



УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

doi: 10.17586/2226-1494-2024-24-3-348-356

УДК 504.064

Применение ксантовых флуоресцентных красителей для обнаружения микропластика в почве и проведения фитотестов

Анастасия Олеговна Носова¹✉, Майя Валерьевна Успенская²

^{1,2} Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация

¹ aonosova@itmo.ru✉, <https://orcid.org/0009-0009-2014-5876>

² mv_uspenskaya@itmo.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2510-2639>

Аннотация

Введение. В работе рассмотрены вопросы применения ксантовых флуоресцентных красителей, доступных широкому кругу исследовательских лабораторий для обнаружения микропластика со средней длиной частиц 157 ± 59 мкм в почве и проведения фитотестов с использованием флуоресцентно-меченого микропластика.

Метод. При проведении исследования использовались почвы с содержанием гумуса $1,59 \pm 0,15$ % (П1) и $6,74 \pm 0,11$ % (П2), а также суспензионный поливинилхлорид (ООО «РусВинил», 157 ± 59 мкм, белого цвета). В целях изучения возможности избирательного окрашивания микропластика в присутствии почвенных частиц микропластики поливинилхлорида, почв П1 и П2, а также смеси почвы П1 и поливинилхлорида (5 % по массе) окрашивались родаминами С и Ж, флуоресцеином и эозином Н в изопропиловом спирте (концентрация красителя — 200 мг/л, температура — 100 °С, время окрашивания — 2 ч при постоянном перемешивании на магнитной мешалке) и промывались дистиллированной водой на бумажном фильтре. Для исследования химической структуры микропластиков поливинилхлорида до и после окрашивания применялась инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье нарушенного полного внутреннего отражения (спектрометр Tensor 37 (Bruker, Германия) с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения MIRacle Pike с кристаллом из ZnSe с алмазным напылением). Для определения возможности вымывания красителя из микропластиков поливинилхлорида после многократного промывания водой использовались спектрофотометрия и анализ микрофотографий с применением программы ImageJ. Для проведения лабораторного эксперимента по обнаружению микропластика в почве готовилась смесь почвы П1 и микропластиков поливинилхлорида (0,1 % по массе) и проводилось окрашивание родамином Ж. Для уменьшения количества минеральных частиц и концентрирования микропластиков поливинилхлорида использовалась техника разделения за счет разницы в плотности с помощью бинарного раствора NaCl и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Получены микрофотографии с использованием оптического микроскопа с дополнительным источником ультрафиолета ($\lambda = 365$ нм). Измерения площадей изображений проекций обнаруженных микропластиков, необходимых для расчета ориентировочной массы загрязнителя, производились с помощью ImageJ. Возможность применения флуоресцентно-меченых микропластиков поливинилхлорида для проведения фитотестов устанавливалась с помощью теста на проращивание семян в загрязненной почве и изучения проростков с использованием оптического микроскопа с дополнительным источником ультрафиолета. **Основные результаты.** Показано, что после окрашивания родаминами С и Ж флуоресценция наблюдается у микропластиков поливинилхлорида как отдельно, так и в смеси, так как частицы почв П1 и П2 аналогичных свойств не приобретают. В случае применения флуоресцеина и эозина Н микропластики поливинилхлорида и почва практически не флуоресцируют. Установлено, что окрашивание не влияет на химическую структуру поливинилхлорида. Красители не вымываются из микропластиков поливинилхлорида при многократном промывании водой. В лабораторном эксперименте показано, что возможно обнаружение и количественное определение микропластиков поливинилхлорида в почве в концентрации 0,1 % по массе с относительной погрешностью около 30 %. Возможно применение флуоресцентно-меченых родаминами С и Ж микропластиков поливинилхлорида при проведении фитотестов. **Обсуждение.** В настоящей работе впервые показана возможность избирательного окрашивания родаминами С и Ж микропластиков поливинилхлорида в смеси с почвой, их обнаружения по причине наблюдаемой флуоресценции и количественного определения в концентрации от 0,1 % по массе. Полученные результаты расширяют знания в области контроля микропластика в почве. Так как на сегодняшний день не существует стандартизированных методик по обнаружению данного загрязнителя, результаты могут найти применение при разработке новых методик. Флуоресцентно-меченые родаминами С и Ж микропластики поливинилхлорида планируется использовать при проведении фитотестов

© Носова А.О., Успенская М.В., 2024

в рамках экспериментов по гигиеническому обоснованию предельно допустимой концентрации загрязнителя в почве.

Ключевые слова

микропластик, ксантеновые красители, почва, микроскопия, флуоресценция, родамин С, родамин Ж, эозин Н, флуоресцеин, фитотесты

Ссылка для цитирования: Носова А.О., Успенская М.В. Применение ксантеновых флуоресцентных красителей для обнаружения микропластика в почве и проведения фитотестов // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2024. Т. 24, № 3. С. 348–356. doi: 10.17586/2226-1494-2024-24-3-348-356

The xanthene fluorescent dyes usage for the microplastics in soil detection and for phytotests

Anastasiia O. Nosova¹✉, Mayya V. Uspenskaya²

^{1,2} ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation

¹ aonosova@itmo.ru✉, <https://orcid.org/0009-0009-2014-5876>

² mv_uspenskaya@itmo.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2510-2639>

Abstract

The paper examines the xanthene fluorescent dyes questions available to a wide laboratories range in order to detect microplastics with an average particle length of $157 \pm 59 \mu\text{m}$ in soil samples and conduct phytotests using fluorescently labeled microplastics. For the research, soils with a humus content of $1.59 \pm 0.15 \%$ (P1) and $6.74 \pm 0.11 \%$ (P2) as well as suspension polyvinyl chloride (RusVinyl LLC, $157 \pm 59 \mu\text{m}$, white) were used. In order to study the possibility of selective staining of microplastics in the presence of soil particles, polyvinyl chloride microparticles, soil P1 and P2, as well as a mixture of soil P1 and polyvinyl chloride (5 % by weight) were stained with rhodamine B, rhodamine G, fluorescein and eosin Y in isopropyl alcohol (dye concentration — 200 mg/L, temperature — 100 °C, staining time — 2 hours with constant stirring on a magnetic stirrer) and washed with distilled water on a paper filter. To study the chemical polyvinyl chloride microparticles structure before and after staining attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy was used (spectrometer Tensor 37 (Bruker, Germany), attenuated total internal reflection MIRacle Pike attachment with a diamond-coated ZnSe crystal). Spectrophotometry and microphotograph analysis using ImageJ software were used to determine whether dye could be leached from polyvinyl chloride microparticles after repeated washing with water. To conduct the laboratory experiment to detect microplastics in soil a mixture of P1 soil and polyvinyl chloride microparticles (0.1 % by weight) was prepared and stained with rhodamine G. In order to reduce the amount of mineral particles and concentrate polyvinyl chloride microparticles, a separation technique was used due to the difference in density using binary solution of NaCl and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Microphotographs were obtained using an optical microscope with an additional ultraviolet source ($\lambda = 365 \text{ nm}$). Image areas measurements of detected microparticles projections, that are necessary for calculating the approximate mass of the pollutant, were carried out using ImageJ software. The possibility of using fluorescently labeled polyvinyl chloride microparticles for phytotests was established using the seed germination test in contaminated soil and studying seedlings using an optical microscope with an additional ultraviolet source. It was shown that after staining with rhodamine B and rhodamine G, fluorescence is observed in polyvinyl chloride microparticles both separately and in a mixture, since soil particles P1 and P2 do not acquire similar properties. When fluorescein and eosin were used, polyvinyl chloride microparticles and soil practically did not fluoresce. It has been established that coloring does not affect the polyvinyl chloride chemical structure. Dyes are not washed out of polyvinyl chloride microparticles after repeated washing with water. The laboratory experiment showed that it is possible to detect and quantitation polyvinyl chloride microparticles in soil at the 0.1 % concentration by weight with a relative error of about 30 %. It is possible to use fluorescently labeled polyvinyl chloride microparticles with rhodamine B and rhodamine G when conducting phytotests. This research demonstrates for the first time the possibility of selective staining of polyvinyl chloride microparticles with rhodamine B and rhodamine G in a mixture with soil due to the observed fluorescence and their detection in a concentration of 0.1 % by weight. The results obtained expand knowledge in the field of monitoring microplastics in soil and, since today there are no standardized methods for detecting this pollutant, it can be used in their development. Fluorescently labeled polyvinyl chloride microparticles with rhodamine B and rhodamine G are planned to be used in phytotests as part of experiments on the hygienic justification of the maximum permissible concentration of the pollutant in the soil.

Keywords

microplastic, xanthene dyes, soil, microscopy, fluorescence, rhodamine B, rhodamine G, eosin Y, fluorescein

For citation: Nosova A.O., Uspenskaya M.V. The xanthene fluorescent dyes usage for the microplastics in soil detection and for phytotests. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2024, vol. 24, no. 3, pp. 348–356 (in Russian). doi: 10.17586/2226-1494-2024-24-3-348-356

Введение

Более полутора веков прошло с момента получения первой пластмассы — паркезина. С тех пор благодаря своим свойствам пластмассовые материалы прочно во-

шли во все сферы жизни человека. Заметим, что широкое использование пластмассы в сочетании с отсутствием надлежащей ее переработки и утилизации привело к появлению нового загрязнителя — микропластика. Данный загрязнитель образуется, когда при попадании

в окружающую среду крупные пластмассовые объекты подвергаются непрерывным процессам фрагментации и деградации из-за воздействия солнечного света, ветра, воды, механического истирания и других факторов окружающей среды [1]. Микропластиком принято называть совокупность пластиковых частиц различного химического состава и размера от 1 мкм до 5 мм [2]. Первые исследования о микропластиковых частицах начали появляться в 1970-х годах, а сам термин «микропластик» был предложен в 2004 году морским биологом Ричардом Томпсоном [3, 4]. В настоящее время опубликовано большое количество исследований, результаты которых показывают негативное воздействие различных типов микропластика, в том числе и на характеристики почвы, почвенных животных, микробные сообщества и биогеохимические циклы [5]. Учитывая то, что почвы могут быть загрязнены намного сильнее, чем морские экосистемы, изучение вопросов, связанных с совершенствованием методов контроля, является актуальным, так как определение уровня содержания микропластика может быть одним из основных факторов для оценки экологического риска [5, 6].

Предмет исследования

Почва является сложной системой, так как состоит из минеральных частиц, органических веществ и различных химических компонентов. На данный момент не существует стандартизированных методик обнаружения микропластика в почве, однако исследователями предлагаются многообразные методы к решению данного вопроса. Например, предлагается применение оптической микроскопии, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), инфракрасной (ИК) спектроскопии с преобразованием Фурье и рамановской спектроскопии и термических методов анализа, таких как термогравиметрический анализ (ТГА), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), пиролиз-газовая хроматография — масс-спектрометрия, термическая экстракционно-десорбционная газовая хромато-масс-спектрометрия [6]. Большинство из перечисленных методов отнимают много времени, требуют высокой квалификации персонала и дорогостоящего оборудования, поэтому существует потребность в доступном широкому кругу исследовательских лабораторий методе [7]. К такому методу можно отнести визуальное обнаружение микропластика с применением оптического микроскопа, однако, если классифицировать микрочастицы как пластмассовые только по неестественной окраске или форме, высока вероятность ошибочной идентификации, особенно для микрочастиц размером менее 500 мкм [8, 9]. Для того чтобы повысить надежность получаемых результатов для объектов меньших размеров, возможно использование различных красителей, позволяющих более точно идентифицировать микропластик за счет избирательного окрашивания. Данный метод широко применим, однако есть вероятность получения ложноположительных результатов (окрашивание органических частиц почвы) [6]. Один из самых популярных красителей — жирорастворимый флуоресцентный

нильский красный, применение которого снижает вероятность ошибок [7]. Стоит отметить, что стоимость данного красителя крайне высока, поэтому актуальным является вопрос исследования применимости более доступных веществ. Ксантеновые флуоресцентные красители — органические люминофоры, типичными представителями которых являются гидроксиксантеновые (флуоресцеин, эозин Н) и аминоксантеновые (родамин С, родамин Ж) красители [10, 11]. Их стоимость значительно ниже в сравнении со стоимостью нильского красного. Окрашивание возможно производить путем диффузии красителя в условиях нагрева, при котором макромолекулярная цепь полимера ослабляется [12]. В работах [12–14] изучены разные варианты ксантеновых красителей, например изотиоционат флуоресцеина, родамин С. Работы [12, 13] посвящены разработкам технологий окрашивания микропластика, [14] — предварительному окрашиванию микрочастиц ПВХ для использования в биологических исследованиях. Гипотетически, возможно применение данных красителей для избирательного окрашивания, последующего обнаружения и количественного определения микропластика в образцах почвы. Однако такой вопрос не изучался. В связи с вышеизложенным, исследование возможности применения ксантеновых красителей для обнаружения микропластика менее 500 мкм в образце почвы вызывает интерес, так как полученные результаты могут расширить знания и возможности в области контроля микропластика в почве.

Также актуальной областью исследований является изучение механизмов взаимодействия растений и микропластика и возможности транслокации его в растения [15]. Известно, что крупные микрочастицы пластмассы не имеют возможности проникать в ткани растений, однако могут захватываться корневыми волосками [16]. Использование при проведении фитотестов флуоресцентно-меченых микрочастиц загрязнителя позволяет быстро обнаруживать и более наглядно визуализировать их локализацию [17]. Однако авторами не обнаружено исследований, в которых бы для проведения фитотестов использовался микропластик, меченый ксантеновыми красителями.

Цель настоящей работы — исследование возможности применения ксантеновых красителей (флуоресцеина, эозина Н, родамина С, родамина Ж) для избирательного окрашивания микропластика в почве без влияния на химическую структуру полимера, обнаружения загрязнителя за счет наблюдаемой флуоресценции и его количественного определения, а также подготовки флуоресцентно-меченых микрочастиц пластмассы для проведения фитотестов (на примере поливинилхлорида (ПВХ)).

Материалы и методы

Для исследования использовались два образца почвы с содержанием гумуса $1,59 \pm 0,15$ % (П1) и $6,74 \pm 0,11$ % (П2), суспензионный ПВХ белого цвета производства ООО «РусВинил» со средней длиной частиц 157 ± 59 мкм (установлено в результате измерений с помощью программы ImageJ и статистического

анализа) в качестве микропластика и красителя: флуоресцеин, эозин Н, родамины С и Ж.

С целью определения, возможно ли избирательное окрашивание микрочастиц ПВХ флуоресцентными красителями в образце почвы, процедура окрашивания четырьмя красителями выполнена отдельно для микропластика ПВХ, образцов чистой почвы П1 и П2, а также смеси почвы П1 и ПВХ (5 % по массе). Параметры окрашивания: краситель был растворен в изопропиловом спирте, концентрация красителя — 200 мг/л, температура — 100 °С, время окрашивания — 2 ч при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Далее образцы многократно промывались дистиллированной водой на фильтре (синяя лента) для вымывания остатков красителя и сушились при комнатной температуре. Затем образцы были изучены и получены микрофотографии с использованием оптического микроскопа STM6 (OLYMPUS, Япония) с дополнительным источником ультрафиолета (УФ) ($\lambda = 365$ нм).

Определено влияние процедуры окрашивания на химическую структуру ПВХ и получены ИК спектры с помощью ИК фурье-спектрометра Tensor 37 (Bruker, Германия) на приставке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) MIRacle Pike с кристаллом из ZnSe с алмазным напылением. ИК спектры регистрировались в диапазоне от 4000 до 600 см^{-1} с разрешением 2 см^{-1} и усреднением по 32 сканированиям.

При многократном промывании дистиллированной водой окрашенных микропластика ПВХ выполнено исследование возможности вымывания красителей. Проведено сравнение интенсивности полученных микрофотографий, используя УФ источник с помощью ImageJ, и измерен показатель «среднее значение серого» («mean grey value»), который представляет собой среднюю интенсивность пикселей в выделенной области [18]. Измерения проводились для 50 микропластика на каждой микрофотографии до и после промывания. Дополнительно проанализирован фильтрат с использованием спектрофотометра UNICO 2100 (UNITED PRODUCTS & INSTRUMENTS, США).

Проведен лабораторный эксперимент по обнаружению микропластика в почве и его количественное определение. Был подготовлен образец почвы (1 г), загрязненной микропластиком ПВХ в концентрации 0,1 % по массе (0,001 г) (для концентраций выше возможно использование менее трудозатратных термических методов анализа [19]) и подвергнут окрашиванию. Для уменьшения количества минеральных частиц и концентрирования микропластика ПВХ использована техника сепарации и разделения за счет разницы в плотности частиц с помощью бинарного раствора NaCl и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($\rho = 1,55$ г/см³). Для этого был добавлен раствор к образцам и полученный состав тщательно перемешан. Микропластики, всплывшие на поверхность, были перенесены на фильтр, промыты дистиллированной водой и высушены. Данная процедура повторена трижды. Далее фильтры и остатки почвы были изучены с использованием микроскопа STM6 с дополнительным УФ источником ($\lambda = 365$ нм) при увеличениях 5, 10 или 20 $\times$. Получены микрофотографии всех флуоресцирующих микропластика. Для того чтобы рассчитать

их общую ориентировочную массу, необходимо иметь информацию об объемах микропластика и плотности материала. Однако только объект сферической формы может быть охарактеризован одним числовым значением — диаметром, в то время как микропластики ПВХ, примененные в данном исследовании, не имели идеальной сферической формы, поэтому использовать их длину для расчета приблизительного объема, ориентировочной массовой концентрации и оценки погрешности не представлялось возможным [20]. В таких случаях одним из приемов для дальнейших расчетов является замена реальной частицы на эквивалентную, правильной формы и определение ее эквивалентного диаметра.

$$d_n = \sqrt{\frac{4S_n}{\pi}}. \quad (1)$$

По этой причине для каждой обнаруженной микропластика с помощью ImageJ определялась площадь проекции и рассчитывался эквивалентный средний проектированный диаметр d_n согласно (1), представляющий собой диаметр круга, площадь которого равна площади изображения проекции частицы S_n [20]. После этого рассчитывались ориентировочные объем каждой микропластика (по формуле объема шара [21]) и масса [20] (с использованием плотности 1,4 г/см³, как среднего показателя плотности ПВХ). В итоге, суммируя полученные значения масс, получали общую ориентировочную массу микропластика ПВХ.

В целях определения возможности использования флуоресцентно-меченых микропластика ПВХ проведены фитотесты семян горчицы белой (*Sinapis alba*), которые были помещены в увлажненную почву, загрязненную предварительно окрашенными микропластиком, для проращивания. На четвертый день проростки были извлечены и тщательно промыты в дистиллированной воде и исследованы с использованием микроскопа STM6 с дополнительным УФ источником ($\lambda = 365$ нм).

Экспериментальные результаты

После предварительного окрашивания красителями (флуоресцеина, эозина Н, родамина С, родамина Ж) микропластика ПВХ, почвы и их смеси, были получены микрофотографии (рис. 1) с использованием УФ источника (время экспозиции 200 мс).

Микропластики ПВХ были успешно окрашены родаминами С и Ж и их цвет изменился на ярко-розовый и оранжевый. При воздействии на них УФ излучения проявилась заметная флуоресценция оранжевого и желтого цвета. Минимальный размер флуоресцирующих микропластика составил около 15 мкм. Частицы почвы П1, для которых была проведена аналогичная процедура окрашивания, не меняли цвет и флуоресцирующих объектов замечено не было. В смеси с частицами почвы микропластики ПВХ селективно окрасились и стали заметны и отличимы под УФ.

Микропластики, окрашенные флуоресцеином и эозином Н, заметной флуоресценции не проявили, однако визуально несколько отличались. Низкую интенсивность флуоресценции ПВХ исследователи наблюдали

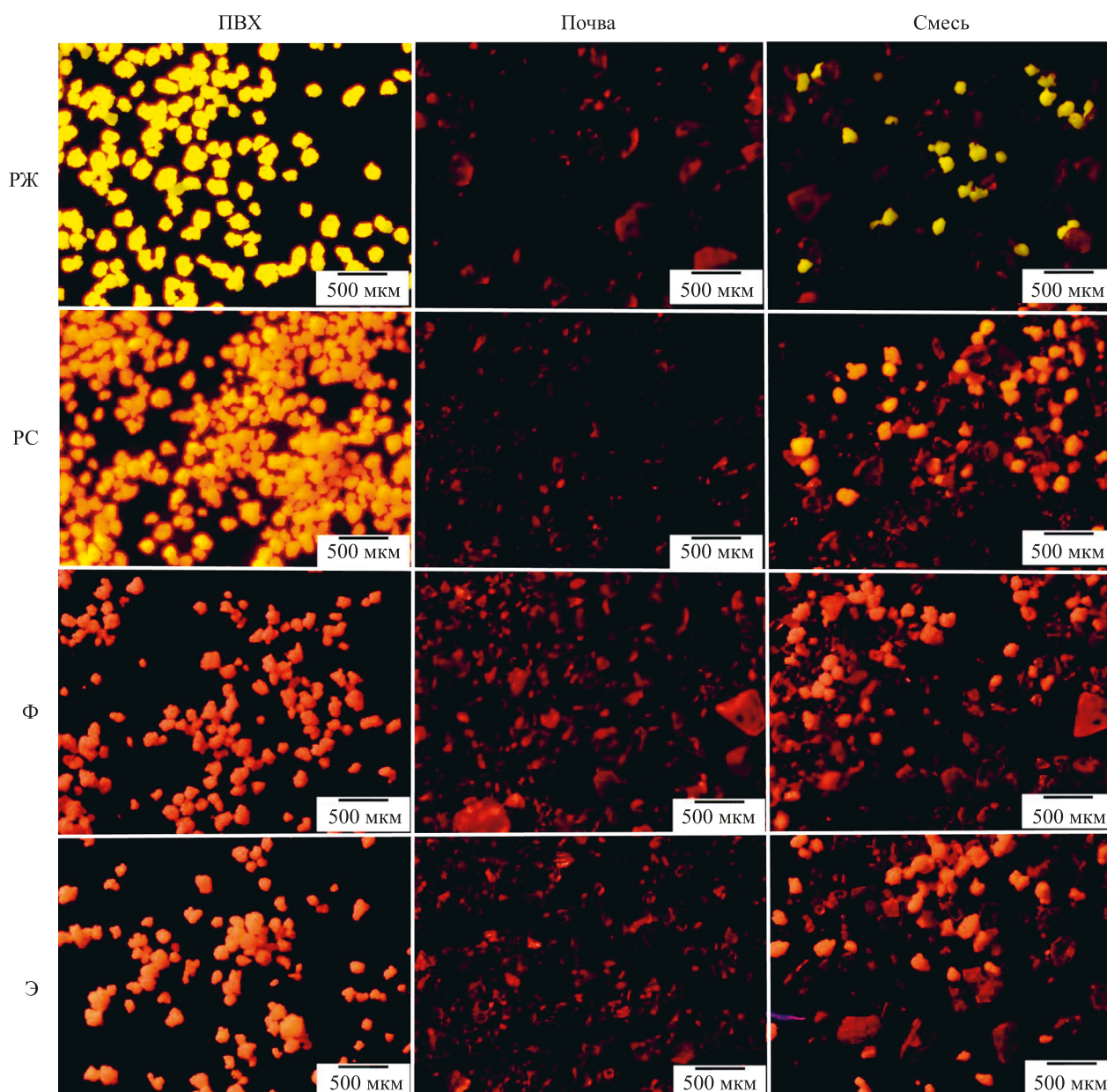


Рис. 1. Микрофотографии микрочастиц поливинилхлорида, почвы с содержанием гумуса $1,59 \pm 0,15$ % и их смеси, окрашенных различными красителями (РЖ — родамин Ж, РС — родамин С, Ф — флуоресцеин, Э — эозин Н) под источником ультрафиолета, время экспозиции 200 мс

Fig. 1. Microphotographs of polyvinyl chloride microparticles, soil with a humus content of 1.59 ± 0.15 % and their mixture, stained with various dyes (РЖ — rhodamine G, РС — rhodamine C, Ф — fluorescein, Э — eosin Y), under an ultraviolet source, exposure time 200 ms

и для другого производного флуоресцеина — красителя FITC (флуоресцеин 5(6)-изотиоцианат) [11].

Также процедура окрашивания была проведена для образца почвы П2 с более высоким содержанием гумуса для того, чтобы определить, будут ли окрашиваться и флуоресцировать органические непластмассовые частицы почвы, тем самым влияя на получаемые результаты. В итоге наблюдалась аналогичная П1 картина: в окрашенных образцах флуоресцирующих объектов замечено не было.

В практике обнаружения микропластика в случае необходимости точно идентифицировать тип пластмассы часто используется ИК фурье-спектроскопия, в том

числе в комбинации с флуоресцентными красителями. По этой причине важно, чтобы при окрашивании образцов химическая структура материала не подвергалась сильным изменениям [22]. Применив приставку НПВО были получены ИК спектры неокрашенных и окрашенных микрочастиц ПВХ (рис. 2).

Отметим, что при использовании метода ИК фурье-спектроскопии с приставкой НПВО, основанного на многократном отражении ИК луча на границе раздела двух фаз — кристалла НПВО и исследуемого образца, и регистрации его интенсивности на выходе из кристалла, получим ИК спектры НПВО в относительных единицах: $\text{НПВО} = AB \times X/1000$, где X — длина

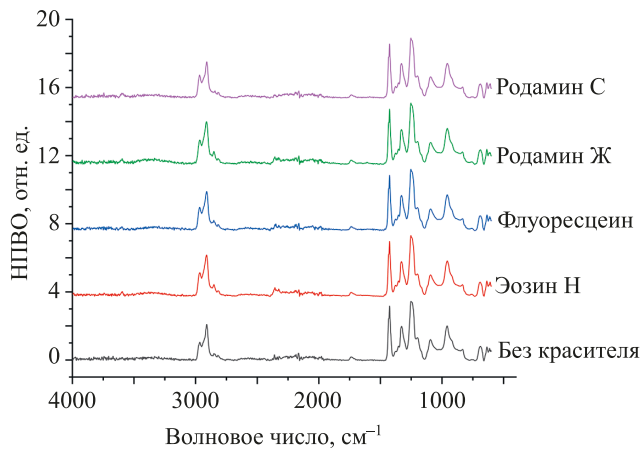


Рис. 2. Инфракрасные спектры неокрашенных и окрашенных микрочастиц поливинилхлорида
Fig. 2. Infrared spectra of unstained and stained polyvinyl chloride microparticles

волны; $AB = \log(TR)$ — поглощение, TR — пропускание [23, 24].

После окрашивания все характерные полосы поглощения ПВХ сохраняются. Можно предположить, что красители не связываются с полимерами ковалентно и процедура окрашивания существенно не влияет на химическую структуру ПВХ, что позволяет при необходимости идентифицировать тип материала. Полученные данные согласовываются с уже известными результатами в отношении других красителей [25].

Так как по результатам использования флуоресцеина и эозина Н визуальная флуоресценция не наблюдалась, возможность вымывания красителя была проверена для микрочастиц ПВХ, окрашенных родаминами Ж и С. Показатель «среднее значение серого» микрочастиц, окрашенных родамином Ж до промывания, составил $141,9 \pm 1,7$, после — $141,0 \pm 1,5$, родамином С — $143,7 \pm 0,9$ и $142,0 \pm 0,8$. Показатели оптической плотности фильтратов (используемые длины волн — 530 нм (родамин Ж), 600 нм (родамин С)) в сравнении с чистой дистиллированной водой не изменились. Полученные данные позволяют высказать предположение о том, что при многократном промывании водой краситель не вымывается из микрочастиц и окрашивание устойчиво.

Для проведения эксперимента по обнаружению микрочастиц ПВХ в почве, в качестве красителя был выбран родамин Ж, как наиболее удобный для визуального наблюдения микрочастиц под УФ источником. Пример микрофотографии части фильтра с обнаруженной микрочастицей показан на рис. 3. Выполнен анализ фильтра (Ф1), на котором промывался окрашенный образец, фильтра (Ф2), на который переносились отделенные по плотности микрочастицы, и часть образца, которая при разделении осталась на дне стакана (О). После проведения измерений в ImageJ рассчитана ориентировочная масса микрочастиц ПВХ, результаты расчета которой представлены в таблице.

Учитывая, что при подготовке образца к 1 г почвы было добавлено 0,1 % (0,001 г) микрочастиц ПВХ по

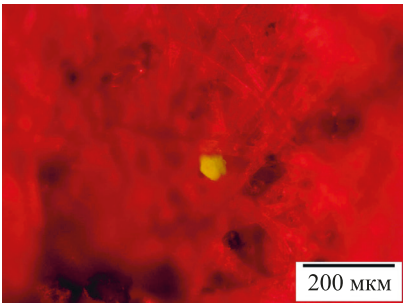


Рис. 3. Микрочастица поливинилхлорида из окрашенного родамином Ж образца на фильтре (время экспозиции 200 мс)
Fig. 3. Polyvinyl chloride microparticle from the rhodamine G-stained sample on a filter (exposure time 200 ms)

массе, относительная погрешность составила около 30 %, что, возможно, обусловлено несколькими факторами. Во-первых, вероятны неточности при ручном выделении границ объектов в ImageJ для определения площади проекции, поэтому в перспективе актуальна разработка метода автоматизированного определения границ микрочастиц на микрофотографии и расчета их площади при минимальном участии исследователя. Это позволит сделать метод обнаружения более точным и менее трудозатратным. Во-вторых, в реальности частицы не имеют идеально плоских поверхностей, так как на них имеются и впадины, и возвышения, что сложно учесть при обработке изображений и расчетах.

Также родамины С и Ж были использованы для окрашивания микрочастиц ПВХ и проведения фитотеста на прорастивание семян горчицы белой. По результатам микроскопии с дополнительным УФ источником получены микрофотографии микрочастиц ПВХ, прикрепившихся к корням проростков с помощью развивающихся на корнях волосков (рис. 4). Использование при проведении фитотестов флуоресцентно-меченого микропластика определенного цвета позволило быстрее определить местоположение микрочастиц без необходимости последующего подтверждения типа материала. При этом допустимо применять как родамин С, так и родамин Ж для предварительной подготовки микрочастиц, и это возможно использовать, к примеру, при постановке экспериментов с различными типами пластмассы.

Таблица. Результаты определения ориентировочной массы микрочастиц поливинилхлорида в лабораторном эксперименте

Table. Results of determining the approximate mass of polyvinyl chloride microparticles in a laboratory experiment

Номер	Образец	Количество микрочастиц	Рассчитанная масса, г
1	Ф1	7	0,00006
2	Ф2	561	0,00118
3	О	8	0,00020
Итого			0,00144

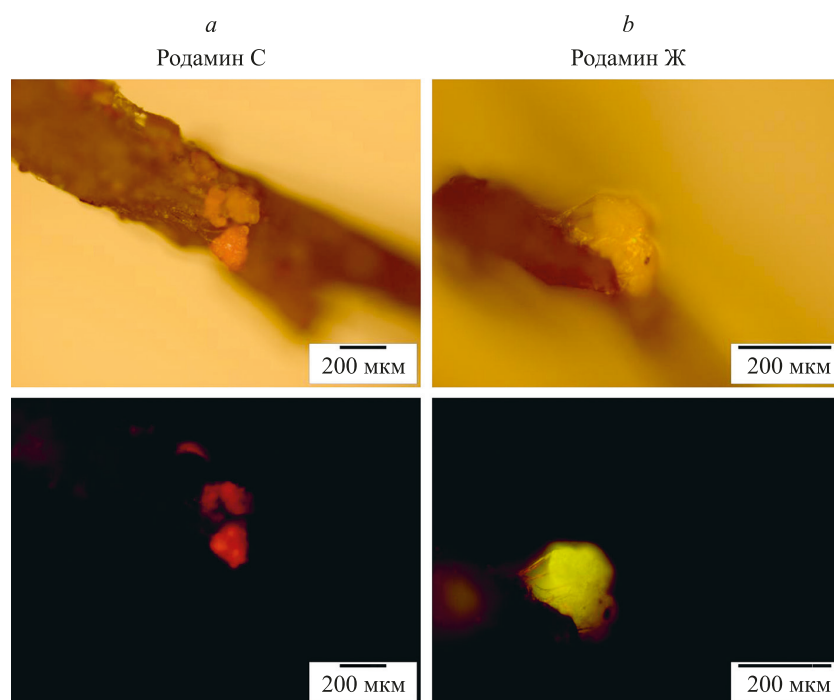


Рис. 4. Обнаруженные по результатам фитотеста микрочастицы поливинилхлорида, окрашенные родаминами С (а) и Ж (b), прикрепившиеся к корням проростка горчицы белой (в светлом поле — верхний ряд, под источником ультрафиолета — нижний ряд, время экспозиции 200 мс)

Fig. 4. Polyvinyl chloride microparticles, stained with rhodamine B (a) and rhodamine G (b), found according to the results of the phytotest, attached to the roots of a white mustard seedling (in the bright field — top row, under an ultraviolet source — bottom row, exposure time 200 ms)

Закключение

В настоящей работе выполнено исследование возможности применения ксантовых флуоресцентных красителей для избирательного окрашивания микропластика в почве, его обнаружения и количественного определения, а также подготовки флуоресцентно-меченых микрочастиц пластмассы для проведения фитотестов (на примере поливинилхлорида). Впервые показана возможность избирательного окрашивания родаминами С и Ж микрочастиц поливинилхлорида со средней длиной частиц 157 ± 59 мкм в смеси с почвой и их обнаружения в концентрации от 0,1 % по массе с относительной погрешностью 30 % по причине наблюдаемой флуоресценции. Установлено, что красители не вымываются из микрочастиц при многократном промывании водой. Окрашивание не влияет на химическую структуру материала, что позволяет в дальнейшем, при необходимости, идентифицировать тип пластмассы. Показано, что в целях быстрого поиска и визуализации

при проведении фитотестов возможно использование микрочастиц поливинилхлорида, окрашенных родаминами С и Ж. Полученные результаты расширяют знания в области контроля микропластика в почве и, так как на сегодняшний день стандартизированных методик по обнаружению данного загрязнителя не существует, могут найти применение при их разработке. Флуоресцентно-меченые родаминами С и Ж микрочастицы поливинилхлорида планируется использовать при проведении фитотестов в рамках экспериментов по гигиеническому обоснованию предельно допустимой концентрации загрязнителя в почве. В перспективе, актуально исследование возможности обнаружения цветных и черных микрочастиц различного типа пластмассы с использованием окрашивания данными флуоресцентными красителями, а также разработка метода автоматизированного анализа изображений для обнаружения микрочастиц и измерения их параметров в целях уменьшения трудоемкости и погрешности.

Литература

1. Murphy F., Ewins C., Carbonnier F., Quinn B. Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment // *Environmental Science & Technology*. 2016. V. 50. N 11. P. 5800–5808. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05416>
2. Christian A.E., Köper I. Microplastics in biosolids: A review of ecological implications and methods for identification, enumeration, and characterization // *Science of The Total Environment*. 2023. V. 864. P. 161083. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161083>

References

1. Murphy F., Ewins C., Carbonnier F., Quinn B. Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology*, 2016, vol. 50, no. 11, pp. 5800–5808. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05416>
2. Christian A.E., Köper I. Microplastics in biosolids: A review of ecological implications and methods for identification, enumeration, and characterization. *Science of The Total Environment*, 2023, vol. 864, pp. 161083. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161083>

3. Carpenter E.J., Smith K.L. Plastics on the Sargasso Sea surface // *Science*, 1972, V. 175, N 4027. P. 1240–1241. <https://doi.org/10.1126/science.175.4027.1240>
4. Thompson R.C., Olsen Y., Mitchell R.P., Davis A., Rowland S.J., John A.W., McConigle D., Russell A.E. Lost at sea: where is all the plastic? // *Science*, 2004, V. 304, N 5672. P. 838. <https://doi.org/10.1126/science.1094559>
5. He D., Luo Y., Lu S., Liu M., Song Y., Lei L. Microplastics in soils: Analytical methods, pollution characteristics and ecological risks // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, V. 109, P. 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.006>
6. Zhang Z., Zhao S., Chen L., Duan C., Zhang X., Fang L. A review of microplastics in soil: Occurrence, analytical methods, combined contamination and risks // *Environmental Pollution*, 2022, V. 306, P. 119374. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119374>
7. Sturm M.T., Horn H., Schuhen K. The potential of fluorescent dyes—comparative study of Nile red and three derivatives for the detection of microplastics // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, V. 413, N 4, P. 1059–1071. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03066-w>
8. Löder M.G., Gerdt G. Methodology used for the detection and identification of microplastics—a critical appraisal // *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, Cham, 2015, P. 201–227. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_8
9. Perez C.N., Carré F., Hoarau-Belkhir A., Joris A., Leonards P.E.G., Lamoree M.H. Innovations in analytical methods to assess the occurrence of microplastics in soil // *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, V. 10, N 3, P. 107421. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107421>
10. Красовицкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры / 2-е изд., перераб. М.: Химия, 1984, 336 с.
11. Степанов Б.И. Введение в химию и технологию органических красителей: учеб. для вузов / 3-е изд., перераб. и доп. М.: Химия, 1984, 592 с.
12. Lv L., Qu J., Yu Z., Chen D., Zhou C., Hong P., Li C. A simple method for detecting and quantifying microplastics utilizing fluorescent dyes - Safranin T, fluorescein isophosphate, Nile red based on thermal expansion and contraction property // *Environmental Pollution*, 2019, V. 255, Part 2, P. 113283. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113283>
13. Tong H., Jiang Q., Zhong X., Hu X. Rhodamine B dye staining for visualizing microplastics in laboratory-based studies // *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, V. 28, N 4, P. 4209–4215. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10801-4>
14. Le Quoc P., Fokina M.I., Martynova D.M., Olekhovich R.O., Uspenskaya M.V. Method of manufacturing and staining microplastics for using in the biological experiments // *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, V. 29, N 44, P. 67450–67455. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22776-5>
15. Azeem I., Adeel M., Ahmad M.A., Shakoore N., Jianguo G.D., Azeem K., Ishfaq M., Shakoore A., Ayaz M., Xu M., Rui Y. Uptake and accumulation of nano/microplastics in plants: a critical review // *Nanomaterials*, 2021, V. 11, N 11, P. 2935. <https://doi.org/10.3390/nano11112935>
16. Li T., Wang Y., Jiao M., Zhao Z., Li R., Qin C. Distinct microplastics abundance variation in root-associated sediments revealed the underestimation of mangrove microplastics pollution // *Science of the Total Environment*, 2023, V. 899, P. 165611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165611>
17. Li L., Luo Y., Peijnenburg W.J., Li R., Yang J., Zhou Q. Confocal measurement of microplastics uptake by plants // *MethodsX*, 2020, V. 7, P. 100750. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.023>
18. Моргун А.В., Хилажева Е.Д., Бойцова Е.Б. Использование пакета программного комплекса «ImageJ / FIJI» для обработки изображений: учеб. пособие для аспирантов. Красноярск: тип. КРАСГМУ, 2018, 72 с.
19. Носова А.О., Варфоломеева А.Е., Успенская М.В., Олехнович Р.О. Возможности применения методов термического анализа для обнаружения ПВХ-микропластика в почве // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии*, 2023, № 5(361), С. 99–109. <https://doi.org/10.33979/2073-7408-2023-361-5-99-109>
20. Гаврилова Н.Н., Назаров В.В., Яровая О.В. Микроскопические методы определения размеров частиц дисперсных материалов: учеб. пособие. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2012, 56 с.
21. Сергеев М.Н. Расчет объема бесконечномерной сферы // *Академическая публицистика*, 2021, № 7, С. 28–33.
3. Carpenter E.J., Smith K.L. Plastics on the Sargasso Sea surface. *Science*, 1972, vol. 175, no. 4027, pp. 1240–1241. <https://doi.org/10.1126/science.175.4027.1240>
4. Thompson R.C., Olsen Y., Mitchell R.P., Davis A., Rowland S.J., John A.W., McConigle D., Russell A.E. Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, 2004, vol. 304, no. 5672, pp. 838. <https://doi.org/10.1126/science.1094559>
5. He D., Luo Y., Lu S., Liu M., Song Y., Lei L. Microplastics in soils: Analytical methods, pollution characteristics and ecological risks. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, vol. 109, pp. 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.006>
6. Zhang Z., Zhao S., Chen L., Duan C., Zhang X., Fang L. A review of microplastics in soil: Occurrence, analytical methods, combined contamination and risks. *Environmental Pollution*, 2022, vol. 306, pp. 119374. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119374>
7. Sturm M.T., Horn H., Schuhen K. The potential of fluorescent dyes—comparative study of Nile red and three derivatives for the detection of microplastics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, vol. 413, no. 4, pp. 1059–1071. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03066-w>
8. Löder M.G., Gerdt G. Methodology used for the detection and identification of microplastics—a critical appraisal. *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, Cham, 2015, pp. 201–227. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_8
9. Perez C.N., Carré F., Hoarau-Belkhir A., Joris A., Leonards P.E.G., Lamoree M.H. Innovations in analytical methods to assess the occurrence of microplastics in soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, vol. 10, no. 3, pp. 107421. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107421>
10. Krasovitskii B.M., Bolotin B.M. *Organic Luminescent Materials*. 2nd ed. Moscow, Himija Publ., 1984, 336 p. (in Russian)
11. Stepanov B.I. *Introduction to the Chemistry and Technology of the Organic Dyes*. 3rd ed. Moscow, Himija Publ., 1984, 592 p. (in Russian)
12. Lv L., Qu J., Yu Z., Chen D., Zhou C., Hong P., Li C. A simple method for detecting and quantifying microplastics utilizing fluorescent dyes — Safranin T, fluorescein isophosphate, Nile red based on thermal expansion and contraction property. *Environmental Pollution*, 2019, vol. 255, part 2, pp. 113283. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113283>
13. Tong H., Jiang Q., Zhong X., Hu X. Rhodamine B dye staining for visualizing microplastics in laboratory-based studies. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, vol. 28, no. 4, pp. 4209–4215. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10801-4>
14. Le Quoc P., Fokina M.I., Martynova D.M., Olekhovich R.O., Uspenskaya M.V. Method of manufacturing and staining microplastics for using in the biological experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, vol. 29, no. 44, pp. 67450–67455. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22776-5>
15. Azeem I., Adeel M., Ahmad M.A., Shakoore N., Jianguo G.D., Azeem K., Ishfaq M., Shakoore A., Ayaz M., Xu M., Rui Y. Uptake and accumulation of nano/microplastics in plants: a critical review. *Nanomaterials*, 2021, vol. 11, no. 11, pp. 2935. <https://doi.org/10.3390/nano11112935>
16. Li T., Wang Y., Jiao M., Zhao Z., Li R., Qin C. Distinct microplastics abundance variation in root-associated sediments revealed the underestimation of mangrove microplastics pollution. *Science of the Total Environment*, 2023, vol. 899, pp. 165611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165611>
17. Li L., Luo Y., Peijnenburg W.J., Li R., Yang J., Zhou Q. Confocal measurement of microplastics uptake by plants. *MethodsX*, 2020, vol. 7, pp. 100750. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.023>
18. Morgun A.V., Khilazheva E.D., Boitcova E.B. *Using the ImageJ / FIJI Software Package for Image Processing*. Krasnoyarsk, KrasSMU Publ., 2018, 72 p. (in Russian)
19. Nosova A.O., Varfolomeeva A.E., Uspenskaya M.V., Olekhovich R.O. The possibilities of applying thermal analysis methods to detect pvc microplastics in soil. *Fundamental and Applied Problems of Technics and technology*, 2023, no. 5(361), pp. 99–109. (in Russian). <https://doi.org/10.33979/2073-7408-2023-361-5-99-109>
20. Gavrilova N.N., Nazarov V.V., Iarovaia O.V. *Microscopic Methods for Determining Particle Sizes of Dispersed Materials*. Moscow, D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, 2012, 56 p. (in Russian)
21. Sergeev M.N. Calculating the volume of an infinite dimensional sphere. *Akademicheskaja publicistika*, 2021, no. 7, pp. 28–33. (in Russian)

22. Liu S., Shang E., Liu J., Wang Y., Bolan N., Kirkham M.B., Li Y. What have we known so far for fluorescence staining and quantification of microplastics: a tutorial review // *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2022. V. 16. N 1. P. 8. <https://doi.org/10.1007/s11783-021-1442-2>
23. Нечипоренко А.П., Нечипоренко У.Ю., Ситникова В.Е. Фурье-спектроскопия в исследовании плазмы крови с диабетом второго типа // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2021. Т. 21. № 1. С. 52–64. <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2021-21-1-52-64>
24. Усольцев Д.А., Ситникова В.Е., Носенко Т.Н., Олехнович Р.О., Успенская М.В. Сравнение методик расчета вторичной структуры белков на основе деконволюции инфракрасных спектров // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2019. Т. 19. № 4. С. 586–593. <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2019-19-4-586-593>
25. Gao Z., Wontor K., Cizdziel J.V. Labeling microplastics with fluorescent dyes for detection, recovery, and degradation experiments // *Molecules*. 2022. V. 27. N 21. P. 7415. <https://doi.org/10.3390/molecules27217415>
22. Liu S., Shang E., Liu J., Wang Y., Bolan N., Kirkham M.B., Li Y. What have we known so far for fluorescence staining and quantification of microplastics: a tutorial review. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2022, vol. 16, no. 1, pp. 8. <https://doi.org/10.1007/s11783-021-1442-2>
23. Nechiporenko A.P., Nechiporenko U.Yu., Sitnikova V.E. Fourier spectroscopy in blood plasma study with type two diabetes. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2021, vol. 21, no. 1, pp. 52–64. (in Russian). <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2021-21-1-52-64>
24. Usoltsev D.A., Sitnikova V.E., Nosenko T.N., Olekhovich R.O., Uspenskaya M.V. Comparison of protein secondary structure calculation methods based on infrared spectra deconvolution. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2019, vol. 19, no. 4, pp. 586–593. (in Russian). <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2019-19-4-586-593>
25. Gao Z., Wontor K., Cizdziel J.V. Labeling microplastics with fluorescent dyes for detection, recovery, and degradation experiments. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 21, pp. 7415. <https://doi.org/10.3390/molecules27217415>

Авторы

Носова Анастасия Олеговна — аспирант, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация, [sc 58567719500](https://orcid.org/0009-0009-2014-5876), <https://orcid.org/0009-0009-2014-5876>, aonosova@itmo.ru

Успенская Майя Валерьевна — доктор технических наук, профессор, профессор, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация, [sc 6602189454](https://orcid.org/0000-0003-2510-2639), <https://orcid.org/0000-0003-2510-2639>, mv_uspenskaya@itmo.ru

Authors

Anastasiia O. Nosova — PhD Student, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation, [sc 58567719500](https://orcid.org/0009-0009-2014-5876), <https://orcid.org/0009-0009-2014-5876>, aonosova@itmo.ru

Mayya V. Uspenskaya — D.Sc., Full Professor, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation, [sc 6602189454](https://orcid.org/0000-0003-2510-2639), <https://orcid.org/0000-0003-2510-2639>, mv_uspenskaya@itmo.ru

Статья поступила в редакцию 10.03.2024

Одобрена после рецензирования 26.03.2024

Принята к печати 16.05.2024

Received 10.03.2024

Approved after reviewing 26.03.2024

Accepted 16.05.2024



Работа доступна по лицензии
Creative Commons
«Attribution-NonCommercial»