москва), полученные методом плазмохимического синтеза. Наночастицы представляют собой частицы сферической формы, желтого цвета, размером $92 \pm 0,3$ нм, Z-потенциал $-42 \pm 0,52$ мВ, $S_{\text{уд.}} - 12$ м²/г. Исследуемые концентрации НЧ оксида молибдена – 10, 40, 500 мг/кг.

Испытания токсичности проводили по OECD guidelines for the testing of chemicals (OECD, 1984) на лабораторных культурах дождевых червей – *Eisenia fetida* Andrei Vouche. Используемые в исследованиях черви выращены в питомнике лаборатории агроэкологии техногенных наноматериалов Всероссийского НИИ мясного скотоводства, ранее были приобретены в ООО «БиОЭра-Пенза» (www.bioeragrup.ru).

Токсикологическую оценку проводили на двух субстратах:

субстрат А – микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) (ЗАО «Эвалар»);

субстрат В – стандартизированная искусственная почва (Резниченко, 2013): 70% кварцевого песка (сухой вес), 20% каолина и 10% измельченного торфа, 10% торфа сфагнума.

Перед постановкой на эксперимент червей промывали дистиллированной водой и помещали на трое суток в пластиковые контейнеры с влажным субстратом из фильтровальной бумаги для очищения пищеварительного тракта (Резниченко, 2013).

Отобранные для исследования половозрелые черви массой 500–600 мг акклиматизировались в течение 7 суток на чистых субстратах А и В при постоянной температуре 25⁰С.

Исходные лиозоли НЧ были приготовлены методом, предложенным Scott-Fordsmann с соавт. (2008), путем добавления испытуемого металла (сухой порошок) в исследуемых концентрациях в деионизированную воду (10 мл) с последующим диспергированием на ультразвуковом диспергаторе (УЗДН, f-35 кГц, N-300 Вт, Россия) в течение 30 мин. Приготовленные лиозоли НЧ для каждой повторности и концентрации были смешаны с влажной искусственной почвой (влажность 45–50%), затем доведены дистиллированной водой до влажности 75–80% и перемешаны с помощью миксера.

Концентрацию металлов в *E. fetida* определяли в начале, на 7-е и 14-е сутки эксперимента. Содержание металлов оценивали на атомно-

абсорбционном спектрофотометре Formula FM 400 (ООО «НТЦ «Лабист», Россия).

Биоаккумуляцию металла рассчитывали по формуле $BSAF = \frac{\text{содержание металла в черве}}{\text{общее содержание металла в почве}}$ (Cortet et al., 1999).

Поглощение металла вычисляли по формуле $R = \frac{M_a - M_b}{M_e} 100\%$,

где M_a и M_b – масса конце и в начале эксперимента соответственно, мг; M_e – масса червя, мг.

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

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

где $C_{\text{червь}}$ – концентрация вещества в черве в день выборки; t_n – дни выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначальное содержание молибдена в червях составило $0,9 \pm 0,018$ мг/кг сухого вещества. Содержание металла в микрокристаллической целлюлозе и искусственной почве – 1,89 и 1,83 мг/кг сухого вещества соответственно.

На 7-е сутки экспозиции на субстрате А концентрация молибдена в дождевых червях линейно возрастала в зависимости от концентрации НЧ MoO_3 в субстрате, с максимальным значением при концентрации 40 мг/кг (13,9 мг/кг) (рис. 1,а).

На 14-е сутки концентрации молибдена в опытных образцах червей составили при концентрации НЧ MoO_3 10 мг/кг – 7,53 мг/кг, при 40 мг/кг – 7,21 мг/кг и при 500 мг/кг – 7,11 (рис. 1,а).

Степень накопления молибдена из субстрата В в организм червя на 7-е сутки экспозиции составила 0,5 мг/кг (10 мг/кг НЧ MoO_3), 15,2 (40 мг/кг) и 13,45 мг/кг (500 мг/кг), тогда как на 14-е сутки при дозировках 40 и 500 мг/кг по сравнению с предыдущим периодом концентрация молибдена в черве уменьшилась на 64,8 и 47% соответственно (рис. 1,б).

Изучение динамики показателя общего минерального состава тканей червя, проведенное на 7-е и 14-е сутки экспозиции свидетельствует о наличии колебаний уровня элементов в тканях червя под влиянием действующего фактора. Так, независимо от типа субстрата выявлено снижение практически всех химических элементов в

черве на 7-е сутки экспозиции в присутствии НЧ MoO_3 относительно фоновых концентраций.

В субстрате А по мере увеличения концентрации НЧ MoO_3 от 10 до 500 мг/кг установлено выраженное снижение Al, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Si

и V. Вместе с тем произошло накопление Ca, P, Cu и Zn (рис. 2,а).

В субстрате В по степени выведения и накопления химических элементов наблюдалась схожая картина (рис. 2,б).

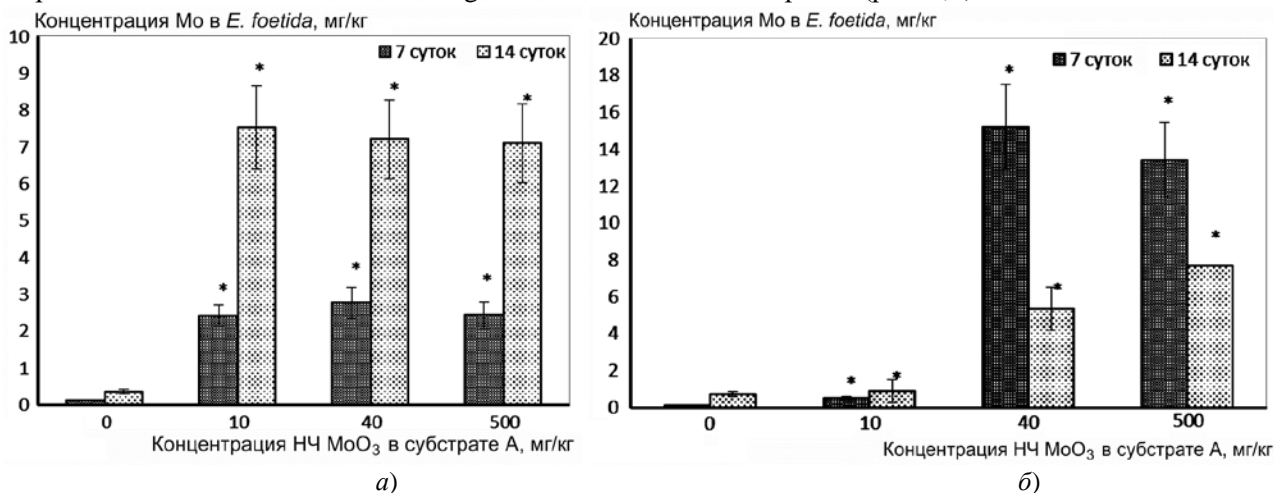


Рис. 1. Концентрация Mo в черве *E. foetida* при различных концентрациях НЧ MoO_3 в субстрате А (а) и В (б); бары отражают стандартные отклонения среднего значения из трех повторностей (*– достоверное отличие от контроля (0 мг/кг), $p \leq 0,05$)

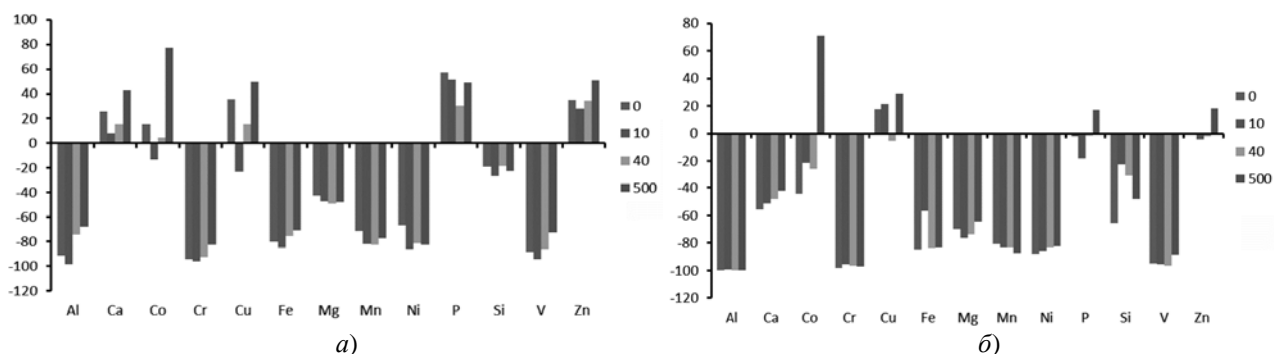


Рис. 2. Достоверная разница концентраций химических элементов в организме червя на 7-е сутки экспозиции в субстратах А (а) и В (б) относительно фоновой концентрации, мг/кг: 1 – 0; 2 – 10; 3 – 40; 4 – 500 ($p < 0,05$)

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 (Nameik, 1994). Все три процесса имеют свои собственные кинетики и, следовательно, токсичность не может быть определена без принятия во внимание времени экспозиции.

В проведенных исследованиях острой токсичности НЧ MoO_3 в различных концентрациях, длительностью 7 и 14 суток были использованы

компостные черви *E. foetida* при соблюдении критериев обоснованности, установленных OECD (1984). Моделируя токсическую нагрузку на почвенные организмы были использованы два субстрата, один из искусственной почвы, другой из микрокристаллической целлюлозы.

Используемые для биотестирования дозы молибдена не случайны, так как на основании результатов (Wichard, 2009), где в естественных почвах содержание молибдена колеблется от 1 до 2 мг·г⁻¹ сухого веса, тогда как в загрязненных почвах концентрации могут достигать 100–210 мг·г⁻¹ сухого веса. Это продемонстрировано при состоянии общего минерального состава

ва, когда степень выведения отмечена у большинства элементов, что привело к критическому дефициту многих элементов. Вместе с тем в зависимости от дозы НЧ MoO_3 скорость выведения химических элементов снижалась. Наиболее стабильными под действием изучаемых факторов являлись Co , Cu , P , Zn .

Высокая степень аккумуляции молибдена в тканях червя имела линейную зависимость от дозы. В частности, из субстрата А накапливалось порядка 2–7 мг/кг молибдена, а из субстрата В – до 15 мг/кг (7-е сутки), со снижением концентрации при дозах 40 и 500 мг/кг на 14-е сутки на 64,8 и 57,4% соответственно.

Полученные данные позволяют предположить следующее: 1) как указано (Sheppard et al., 1997), воздействие некоторых элементов происходит медленно, а их накопление может продолжаться в течение длительного периода (месяцев); 2) токсикинетика воздействия НЧ молибдена в наноформе может затрагивать неизвестные адаптационные механизмы, что в основном связано с регуляцией молибдена в организме червя.

С одной стороны, эти результаты дают возможность предполагать, что высокая степень аккумуляции молибдена в теле червя, находящегося на субстрате А, связана с пассивными процессами, что обусловлено доступными концентрациями молибдена в субстрате, а не активными процессами, которые регулируются дождевыми червями. Аналогичные заключения в ходе экспериментальных исследований получили Van Gestel et al. (2011). С другой стороны, некоторые активные механизмы экскреции были установлены на 14-е сутки при экспозиции на субстрате В, что возможно связано со снижением двигательной активности и трофической деятельностью червя.

ВЫВОДЫ

В ходе исследования было установлено, что черви *E. fetida* проявляют способность к накоплению и аккумуляции НЧ MoO_3 . Так, степень аккумуляции молибдена в тканях червя имела прямую зависимость от дозы, в частности из субстрата А накапливалось порядка 2–7 мг/кг молибдена, а из субстрата В – до 15 мг/кг (7-е сутки), со снижением концентрации при дозах 40 и 500 мг/кг на 14-е сутки на 64,8 и 57,4% соответственно.

Накопление молибдена, в свою очередь, неоднозначно сказывалось на накоплении и выведении других химических элементов, что может свидетельствовать о токсическом действии

НЧ MoO_3 , которые нарушали содержание общего минерального пула в червях по сравнению с контрольной группой. Немалую роль при воздействии НЧ MoO_3 играл временной фактор, так как известно, что накопление многих наночастиц может продолжаться в течение длительного периода (месяцев). Кроме того, токсичность воздействия НЧ молибдена в может затрагивать неизвестные адаптационные механизмы, что в основном связано с регуляцией молибдена в организме червя.

Данные результаты могут быть использованы при оценке допустимых пределов содержания наночастиц оксида молибдена в почве, а также для разработки методов биоремедиации антропогенно-загрязненных почв.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены при финансовой поддержки гранта Российского научного фонда (№ 14-36-00023).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Резниченко И.С. Сравнительный анализ методик очищения пищеварительной системы дождевых червей для экотоксикологических исследований на *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). Фундаментальные исследования. 2013. Вып. 6–5. С. 1156–1159.

(Reznichenko I.S. Comparative analysis of the methods of cleansing the digestive system of earthworms for ecotoxicological studies on *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). Fundamental'nye issledovaniya. 2013. Vyp. 6–5. S. 1156–1159 [In Russ.]).

Buekers J., Mertens J., Smolders E. Toxicity of the molybdate anion in soil is partially explained by effects of the accompanying cation or by soil pH. Environ Toxicol Chem. 2010, 29(6):1274–1278.

Cortet J., Gomot-De Vaufleury A., Poinot-Balaguer N., Gomot L., Texier C., Cluzeau D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. Eur J Soil Biol. 1999, 35(3):115–134.

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

He Z.L., Yang X.E., Stoffella P.J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. J Trace Elem Med Bio. 2005, 19(2):125–140.

Jager T., Fleuren R.H., Hogendoorn, E.A., De Korte, G. (2003). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 2003, 37(15):3399–3404.

Lapied E., Moudilou E., Exbrayat J.M., Oughton D.H., Joner E.J. Silver nanoparticle exposure causes apoptotic re-

sponse in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Nanomed.* 2010, 5(6):975–984.

Mendel R.R., Bittner F. Cell biology of molybdenum. *BBA-Mol Cell Res.* 2006, 1763(7):621–635.

Morgan J.E., Morgan A.J. 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. *Appl Soil Ecol.* 1999, 13(1):9–20.

OECD 207 OECD. Guidelines for testing of chemicals: earthworm acute toxicity test. 1984. №. 207, Paris, France.

Scott-Fordsmand J.J., Krogh P.H., Schaefer M., Johansen A. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. *Ecotox Environ Safe.* 2008, 71(3):616–619.

Sheppard S.C., Evenden W.G., Cornwell T.C. Depuration and uptake kinetics of I, Cs, Mn, Zn and Cd by the earthworm (*Lumbricus terrestris*) in radiotracer-spiked litter. *Environ Toxicol Chem.* 1997, 16(10):2106–2112.

Van Gestel C.A., Ortiz M.D., Borgman E., Verweij R.A. The bioaccumulation of molybdenum in the earthworm *Eisenia andrei*: influence of soil properties and ageing. *Chemosphere.* 2011, 82(11):1614–1619.

Van Gestel C.A., Ortiz M.D., Borgman E., Verweij R.A. The bioaccumulation of molybdenum in the earthworm *Eisenia andrei*: influence of soil properties and ageing. *Chemosphere.* 2011, 82(11):1614–1619.

Wichard T., Mishra B., Myneni S.C., Bellenger J.P., Kraepiel A.M. Storage and bioavailability of molybdenum in soils increased by organic matter complexation. *Nat Geosci.* 2009, 2(9):625–629.

Žaltauskaitė J., Sodienė I. Effects of total cadmium and lead concentrations in soil on the growth, reproduction and survival of earthworm *Eisenia fetida*. *Ekologija.* 2010, 56(1–2):10–16.

Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A. Uptake, bioaccumulation, and biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) and its reduced metabolites (MNX and TNX) by the earthworm (*Eisenia fetida*). *Chemosphere.* 2009, 76(1):76–82.

THE MINERAL COMPOSITION OF *EISENIA FETIDA* TISSUES AT THE PRESENCE OF MOLYBDENUM OXIDE (VI) NANOPARTICLES IN CULTURE MEDIUM

S.V. Lebedev^{1,2}, I.A. Gavrish^{1,2}

¹ Orenburg State University, Pobedy str. 13, Orenburg, 460015, Russia

² All-Russian Research Institute of Beef Cattle Breeding, 9 Janvarja str. 29, Orenburg, 460000, Russia

ABSTRACT. In recent years a promising area of research in science and technology have become nanotechnology. However, the use of nanoparticles, including metals, requires careful assessment of their behavior in living systems to determine their applicability. The accumulation of the molybdenum oxide nanoparticles in tissues of *Eisenia fetida* was investigated at dosage 10, 40 and 500 mg/kg of dry soil. We use two substrates: microcrystalline cellulose (A) and artificial soil (B). Degree of Mo accumulation in the tissues of the worm depended upon the dose and the substrate. In particular, when increase the concentration of molybdenum oxide nanoparticles, in the substrate A there was accumulated from 2 to 7 mg/kg molybdenum, while in the substrate B up to 15 mg/kg, with a decrease in concentration at doses 40 mg/kg and 500 mg/kg by the 14th day to 64.8% and 57.4% respectively. These results make it possible to assume that the high degree of Mo accumulation in the body of the worm located on the substrate A is associated with passive process, which is due to available Mo concentrations in the substrate, instead of the active processes that are regulated by earthworms.

KEYWORDS: nanoparticles of molybdenum oxide, *Eisenia fetida*, the rate of accumulation.