

ОЦЕНКА РИСКА БИОАККУМУЛЯЦИИ МИКРОПЛАСТИКА И НАНОЧАСТИЦ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ ПРЕСНОВОДНЫХ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ *PARAMECIUM CAUDATUM* И *TETRAHYMENA THERMOPHILA*

О.В. Карпухина^{1, 3*}, А.А. Снег², И.Г. Калинина³

¹ Биологический факультет и ² Факультет почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова и ³ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

* Эл. почта: karpukhina.msu@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 07.03.2024; принята к печати 04.05.2024

Масштабное использование микропластиков и наноматериалов, приводящее к загрязнению окружающей среды, вызывает серьезную обеспокоенность. Исследования показали, что микропластик модулирует токсичность тяжелых металлов. Нами изучено сочетанное влияние микрополиэтилена (порошок 300 мкм) и наночастиц оксидов тяжелых металлов на жизнедеятельность пресноводных одноклеточных *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena thermophila*. Полученные данные свидетельствуют о том, что токсичность наночастиц оксидов меди (20–60 нм), цинка (40–60 нм) и молибдена (5–20 нм) увеличивается, когда они воздействуют на организм в сочетании с микрополиэтиленом.

Ключевые слова: микропластик, наночастицы, биоаккумуляция, эукариоты, пресноводные инфузории.

ASSESSING THE RISK OF BIOACCUMULATION OF MICRO-PLASTICS AND HEAVY METAL NANOPARTICLES FOR FRESH-WATER UNICELLULAR ORGANISMS *PARAMECIUM CAUDATUM* И *TETRAHYMENA THERMOPHILA*

O.V. Karpukhina^{1, 3*}, A.A. Sneg², I.G. Kalinina³

¹ Biological Faculty and ² Soil Science Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University and ³ N.N. Semenov Research Center of Chemical Physics, Moscow, Russia

* Email: karpukhina.msu@yandex.ru

Large-scale use of micro-plastics and nanomaterial is prone with environmental pollution and therefore raises serious concerns. Research has shown that micro-plastics modulate the toxicity of heavy metals. We have studied the combined effects of micro-polyethylene (300 μm powder) and of nanoparticles of heavy metal oxides on the conditions of freshwater unicellular organisms *Paramecium caudatum* and *Tetrahymena thermophila*. The results suggest that the toxicity of the nanoparticles of oxides of copper (20–60 nm), zinc (40–60 nm) and molybdenum (5–20 nm) increase when they interact with micro-polyethylene.

Keywords: micro-plastics, nanoparticles, bioaccumulation, eukaryotes, fresh-water infusorians.

Введение

За последнее десятилетие в значительном числе исследований проанализировано воздействие микро- и наноразмерных материалов на наземные и водные системы, а также механизмы их токсичности для человека, животных и растительных организмов. Однако существуют вопросы, которые требуют дальнейшего внимания. Загрязнение пластическими полимерами стало в настоящее время глобально важной экологической проблемой в мире [3, 8, 12, 13, 15, 24, 25]. Полиэтилен, полистирол, поливинилхлорид и поли-

метилметакрилат используются в различных промышленных производствах и в быту. Частицы пластика <5 мм определяются как микропластик (МП), в окружающей среде размер частиц МП колеблется от нескольких микрон до нескольких миллиметров, появляются даже наноразмерные частицы [12, 19, 25].

Первичный пластик микроразмера – это обычно промышленное сырье, которое используется, например, в изготовлении средств медицинского назначения и косметических препаратов; большие количества пластиковых микрошариков применяются в различ-

ных производствах для увеличения трения и очищающего эффекта. После применения первичный МП в больших количествах поступает через канализацию в водную среду.

Вторичный МП в основном образуется в результате крупномасштабного механического дробления пластических полимеров, например, при износе пластмассовых конструкций, пластиковых труб, шин или при биологическом разложении пластика [19, 25].

Предполагается, что в первую очередь МП первичный и выделяющийся из материалов, контактирующих с водой или почвой, оказывает воздействие на пресноводные организмы. *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena thermophila* – свободноживущие относительно крупные (до 300 мкм) одноклеточные организмы широко распространены в прудах, реках и озёрах. Эти инфузории находятся на первом уровне водной пищевой цепи и, следовательно, обладают способностью переносить загрязняющие вещества, такие как тяжелые металлы, на более высокие трофические уровни.

Исследование в данной работе направлено на расширение знаний о роли МП как потенциального токсичного агента, попадающего в пресноводную пищевую цепь. В естественной среде обитания организмы обычно подвергаются одновременному воздействию нескольких загрязнителей окружающей среды. Биологические эффекты, возникающие в результате суммы токсических взаимодействий, могут значительно отличаться от эффектов, вызванных воздействием каждого загрязняющего вещества в отдельности. Опасность МП заключается как в прямом воздействии на биологические системы, так и в переносе других загрязняющих окружающую среду токсикантов [7, 16, 24]. МП благодаря своим уникальным характеристикам, таким как небольшой размер, пористость, высокое соотношение поверхности и объема и высокая гидрофобность, легко адсорбирует тяжелые металлы [21, 30]; например, полиэтиленовые МП и хлорированные полиэтиленовые МП могут адсорбировать на своей поверхности медь (Cu^{2+}), кадмий (Cd^{2+}) и свинец (Pb^{2+}) [4, 24, 31]. Взаимодействие между МП и тяжелыми металлами может изменить поведение ионов металлов в окружающей среде, их биодоступность и потенциальную токсичность, что сопряжено с существенными экологическими рисками.

В последние годы в связи с развитием нанотехнологий в мире возросло использование наночастиц (НЧ) металлов и металлосодержащих соединений [27], которые попадают в окружающую среду всевозможными путями. Такие обстоятельства, как сброс городских канализационных вод, накопление мусорных отходов, городские промышленные и сельскохозяйственные сточные воды, являются причинами проникновения НЧ металлов в водные объекты [20].

Присутствие НЧ тяжелых металлов в окружающей среде может оказать потенциально негативное воздействие на жизнедеятельность наземных, почвенных и водных организмов. Физические и химические свойства НЧ выступают в качестве ключевых факторов, влияющих на проникновение, транслокацию и накопление НЧ в клетках организма.

Основой токсичности НЧ тяжелых металлов считается индукция окислительного стресса [17, 22, 27]. Этот процесс возникает при дисбалансе между образованием свободных радикалов азота и кислорода и уровнем антиоксидантной защиты, как ферментативной, так и не ферментативной [11].

Проведено множество экспериментов с целью исследования сложных физических и химических механизмов взаимодействия между МП и тяжелыми металлами [18, 23], всесторонне изучались такие факторы, как структурная конфигурация, реакционная способность, pH, скорость адсорбции тяжелых металлов на микропластике в водной среде [23], но информация о совместном влиянии МП и НЧ металлов на биологические системы остается недостаточной. Адсорбция НЧ тяжелых металлов на поверхности МП может приводить к появлению неожиданных токсических эффектов и при попадании внутрь организма ощутимо влиять на функции клеток, поэтому в представленном исследовании мы оценивали двигательную активность и функциональные особенности поведения пресноводных одноклеточных организмов *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena thermophila* в условиях раздельного и сочетанного присутствия полиэтиленового микропорошка и НЧ оксидов меди CuO (20–60 нм), цинка ZnO (40–60 нм) и молибдена MoO_3 (5–20 нм) в среде культивирования.

Материалы и методы

В опытах использован полиэтиленовый порошок 300 мкм ЛПЭНП (ОСЧ 99,9%; производство Казаньоргсинтез, Россия), поскольку полиэтилен – наиболее распространенный в мировом производстве полимер и один из основных компонентов МП, встречающегося в пресноводных экосистемах [1, 12]. Наночастицы были получены в ОИВТ РАН методом лазерной абляции металлических мишеней, помещенных в различные жидкости [1]. Для опытов в ультразвуковом диспергаторе ULTRA-TURRAX® Tube Drive нами готовилась суспензия металлосодержащих наночастиц на основе физиологического раствора и дистиллированной воды (pH = 7).

Опыты были проведены на инфузориях *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena thermophila* – хорошо изученных моделях-биоиндикаторах для исследования воздействия факторов среды [2, 14, 26, 32]. Преимущество экспериментов с этими микроорганизмами заключается в их коротком жизненном цикле, про-

стоте и экономичности лабораторных манипуляций с клетками.

Клетки ($n = 10-12$) собирали вручную из маточной культуры (стационарная фаза роста) и инокулировали в 96-луночные культуральные планшеты с добавлением либо 50 мкл МП, либо 50 мкл НЧ оксида металла, либо смеси МП и НЧ оксида металла. *P. caudatum* и *T. thermophila* инокулировали до 24 ч при температуре 22 ± 2 °C без доступа к пище. В контрольный момент времени подсчитывали жизнеспособные и нежизнеспособные клетки с применением светового микроскопа и цифровой камеры Levenhuk C310, 3.1 Mpixel; погибшими считали те клетки, которые были неподвижны и не сохранили типичную форму.

Выживаемость (N , %) рассчитывали по формуле:

$$N = N_2/N_1 \times 100,$$

где N_2 – среднее число клеток в контрольный момент времени эксперимента и N_1 – среднее число клеток в начале эксперимента.

Репродуктивную способность *P. caudatum* исследовали, помещая одну клетку инфузории в лунки культурального планшета (использовали 24-луночные планшеты) и фиксируя динамику роста (численность потомства) в течении 96 ч. В лунки добавляли соответствующие объемы МП, наночастиц и питательной среды (включая пищу – стерильную взвесь дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*). Влияние исследуемых частиц на воспроизводство потомства оценивали как снижение скорости бинарного деления по сравнению с контрольными клетками. Контрольные эксперименты проводили только с использованием чистых питательных сред.

Антиоксидантную ферментативную активность в клетках *P. caudatum* и *T. thermophila* анализировали с использованием общепринятых методик биохимического анализа. Клетки инокулировали в 96-луночный планшет (~700 клеток/лунка) и подвергали воздействию сред с МП, НЧ оксидов металлов и их смеси. После 24-часового воздействия клетки центрифугировали при 800 g в течение 15 минут, а осадок клеток перед обработкой ультразвуком при 4 °C суспензировали в 5 мл предварительно охлажденного физраствора, забуференного фосфатами (PBS); далее лизаты клеток центрифугировали при 13 000 g в течение 20 мин при 4 °C, а затем собирали надосадочную жидкость (1 мл) для анализа активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Активность СОД измеряли в соответствии с протоколом Бочампа и Фридовича [5]. Активность КАТ в клетках анализировали с помощью спектрофотометрического анализа (UV-3600, Shimadzu) методом прямого измерения распада H_2O_2 при длине волны 240 нм, как описано Бирсом и Сайзером [6].

Для статистического анализа обрабатывались результаты трех независимых опытных повторов; для

оценки значимости различий между вариантами опытов применяли t -критерий Стьюдента (Statistica 12.6).

Результаты

Присутствие полиэтиленового порошка в среде инокубирования привело к снижению скорости движений у исследуемых нами видов инфузорий. Численность жизнеспособных клеток *P. caudatum* и *T. thermophila* начала снижаться через 2 ч от начала опыта (рис. 1).

НЧ оксидов тяжелых металлов в опытных концентрациях также оказали значительное негативное влияние на клетки *P. caudatum* и *T. thermophila*: сократилась подвижность ресничек, отмечались морфологические изменения тела, наблюдался лизис и разрушение мембран клеток. Коллоидный раствор НЧ оксида цинка (3,9 мг/л) был токсичен для инфузорий в большей степени, чем суспензии НЧ оксида меди (122 мг/л) или молибдена (131 мг/л). Токсическое действие НЧ оксида меди не зависело от продолжительности воздействия, тогда как негативное влияние наночастиц соединений цинка и молибдена уменьшилось после 8 ч инокубирования, что, вероятно, связано с адаптацией клеток к новым условиям среды (рис. 2).

Одновременное присутствие в среде культивирования МП и НЧ оксидов тяжелых металлов значительно уменьшило выживаемость клеток инфузорий при сравнении с контрольной группой и наличием каждого токсиканта в отдельности.

Повышение супероксиддисмутазной (СОД) и каталазной (КАТ) активностей является индикатором окислительного стресса в клетках. Результаты биохимического анализа продемонстрировали общее увеличение активности двух антиоксидантных ферментов, которое коррелировало с действием НЧ оксидов металлов. Значимое увеличение СОД в сравнении с контролем наблюдалось, когда клетки *P. caudatum* подвергались воздействию НЧ оксида цинка либо НЧ оксида меди (рис. 3).

При наличии в среде одного только полиэтиленового порошка активность СОД в клетках инфузорий *Paramecium caudatum* оказалась меньше, нежели в случае одновременного сочетанного присутствия в культуральной среде МП и каких-либо из исследуемых нами металлосодержащих НЧ (рис. 3).

Значимое усиление активности антиоксидантного фермента КАТ наблюдалось нами только у инфузорий, подвергшихся воздействию НЧ оксида цинка. Повышение уровня этого фермента в клетках после воздействия НЧ оксида меди и НЧ оксида молибдена было незначительным по сравнению с интактными клетками (рис. 4). Между тем, нами установлено, что активность КАТ повышалась в клетках в случае инокубирования их в среде, содержащей смесь МП и НЧ оксида меди либо смесь МП и НЧ оксида молибдена, и показатели КАТ для этих клеток были выше, чем

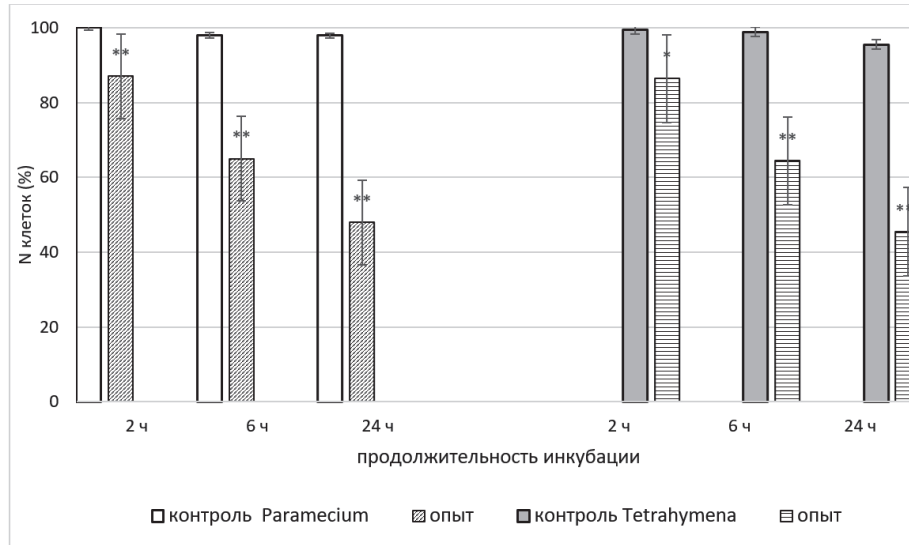


Рис. 1. Выживаемость N (%) клеток *P. caudatum* и *T. thermophila* в среде с 50 мкл полиэтиленового порошка, инкубация 24 ч. Представлены средние по трем независимым экспериментам; * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$ для различий между средними значениями, указанными линиями

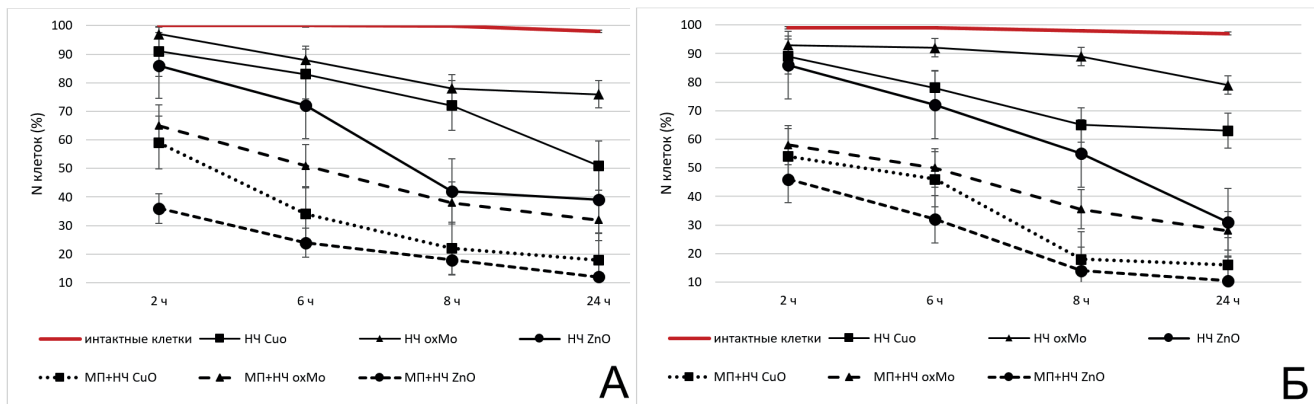


Рис. 2. Выживаемость N (%) клеток *P. caudatum* (А) и *T. thermophila* (Б) при 24-часовом воздействии токсикантов

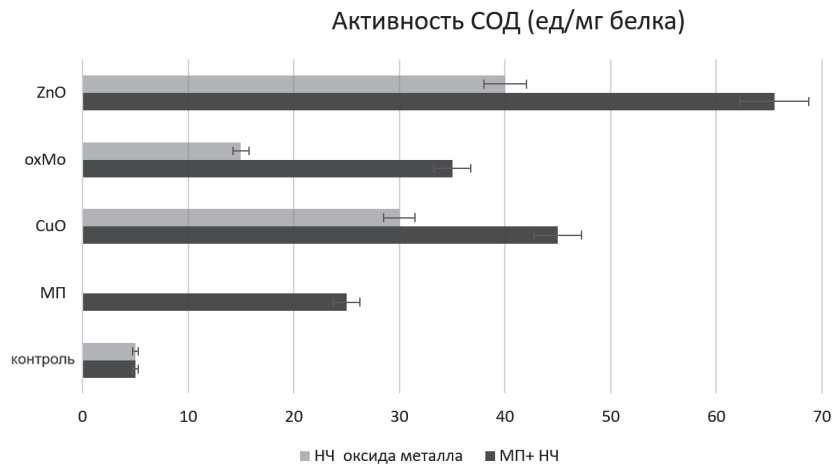


Рис. 3. Активность СОД в клетках *P. caudatum* в контроле и при наличии МП и металлосодержащих НЧ в среде

в случае присутствия в среде культивирования только одного полиэтиленового порошка (рис. 4). Аналогичные данные были получены в результате биохимического анализа лизата клеток *T. thermophila*.

Дополнительно установлено, что полиэтиленовый МП ингибирует бесполое размножение (деление) у *Paramecium caudatum* (рис. 5). Сочетанное влияние МП и НЧ оксида цинка подавляло у инфузорий деле-

ние настолько сильно, что число дочерних клеток в каждой лунке планшета к третьим суткам эксперимента оказалось почти равным нулю.

Данные о негативном сочетанном воздействии полиэтиленового порошка и металлосодержащих наночастиц на репродуктивную функцию *P. caudatum* получены также и в опытах с частицами оксида меди и оксида молибдена.

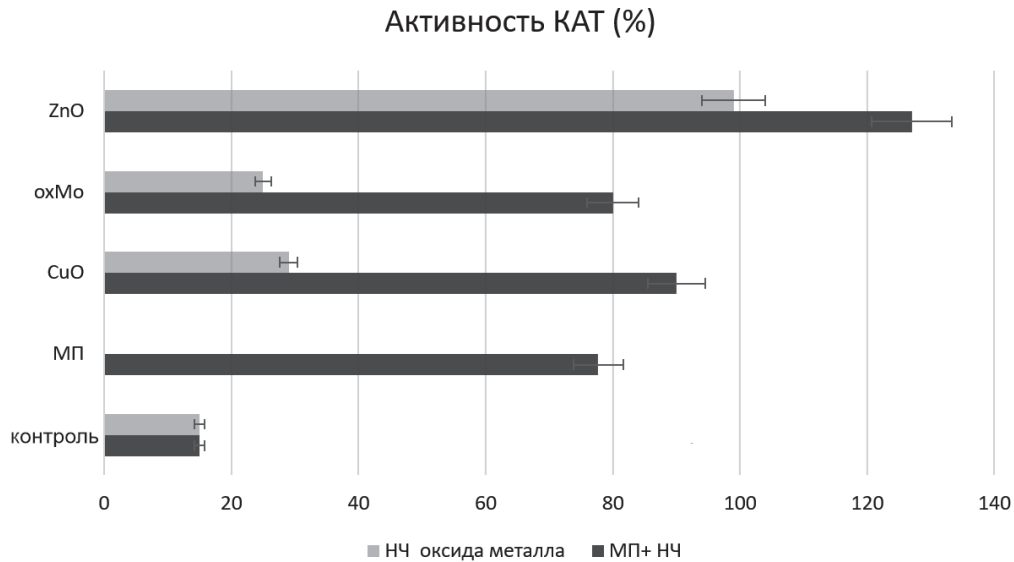


Рис. 4. Активность каталазы в клетках *P. caudatum* в контроле и при наличии МП и металлосодержащих НЧ в среде

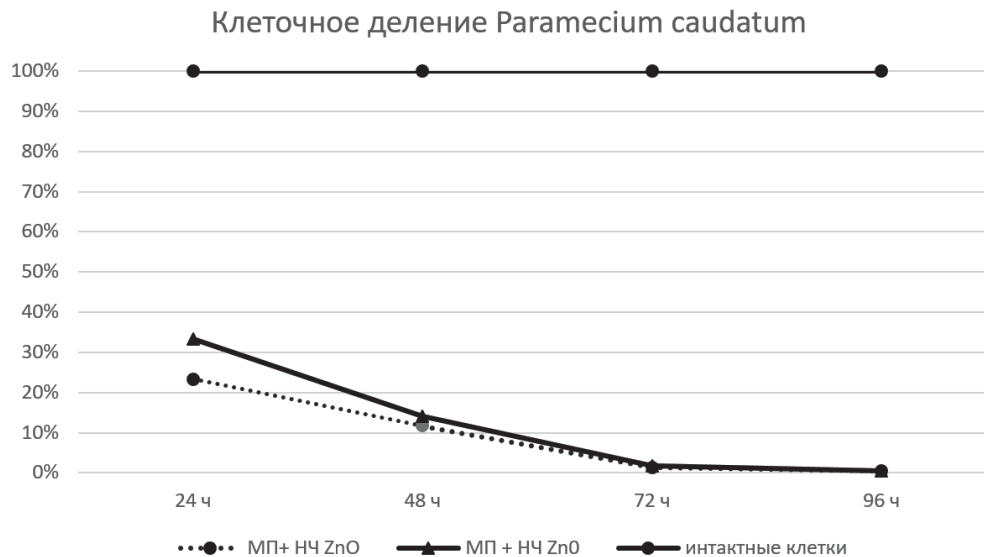


Рис. 5. Число клеток *P. caudatum* в среде с полиэтиленовым микропорошком (300 мкм) и НЧ оксида ZnO (~60 нм) относительно числа интактных клеток в контроле (%) при различных сроках инкубации в условиях бесполого размножения

Обсуждение результатов

В наших опытах после воздействия полиэтиленового порошка, либо металлосодержащих НЧ, либо их смеси наблюдались изменения в локомоции *P. caudatum* и *T. thermophila*. Движение инфузорий становилось аномальным: отмечались выраженные однонаправленные круговые траектории, сопровождающиеся заметным снижением скорости с нарушением ритма биения ресничек. В результате сочетанного воздействия МП и НЧ оксидов металлов было зарегистрировано «слипание» ресничек и нарушение целостности мембранного аппарата клеток. Следовательно, физическое повреждение от микрочастиц могло стать основной причиной нарушения двигательной активности *P. caudatum* и *T. thermophila*.

НЧ легко проникают через клеточную мембрану, далее попадают в цитоплазму и внутрь клеточных органелл [29]. Известно, что НЧ малого размера (менее 10 нм) могут проходить через клеточные мембраны путем диффузии, тогда как НЧ большего размера проникают в клетки с помощью других механизмов транспорта, таких как фагоцитоз, микропиноцитоз и прочее [29, 33]. Размер НЧ обеспечивает прохождение мембран для взаимодействия с такими органеллами, как митохондрии, лизосомы и ядро, что в конечном итоге приводит к повреждению клеток [9–10, 29].

Мы получили данные, что при инкубировании клеток в среде, содержащей смесь полиэтиленового порошка и НЧ оксида металла, происходили изменения мембранного аппарата и заметная реорганизация структур цитоскелета *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena thermophila*, которые становились причиной гибели этих организмов (не показано).

Морфологические и функциональные нарушения у двух видов инфузорий под влиянием НЧ оксидов металлов могут быть связаны с развитием окислительного стресса, что соответствует показанному нами увеличению активности антиоксидантных ферментов СОД и КАТ более чем на 20%, указывающему на запуск каскада окислительных процессов в клетках *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena thermophila*. Совместное действие СОД и КАТ обеспечивает разложение перекиси водорода, таким образом уменьшая повреждение клеток [28].

Большая удельная поверхность НЧ оксидов тяжелых металлов увеличивает их каталитические и адсорбционные свойства и химическую реакционную способность. Дополнительно ионы металлов Cu, Zn и Mo сами по себе могут обладать способностью катализировать активные формы кислорода (АФК), такие как синглетный кислород, супероксид ($O_2^{\bullet-}$), гидроксил (HO^{\bullet}), гидропероксил (HO_2^{\bullet}), перекись водорода

(H_2O_2) [22]. Генерация реактивных радикалов возможна как за счет взаимодействия металлосодержащих НЧ или же высвободившихся из наноконтекста ионов металла с внешней мембраной инфузорий (каскадный механизм перекисного окисления липидов), так и внутри клеток инфузорий при взаимодействии НЧ с эндоплазматической сетью и митохондриями [9, 28].

Результаты нашего эксперимента подтверждают, что МП является окислительным стрессором и в сочетании с металлосодержащими НЧ приводит к изменению окислительного статуса инфузорий в пользу образования агрессивных свободных радикалов.

Сочетанное действие полиэтиленового пластика и НЧ оксида металла оказали резко негативное влияние на репродуктивные функции инфузорий. Обычно бесполой процесс размножения у *Paramecium caudatum* происходит при благоприятных условиях – температуре 20–25 °С и рН 6,6–7,6; в этом случае одна особь может делиться два раза в сутки [2]. Результаты проведенных нами опытов показали, что одновременное наличие в среде культивирования микрочастиц пластика и металлосодержащих НЧ полностью ингибирует процесс деления у инфузорий данного вида.

Заключение

Наше исследование демонстрирует, что простейшие пресноводные организмы *P. caudatum* и *T. thermophila* уязвимы к сочетанному воздействию МП и НЧ оксидов таких металлов, как медь, цинк и молибден, сильнее, чем при действии этих веществ по отдельности. Микропластик и наночастицы металлов являются двумя важными источниками загрязнения водных экосистем, и взаимодействие этих двух токсикантов может вызвать опасные последствия для окружающей среды и живых организмов. Адсорбируя наночастицы металлов, микропластики выступают переносчиками таких загрязнителей в водной среде, и кроме того, воздействуя комплексно с металлосодержащими частицами, способны в высшей степени отрицательно изменить жизненные функции водных организмов. Полученные нами данные подтверждают необходимость дополнительных исследований для более точного понимания негативных последствий присутствия микропластика в водной среде с экологической и токсикологической точек зрения; для оценки рисков синергетического воздействия наноразмерных материалов на живые организмы.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема «Нейробиологические основы поведения животных» № 121032500080-8).

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Бородина ТИ, Вальяно ГЕ, Карпухин ВТ, Маликов ММ, Казарян МА. Особенности строения и общность морфологии наноструктур оксидов меди, цинка, циркония, молибдена, вольфрама и ванадия, синтезированных методом лазерной абляции в воде. Краткие сообщения по физике Физического института им. П.Н. Лебедева Российской Академии наук. 2020;47(7):3-10.
2. Карпухина ОВ, Гумаргалиева КЗ, Иноземцев АН, Заиков ГЕ, Абзалдинов ХС. Особенности кинетики роста культуры *Paramecium caudatum* в модели окислительного стресса. Вестник Казанского технологического университета. 2015;18(10):9-11.
3. Сперанская О, Понизова О, Цитцер О, Гурский Я. Пластик и пластиковые отходы в России: ситуация, проблемы и рекомендации. Международная Сеть по Ликвидации Загрязнителей (International Pollutants Elimination Network). М.: ЭКО-Согласие; 2021.

Общий список литературы/References

1. Borodina TI, Valyano GE, Karpukhin VT, Malikov MM, Kazaryan MA. [Structural features and common morphology of nanostructures of copper, zinc, zirconium, molybdenum, tungsten and vanadium oxides synthesized by laser ablation in water]. Kratkiye soobshcheniya po fizike Fizicheskogo instituta im. P.N. Lebedeva Rossiyskoy Akademii Nauk. 2020;47(7):3-10. (In Russ.)
2. Karpukhina OV, Gumargaliyeva KZ, Inozemtsev AN, Zaikov GE, Abzal'dinov KHS. Osobennosti kinetiki rosta kul'tury *Paramecium caudatum* v modeli okislitel'nogo stressa. Vestnik Kazanskogo Tekhnologicheskogo Universiteta. 2015;18(10):9-11. (In Russ.)
3. YA. Plastik i Plastikovye Otkhody v Rossii: Situatsiya, Problemy i Rekomendatsii. Mezhdunarodnaya Set' po Likvidatsii Zagryazniteley (International Pollutants Elimination Network). M.: EKO-Soglasie; 2021. (In Russ.)
4. Metal adsorption by microplastics in aquatic environments under controlled conditions: exposure time, pH and salinity. Int J Environ Anal Chem. 2020;102(5):1-8 <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1733546>.
5. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem. 1971;44:276-87.
6. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem. 1952;195:133-40.
7. Bhagat J, Nishimura N, Shimada Y. Toxicological interactions of microplastics/nanoplastics and environmental contaminants: Current knowledge and future perspectives. J Hazard Materials. 2021;405:123913. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123913>.
8. Burns EE, Boxall ABA. Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps. Environ Toxicol Chem. 2018;37(11):2776-96.
9. Dayem A, Hossain MK, Lee SB, Kim K, Saha SK, Yang GM, Choi HY, Cho SG. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. Int J Mol Sci. 2017;18(1):120. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>.
10. Donahue ND, Acar H, Wilhelm S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. Advanced Drug Delivery Rev. 2019;143:68-96.
11. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th Edition. New York: Oxford University Press; 2015.
12. Henderson L, Green C. Making sense of microplastics? Public understandings of plastic pollution. Marine Pollut Bulln. 2020;152:110908-23.
13. Huang D, Tao J, Cheng M, Deng R, Chen S, Yin L, Li R. Microplastics and nanoplastics in the environment: Macroscopic transport and effects on creatures. J Hazard Mater. 2021;5(407):124399. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124399>.
14. Karpukhina OV, Gumargaliyeva KZ, Inozemtsev AN. The effect of antioxidant compounds on oxidative stress in unicellular aquatic organisms. In: Gennady E. Zaikov GE, Haghi AK, Klodzinska E, eds. Materials Science and Engineering: Physicochemical Concepts, Properties, and Treatments. Toronto: Apple Academic Press & CRC Press; 2016. p. 323-9.
15. Koelmans AA, Redondo-Hasselerharm PE, Nor NHM, Ruijter VN de, Mintenig SM, Kooi M. Risk assessment of microplastic particles. Nat Rev Materials. 2022;7:138-52.
16. Kumar R, Ivy N, Bhattacharya S, Dey A, Sharma P. Coupled effects of microplastics and heavy metals on plants: Uptake, bioaccumulation, and environmental health perspectives. Sci Total Environ. 2022;836:155619.

17. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Rad Biol. Med.* 2008;44:1689-99. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.028>.
18. Liu S, Shi J, Wang J, Dai Y, Li H, Li J, Liu X, Chen X, Wang Z, Zhang P. Interactions between microplastics and yeavy metals in aquatic environments: A review. *Front Microbiol.* 2021;12:652520. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652520>.
19. Lusher A, Hollman P, Mendoza-Hill J. Microplastics in Fisheries and Aquaculture: Status of Knowledge on Their Occurrence and Implications for Aquatic Organisms and Food Safety. FAO; 2017.
20. Malakar A, Kanel SR, Ray C, Snow DD, Nadagouda MN. Nanomaterials in the environment, human exposure pathway, and health effects: A review. *Sci Total Environ.* 2021;759:143470-522. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143470>.
21. Ming L, Yang L, Guanghui X, Yang W, Yong Y. Impacts of polyethylene microplastics on bioavailability and toxicity of metals in soil. *Sci Total Environ.* 2021;760:144037. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144037>.
22. Nel AE, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006;311:622-7. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>.
23. Oz N, Kadizade G, Yurtsever M. Investigation of heavy metal adsorption on microplastics. *App Ecol Environ Res.* 2019;17(4):7301-10.
24. Ozogul F. Nano/micro-Plastics Toxicity on Food Quality and Food Safety. Netherlands, Elsevier Science, 2023.
25. Rochman CM, Brooks C, Bikker J, Djuric N, Earn A, Bucci K, Athey S, Huntington A, McIlwraith H, Munno K, De Frond H, Kolomijeca A, Erdle L, Grbic J, Bayoumi M, Borrelle SB, Wu T, Santoro S, Werbowski LM, Zhu X, Giles RK, Hamilton BM, Thaysen C, Kaura A, Klasios N, Ead L, Kim J, Sherlock C, Ho A, Hung C. Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. *Environ Toxicol Chemistry.* 2019; 38(4):703-11. <https://doi.org/10.1002/etc.4371>.
26. Savinov VP, Yakunin VG, Karpukhina OV, Inozemtsev AN, Timoshenko VY, Riaby VA. Influence of low-temperature atmospheric pressure plasma on the vital functions of microorganisms. *J Phys: Conference Ser.* 2019;1348:012007.
27. Sengul AB, Asmatulu E. Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review. *Environ Chem Lett.* 2020; 18:1659-83. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01033-6>.
28. Somasundaram S, Abraham JS, Maurya S, Toteja R, Gupta R, Makhija S. Expression and molecular characterization of stress-responsive genes (hsp70 and Mn-sod) and evaluation of antioxidant enzymes (CAT and GPx) in heavy metal exposed freshwater ciliate, *Tetmemena* sp. *Mol Biol Rep.* 2019;46(5):4921-31. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04942-0>.
29. Sukhanova A, Borzova S, Sokolov S, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale Res Lett.* 2018;13:1-21.
30. Turner A, Holmes LA. Adsorption of trace metals by microplastic pellets in fresh water. *Environ Chem.* 2015; 12:600-10. <https://doi.org/10.1071/EN14143>.
31. Turner, Holmes, Thompson RC, Fisher AS. Metals and marine microplastics: Adsorption from the environment versus addition during manufacture, exemplified with lead. *Water Res.* 2020;173:115577. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115577>.
32. Van Houten JL. Chemoresponse in microorganisms. *Annu Rev Physiol.*1992;54:639-63.
33. Zhang S, Gao H, Bao G. Physical principles of nanoparticle cellular endocytosis. *ACS Nano.* 2015;9(9):8655-71. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03184>.

