

Nanoplastic influence on the siliceous sponge *Lubomirskia baicalensis*

Danilovtseva E.N., Pal'shin V.A., Zelinskiy S.N., Annenkov V.V.*

Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. Effects of plastic nanoparticles on the Baikal siliceous sponge *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), including the whole organism and primmorphs, were studied. A vital fluorescence dye was applied to visualize the spicules formed during the experiment. Polystyrene, polyvinyl chloride, and poly(methyl methacrylate) nanoparticles were found to be able to penetrate into the sponge body and cause toxic effects (decreased spicule production) starting from concentrations of 0.005-0.01 mg/L. This is a relatively high concentration, unthinkable in normal water bodies. On the other hand, the duration of the experiment (three months) is negligible compared to the life span of the sponge. Further experiments should aim to elucidate the fate of nanoplastics within sponges, the balance between plastic consumption, excretion and degradation, possibly involving sponge symbionts.

Keywords: siliceous sponge, primmorphs, nanoplastics, polystyrene, polyvinyl chloride, poly(methyl methacrylate)

1. Introduction

Plastic pollution is considered a formidable threat to humanity in this century. Nanoplastic is the least studied substance due to the great difficulty in its determination in the environment and living organisms. These small particles (less than 500 nm) are not visible under optical microscopy and can be tightly mixed with a variety of organic and inorganic compounds. Nanoplastics, especially particles smaller than 200 nm, are considered very dangerous due to their potential ability to penetrate living cells by endocytosis (Manzanares and Ceña, 2020). We recently estimated how much nanoplastic can be formed when commercial plastics such as polystyrene (PS), polyvinyl chloride (PVC), and poly(methyl methacrylate) (PMMA) are mechanically broken down (Annenkov et al., 2021). Nanoparticles were a minor fraction in this process compared to microplastics. Certainly, microplastics in water bodies can break down into smaller particles by photo- and chemodestruction, but the same factors should break down nanoparticles to a greater extent, since smaller particles are more active in any reactions. Thus, we estimated the actual amount of nanoplastics in water bodies to be many times lower than 0.01 mg/L.

Since it is difficult to study nanoplastics in the field, there are many works focusing on laboratory experiments with commercial or specially synthesized nanoparticles. In a study of the heterotrophic dinoflagellate *Gymnodinium corollarium* Sundström,

Kremp et Daugbjerg (Annenkov et al., 2023), we found that 0.01 mg/L of nanoplastic was a nontoxic concentration; moreover, these organisms can assimilate and degrade nanoparticles of plastic. On the other hand, the filtrating organisms, such as sponges, can accumulate significant amounts of nanoplastic even at low concentrations in the environment.

There are few works on the effect of nanoplastics on sponges. Recently, it was found that microplastics of 2-10 µm in size are expelled from the sponge body in 1-2 hours (Funch et al., 2023). Microplastic particles of 1 µm size at a concentration of 1 mg/L were non-toxic to temperate zone sponge species (*Tethya bergquistae* and *Crella incrustans*) (Baird, 2016). Nanoparticles of 100-500 nm can penetrate the sponge (Willenz and Van de Vyver, 1982; Turon et al., 1997; Leys and Eerkes-Medrano, 2006), but these were short-term experiments (no more than 4 h), and no information about the state of the sponge under the action of plastic was possible to obtain.

We have developed several vital fluorescent dyes that stain growing siliceous spicules (Annenkov et al., 2017; Annenkov et al., 2019; Danilovtseva et al., 2019). These dyes allow the growth of spicules in sponges and sponge primmorphs (3D cell culture) to be monitored and thus provide information on the sponge health. In this work, we evaluated the effects of plastic nanoparticles on the Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), including the whole organism and primmorphs.

*Corresponding author.

E-mail address: annekov@lin.irk.ru, annekov@yahoo.com (V.V. Annenkov)

Received: December 08, 2023; **Accepted:** December 19, 2023;
Available online: December 20, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



2. Materials and methods

2.1. Sponge samples and cultivation of primmorphs

Experiments with sponge samples were carried out according to (Annenkov et al., 2014). Samples of *L. baicalensis* were collected near the settlement of Bolshiye Koty, in the southwestern part of Lake Baikal, at a depth of 10 meters. Sponge specimens (4-5 cm in length) were grown in 3 L aquariums at $3 \pm 1^\circ\text{C}$ under air barbotage with daily 2/3 water changes. Luminescent lamps (color temperature 6500 K) were used for illumination of the aquariums in 12h/12h light/dark cycle.

Primmorphs were obtained similar to (Custodio et al., 1998). Briefly, sponge samples were cut under Baikal water (3°C) into $\approx 1\text{-}2$ mm particles. The particles and water were transferred into 50 mL conical plastic tubes (sponge to water ratio $\approx 1:20$) and gently shaken for 15 min on a rotary shaker. The suspension was then filtered through $100\ \mu\text{m}$ nylon mesh, and the resulting cells were harvested by sedimentation (1 h, 3°C) and washed again with Baikalian water. The cell suspension was placed in 400 ml plastic containers with 200 ml of Baikal water containing 0.002 % ampicillin. The containers were kept under the same conditions as the sponge samples when cultured. Every day for two weeks, 75% of the water was replaced with fresh water containing the antibiotic. After two weeks, the obtained primmorphs (1 mm or more in diameter) were transferred to new containers with water and antibiotic, and a 75% water change was performed weekly throughout the experiment.

Additives (plastic nanoparticles, dye) were added at each water change.

2.2. Chemical reagents

Bottled Baikalian water was used for sponge cultivation. The chemical composition of this water is described in (Suturin et al., 2002). NBD-N2 dye was obtained according to (Annenkov et al., 2010). Fluorescent nanoparticles were synthesized according our previous articles (Annenkov et al., 2021; Annenkov et al., 2023). Other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Fisher or Acros Chemicals and used without further treatment.

2.3. Study of the primmorphs and sponge tissues

Primmorphs were placed on a coverslip, cut into 2-4 pieces (depending on the size of the primmorph), each piece was transferred to a separate coverslip, flattened with a glass slide, and examined using epifluorescence microscopy. When the experiment was designed to count the number of spicules per dry weight of the primmorph, two pre-weighed coverslips were used. After counting the spicules by epifluorescence microscopy, the sample was dried over anhydrous CaCl_2 for two weeks and in vacuo to constant weight. Counting experiments were performed in at least four repetitions. Sponge samples for microscopy were prepared by cutting ≈ 1 mm slices from the sponge apex or middle of the sponge body.

Light and fluorescent microscopy was performed with MOTIC AE-31T inverted microscope with a HBO 103 W/2 OSRAM mercury lamp. Excitation was performed at 470 nm for green and yellow emission and 365 nm for blue emission.

3. Results and discussion

Two series of sponge experiments were carried out. The first short-term experiment consisted of an 8-day cultivation at extremely high concentrations of nanoplastic (0.1 and 1 mg/L, Fig. 1). PS and PVC nanoparticles entered the sponge body at a concentration of 1 mg/L, with a tendency to concentrate into 10-20 μm clusters similar to sponge cell size (Fig 1A). In the case of 0.1 mg/L, only single clusters of plastic were detected (Fig. 1C). In the second experiment, 0.01 and 0.1 mg/L PS and PVC nanoparticles were added to the culture medium for two months. The sponges with 0.01 mg/L nanoparticles looked healthy after two months, while the sponges with 0.1 mg/L plastic turned partially white after one month of experiment and completely collapsed after two months.

It should be mentioned that *L. baicalensis* is a very difficult organism for laboratory experiments. Long-term experiments are unlikely, as the sponge may die after 1-2 months of cultivation without exposure to any harmful factors. In addition, the moment of death of a sponge is difficult to record. Primmorphs, a 3D culture of self-organizing sponge cells, are a good model for

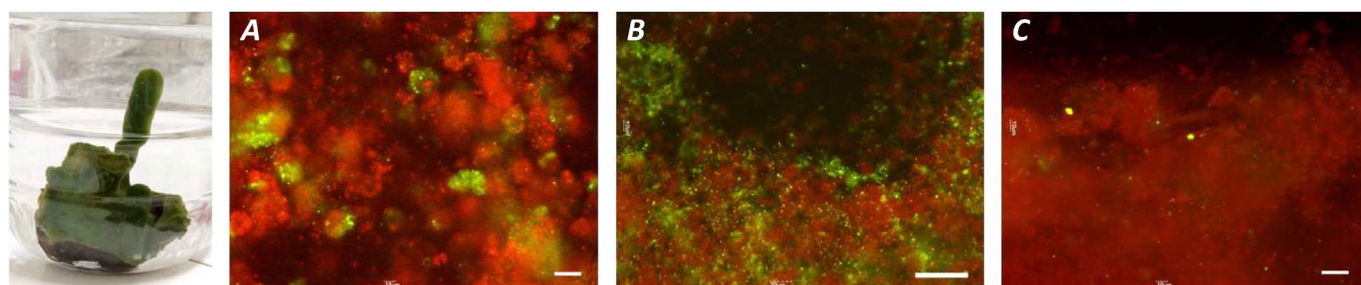


Fig.1. The sponge *L. baicalensis* in an aquarium and fluorescence images of sponge slices after 8 days of culturing in the presence of nanoplastics. Red fluorescence – chloroplasts, green – plastic nanoparticles. A - PS 200 nm, B and C -PVC 85 nm particles. Particles were stained with dibenzylfluorescein. Plastic concentration was 1 (A and B) and 0.1 (C) mg/L. Scale bars represent 25 (A), 50(B) and 75 (C) μm .

long-term experiments. *L. baicalensis* primmorphs can live as spherical structures of 1-8 mm in size for up to nine months. Spicules are formed in primmorphs, and the death of a primmorph is easily detected by its destruction.

We performed two series of experiments with primmorphs of *L. baicalensis*. First (Fig. 2), PVC and PS nanoparticles were added at a concentration of 0.01-10 mg/L. The fluorescent dye NBD-N2 was added to detect the spicules formed during the experiment. After one month, we found a more than threefold reduction in the number of new spicules in the presence of plastic at any concentration tested. The following experiment (Fig. 3) shows no effect of nanoplastics at a concentration of 0.001 mg/L for three months. Sub-micrometer PS particles of 600 nm reduced spicule formation at a concentration of 0.001 mg/L. All three plastics were toxic at a concentration of 0.005 mg/L.

4. Conclusions

Our experiments showed that polystyrene, polyvinyl chloride, and poly(methyl methacrylate) nanoparticles can penetrate into the sponge body and cause toxic effects (decreased spicule production) starting from concentrations of 0.005-0.01 mg/L. This is a relatively high concentration, unthinkable in normal water bodies. On the other hand, three months of experiment is negligible compared to the life span of a sponge. Further experiments should aim to elucidate the fate of nanoplastics within sponges, the balance between plastic consumption, excretion and degradation, possibly involving sponge symbionts.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Project # 122012600070-9.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2010. Novel fluorescent dyes based on oligopropylamines for the in vivo staining of eukaryotic unicellular algae. *Analytical Biochemistry* 407:44–51. DOI: [10.1016/j.ab.2010.07.032](https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.032)
- Annenkov V.V., Glyzina O.Yu., Verkhovzina O.N. et al. 2014. Fluorescent amines as a new tool for study of siliceous sponges. *Silicon* 6(4):227-231 DOI: [10.1007/s12633-014-9220-4](https://doi.org/10.1007/s12633-014-9220-4)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160:336–343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)
- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2021. Submicro- and nanoplastics: how much can be expected in water bodies? *Environmental Pollution* 278:116910, DOI: [10.1016/j.envpol.2021.116910](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116910)

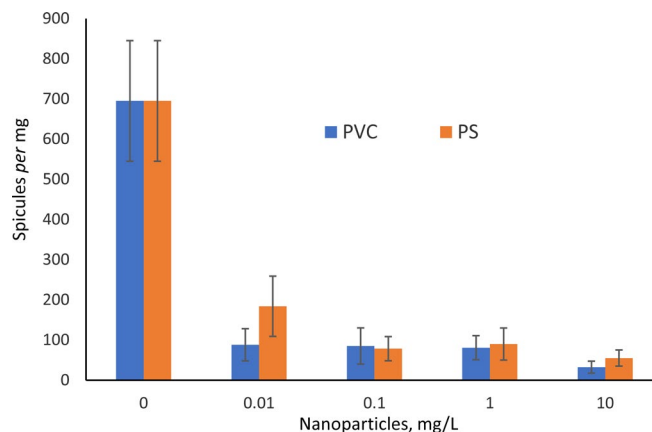


Fig.2. Dependence of the number of spicules *per* dry weight of primmorph (mg) on nanoplastic concentration. NBD-N2 dye (0.5 μ M) was added to the culture medium as a vital dye for new spicules. PVC particle size was 65 nm and PS – 200 nm. The cultivation time was one month.

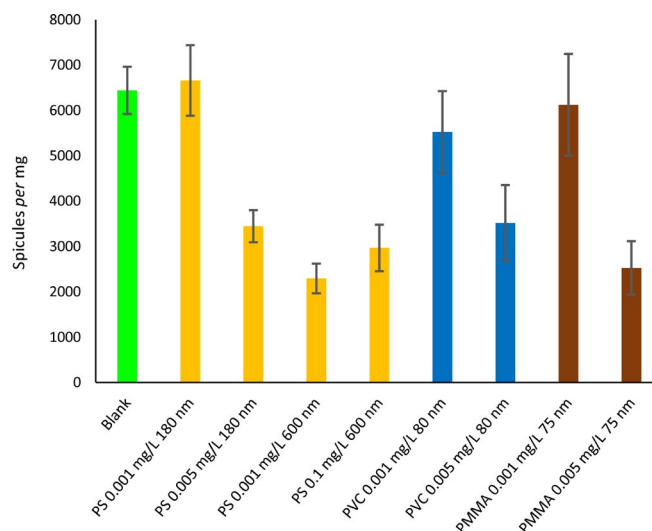


Fig.3. Dependence of the number of spicules *per* dry weight of primmorph (mg) on nanoplastic concentration. NBD-N2 dye (0.5 μ M) was added to the culture medium as a vital dye for new spicules. The cultivation time was three months.

Annenkov V.V., Pal'shin V.A., Annenkova N.V. et al. 2023. Uptake and Effects of Nanoplastics on the Dinoflagellate *Gymnodinium corollarium*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 42(5):1124-1133. DOI: [10.1002/etc.5604](https://doi.org/10.1002/etc.5604)

Baird C.A. 2016. Measuring the effects of microplastics on sponges. A thesis for the degree of Master of Science in Marine Biology. Wellington, Victoria University. <http://researcharchive.vuw.ac.nz/handle/10063/6749>

Custodio M.R., Prokic I., Steffen R. et al. 1998. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech. Ageing Dev.* 105, 45–59. DOI: [10.1016/S0047-6374\(98\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00078-5)

Danilovtseva E.N., Palshin V.A., Zelinskiy S.N. et al. 2019. Fluorescent dyes for the study of siliceous sponges. *Limnology and Freshwater Biology* 5:302-307. DOI: [10.31951/2658-3518-2019-A-5-302](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2019-A-5-302)

Funch P., Kealy R.A., Goldstein J. et al. 2023. Fate of microplastic captured in the marine demosponge *Halichondria panicea*. *Marine Pollution Bulletin* 194A:115403, DOI: [10.1016/j.marpolbul.2023.115403](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115403)

Leys S.P., Eerkes-Medrano D.I. 2006. Feeding in a Calcareous Sponge: Particle Uptake by Pseudopodia. *The Biological Bulletin* 211(2):157–171, DOI: [10.2307/4134590](https://doi.org/10.2307/4134590)

Manzanares D., Ceña V. 2020. Endocytosis: the nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. *Pharmaceutics* 12:371. DOI: [10.3390/pharmaceutics12040371](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371)

Suturin A.N., Paradina L.F., Epov V.N. et al. 2002. Development of a standard sample of composition of deep Baikalian water. *Chemistry for Sustainable Development* 10:473–482.

Turon X., Galera J., Uriz M. J. 1997. Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *The Journal of Experimental Zoology* 278(1): 22-36. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19970501\)278:1 <22::AID-JEZ3 > 3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19970501)278:1<22::AID-JEZ3>3.0.CO;2-8)

Willenz P., Van de Vyver G. 1982. Endocytosis of latex beads by the exopinacoderm in the fresh water sponge *Ephydatia fluviatilis*: an in vitro and in situ study in SEM and TEM. *Journal of Ultrastructure Research* 79(3):294–306, DOI: [10.1016/S0022-5320\(82\)90005-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(82)90005-3)

Влияние нанопластика на кремнистую губку *Lubomirskia baicalensis*

Даниловцева Е.Н., Пальшин В.А., Зелинский С.Н., Анненков В.В.*

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Изучено воздействие наночастиц пластика на байкальскую кремнистую губку *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), включая весь организм и примморфы. Для визуализации спикул, образовавшихся в ходе эксперимента, применялся витальный флуоресцентный краситель. Было установлено, что наночастицы полистирола, поливинилхлорида и полиметилметакрилата способны проникать в тело губки и вызывать токсические эффекты (снижение продукции спикул), начиная с концентраций 0,005-0,01 мг/л. Это относительно высокая концентрация, немислимая в обычных водоемах. С другой стороны, продолжительность эксперимента (три месяца) ничтожно мала по сравнению с продолжительностью жизни губки. Дальнейшие эксперименты должны быть направлены на выяснение судьбы нанопластика в губках, баланса между потреблением, выведением и деградацией пластика, возможно, с участием симбионтов.

Ключевые слова: кремнистая губка, примморфы, нанопластики, полистирол, поливинилхлорид, полиметилметакрилат

1. Введение

Загрязнение пластиком считается большой угрозой для человечества в этом веке. Нанопластик - наименее изученный компонент из-за большой сложности его определения в окружающей среде и живых организмах. Эти мелкие частицы (менее 500 нм) не видны при оптической микроскопии и могут быть плотно смешаны с различными органическими и неорганическими соединениями. Нанопластики, особенно частицы размером менее 200 нм, считаются очень опасными из-за их потенциальной способности проникать в живые клетки путем эндоцитоза (Manzanares and Ceña, 2020). Недавно мы оценили, сколько нанопластика может образоваться при механическом разрушении коммерческих пластмасс, таких как полистирол (ПС), поливинилхлорид (ПВХ) и полиметилметакрилат (ПММА) (Annenkov et al., 2021). Наночастицы составляют незначительную долю в этом процессе по сравнению с микропластиком. Конечно, микропластик в водоемах может распадаться на более мелкие частицы путем фото- и хемодеструкции, но те же факторы должны в большей степени разрушать наночастицы, поскольку мелкие частицы более активны в любых реакциях. Таким образом, по нашим оценкам, реальное количество нанопластика в водоемах во много раз меньше, чем 0,01 мг/л.

Поскольку изучать нанопластики в полевых условиях сложно, существует множество работ,

посвященных лабораторным экспериментам с коммерческими или специально синтезированными наночастицами. В исследовании гетеротрофных динофлагеллят *Gymnodinium corollarium* Sundström, Kremp et Daugbjerg, (Annenkov et al., 2023) мы обнаружили, что 0,01 мг/л нанопластика является нетоксичной концентрацией. Более того, эти организмы могут ассимилировать и разлагать наночастицы пластика. С другой стороны, фильтрующие организмы, такие как губки, могут накапливать значительные количества нанопластика даже при низких концентрациях в окружающей среде.

Работы по изучению влияния нанопластиков на губки немногочисленны. Недавно было установлено, что микропластик размером 2-10 μm выводится из тела губки за 1-2 часа (Funch et al., 2023). Частицы микропластика размером 1 μm в концентрации 1 мг/л оказались нетоксичными для губок умеренной зоны (*Tethya bergquistae* и *Crella incrustans*) (Baird, 2016). Наночастицы размером 100-500 нм могут проникать в губку (Willenz and Van de Vyver, 1982; Turon et al., 1997; Leys and Eerkes-Medrano, 2006), но это были краткосрочные эксперименты (не более 4 ч), и о состоянии губки под действием пластика было невозможно получить никакой информации.

Мы разработали несколько витальных флуоресцентных красителей, которые окрашивают растущие кремнистые спикулы (Annenkov et al.,

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: annenkov@lin.irk.ru, annenkov@yahoo.com (В.В. Анненков)

2017; Annenkov et al., 2019; Danilovtseva et al., 2019). Эти красители позволяют отслеживать рост спикул в губках и примморфах губок (3D-культурах клеток) и тем самым получать информацию о состоянии здоровья губки. В данной работе мы оценили влияние наночастиц пластика на байкальскую губку *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), включая весь организм и примморфы.

2. Материалы и методы

2.1. Образцы губок и выращивание примморфов

Эксперименты с образцами губок проводились в соответствии с методикой (Annenkov et al., 2014). Образцы *L. baicalensis* были собраны в районе поселка Большие Коты, в юго-западной части озера Байкал, на глубине 10 м. Образцы губок (длиной 4-5 см) выращивали в аквариумах объемом 3 л при температуре $3 \pm 1^\circ\text{C}$ в условиях воздушного барботажа с ежедневной сменой 2/3 воды. Для освещения аквариумов использовались люминесцентные лампы (цветовая температура 6500 К) с циклом свет/темнота 12 ч/12 ч.

Примморфы получали аналогично (Custodio et al., 1998). Вкратце, образцы губки измельчали в байкальской воде (3°C) на частицы размером $\approx 1-2$ мм. Частицы и воду переносили в конические пластиковые пробирки объемом 50 мл (соотношение губки и воды $\approx 1:20$) и осторожно встряхивали в течение 15 мин на ротационном шейкере. Затем суспензию фильтровали через нейлоновую сетку 100 мкм, полученные клетки собирали методом седиментации (1 ч, 3°C) и снова промывали байкальской водой. Суспензию клеток помещали в пластиковые контейнеры объемом 400 мл с 200 мл байкальской воды, содержащей 0,002 % ампициллина. Контейнеры содержались в тех же условиях, что и образцы губки при культивировании. Ежедневно в течение двух недель 75 % воды заменяли свежей водой, содержащей антибиотик. Через две недели полученные примморфы (диаметром 1 мм и более) переносили в новые контейнеры с водой и антибиотиком, а смену 75 % воды проводили еженедельно в течение всего эксперимента.

Добавки (наночастицы пластика, краситель) добавлялись при каждой смене воды.

2.2. Химические реагенты

Для культивирования губки использовали бутилированную байкальскую воду. Химический состав этой воды описан в (Suturin et al., 2002). Краситель NBD-N2 был получен согласно (Annenkov et al., 2010). Флуоресцентные наночастицы были синтезированы в соответствии с нашими предыдущими статьями (Annenkov et al., 2021; Annenkov et al., 2023). Другие химические вещества были приобретены в Sigma-Aldrich, Fisher или Acros Chemicals и использовались без дополнительной обработки.

2.3. Исследование примморфов и тканей губок.

Примморфы помещали на покровное стекло, разрезали на 2-4 части (в зависимости от размера приморфа), каждую часть переносили на отдельное покровное стекло, сплющивали стеклянным предметным стеклом и изучали с помощью эпифлуоресцентной микроскопии. В экспериментах по подсчёту количества спикул в единице сухого веса примморфа, использовали две предварительно взвешенные покровные пластинки. После подсчета спикул методом эпифлуоресцентной микроскопии образец высушивали над безводным CaCl_2 в течение двух недель и в вакууме до постоянного веса. Эксперименты по подсчёту проводили не менее чем в четырех повторностях. Образцы губки для микроскопии готовили, делая ≈ 1 мм срезы из вершины или середины тела губки.

Световая и флуоресцентная микроскопия проводилась на инвертированном микроскопе MOTIC AE-31T с ртутной лампой HBO 103 W/2 OSRAM. Для возбуждения зеленой и желтой эмиссии использовали свет 470 нм, а для синей 365 нм.

3. Результаты и обсуждение

Было проведено две серии экспериментов с губками. Первый краткосрочный эксперимент состоял из 8-дневного культивирования при чрезвычайно высоких концентрациях нанопластика (0,1 и 1 мг/л, Рис. 1). Наночастицы ПС и ПВХ проникали в тело губки при концентрации 1 мг/л с тенденцией к концентрации в кластеры размером 10-20

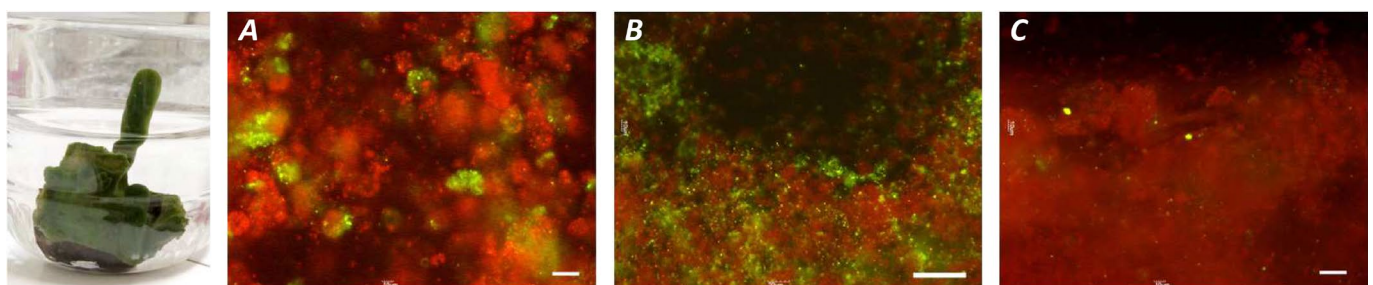


Рис.1. Губка *L. baicalensis* в аквариуме и флуоресцентные изображения срезов губки после 8 дней культивирования в присутствии нанопластиков. Красная флуоресценция - хлоропласты, зеленая - наночастицы пластика. А – частицы ПС 200 нм, В и С – частицы ПВХ 85 нм. Частицы окрашивали дибензилфлуоресцеином. Концентрация пластика составляла 1 (А и В) и 0,1 (С) мг/л. Масштабные линейки составляют 25 (А), 50 (В) и 75 (С) μm .

мкм, близкие к размеру клеток губки (Рис. 1А). В случае 0,1 мг/л были обнаружены только отдельные кластеры пластика (Рис. 1С). Во втором эксперименте в течение двух месяцев в культуральную среду добавляли 0,01 и 0,1 мг/л наночастиц ПС и ПВХ. Губки с наночастицами 0,01 мг/л выглядели здоровыми через два месяца, в то время как губки с 0,1 мг/л пластика частично побелели через месяц эксперимента и полностью разрушились через два месяца.

Следует отметить, что *L. baicalensis* - очень сложный организм для лабораторных экспериментов. Длительные эксперименты маловероятны, так как губка может погибнуть через 1-2 месяца культивирования без воздействия каких-либо вредных факторов. Кроме того, момент смерти губки сложно зафиксировать. Примморфы, 3D-культура самоорганизующихся клеток губки, являются хорошей моделью для долгосрочных экспериментов. Примморфы *L. baicalensis* могут жить в виде сферических структур размером 1-8 мм до девяти месяцев. В примморфах формируются спикулы, а гибель примморфа легко обнаружить по его разрушению.

Мы провели две серии экспериментов с примморфами *L. baicalensis*. Сначала (Рис. 2) добавляли наночастицы ПВХ и ПС в концентрации 0,01-10 мг/л. Флуоресцентный краситель NBD-N2 был добавлен для обнаружения спикул, образовавшихся в ходе эксперимента. Через месяц мы обнаружили более чем трехкратное снижение количества новых спикул в присутствии пластика в любой концентрации. Следующий эксперимент (Рис. 3) показывает отсутствие влияния нанопластика в концентрации 0,001 мг/л в течение трех месяцев. Субмикрометровые частицы PS размером 600 нм снижали образование спикул при концентрации 0,001 мг/л. Все три пластика были токсичны при концентрации 0,005 мг/л.

4. Выводы

Наши эксперименты показали, что наночастицы полистирола, поливинилхлорида и поли(метилметакрилата) могут проникать в тело губки и вызывать токсические эффекты (снижение продукции спикул), начиная с концентраций 0,005-0,01 мг/л. Это относительно высокая концентрация, немислимая в обычных водоемах. С другой стороны, три месяца эксперимента ничтожно малы по сравнению с продолжительностью жизни губки. Дальнейшие эксперименты должны быть направлены на выяснение судьбы нанопластика в губках, баланса между потреблением, выведением и деградацией пластика, возможно, с участием симбионтов.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 122012600070-9.

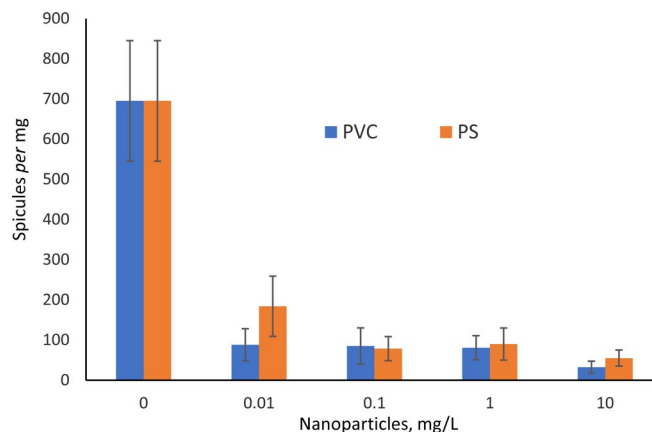


Рис.2. Зависимость количества спикул, приходящихся на 1 мг сухого веса примморфа, от концентрации нанопластика. В культуральную среду добавляли краситель NBD-N2 (0,5 μ M) в качестве витального красителя для новых спикул. Размер частиц ПВХ составлял 65 нм, а ПС - 200 нм. Время культивирования составляло три месяца.

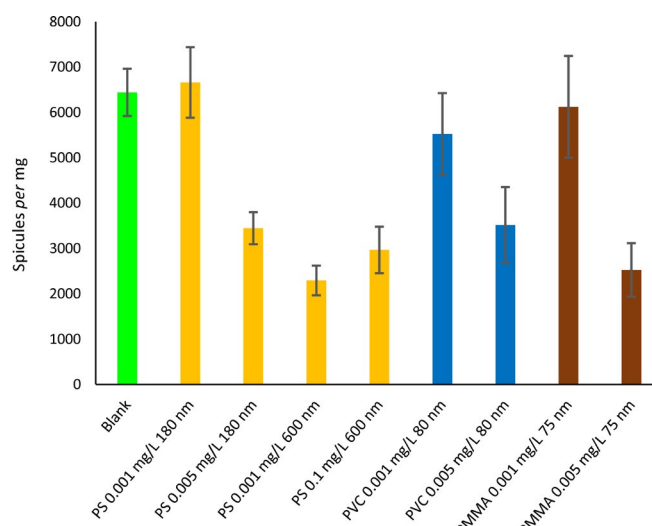


Рис.3. Зависимость количества спикул, приходящихся на 1 мг сухого веса примморфа, от концентрации нанопластика. В культуральную среду добавляли краситель NBD-N2 (0,5 μ M) в качестве витального красителя для новых спикул. Время культивирования составляло три месяца.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2010. Novel fluorescent dyes based on oligopropylamines for the in vivo staining of eukaryotic unicellular algae. *Analytical Biochemistry* 407:44–51. DOI: [10.1016/j.ab.2010.07.032](https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.032)
- Annenkov V.V., Glyzina O.Yu., Verkhovzina O.N. et al. 2014. Fluorescent amines as a new tool for study of siliceous sponges. *Silicon* 6(4):227-231 DOI: [10.1007/s12633-014-9220-4](https://doi.org/10.1007/s12633-014-9220-4)

Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A. et al. 2019. Coumarin based fluorescent dye for monitoring of siliceous structures in living organisms. *Dyes and Pigments* 160:336–343. DOI: [10.1016/j.dyepig.2018.08.020](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.08.020)

Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N. et al. 2021. Submicro- and nanoplastics: how much can be expected in water bodies? *Environmental Pollution* 278:116910, DOI: [10.1016/j.envpol.2021.116910](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116910)

Annenkov V.V., Pal'shin V.A., Annenkova N.V. et al. 2023. Uptake and Effects of Nanoplastics on the Dinoflagellate *Gymnodinium corollarium*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 42(5):1124-1133. DOI: [10.1002/etc.5604](https://doi.org/10.1002/etc.5604)

Baird C.A. 2016. Measuring the effects of microplastics on sponges. A thesis for the degree of Master of Science in Marine Biology. Wellington, Victoria University. <http://researcharchive.vuw.ac.nz/handle/10063/6749>

Custodio M.R., Prokic I., Steffen R. et al. 1998. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech. Ageing Dev.* 105, 45–59. DOI: [10.1016/S0047-6374\(98\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00078-5)

Danilovtseva E.N., Palshin V.A., Zelinskiy S.N. et al. 2019. Fluorescent dyes for the study of siliceous sponges. *Limnology and Freshwater Biology* 5:302-307. DOI: [10.31951/2658-3518-2019-A-5-302](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2019-A-5-302)

Funch P., Kealy R.A., Goldstein J. et al. 2023. Fate of microplastic captured in the marine demosponge *Halichondria panicea*. *Marine Pollution Bulletin* 194A:115403, DOI: [10.1016/j.marpolbul.2023.115403](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115403)

Leys S.P., Eerkes-Medrano D.I. 2006. Feeding in a Calcareous Sponge: Particle Uptake by Pseudopodia. *The Biological Bulletin* 211(2):157–171, DOI: [10.2307/4134590](https://doi.org/10.2307/4134590)

Manzanares D., Ceña V. 2020. Endocytosis: the nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. *Pharmaceutics* 12:371. DOI: [10.3390/pharmaceutics12040371](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371)

Suturin A.N., Paradina L.F., Epov V.N. et al. 2002. Development of a standard sample of composition of deep Baikalian water. *Chemistry for Sustainable Development* 10:473–482.

Turon X., Galera J., Uriz M. J. 1997. Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *The Journal of Experimental Zoology* 278(1): 22-36. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19970501\)278:1<22::AID-JEZ3>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19970501)278:1<22::AID-JEZ3>3.0.CO;2-8)

Willenz P., Van de Vyver G. 1982. Endocytosis of latex beads by the exopinacoderm in the fresh water sponge *Ephydatia fluviatilis*: an in vitro and in situ study in SEM and TEM. *Journal of Ultrastructure Research* 79(3):294–306, DOI: [10.1016/S0022-5320\(82\)90005-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(82)90005-3)