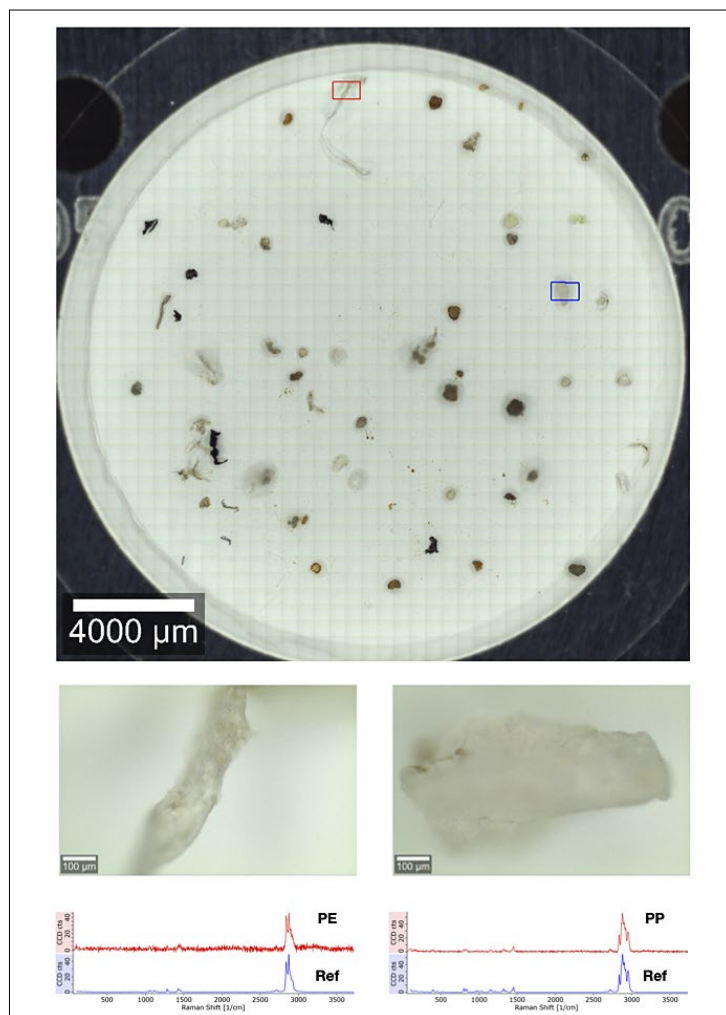


Utveckling av analysmetoder för mikroplast i miljöprover för forskning och miljöövervakning

Martin Hassellöv, Karin Mattsson,
Josef Brandt, Juliana Aristeia De Lima,
Tim Wilkinson

RAPPORT 7093 | JUNI 2023



Utveckling av analysmetoder för mikroplast i miljöprover för forskning och miljöövervakning

av Martin Hassellöv, Karin Mattsson, Josef Brandt,
Juliana Aristeia De Lima och Tim Wilkinson

Institutionen för marina vetenskaper, Göteborgs universitet

Beställningar

Ordertel: 08-505 933 40

E-post: natur@cm.se

Postadress: Arkitektkopia AB, Box 110 93, 161 11 Bromma

Internet: www.naturvardsverket.se/publikationer

Naturvårdsverket

Tel: 010-698 10 00

E-post: registrator@naturvardsverket.se

Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm

Internet: www.naturvardsverket.se

ISBN 978-91-620-7093-9

ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2023

Tryck: Arkitektkopia AB, Bromma 2023

Omslagsfoto: Karin Mattsson



Förord

Denna rapport med titeln: *Utveckling av analysmetoder för mikroplast i miljöprover för forskning och miljöövervakning* presenterar resultaten av ett av fem beviljade projekt inom utlysningen Mikroplaster från 2018. Forskningsresultaten från denna utlysning syftar till att öka kunskapen om mikroplaster och hur åtgärder kan bidra till att reducera mikroplastspridningen.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag till stöd för Naturvårdsverkets och Havs- och vattenmyndighetens kunskapsbehov.

Rapporten är författad av Martin Hassellöv, Karin Mattsson, Josef Brandt, Juliana Aristeia De Lima och Tim Wilkinson på Göteborgs universitet.

Författarna ansvarar för rapportens innehåll.

Stockholm, december 2022

Maria Ohlman
Avdelningschef för Hållbarhetsavdelningen

Preface

This report entitled: *Utveckling av analysmetoder för mikroplast i miljöprover för forskning och miljöövervakning* presents the results of one of five funded projects within the call Microplastics from 2018. The research results from this call aim to increase knowledge about microplastics and how measures can help reduce their spreading.

The project has been funded with funds from the Swedish Environmental Protection Agency's environmental research grant to support the Swedish Environmental Protection Agency's and the Swedish Agency for Marine and Water Management's knowledge needs.

This report is written by Martin Hassellöv, Karin Mattsson, Josef Brandt, Juliana Aristeia De Lima, and Tim Wilkinson at the University of Gothenburg.

The authors are responsible for the content of the report.

Stockholm, December 2022

Maria Ohlman
Department head
Sustainability Department

Innehåll

Förord	3
Preface	4
Sammanfattning	6
Summary	7
1. Bakgrund	8
2. Syfte och tillvägagångssätt	9
3. Metodik	10
4. Resultat	16
5. Fallstudier	28
6. Slutsatser och rekommendationer	35
7. Källhänvisning	36
8. Publikationer	39

Sammanfattning

För att bättre förstå omfattning och miljöpåverkan av mikroplast samt kunna ta beslut om lämpliga åtgärder och uppföljning, är det av yttersta vikt att det finns tillförlitliga mätmetoder. Det har lyfts fram som prioriterade områden för vidare forskning och utveckling under lång tid och även om stora framsteg har gjorts är det fortfarande ett viktigt område i internationella forskningsagendor.

För att en mätmetod ska anses tillförlitlig bör syftet ta ett helhetsperspektiv längs hela den analytiska kedjan från provtagning, upparbetning, instrumentell analytisk bestämning, definitioner och rapportering. Jämförbarhet eller harmonisering mellan metoder är viktigt liksom att metoden kan valideras och visa att syftet kan uppfyllas med metoden.

När det gäller mikroplastanalys så är det många olika polymerer i ett stort storleksområde (minst tre tiopotenser), som ska hanteras av samma mätprincip. Det är en stor utmaning i sig och för miljöövervakning finns även önskemål att metoden ska vara enkel, robust och kostnadseffektiv. Detta perspektiv har i projektet sammanvägts med forskningens behov av så heltäckande information som möjligt.

För miljöövervakningsbehov har en mätmetod baserad på en ny kortvågsinfraröd hyperspektralkamera utvecklats, med goda preliminära resultat. Metoden kan skilja mikroplast från naturliga partiklar samt i viss mån urskilja olika polymerer från varandra. Nästa steg blir att integrera kameran i ett motoriserat mikroskop.

För forskningsbehov har flera olika metoder tagits fram. Inledningsvis har ett nytt nano-platinabelagt filter utvecklats. Sen har infraröd absorptionsspektroskopi (FTIR) utvecklats med avseende på mjukvarukontroll av mikroskop samt bildupptagning och dataanalys med en öppen källkodsmjukvara. Den kan anses vara en mogen analysteknik ner till 10 μm för de flesta polymerer.

För mindre partikelstorlekar har fokus legat på vidareutveckling av Raman-spektroskopi, vilket även har utprovats i flera fallstudier för partiklar ner till nanoplastområdet ($> 0,5 \mu\text{m}$ i det här fallet).

För vissa specialfall, till exempel båtbottnfärgpartiklar eller däckslitagepartiklar, har det visat sig att varken FTIR eller Raman är särskilt effektiva identifieringsmetoder, men att en kombination av ljus- och svepelektronmikroskopi i korrelativ modalitet kunnat identifiera partiklarna.

Provupparbetning är en viktig del för både miljöövervakning och forskning av mikroplastanalys i komplexa prover som sediment, havsvattenbiota, och här har optimerats protokoll för nedbrytning av organiskt material och även apparatur och metod för extraktion av mikroplast från sediment efter nedbrytning av organiskt material.

Summary

In order to better understand the extent and environmental impact of microplastics and enable better decisions and follow up of appropriate measures, it is of utmost importance to have reliable measurement methods available. It has been emphasized as priority research areas for a long time, and although great progress has been made it is still a prioritized area in international research agendas.

For a measurement method to be considered reliable the purpose should be considered holistically along the entire analytical chain from sampling, preparation, instrumental analytical determination, definitions and reporting. Comparability and harmonization between methods is important and that the method can be validated to show that it is fit for purpose.

When it comes to microplastics analysis, then there are many different polymers that spans a large size range (at least three orders of magnitude), that should be covered by the same measurement principle. That is a big challenge and for environmental monitoring there is also a need for it to be simple, robust, and cost effective. These perspectives have been addressed in the project, together with the needs from research of as comprehensive method information as possible.

For environmental monitoring needs a measurement method with a new short wave infrared hyperspectral camera have been developed with good preliminary results. The method can distinguish microplastics from natural particles and to some extent different polymers from each other. The next step will be to integrate the camera into a motorized microscope.

For research needs several different methods have been developed. Initially a new nano-platinumcoated filter membrane has been developed. Then an infrared absorptionspektroskopi (FTIR) method was developed with respect to software control of microscope image acquisition and data analysis with open source code software. It could be considered a mature analysis method down to 10 μm for most polymers.

For smaller particle sizes focus has been on further development of Raman spectroscopy, which also has been applied in several case studies for particles down to nanoplastics range ($> 0.5 \mu\text{m}$ in this case).

For some special cases, e.g. boat paint or tire and road wear particles, neither FTIR or Raman have been particularly efficient identification method, but with a combination of light and scanning electron microscopy in correlative mode it has been possible to identify the particles.

Sample preparation is an essential part of both monitoring and research of microplastics in complex samples such as sediment, seawater, and biota. Here protocols have been optimized for degradation of organic matter and apparatus and method for extraction of microplastics from sediment after treatment.

1. Bakgrund

Det rapporteras om förekomst av mikroplast-partiklar (MP) i alla delar av miljön globalt, från alla delar av hav och sediment, inklusive havsis och glaciärer, och ökande antal terrestra miljöer samt upptag i nästan alla fyra av djurlivet. Länkar till källor och spridningsvägar för vissa speciella fall, till exempel syntetiska textilfibrer, har påvisats, men det saknas flera viktiga komponenter av källspårning. För det första finns det en diskrepans i massbalansen mellan hur mycket plastmaterial som kan uppskattas ha tillförts havet och hur mycket som kan redovisas genom mätningar. Den mest sannolika sänkan har föreslagits som marina sediment, men det finns mycket färre mätningar i sediment. Det finns därför ett behov av att bättre förstå transport och spridning av MP från land till hav, och hur olika egenskaper hos MP (till exempel flytkraft och interaktioner med biofilmer och sedimentande organiskt material) kommer att inverka på transportfenomen. För att utveckla förståelsen behövs fler utförliga studier om förekomst, och för det behövs adekvata analytiska metoder för att identifiera och kvantifiera den stora diversiteten av sammansättningar av MP som är vanligt förekommande (Wang and Wang 2018). Mikroplastmätningar har traditionellt delats in i två spår av tillvägagångssätt, där det första framtaget främst av biologer, till exempel med expertis inom taxonomi, förlitar sig på visuell mikroskopi, medan det andra framtaget främst av kemister lägger fram övertygande argument för varför spektroskopiska analyser är mer tillförlitliga (Song m fl, 2015, Silva m fl, 2018, Shim m fl, 2017, Primke m fl, 2017).

Vår erfarenhet av att arbeta med båda metoderna är emellertid att ingen enskild metod är perfekt och komplett, och medan visuell mikroskopi ensam är benägen för subjektiva tolkningar och underskattningar framför allt av vita och halvtransparenta partiklar, icke-fibrösa former, falska negativ (missade MP) och osäkerheter som ökar med minskande storlekar. Å andra sidan ger avbildningsbaserade spektroskopitekniker, till exempel avbildning, omfattande kompositionsdata, men för miljövittrade plaster är det ofta inte möjligt att matcha referensspektra (falska negativ) eller är felaktiga (falska positiva fel) och kräver därmed också subjektiva användarinterventioner (Silva m fl, 2018, Primpke m fl, 2018, Renner m fl, 2017). Dessutom samlar kartläggning av spektroskopimetoder som hittills publicerats inte värdefulla visuella egenskaper om form, färg och så vidare. För maximal informationsinhämtning föreslås därför analytiska arbetsflöden som både använder visuella egenskaper och kemiska sammansättningsdata, där så är möjligt.

Men det är inte bara den instrumentella analysen som är viktigt utan hela analyskedjan från provtagning till datarapportering (Wang och Wang 2018, Stock m fl, 2018). Dessutom är det viktigt att metodiken är jämförbar mellan studier och miljöövervakningsprogram internationellt. I förlängningen blir standardisering viktig, men i den tidiga utvecklingen, harmonisering av viktiga komponenter i metoderna (Mai m fl, 2018, Primpke m fl, 2020, Yan m fl, 2021).

2. Syfte och tillvägagångssätt

Det finns ett stort behov av tillförlitliga analysmetoder för mikroplast i miljöprover både i miljöövervakning och forskning. Exempelvis har EUs medlemsländer ett rapporteringskrav enligt Marine Strategy Framework Directive Deskriptor 10 (Havsmiljödirektivet) om förekomst och trender av mikrokräp på havsytan samt i sediment samt om möjligt relateras till tillförselkällor. Även inom andra miljö- och hälsojurisdiktioner (till exempel vattendirektivet) kan mikroplastövervakning komma att utpekas mer explicit även om det ännu ej är lika utvecklat som i den marina domänen. Syftet med detta projekt var således att utveckla kompletta analysmetoder som svarar mot båda dessa behov. Inom både forskning och miljöövervakning finns behov av liknande provtagnings- och provupparbetningsmetoder, framför allt inom de prioriterade matriserna (sediment, ytvatten och biota). För miljöövervakning finns dock ett tydligare fokus på kostnadseffektiva, snabbare analysmetoder, vilka ska vara robusta och gärna med lite enklare handhavande, med något lägre krav på minsta partikelstorlek, och urskiljande av olika typer av polymerer. För forskningsändamål, vill man dock kunna analysera mindre partikelstorlekar, och erhålla så mycket information som möjligt från partiklarnas sammansättning och dess fysikalkemiska egenskaper, med eftergiften att analyserna kan ta mer tid i anspråk och kräva längre upplärning och större total analyskostnad.

Tillvägagångssättet för miljövakningsmetodik har varit att basera metodiken på en ny kortvågig infrarött hyperspektralkamerasensor för integrering i ljusmikroskopi. Tillvägagångssättet för forskningsmetodik har varit att utveckla korrelativ mikroskopi för ljusmikroskopi, FTIR, Ramanmikrospektroskopi, samt svepelektronmikroskopi med röntgenspektroskopi. Labutvecklingar har valts att valideras i fallstudier i miljön när så har varit möjligt.

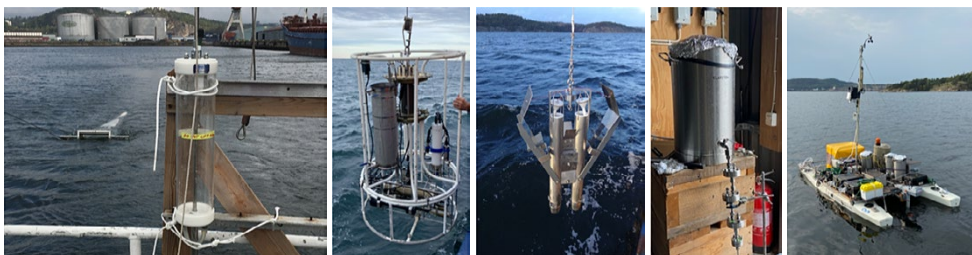
3. Metodik

Metoder i hela analyskedjan

I varje applikation (se fallstudier) har hela analyskedjan inklusive provtagning, provupparbetning, filtrering, instrumentell analys, samt databehandling och rapportering tagits hänsyn till, och optimerats för tillämpningen. Här beskrivs de utvecklade metodikerna, medan de uppnådda metodutvecklingsresultaten beskrivs i nästa sektion.

Provtagning

Provtagningsmetodik har utvecklats eller optimerats med avseende på flera viktiga miljöprovtyper; havsvatten (både ytvatten, pelagiskt och djuphavet), sediment (från utsjösediment till urbana), samt dricksvatten (Figur 1).



Figur 1. Från vänster visas exempel på mikroplastprovtagning av havsytan och övre pelagialen med mantatrål och enkel Ruttner-hämtare för mindre partiklar i kustnära vatten; därefter en specialbyggd 20 L Niskin-provtagare i rostfritt stål för medelstora volymer av små mikroplast i djupa pelagialen; i mitten en Gemini sedimentprovtagare och åt höger det 30 L provtagningskärlet i rostfritt stål som använts för att samla upp prov från havsytans mikroskikt s.k. "sea surface microlayer" provtagning med specialbyggd katamaran (längst till höger; från JPI Oceans projektet FACTS).

Provupparbetning

Det har kunnat sakligt påvisas betydelsen av förbehandling för utbytet av mikroplast från sedimentprover med högdensitetsvätska, och det framgick även att den kemiska förbehandlingen med NaClO+KOH var effektivare än den enzymatiska behandlingen (Mattsson m fl, 2022).

För analys av däckpartiklar har det visat sig effektivt att komplettera den oxidativa kemiska behandling med en mineralupplösande syrabehandling, samt för vissa prover en cellulosanedbrytande kemisk behandling (pågående arbete).

Analysfilter som utvecklats

De flesta analysmetoder kräver ett partikelprov från en lösning till en mikroskopering på en yta, vilket är mest lämpat med en filtrering på ett membranfilter som är kompatibelt med analysmetoden. Varje analysmetod har sina krav på ett filter, såsom att det ej ska interferera med avbildningen eller med signalen från partiklarna, samt om metoden är känslig för fokus och topografi, ska vara ett plant filter.

De kriterier som vi har identifierat som viktigast är: tillgänglighet i många olika porstorlekar, tillförlitliga porstorlekar, olika diametrar, flathet, ej absorbera eller fluorescera ljus, gärna reflektera ljus, antingen vara mycket lågt eller mycket högt atomnummer, elektriskt ledande.

Det fanns inget kommersiellt tillgängligt filter som uppfyllde många av dessa krav, men det fanns exempel på förångning och deponering av metallfilmer på polykarbonatmembran, och därför utvecklades en metod för att kunna utföra detta i stor skala tillsammans med Chalmers Nanofabriceringslab. Den metall som fanns bäst uppfylla alla kriterier var platina, och en metod optimerades och sedermera använts i en rad olika applikationer.

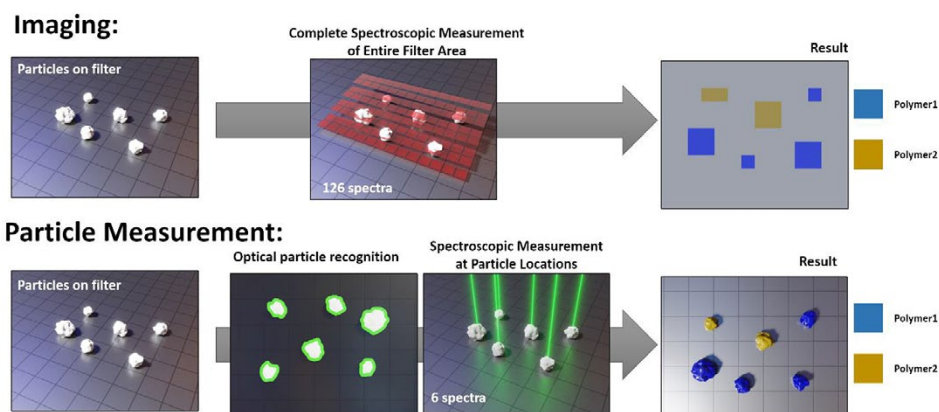
Analysinstrumentering

Ljuskopiering

Ljuskopiering är den metod som mest använts för analys av mikroplast, men det finns många olika modaliteter inom ljuskopiering samt grad av automatisering. Här har valts ett ljuskopieringsmikroskop (Zeiss AxioImager M2) för påfallande ljus med full automatiseringsmöjlighet, stor bredd av objektiv, ljusfälts samt mörkfälts belysning, differential interferenskontrast möjlighet. Den främsta kapaciteten hos detta mikroskop är den korrelativa möjligheten, att kalibrera provhållaren för överflyttning till andra Zeiss mikroskop, till exempel svepelektronmikroskop.

FTIR

För att kunna kemiskt identifiera om en partikel är plast och vilken polymer den består av kan olika typer av vibrationspektroskopi användas, där FTIR – fourier transform infraröd absorptionsspektroskopi – är vanligast, men även Raman eller nära infrarött kan användas (Kappler m fl, 2016). För FTIR inbyggt i mikroskop, finns det några olika typer av instrumentering som framför allt för mikroplastanalys skiljer ut sig avseende vilket detektor-sensor som använts, men även om hur mjukvaran anpassats för partikelanalys. För instrument med (de dyra) fokalplansdetektorchipen, kan man avbilda varje pixel över provet i rimlig tid men då i relativt små ytor av provet (ca 10 x 10 mm). För instrument som prioriterat andra prestanda och lägre kostnad så används istället tillvägagångssättet att först finna var partiklarna är med ljuskopieringsmikroskopisk avbildning och därefter mäta endast där det finns partiklar och inte i varje pixel oavsett om det är partiklar eller ej. I det andra fallet krävs det att partiklarna är utspridda så de ej vidrör varandra, vilket även är önskvärt men ej lika kritiskt för avbildnings-FTIR (Figur 2).



Figur 2. Här visas de två huvudprinciperna för mikroplast analys genom vibrationsmikrospektroskopi, där den ena är avbildningsbaserad (ett spektra från varje upplösningapixel), och den andra är partikel-baserad, där en optisk avbildning och partikelidentifiering styr den spektroskopiska analysen endast till där det finns partiklar. Från Brandt m fl, 2020).

Här har för FTIR använts en Thermo Nicolet iN10 MX för partikelbaserad analys, med både tillverkarens partikelmjukvara ParticleWizard samt den egentillverkade GEPARD 2.0 med anpassning för Thermo Nicolet.

Ramanmikrospektroskopi

Ramanmikroskopi är den näst vanligaste metoden för att identifiera mikroplast, som bygger på att en laser-excitering i ett konfokalt mikroskop där Raman-ljusspridning ger information om bindningarna i polymeren. Informationen från Raman skiljer sig något från FTIR då den är mer känslig för bindningarna i huvudkedjorna och mindre i de funktionella sidogrupperna. Raman är känsligt för interferens från fluorescerande material, samt påverkas tydligt av förekomst av pigment i plasten.

Raman är mindre känsligt för rester av vatten än FTIR, och har på grund av konfokaliteten betydligt bättre möjlighet att detektera mindre partiklar än FTIR (ca 0,5 μm jämfört med ca 10 μm).

Här har använts ett automatiserat WITEC Alpha 300 R, som både kan fungera som enskilt mikroskop samt som integrerat inuti svepelektronmikroskopet (RISE).

Svepelektronmikroskopi

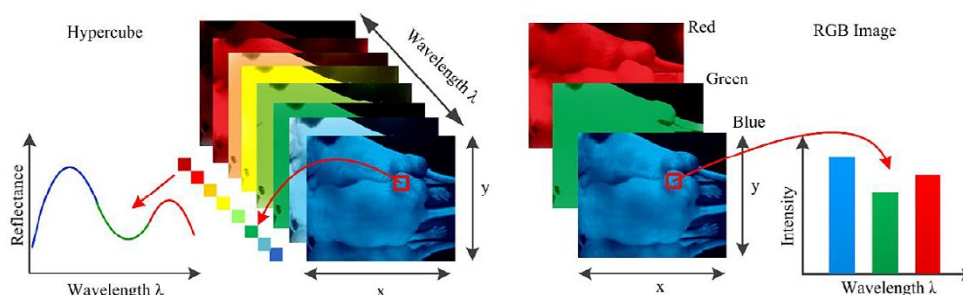
Medan ljusmikroskopi kan påvisa mycket av partiklarnas egenskaper som inte bara är direkt fysiska som storlek och form utan även hur de ser ut, färg och andra visuella karaktäristika, så är upplösningen för konventionell ljusmikroskopi begränsad till ca 1 μm . Därför är det av värde att kunna erhålla högre spatial upplösning för mer detaljerad avbildning framför allt för mindre partikelstorlekar, genom svepelektronmikroskopi. Svepelektronmikroskopi kan utföras med ett flertal olika typer av elektron och röntgenfoton-detektorer, sekundär-elektron, bakåtspridnings-elektron-detektor, samt energidispersiv röntgenspektroskopi.

Här användes Zeiss Gemini SEM 300, som även har korrelativ kapacitet för att kombinera med Zeiss ljusmikroskop då man inte kan se färg och visuella karaktäristika i SEM. Dessutom har detta Gemini SEM RISE kapacitet, alltså Raman inuti SEM, i kombination med WITEC.

Hyperspektralkamera-mikroskopi

Både FTIR och Raman är utmärkta mikrospektroskopiska metoder för att kunna identifiera mikroplast. Det är emellertid kostsamma investeringar (flera miljoner kronor), och tidskrävande analyser. Det finns framför allt för miljöövervakning ett önskemål om enkla och kostnadseffektiva analysmetoder med möjlighet att snabb-screena prover för att åtminstone utröna om specifika partiklar är plast eller ej. För miljöövervakning kan man tänka sig att krav på att identifiera specifika polymerer inte är absolut nödvändigt och heller ej att kunna identifiera de minsta partikelstorlekarna.

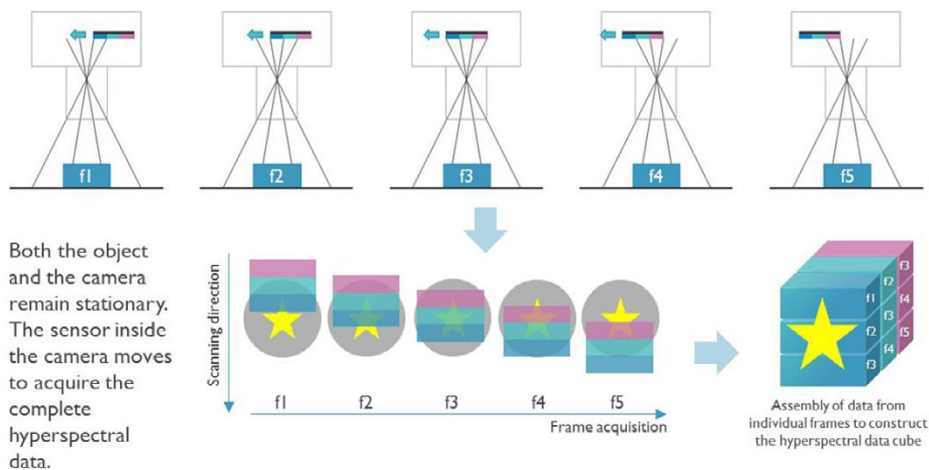
För detta syfte är hyperspektral nära infraröd vibrationsresonansspektroskopi av särskilt intresse vilket har visat god potential (Karlsson m fl, 2016). Hyperspektral avbildning innebär att man erhåller spektral-spatial information över provet, på liknande sätt som görs inom fjärranalys av jordytan. I Figur 3 exemplifieras en hyperspektral avbildning och jämförs med en konventionell RGB (röd, grön, blå) sensor.



Figur 3. Generell beskrivning av en hyperspektral avbildning jämfört med en RGB-avbildning (från Schwarte 2022).

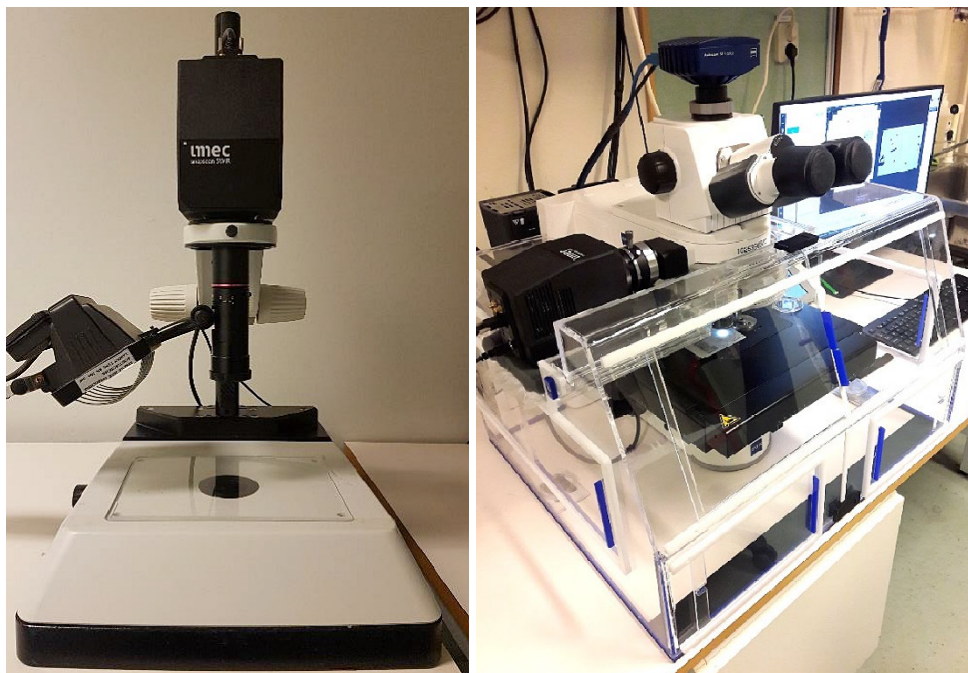
Karlsson m fl (2016) visades att våglängdsområdet var viktigt, och att minst kunna arbeta över 1000 nm var kritiskt för att erhålla tillräcklig kemisk information. I området mellan 1000 nm och 1700 nm återfinns flera vibrationsövertoner och kombinations vibrationer för C-H bindningar, samt absorbansband för -CH₃ och -CH₂- och aromatiska strukturer i polystyren. De kameror som där användes, med mätprincipen av push broom eller line scan, (samma som används inom fjärranalys eller i plast sortering inom återvinningsindustrin), då provet eller kameran förflyttas i respektive relation, uppvisade dock begränsningar för den minsta mätbara storlek. Detta berodde på att det löpande band som provet stegades fram under kameran ledde till små vibrationer vilket ledde till att partiklarna rörde på sig och minskade storleksupplösningen.

Därför har här utvalts att arbetas med en helt ny sensortyp (Snapscan) för kortvågig infrarött ljus (SWIR) 1000–1700 nm, från IMEC. Principen för Snapscan är att både provet och kameran är stilla, men att sensorn rör sig inuti kameran (Figur 4).



Figur 4. Mätprincipen för en Snapscan kamera, där sensor chipet rör sig inuti kameran och därmed erhålles både spektral och spatial information i en form av hyperspektral datakub (från Schwarte 2022).

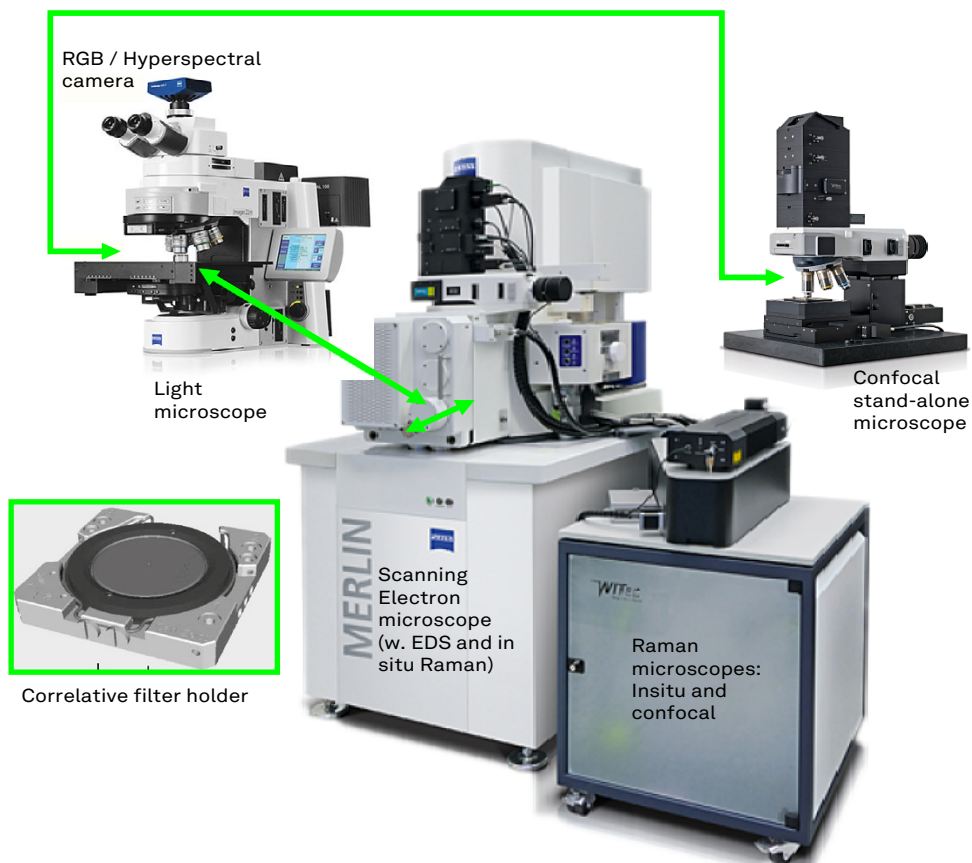
IMEC Snapscan sensorn kommer i en kamera som både kan monteras till ett konventionellt ljusmikroskop samt med lämpligt objektiv som en fristående avbildningstation (Figur 5).



Figur 5. Foton på de två olika instrumentuppsättningarna där IMEC hyperspektral Snapscan SWIR kamera inkluderats. Till vänster ses en fristående uppsättning med telecentric lens (2x) FTV20C-110SW-S (Myutron, Japan) anpassad för SWIR. Till höger ses kameran med adapter för sidoport till Zeiss Axiomager M2.

Korrelativ mikroskopi

Från ovan givna beskrivning framgår att olika mikrospektroskopiska tekniker ger särskild, och kompletterande information av partiklarnas egenskaper. Det finns inte en enskild specifik metod som ger fullständigt tillfredställande information av partiklarnas sammansättning, och därför är det ofta önskvärt med analys med mer än en metod. Då provet består av tusentals olika partiklar på en stor filteryta, blir det komplicerat att återfinna samma partikel för kompletterande analys vilket tidigare inneburit ett hinder. Med ny teknik som utnyttjar exakta kalibreringsreferenser (fiducial-markörer), och mjukvara som kan överföra koordinatsystem från ett mikroskop till ett annat tillsammans med den spektroskopiska bildinformationen, börjar detta kunna möjliggöras. Metodiken kallas korrelativ mikroskopi, och har redan revolutionerat avbildning inom livsvetenskaperna. Det system som använts och utvecklats här är levererat av Carl Zeiss, men innefattar även den unika möjligheten att göra mätningar med Raman (WITEC) inuti svepelektronmikroskopet (Figur 6).



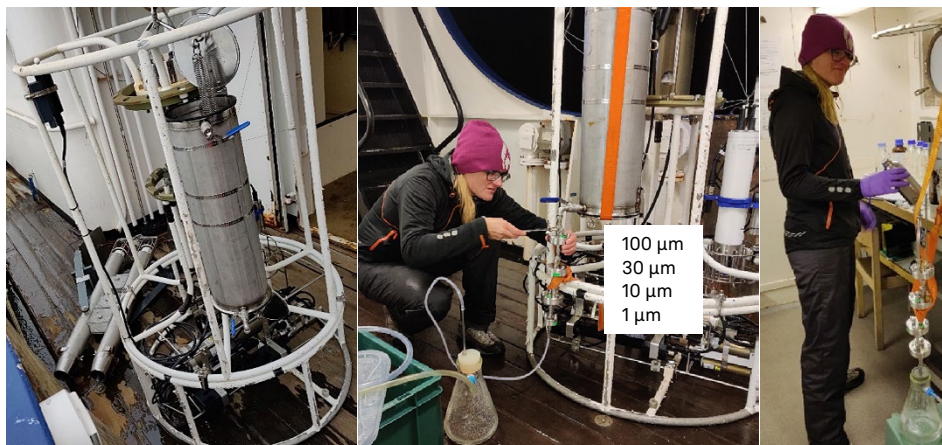
Figur 6. Schematiskt fotokollage över den korrelativa instrumentuppsättningen, inklusive de olika modaliteterna av mikroskop samt de korrelativ provhållare.

4. Resultat

Provtagningsutrustning som utvecklats

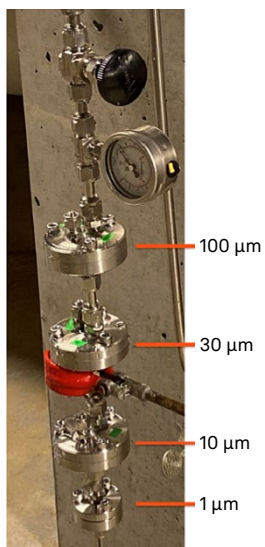
För provtagning av mikroplast i havsvatten är det vanligt att använda trålar och håvar, men dessa är begränsade till större mikroplast (typiskt > 300 μm). Fördelen med dessa metoder är att de är enkla, billiga och möjliggör provtagning av stora volymer. Dessutom förekommer några exempel med in situ pumpfiltreringsprovningar, vilka ofta kan fungera ner till 100 eller 50 μm och provta medelstora volymer (Karlsson m fl, 2020).

För att provta mindre partikelstorlekar och vid större djup, saknades provtagningsmetodik som ej var tillverkad av plast. Därför konstruerades en 20 l Niskin-provtagare i metall för ändamålet (Figur 7).



Figur 7. A. Designad och konstruerad 20 L Niskin-provtagare helt i rostfritt stål för pelagisk provtagning till obegränsat djup. B. Direkt online kaskadfiltrering från provtagaren assisterad med vakuumpump. C. Direkt behandling av proverna i fält utan att öppna filterhållarna för att minimera kontaminering.

För dricksvattenprovtagning finns ingen standardiserad metod för provtagning eller analys, men det är viktigt att kunna provta mycket stora volymer och att ha en helt plastfri provtagningsutrustning. Därför har en kaskadfiltreringsutrustning tagits fram i samverkan med Livsmedelsverket och sedermera förbättrats i samverkan med dricksvattenbranschen (Figur 8). Den bygger på helt inkapslat, plastfritt filtreringssystem. Mer information finns i fallstudiebeskrivningen.



Figur 8. Foto från helikapslade provtagningsfilter i en sekventiell kaskad-filtreringsuppsättning för dricksvatten-provtagning. Provtagaren monterar direkt på vattenkranen och passerar igenom en sekvens av allt finare porstorlek. Mottrycket mäts med en manometer innan första filtret för att säkerställa att filtren ej kloggas eller skadas av för stort tryckfall.

För sedimentprovtagning finns det flera olika etablerade provtagningsmetoder som även använts för mikroplast, och det som använts här är bästa tillgängliga metodik som används för upphämtning av minimalt störda kärnor och för övervakning av farliga ämnen (Figur 9). Viss anpassning till mikroplast avseende material som kommer i kontakt med proverna samt blankprovtagning har gjorts.



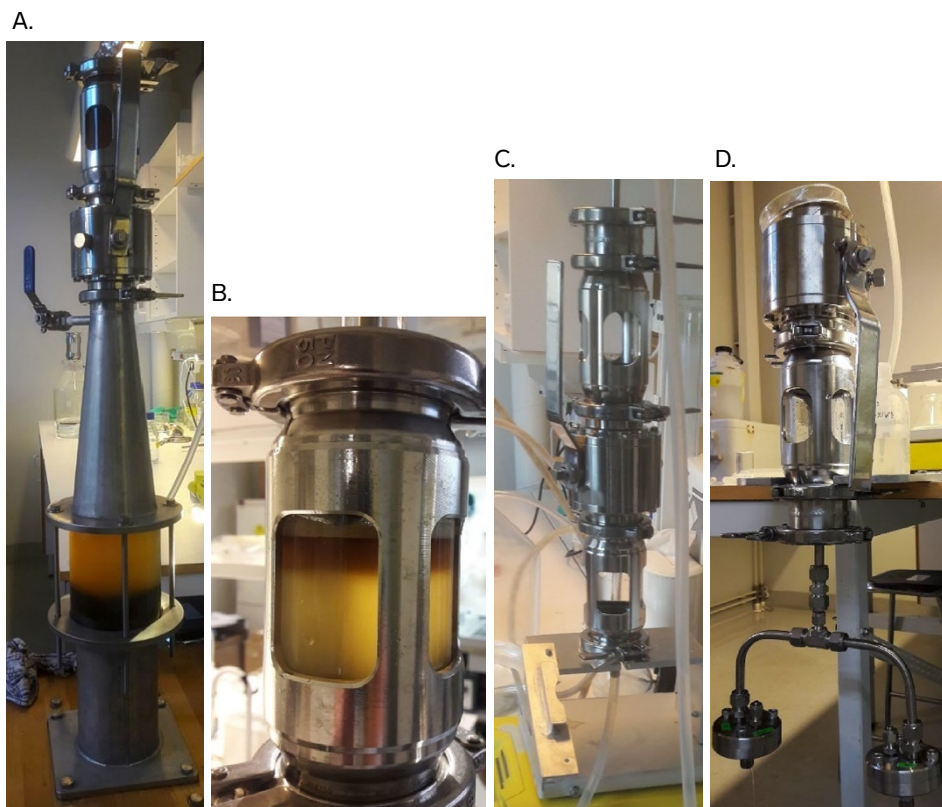
Figur 9. Provtagning av mikroplast i utsjösediment i Skageraks djuphåla, med Gemini-corer, samt sektionering av kärnorna.

Provupparbetningsmetodik som utvecklats

När projektet inleddes fanns etablerad kommersialiserad mikroplastextraktor för högdensitetsvätska (https://www.hydrobios.de/en/product?product_id=105) enligt vetenskaplig publicerad metod (Imhof m fl, 2012). Denna uppsättning har dock utprovats under JPI Oceans projektet BASEMAN som opraktiskt i för stor skala, samt vissa nackdelar i design så att partiklar fastnade i kopplingar och gängor. Därför utvecklades en förbättrad och förminskad version av MPSS som kallades för Kristineberg MPSS, KMPSS, vilken använts i flera studier och beskrivits i detalj i Mattsson m fl, 2022.

Under projektets gång, har KMPSS förbättrats ytterligare med bättre design av kopplingar och valv, samt tillåter nu visuell kontroll av separationen genom siktglas på toppen och att en andra kemisk behandling av det densitetsextraherade materialet och efterföljande andra densitetsseparation (Figur 10). KMPSS 2.0 har använts för Naturvårdsverkets uppdrag för provupparbetning av miljöövervakning av mikroplast i utsjösedimenten.

Alla material är helt i glas eller metall och kopplingar av livsmedelsindustri typ Tri-Clamp, med endast en typ av elastisk tätning mellan ytorna, för att minimera och kontrollera kontamination.



Figur 10. A. KMPSS version 2.0 med extraktionstornet i sin helhet till vänster där man ser det uppslammade sedimentet i ZnCl₂ lösningen både i den nedre glaskolonnen och i det övre siktglaset (förstoring i B) över den förbättrade kulventilen. C. Här ser man uppsättningen när första siktglaset och filtret inverterats och det andra siktglaset monterats och hela uppsättningen monterats på skakbord för att efter väteperoxid-behandling skaka loss partiklarna för en andra densitets separering. D. Här ses uppsättningen för slutlig filtrering på ett eller två kaskadfilteruppsättningar.

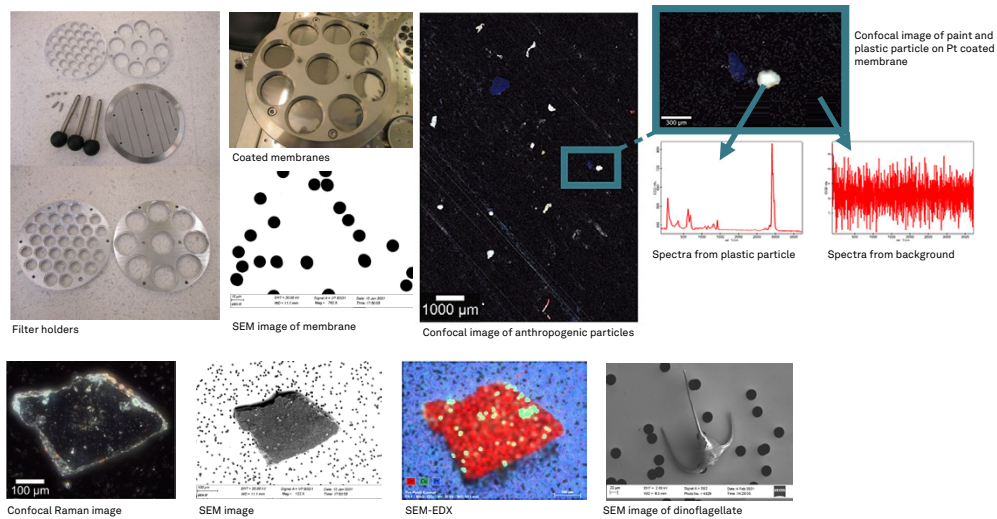
För mikroplastanalys är det i princip alltid nödvändigt med någon form av förbehandling av provmatrisen för att bryta ner eller lösa upp naturligt organiskt och partikulärt material som annars interfererar med mikroplastanalysen. Viktiga hänsyn att tas är att optimera effektiviteten i nedbrytningen utan att för den delen mikroplastpartiklarna signifikant förändras genom det oxiderande behandlingen. Då detta är en avvägning som behöver göras, är val av förbehandlingsprotokoll är en viktig del av metod-harmoniseringsprocesser. De val av behandlingsprotokoll som här använts och presenteras (Tabell 1) är i linje med den konsensusprocess som arbetas fram i expertgrupper för miljöövervakning av mikroplast till exempel i OSPAR och ICES.

Tabell 1. Översiktligt provbehandlingsschema för olika typer av provmatriser samt referenser.

Matris	Protokollbeskrivning	Referens
Marina sediment	NaClO (3 %) + KOH (5 %), ZnCl ₂ (1,8 g cm ⁻³), H ₂ O ₂ (7 %)	Mattsson m fl, 2022, Strand och Lundsteen 2017, Enders m fl, 2017, Bakir m fl, 2020, Pfeiffer och Fischer, 2020
Biota	Pankreatiskt enzymbehandling	Von Friesen m fl, 2019
Dricksvatten	H ₂ O ₂ (10 %)	Mattson m fl i SLV 2020
Havsvatten	H ₂ O ₂ , (10 %)	
Urbana sediment – däckpartiklar	Under utveckling, som Mattsson m fl, 2022, och +bitumenupplösning +cellulosa-nedbrytning +mineralupplutning)	

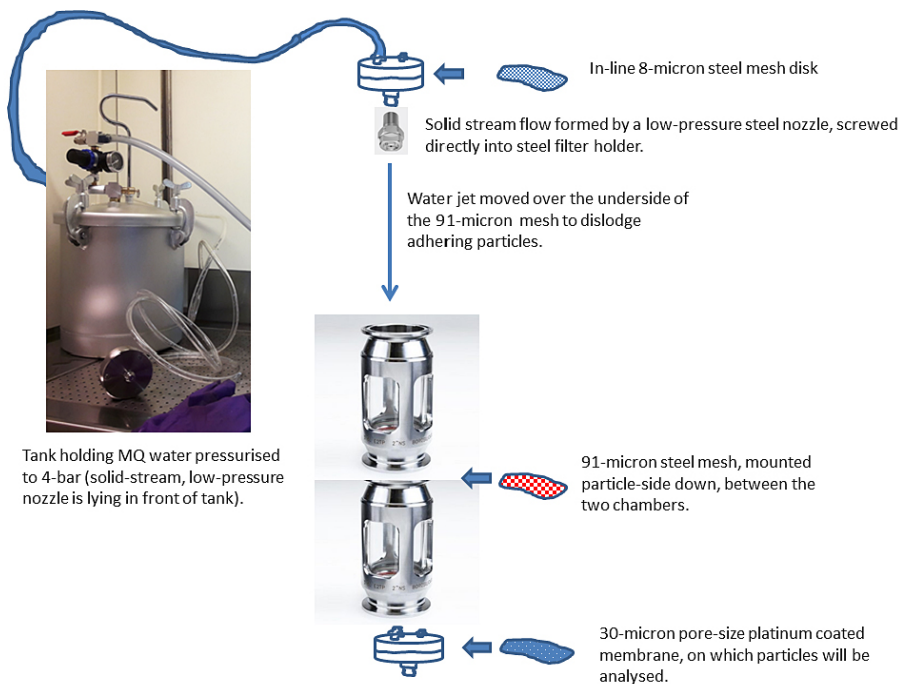
Utveckling av platinabeläggning

Beläggning av platina genom förångning och deponering på analysmembran av spårtsade polykarbonatfilm var framgångsrikt efter mycket elaborerande med olika tjocklekar och förbehandlingar av polykarbonaten, men med 100 nm beläggning på båda sidor var filtren formstabila och tåliga för de olika kemiska behandlingar som beskrivs ovan. Filtren gav bra avbildningsegenskaper i ljusmikroskopi (mörkfältsavbildning) och bra ledningsförmåga och elementkontrast i svepelektronmikroskopi, vilket gjorde att partiklar kan avbildas i högvaccum eller med lägre tryck i variabelt tryck-mod. Dessutom ger filtrens metalliska spegelyta bra funktion i både FTIR (reflektionsmod) och Raman (Figur 11). Beläggningsproceduren kräver mycket specialiserad utrustning som renrumsfaciliteten µFab, Chalmers nanofabriceringslab bistått med. Nu undersöks möjligheten för utförande av produktion vid ett kommersiellt kontraktslab med motsvarande faciliteter.



Figur 11. Från övre vänster, foto av den tillverkade utrustningen för att montera filtren för dubbelsidig deponering i förångaren. Därefter avbildning av filterytan i SEM, och till höger ett partikelprov i Raman. Nedre från vänster, en färgpartikel i darkfield, backscatter SEM, samt Raman. Längst till höger en dinoflagellat mikroalg i högvacuum SEM med sekundär-elektron-detektion.

I vattenprovtagningen används analysfiltren direkt vid provtagningen och endast utsätts för en renande efterbehandling, medan för sedimentprover uppdelas de extraherade partiklarna ofta först på större siktdukar, till exempel 8, 26, 100 eller 300 µm, och efterbehandlas för att senare eventuellt överförs till ett platinumbelagt analysmembran. För detta syfte har en spray-uppsättning med filtrerat vatten under högt tryck utvecklats (Figur 12).

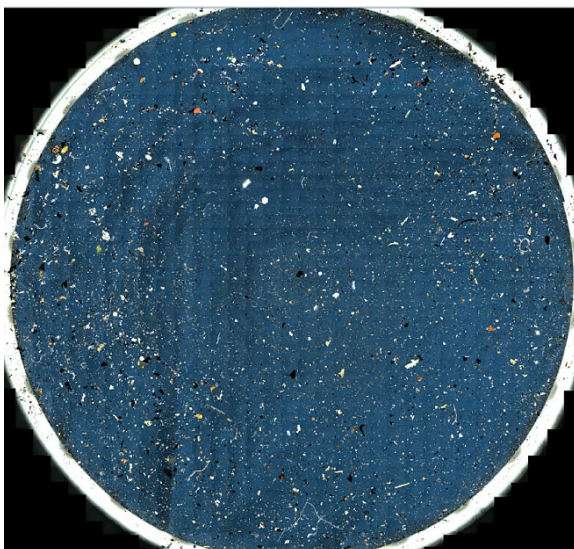


Figur 12. Filtrerat avjoniserat vatten fylls i en trycksatt tank som förs via en slang till ett filter med högtrycks-dysa (sprinklerjet-munstycke) som appliceras på undersidan av det rostfria masknätet som partiklarna avsatts på, och filtreras därefter ner på ett platinabelagt analysfilter.

Instrumentell analys

Ljuskopiering

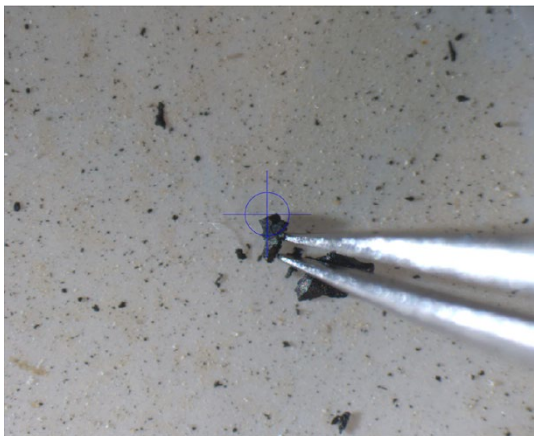
För effektiv visuell analys, oavsett om den är manuell eller automatiserad, är en högkvalitativ avbildning kritisk. Med automatiserad mikroskopi (i x, y, z-ledd) kan en avbildning av ett helt filter göras genom en sammanfogad mosaik av högupplösta (hög förstoring) bilder. Det ställer dock krav på att antingen filtret är absolut platt över hela ytan eller att en annan metod för fokusering kan uppnås. Här har en kombination av att lägga ut referenspunkter över filterytan för att fånga större topografiska variationer över filtret, använts tillsammans med en digital utökad fokusplan. Den metoden bygger på att man identifierar den högsta och lägsta punkten för filtret och partiklar, och programmerar därefter mikroskopet att i varje bildruta ta upp ett stort antal (många tiotals) foton som skiljer sig i fokalplanet (z-ledd) några mikrometer från varandra. Därefter kombineras digitalt alla fotona från samma bildruta till en genom optimerade algoritmer. Det tar därför flera timmar att ta upp en mosaik över ett helt 47 mm filter, men resultatet blir en högupplöst bild som är väl i fokus över hela filtret (Figur 13).



Figur 13. Automatiskt sammanfogad mosaik (kompositbild) över ett helt filter där varje bildruta (ca 1000 st) består av tiotals olika fokalhöjdsbilder som är kollapsade med fokuseringsalgoritmer till en enda som sen kombineras ihop med nästa färdiga bildruta för att minimera kanteffekter mellan bildrutorna.

Manuell visuell-taktil analys

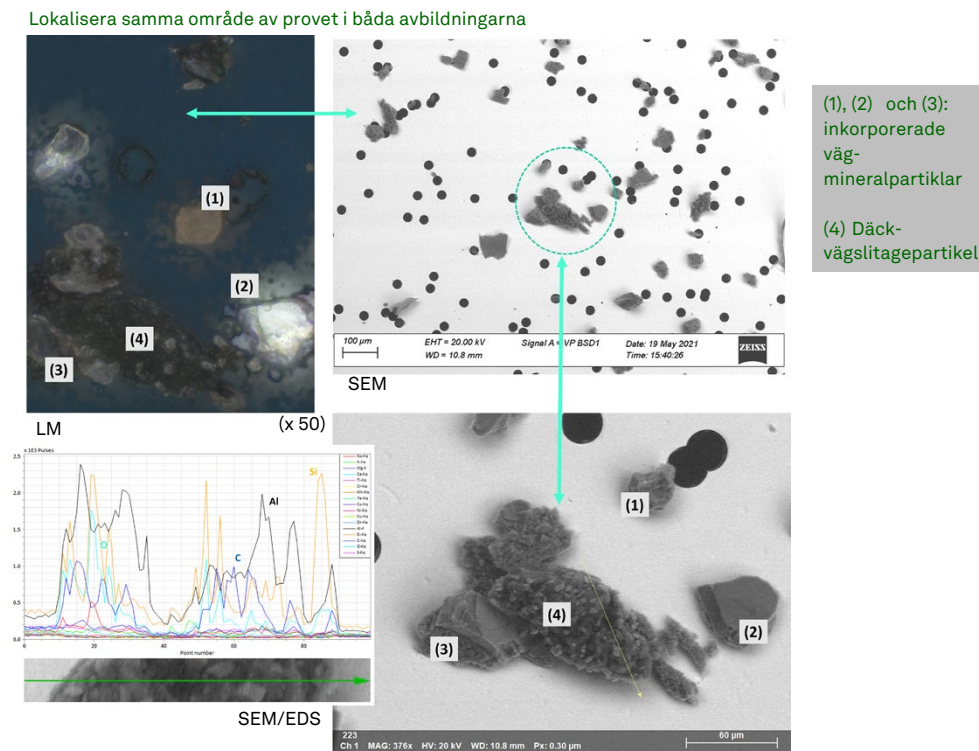
För att uppnå en högre grad av objektivitet för den enklaste och billigaste mikroskopibaserade analysen som är en manuell visuell-taktil bedömning, om möjligt kompletterad med manuell spektroskopisk klassificering har tagits fram ett protokoll och guide för detta (Karlsson m fl, 2020, Mattsson m fl, 2022), som sedermera har förbättrats framför allt avseende däckpartiklar (Figur 14).



Figur 14. Mikroskopbild på visuell-taktil karaktärisering av däck- och vägpartiklar, från VTI:s provvägsmaskin (Wilkinson m fl, manuskript).

Korrelativ ljus och svepelektronmikroskopi

Det är inte alla mikroplastpartiklar som lämpar sig för FTIR eller Raman-analys, exempelvis färgpartiklar eller däckslitagepartiklar är mycket svårt att kunna erhålla vibrationsspektroskopiska data från. Dessa kan dock karaktäriseras med antingen ljusmikroskopi eller svepelektronmikroskopi med olika detektorer, inklusive röntgenspektroskopisk detektor. Allra helst vill man utnyttja avbildning av partiklarna i både ljusmikroskop och i svepelektronmikroskop, men det kräver då att man kan arbeta korrelativt, vilket innebär att koordinaterna på partiklarna är korrelerade eller att bilderna kan överläggas varandra. I projektet har vi arbetat med att kombinera olika korrelativa arbetsflöden för att uppnå detta syfte. I Figur 15 visas exempel för däck- och vägsitagepartiklar avbildade i både ljusmikroskop och svepelektronmikroskop.



Figur 15. Prov från VTI:s provvägsmaskin med ett sommardäcksexperiment. På de övre bilderna visas avbildning i ljusmikroskopi (vänster) och svepelektronmikroskopi (höger), där det framgår att respektive ger olika specifik information. Varje partikel kan dessutom analyseras avseende elementsammansättning med röntgenspektroskopi (nedre vänster visar linjescan över partikel 4 enligt gul pil).

Hyperspektral nära-infraröd spektroskopisk kameraanalys för snabb och kostnadseffektiv screening av mikroplast

In den förstudie av potentialen för den nya hyperspektral kortvågig infraröd kamera som bygger på en ny Snapscan sensor från IMEC, har implementering inledningsvis gjorts både i en enkel fristående uppsättning med en IR transparent 2x lins och i en sidoport för Zeiss AxioImager ljusmikroskop med anpassning för infraröd belysning och strålgångs-transmission.

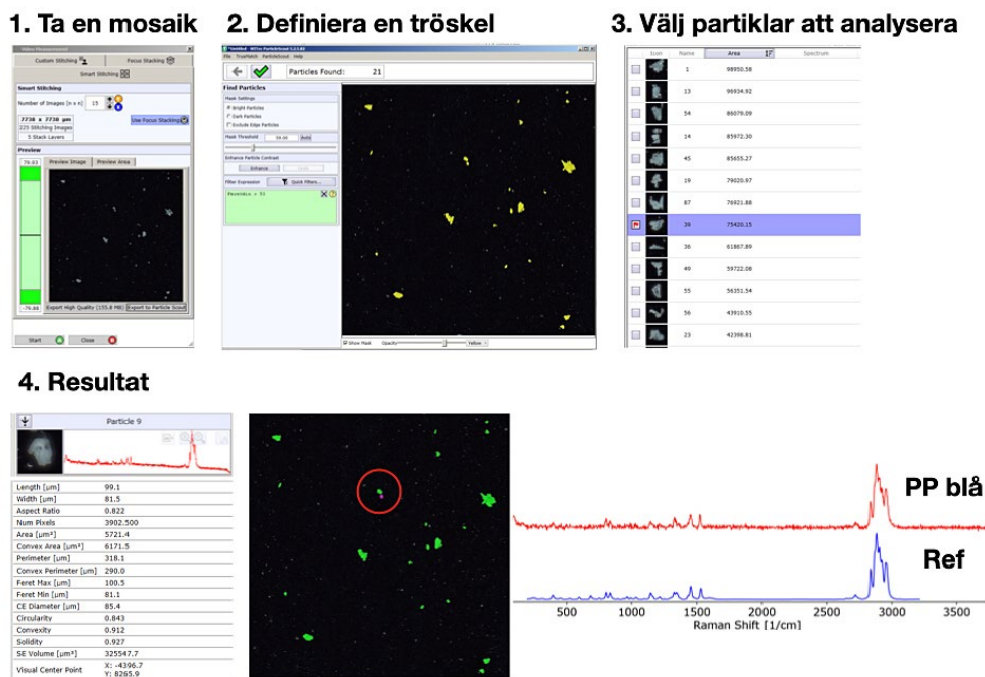
Förstudien, som oss veterligen är unik, har gett lovande första resultat. Den fristående uppsättning med kamera och direktmonterad IR transparent lins med extern halogenbelysning gav tydliga spektrala skillnader mellan plaster av olika polymerer. Två olika prediktiva modeller prövades; en klassisk maskininlärningsmodell Support Vector Machines, samt en neural-nätverks-modell. Båda modeller gav liknande riktighet i prediktionen. Däremot gav neurala nätverksmetoden betydligt snabbare prediktioner.

Validering av modellen testades för både rena polymerer, och vittrad plast och riktigheten var sämre för den vittrade plasten, vilket belyser vikten av att även inkludera förändrad plast i det spektrala träningsbiblioteket. Med den aktuella uppsättningen var prediktionen tillförlitlig för större partiklar (över ca 100 µm), men sämre för mindre mikroplastpartiklar. Detta arbete kommer att fortgå inom ramen för JPI Oceans-projektet ANDROMEDA.

Utveckling av en öppen-källkodsmjukvara för automatiserad instrumentkontroll, och dataanalys för FTIR och Raman

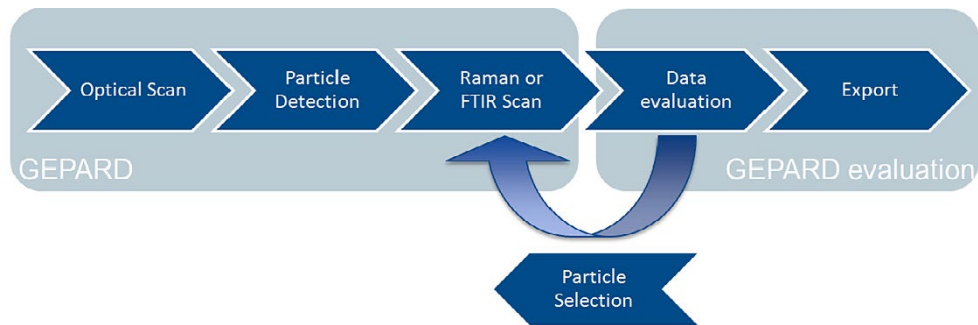
Plastpolymermaterial är ofta möjliga att identifiera med både FTIR och Raman-spektroskopi, och det finns många tillverkare av sådana instrument inbyggda i mikroskop vilket möjliggör identifiering av mikroplast. Men för att metoden ska vara effektiv som analysmetod för prover från miljön där tusentals partiklar behöver hanteras för varje prov, krävs en automatisering, och vissa andra hänsynstaganden behöver harmoniseras. Vissa instrumenttillverkare har utvecklat partikelautomatisering som en del av datainsamlingsmöjligheterna, men de flesta inte, och dessutom finns det ofta begränsningar i funktionaliteten, och varje instrumenttillverkare har löst det lite olika. Därför är det önskvärt med en harmoniserande mjukvara som kan hantera olika typer av instrumentering. Detta är dock ett långsiktigt arbete som kräver mycket kunskap om både analysen, programmering, instrumentkontroll, samt nära samarbete med tillverkarna.

Här har dels arbetats nära instrumenttillverkarna för att utveckla mjukvara och applikationer kring kommersiella system, till exempel WITEC Particle Scout (Figur 16), samt dels utvecklat egen mjukvara i Python med öppen källkod, GEPARD. Particle Scout möjliggör idag en semi-automatiserad identifiering, databassökning och klassificering av mikroplast på ett helt filter.

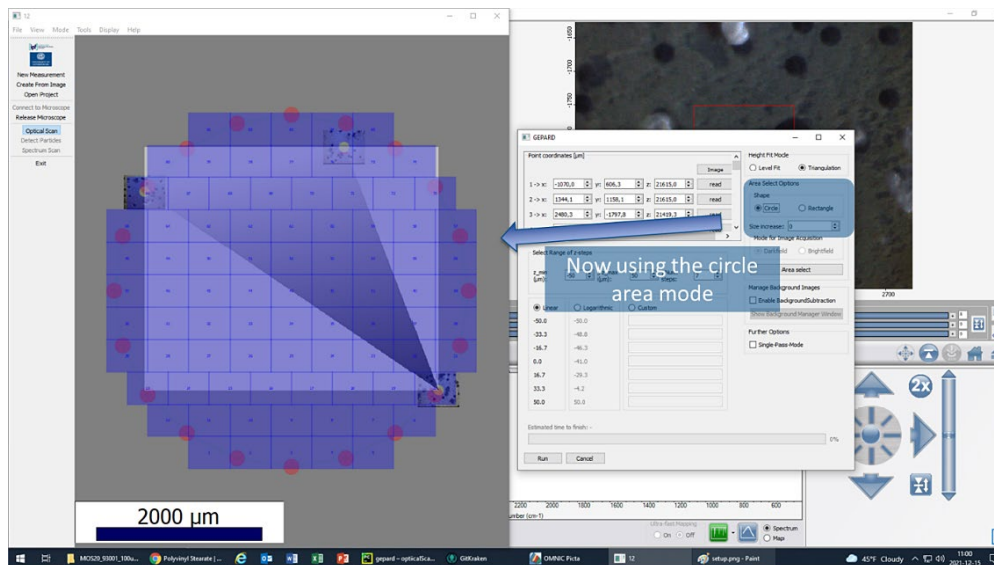


Figur 16. Illustrering av arbetsflödet i WITEC Particle Scout, där först en bild över hela provet tas upp med vitt ljus genom att klippa ihop kompositbilder av hög förstoring till en bild där partiklar definieras över bakgrund genom en bildanalys. Därefter kan man välja ut partiklar att analysera där varje partikel beskjuts med laserljus av inställd effekt, postprocessing av spektra, samt databassökning.

Andra mikroskop har dock mindre utvecklade partikelmjukvaror, eller inga alls, och det är önskvärt att ta fram en generisk, plattformsoberoende mjukvara för denna analys. Detta arbete som påbörjades av Josef Brandt vid Institute for Polymer Research in Dresden, för att utveckla mjukvaran GEPARD med öppen källkod har fortsatt under detta projekt (Figur 17). Nu är GEPARD 2.0 kapabelt att kontrollera 2 olika tillverkare av Ramaninstrument och två olika tillverkare av FTIR instrument, och dessutom har en rad förbättringar i datahanteringen implementerats i utvecklingen (Figur 18).

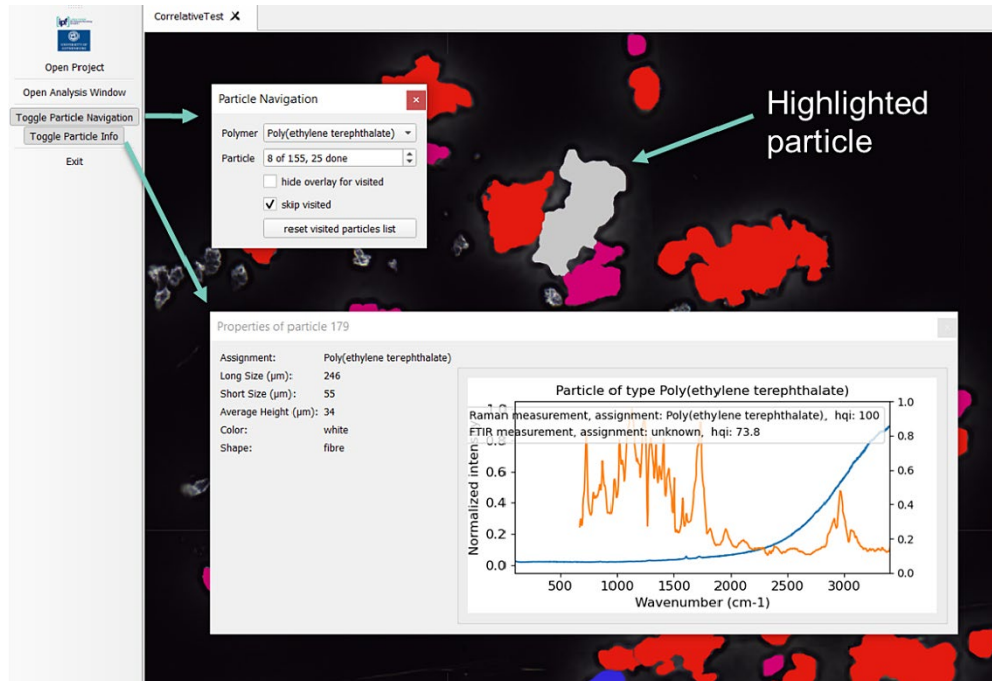


Figur 17. Översiktligt arbetsflöde i mjukvaran GEPARD inkluderande datainsamlingstegen till vänster och datautvärderingen till höger.



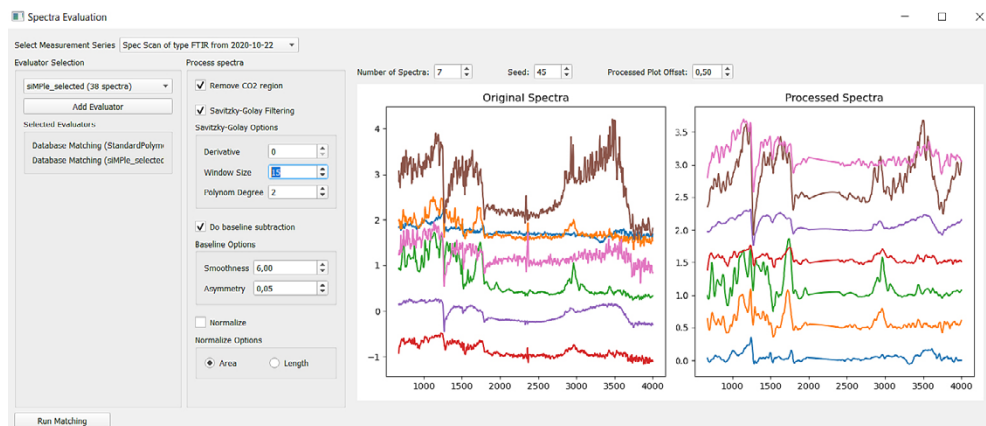
Figur 18. Inställningar i datainsamlingsteget av GEPARD 2.0 för Thermo Nicolet FTIR, där fokusinställningar över ett helt filter säkerställs.

GEPARD 2.0 används nu för att med Thermo Nicolet iN10mx analysera de prover som ingår i den nationella miljöövervakningen av farliga ämnen i utsjösedimenten som SGU och SNV provtagit (Figur 19).



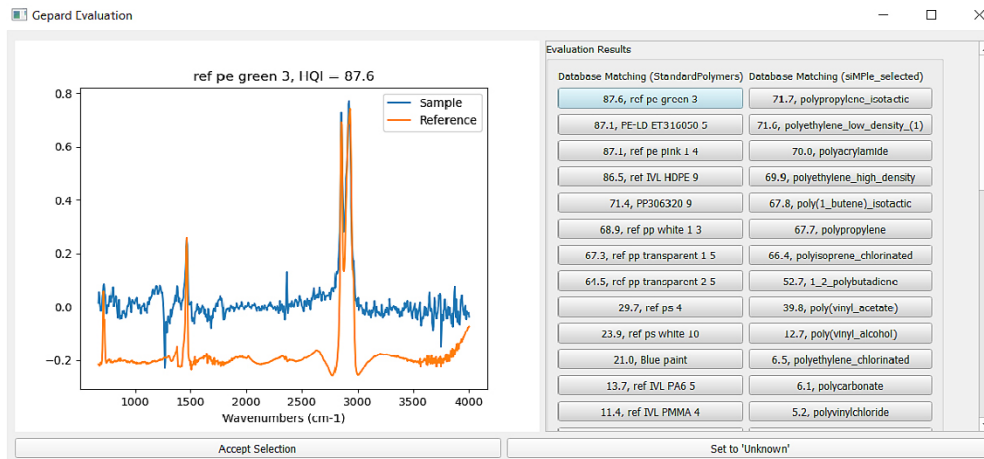
Figur 19. Här visas en partikel i taget och dess spektra, tilldelade klassificering, storlek och form.

GEPARD 2.0 inkluderar flera olika metoder för att efterbehandla spektra för att reducera brus, identifiera och subtrahera bakgrunden samt exkludera toppar från koldioxid (Figur 20).



Figur 20. Här visas inställningsfönstret för postprocessning av spektra såsom brusreducering, bakgrundssubtraktion, eliminering av koldioxid regionen med mera.

Det finns automatiserade rutiner men med manuell kvalitetskontroll och expertbedömningar (Figur 21).



Figur 21. Här stegar man sig igenom en partikel i taget och ser på spektrat, och de föreslagna klassificeringarna för två olika databaser. Där finns möjlighet att acceptera eller sätta som okänd.

5. Fallstudier

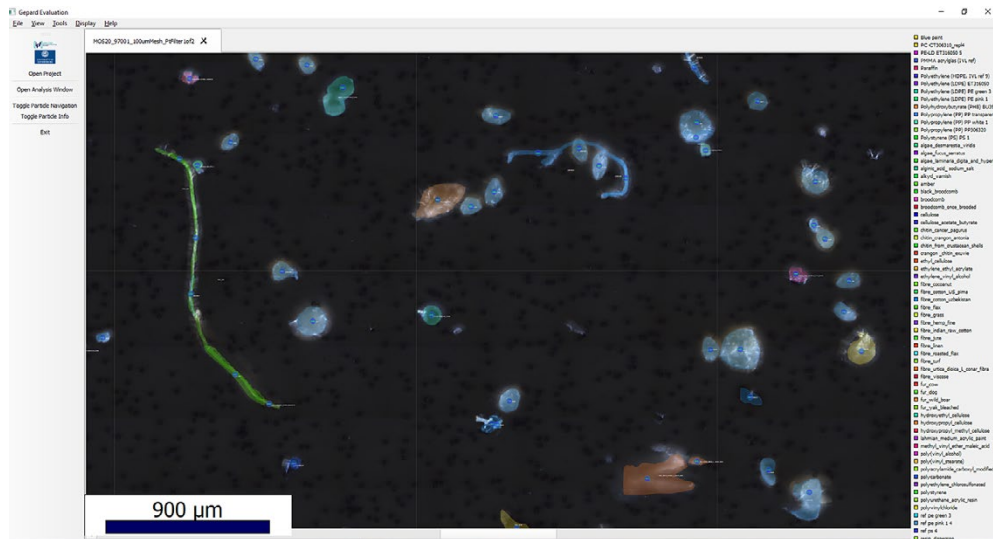
Då mikroplast i den vidare bemärkelsen är en varierande grupp av solida föroreningar, kommer analysmetoder att behöva utvecklas med den specifika tillämpningen i åtanke vilket inkluderar specifik provupparbetning, och analysinstrumentering och tillvägagångsätt vid den instrumentella analysen, samt vid efterarbetning och tolkning av data. Därför exemplifieras här kortfattat de utvecklade metoderna för en rad applikationer, och med hänvisning till publikationer eller manuskript under produktion.

Utveckling av provupparbetning av mikroplast från sediment

Sediment är en av de viktigaste provmatriserna att kunna analysera då där sker en ackumulation av mikroplast och kan ha konsekvenser för bottenlevande samhällen som behöver studeras, samt är en av de utvalda matriserna för miljöövervakning. Det finns flera publicerade metoder för att extrahera mikroplast som bygger på siktning, densitetsseparering, flotering eller elutriering (Imhof m fl, 2012, Karlsson m fl, 2016). Vi valde att utgå från den publicerade och kommersialiserade densitetssepareringsmetoden MPSS (Imhof 2012), men förbättrat den på en rad punkter. Dels har den nedskalats då den var baserad på opraktiska mängder sediment, dels har den utformats för att minimera att partiklar ska kunna fastna i separertornet. En annan viktig skillnad är att vi har undersökt hur effektiviteten i separationen påverkades av om man förbehandlade proverna (Mattsson m fl, 2022). Många andra studier har ej gjort någon förbehandling utan endast efterbehandlat provet för att förenkla analysen, genom att bryta ner biofilm på partiklarna, men då består biofilmen under densitetssepareringen, vilket gör att partiklar förblir agglomererade på grund av den klubbiga bakteriefilm som är välkänt förekommande i sediment, vilket vi har påvisat minskar effektiviteten i extraktionen (Mattsson m fl, 2022). En oxidativ förbehandling gav bättre utbyte än den enzymatiska behandling som vi utvecklat för biota prover (von Friesen m fl, 2019), vilket i sin tur gav bättre utbyte än ingen förbehandling alls. Vidare testades effektiviteten i den tyngre densitetsvätskan ($1,8 \text{ g/cm}^3 \text{ ZnCl}_2$), mot den billigare och harmlösa mättade NaCl lösningen ($1,2 \text{ g/cm}^3$), men som förväntat var utbytet betydligt lägre för NaCl, och det var framför allt de tyngre polymererna som till exempel PVC som förklarade skillnaderna (Mattsson m fl, 2022).

I vissa prover extraheras dock omfattande naturligt partikulärt material som försvårar analysen. Det kan röra sig om planktonrester, pollen eller annat terrestert organiskt material. För att kunna öka renheten av mikroplasten alltså bibehålla utbyte av extraherad mikroplast men med minskad extraktion av naturliga partiklar, så modifierades extraktionsutrustningen för att inkludera en efterbehandling av det extraherade materialet, med vanligtvis väteperoxid, och därefter ett andra densitetsseparering med ZnCl_2 (Figur 10). Dessutom har den övre delen av tornet förbättrats med siktrör som gör att man kan se separationen samt att den andra behandlingen, tvätt och andra extraktionssteget, sker i tornet. För vissa särskilt komplicerade prover, till exempel urbana sediment, kan extra behandlingssteg övervägas.

Parallellt med metodutvecklingsprojektet har vi arbetat med ett uppdrag åt Naturvårdsverkets miljöövervakning där metoden har tillämpats på utsjösediment. Den utvecklade öppen-källkodsmjukvaran GEPARD 2.0, har framgångsrikt applicerats med FTIR på proverna (Figur 22), där partiklar identifierade med individuella specifika spektra eller som polymer grupper kan relateras tillbaka till optiska partikelavbildningar (något som ej är möjligt med pixel-baserade FTIR scanning).



Figur 22. Här kan man se en resultatbild från ett sedimentprov med specifika polymerer identifierade och markerade på specifika partiklar över filtret.

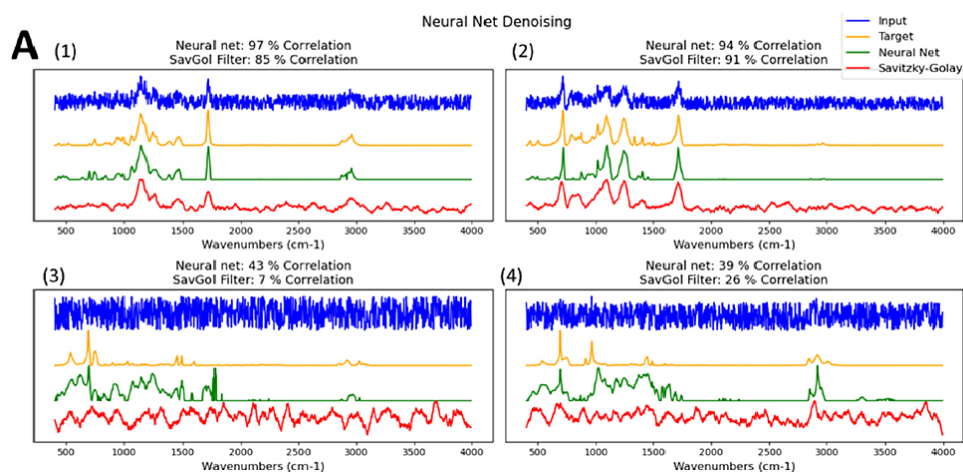
Utveckling av neural nätverksmetodik för postprocessning av spektra och identifiering mikroplast

Befintlig metodik som bygger på brusreducering (till exempel Savitzky-Golay) och bakgrundsanpassning och subtraktion, har stora begränsningar och kräver mycket manuell kontroll och anpassning för varje spektra, vilket försvårar automatisering. Dessutom är spektra av låg kvalitet, till exempel lågt signal/brusförhållande, spök-toppar från biofilm eller vittring av plasten problematiska för identifiering mot spektrala bibliotek av kända substanser, med konventionell korrelation.

I denna studie användes en neural nätverks-autoencoder metod som bygger på en arkitektur av neurala nätverk med två delar. Först kodas indata in till en komprimerad form. Därefter återskapas den kodade datan till originalformatet genom nätverkets avkodare. På det sättet sker en dimensionalitetsreduktion först att inkludera endast den essentiella informationen, som sen används för att åter-skapa originaldatan. På detta sättet kan både brusreducering och eliminering av oönskade artefakter göras i ett steg.

Metoden utvärderades för spektrala data från både FTIR och Ramanspektroskopi, där olika typ av vanligt förekommande felkällor och osäkerheter simulerats på datan. Autoencoder-metoden jämfördes mot konventionella postprocessning

och identifieringsmetodik, och resultatet var anmärkningsvärt positivt för neurala nätverksmetoden jämfört med konventionella brusreduktionsmetoder (Figur 23).



Figur 23. Samtidigt återskapande av originalspektra från brus och spektral förvrängning genom neurala nätverks-autoencodern, där blå kurvor är data med simulerat brus och förvrängda spektra, gul är opåverkade underliggande spektra, medan grön är det autoencodern predikerade, samt rött anger konventionell Savitzky-Golay brusfiltrering. Korrelationskoefficienten anges för respektive.

Den enda begränsningen som kunnat identifieras är att det är nödvändigt att ha ett stort bibliotek av material, även inkluderande material som ej är plast, för att undvika falska positiva identifieringar.

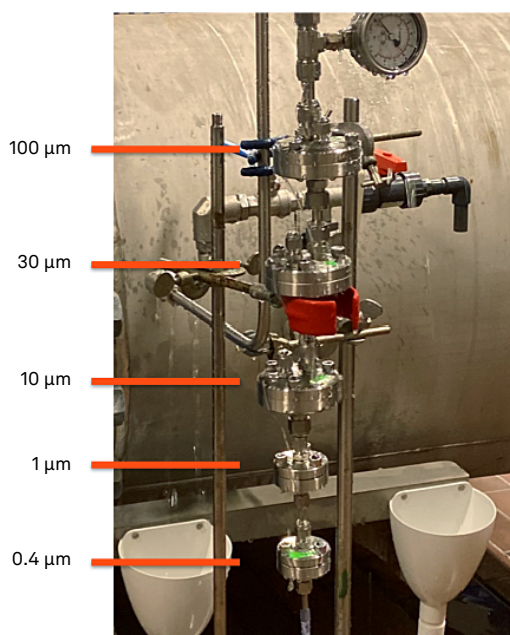
Provtagning och analys av mikro och nanoplast i vattenverk och dricksvatten

Analys av mikroplast i dricksvatten (kranvatten och buteljerat vatten) har fått stor uppmärksamhet under senare år då vissa studier inledningsvis rapporterat om höga halter (Mason m fl, 2016). Även om flertalet studier högst sannolikt är behäftade med stora felkällor och osäkerheter på grund av kontamination från provtagning och provhantering, finns det fortfarande ett stort fokus att kunna fastställa mänsklig exponering via dricksvattenintag och då är det essentiellt att få fram tillförlitliga och jämförbara provtagnings- och mätmetoder (Koelmans m fl, 2019).

Vi har deltagit i flertalet forskningsuppdrag från Livsmedelsverket och tillsammans med aktörer i vattenbranschen för att successivt förbättra metodik och tillämpa dessa för analys av kranvatten, dricksvatten inom verk. För att kunna göra detta utvecklade vi först två rostfria provtagningssystem som var helt slutet och kopplades direkt på kran. Detta för att undvika kontamination från omgivningen. Vi hade en uppställning där vi provtog en större mängd vatten (upp till 400 L) som filterades genom ett 100 µm, 30 µm och 10 µm filter, sedan hade vi en mindre uppställning där vi filterade vatten genom 10, 1 och 0,4 µm samt samlade upp 10 mL vatten som passerat 1 µm filtret för att kunna mäta antalet partiklar i vattnet.

Tio provtagningsplatser baserat på geografisk spridning, typ av vattentäkt, reningsmetod och storlek på vattenverk valdes ut. Först fick vattnet spola några minuter för att undvika att provta vatten som stått i ledningarna under längre tid. Sedan kopplades den större provtagningsutrustningen på kranen och tryck samt antal liter registrerades. Sen kopplades den mindre provtagningsutrustningen på kranen och en mindre volym provtogs. Efter filtreringen av med den större provtagningsutrustningen vändes 100 µm filtret upp och ner och ett 30 µm filter kopplades på mellan 100 µm och 30 µm för att överföra partiklarna på 100 µm filtret till ett 30 µm filter för att underlätta analyser. Filtren (100-30-30-10 µm) behandlades sedan med 100 mL 7,5 % väteperoxid, sköljdes med 100 mL vatten för att sedan torkas genom att suga luft som fått passera ett 0,4 µm filter. Filteruppställningen förslöts med transporterades tillbaka till laboratoriet där filtren plockades ut i en plastfri renluftsbank, förpackades i petriskålar och förvarades i kylan (7 °C) fram till de analyserades.

För att undersöka koncentrationen och variationen av mikroplast inom vattenreningsverk, från råvattnet till kranvattnet, provtogs det på fem strategiskt valda punkter inom 6 vattenverk. Den rostfria provtagningsuppställningen som användes till kranvattnet vidareutvecklades så att alla filter kan användas samtidigt, ett slutet system med 100-30-10-1-0,4 µm filter (Figur 24). De mindre filtren (0,4 och 1 µm) kopplas bort efter hand då tillräcklig volym filtrerats (upp till 0,5 L respektive 20 L). För de större filtren filtrerades över 1000 L.



Figur 24. Slutet provtagningsystem för online kaskadfiltreringssystem av vatten inom dricksvattenverk.

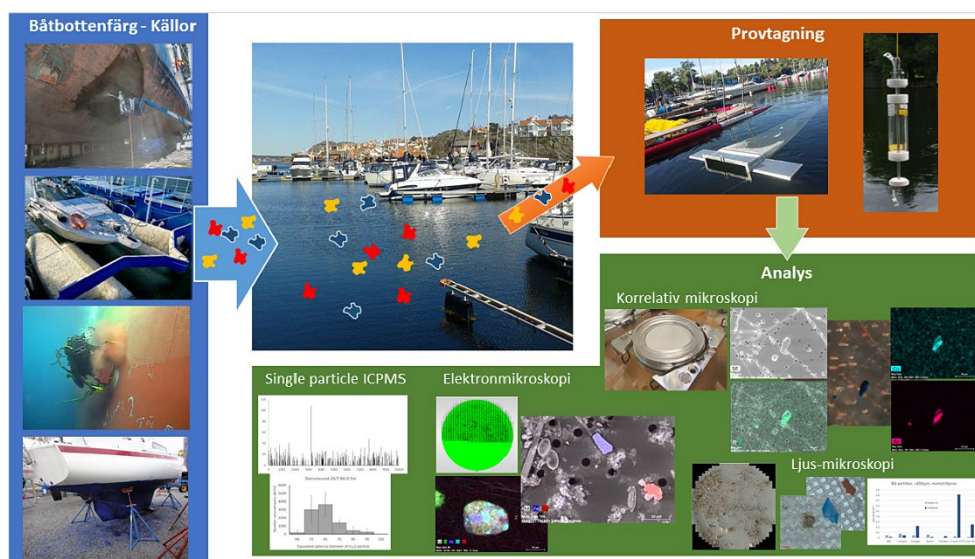
För analys av filter togs först en översiktsbild (mosaik) av hela filtret med ett 5x objektiv och sedan togs bilder med större förstoring (10x, 20x eller 50x) beroende av filterstorlek för att få en tydlig detaljerad bild av partiklarna som sedan analyserades med Ramanmikroskopi (532 nm laser). Exponeringstid och antal upptagna spektrum varierade beroende av vilket objektiv som användes samt partiklarnas

storlek. Alla spektra jämfördes med vårt bibliotek som består av både inköpta spektra och spektra vi själva tagit. Ett spektrum räknades som identifierat då 80 % av spektrumet överensstämde med ett referensspektrum.

Analysmetoder för båtbottnfärgpartiklar i kustvatten och sediment

Färgpartiklar är en av de källorna till mikroplast som först nyligen fått större uppmärksamhet och enligt modellering uppskattats som en potentiellt större källa än pellets, däckpartiklar och textilfibrer (Paruta m fl, 2022). Att färgpartiklar ej beskrivits särskilt omfattande beror troligtvis på att det är bland de svårare partikelsammansättningarna att identifiera och klassificera. Färgpartiklar i miljön kan ha ursprung från husfasad-färg, från andra byggnadskonstruktioner i den urbana miljön, från båtar och fartyg. Mikroplast från just båtar och fartyg hamnar oftast direkt i den marina miljön där de leder till exponering för pelagiska och bentiska organismer (Figur 25). Partiklarna kan komma både från skrovmaterialet (till exempel glasfiberarmerad polyester) och ytbehandlingar på skrov och överbyggnader, samt från bottenfärg. Konventionell bottenfärg innehåller ofta biocider, giftiga metaller eller organiska ämnen som tillsats färgen för att minimera oönskad påväxt. Mikroplastpartiklar från biocid innehållande färg är således av hög prioritet att kunna studera då de är avsiktligt giftiga. Färgpartiklar från både land och maritima applikationer kan bildas under användning eller vid underhållsarbete (Figur 25).

Som en tillämpning av projektet har provtagning och analys av färgpartiklar i fritidsbåtshamnar på svenska väst- och ostkusten genomförts. Analysmetoder som optimerades för tillämpningen var ljusmikroskopi, automatiserad svepelektronmikroskopi (metallrika partiklar identifierade med backscattering detektor och bestämda med energidispersiv röntgenspektroskopi), samt single particle ICPMS som bestämmer kopparrika nanopartiklar (Gondikas m fl, 2022).



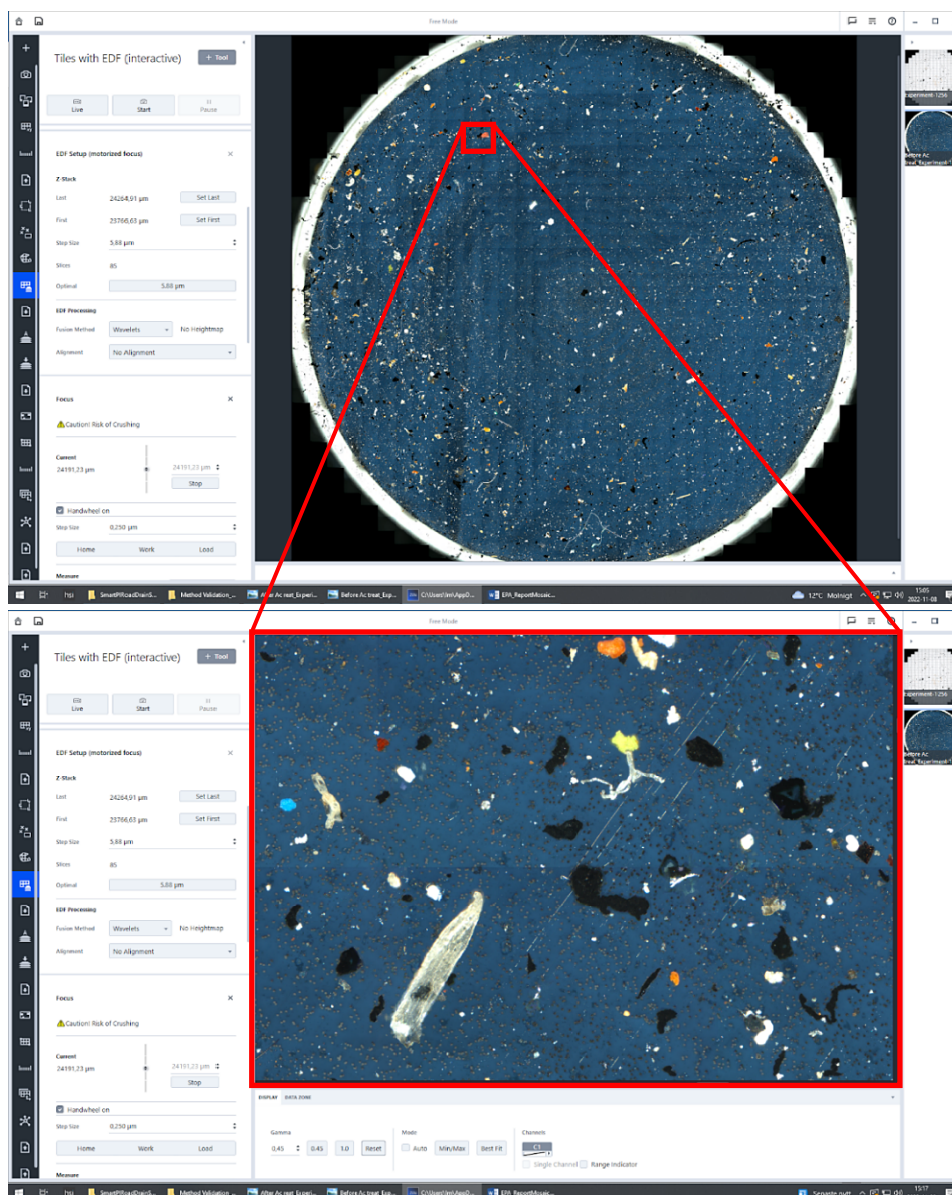
Figur 25. Figuren visar exempel på källor och spridningsvägar för färgpartiklar från båtbottnfärg, samt de metoder som utvärderats för det syftet i Gondikas m fl, 2022.

Analys av däck- och vägslitagepartiklar i urbana akvatiska prover

Till den urbana vattencykeln tillkommer mycket mikroplast transporteras vidare ut i den yttre miljön. Däck- och vägslitagepartiklar sprids till stor del via vägavrinningsvatten, till dagvatten och mottagande vattendrag eller till avloppsreningsverk. Urbana vattendrag är därför viktiga provtagningspunkter, och dess sediment, mycket relevanta men samtidigt bland de mest komplexa provmatriser att hantera. Vi har provtagit sediment från Kvillebäcken på Hisingen i Göteborg, som mottar mycket dagvatten från hårdgjorda ytor som vägar, parkeringsplatser, köpcentrum med mera för metodutvecklingsarbete (Figur 26). Sedimentet innehåller mycket organiskt material, både naturligt som växtmaterial, men även kondenserat fett, olja, kolrester, plastpolymerer och däck- och vägslitagepartiklar (Hassellöv m fl, 2018). Sedimentets innehåll av metallsulfider kan ytterligare bidra till den dominerande svarta färgen på flertalet av partiklarna i ursprungsprovet. För att kunna dra någon nytta av mikroskopisk analys behöver proverna extraheras och renas upp mer än de flesta andra provmatriser. Denna metodutveckling är ännu ej färdigställd men preliminära resultat ser lovande ut med mycket få återstående naturliga partiklar men däck- och vägslitage samt plastpartiklar (Figur 27).



Figur 26. Sedimentprovtagning av det urbana vattendraget Kvillebäcken, Göteborg, med Kayak-sampler (Hydrobios). Översta 2 cm samplades upp från 10 replikat till ett samplingsprov för vidare provupparbetning.



Figur 27. Här ses preliminära tester av ett kemiskt behandlat, densitetsseparerat och efterbehandlat sedimentprov från Kvillebäcken. Däck- och vägslitagepartiklar och mikroplast nominerar provet tillsammans med lite naturliga ljusa mineralpartiklar.

Efter det kompletta provbehandlingsprotokollet återstår nästan inga andra svarta partiklar än däck- och vägslitagepartiklar.

6. Slutsatser och rekommendationer

Det saknas fortfarande mycket kunskap om vilken påverkan mikroplast innebär för akvatiska och terrestra ekosystem, men det står klart att utsläppstakten av mikroplast kommer att fortsätta öka. Miljöövervakning och forskning för att täppa till kunskapsluckorna kräver tillförlitliga och jämförbara mätmetoder. Dessa metoder behöver innefatta ett helhetsgrepp från provtagning, provupparbetning, instrumentell analys, databehandling, rapportering och kvalitetssäkring. Det finns både massbaserade och mikroskopibaserade metoder, och den senare har studerats och utvecklats i projektet. Då det inte finns en specifik perfekt analysmetod, finner vi här för forskningsändamål särskilt intressant de nya korrelativa arbetsflödena och metoder som möjliggör parallell analys med olika mikrospektroskopiska modaliteter på samma partiklar. Men dessa metoder är både kostsamma och komplicerade och kräver omfattande expertis. Därför är enklare, snabbare och billigare metoder av stor vikt för miljöövervakning. Den metod som här vidarearbetats, med hjälp av ny detektor-sensorik, är hyperspektral nära infraröd mikrospektroskopi. Hyperspektral NIR kopplat med en ny neural nätverksmodell visar stor potential för snabb screening av prover för att fastställa om en partikel (inom storleksspannet större än 100 µm) är plast eller ickeplast, och i viss mån vilken polymer det är. Om man vill gå längre ner i storlek och bättre riktighet, finns både FTIR och Ramanmikrospektroskopi att tillgå, och här har ny öppen-källkodsmjukvara tagits fram för instrument från flera tillverkare. Detta understödjer den viktiga harmoniseringsprocessen som efterfrågas från många håll. Erfarenhet från detta projekt och andra visar att nya typer av provmatriser oftast kräver anpassning och vidareutveckling av befintliga protokoll. Här har nu utvecklade protokoll och analysmetoder tagits fram för marina domäner men för färskvatten och jordprover kommer det att krävas ytterligare insatser. För de särskilt utmanande typerna av mikroplast som däckpartiklar och färgpartiklar har framsteg gjorts inom projektet och internationellt men här återstår fortfarande utvecklingsarbete.

För miljöövervakningen kan rekommenderas att utsjösedimentövervakningen enligt OSPARs riktlinjer avseende provupparbetning, kravnivå av spektroskopisk validering, minsta partikel-rapporteringsgräns (100 µm) ses som en avvägd ambitionsnivå för att svara på förekomst och långsiktstrender på bassäng-nivå. För miljöövervakning närmre källor för att identifiera och sätta in åtgärder är dock en högre detaljnivå i analysen av godo, vilket möjliggör miljöforensiska slutsatser om vad det är för partiklar och vilka troliga källor är.

7. Källhänvisning

ENDERS, K., LENZ, R., BEER, S. & STEDMON, C. A. 2017. Extraction of microplastic from biota: recommended acidic digestion destroys common plastic polymers. *Ices Journal of Marine Science*, 74, 326–331.

GESAMP (2019). Guidelines on the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean (Kershaw P. J., Turra A. and Galgani F. editors), Akbar Tahir, Alexander Turra, Amy Lusher, Chris Wilcox, Denise Hardesty, Francois Galgani, Hideshige Takada, Marcus Erikson, Martin Hassellöv, Martin Thiel, Peter Kershaw, Sang Hee Hong, Sheri Mason, Weiwei Zhang and Won Joon Shim. (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 99, 130 pp.

IMHOF, H. K., SCHMID, J., NIESSNER, R., IVLEVA, N. P. & LAFORSCH, C. 2012. A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. *Limnology and Oceanography-Methods*, 10, 524–537.

HARTMANN, NB, HUFFER T, THOMSON RC, HASSELLÖV M, VERSCHOOR A, DAUGAARD AE, RIST S, KARLSSON T, BRENNHOLT N, COLE M, HERRLING MP, HESS MC, IVLEVA NP, LUSHER AL, WAGNER M. Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environ Sci Technol*. 2019; 53(3): 1039–1047. doi: 10.1021/acs.est.8b05297

HASSELLÖV M., KARLSSON, T. M., MATTSSON, K., MAGNUSSON, K., STRAND, J., LENZ, R., VAN BAVEL, B., EIDSVOLL, D. P. (2018) Progress towards monitoring of microlitter in Scandinavian marine environments : State of knowledge and challenges Copenhagen: Nordisk Ministerråd; 67 p.

KAPPLER, A., D. FISCHER, S. OBERBECKMANN, G. SCHERNEWSKI, M. LABRENZ, K. J. EICHHORN AND B. VOIT (2016). “Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both?” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408(29): 8377–8391.

KARLSSON TM, GRAHN H., VAN BAVEL, B., GELADI P. (2016) Hyperspectral imaging and data analysis for detecting and determining plastic contamination in seawater filtrates. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 24(2), 141–149.

KARLSSON, T. M., VETHAAK, A. D., ALMROTH, B. C. ARIESE, F., VAN VELZEN, M. HASSELLÖV, M. LESLIE, H. A (2017) Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation *Marine Pollution Bulletin* 122(1-2), 403–408.

KARLSSON, T. M., KÄRRMAN, A., ROTANDER, A., HASSELLÖV, M. Comparison between manta trawl and in situ pump filtration methods, and guidance for visual identification of microplastics in surface waters (2020) *Environmental Science and Pollution Research* Vol 27(5), p. 5559–5571.

- KOELMANS, A. A., MOHAMED NOR, N. H., HERMSEN, E., KOOI, M., MINTENIG, S. M., DE FRANCE, J. (2019) Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality, *Water Research*, 155: 410–422.
- LV, L. L., X. M. YAN, L. M. FENG, S. Q. JIANG, Z. F. LU, H. F. XIE, S. L. SUN, J. J. CHEN AND C. Y. LI (2021). “Challenge for the detection of microplastics in the environment.” *Water Environment Research* 93(1): 5–15.
- MAGNUSSON, K. et al. 2016 Swedish sources and pathways for microplastics to the marine environment – A review of existing data. IVL report C183, 87 pages.
- MAI, L., L. J. BAO, L. SHI, C. S. WONG AND E. Y. ZENG (2018). “A review of methods for measuring microplastics in aquatic environments.” *Environmental Science and Pollution Research* 25(12): 11319–11332.
- MASON, S. A., GARNEAU, D., SUTTON, R., CHU, Y., EHMANN, K., BARNES, J., FINK, P., PAPAIZSIMOS, D., ROGERS, D. L. (2016) Microplastic pollution is widely detected in US municipal wastewater treatment plant effluent, *Environmental Pollution* 218: 1045–1054.
- PARUTA et al. EA. *Plastic Paints the Environment*, Environmental Action 2022, ISBN 978-2-8399-3494-7.
- PRIMPKE, S., LORENZ, C., RASCHER-FRIESENHAUSEN, R. & GERDTS, G. 2017. An automated approach for microplastics analysis using focal plane array (FPA) FTIR microscopy and image analysis. *Analytical Methods*, 9, 1499–1511.
- PRIMPKE, S., S. H. CHRISTIANSEN, W. COWGER, H. DE FROND, A. DESHPANDE, M. FISCHER, E. B. HOLLAND, M. MEYNS, B. A. O’DONNELL, B. E. OSSMANN, M. PITTROFF, G. SARAU, B. M. SCHOLZ-BOTTCHER AND K. J. WIGGIN (2020). “Critical Assessment of Analytical Methods for the Harmonized and Cost-Efficient Analysis of Microplastics.” *Applied Spectroscopy* 74(9): 1012–1047.
- RENNER, G., SCHMIDT, T. C. & SCHRAM, J. 2017. A New Chemometric Approach for Automatic Identification of Microplastics from Environmental Compartments Based on FT-IR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 89, 12045–12053.
- SHIM, W. J., S. H. HONG AND S. E. EO (2017). “Identification methods in microplastic analysis: a review.” *Analytical Methods* 9(9): 1384–1391.
- SILVA, A. B., A. S. BASTOS, C. I. L. JUSTINO, J. A. P. DA COSTA, A. C. DUARTE AND T. A. P. ROCHA-SANTOS (2018). “Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry A review.” *Analytica Chimica Acta* 1017: 1–19.
- SONG, Y. K., S. H. HONG, M. JANG, G. M. HAN, M. RANI, J. LEE AND W. J. SHIM (2015). “A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples.” *Marine Pollution Bulletin* 93(1-2): 202–209.
- STOCK, F., C. KOCHLEUS, B. BANSCH-BALTRUSCHAT, N. BRENNHOLT AND G. REIFFERSCHIED (2019). “Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment – A review.” *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 113: 84–92.

STRAND, J. & LUNDSTEEN, S. 2017. Microplastic particles in seabed sediments from Inner Danish waters 2015. Aarhus University, DCE – Danish Centre for Environment and Energy, Scientific Report from DCE. Danish Centre for Environment and Energy.

VON FRIESEN, L. W., GRANBERG, M. E., HASSELLÖV, M, GABRIELSEN, G. W., MAGNUSSON, K. (2019) An efficient and gentle enzymatic digestion protocol for the extraction of microplastics from bivalve tissue. Marine Pollution Bulletin, Vol 142, P 129–134.

WANG, W. F. AND J. WANG (2018). “Investigation of microplastics in aquatic environments: An overview of the methods used, from field sampling to laboratory analysis.” Trac-Trends in Analytical Chemistry 108: 195–202.

8. Publikationer

Följande publikationer har producerats direkt inom projektet eller i direkt anslutning till projektet:

- Comparison of pre-treatment methods and heavy density liquids to optimize microplastic extraction from natural marine sediments. Karin Mattsson, Elisabet Ekstrand, Maria Granberg, Martin Hassellöv, Kerstin Magnusson. *Scientific Reports* (2022) 12(1), 15459.
- Deep Learning for Reconstructing Low-Quality FTIR and Raman Spectra – A Case Study in Microplastic Analyses Josef Brandt, Karin Mattsson and Martin Hassellöv. (2021) *Analytical Chemistry Vol 93* (49) p. 16360–16368.
- Handbook of Microplastics in the Environment. Springer. Xu JL., Hassellöv M., Yu K., Gowen A. A. (2020) *Microplastic Characterization by Infrared Spectroscopy*. In: Rocha-Santos T., Costa M., Mouneyrac C. (eds)
- Platinum vaporization-deposition coated polycarbonate membranes for versatile/comprehensive multimodal and correlative microscopic analysis of micro- and nanoplastics and other environmental particles. Karin Mattsson, Mats Hagberg, Martin Hassellöv (manuskript inskickat till *Analytica Chimica Acta*).
- Distribution of small microplastics in Swedish drinking waters elucidated by new clean sampling techniques Karin Mattsson, Olof Bergstedt, Martin Hassellöv (manuskript under skrivande till *Water Research*).
- Methods for the detection and characterization of boat paint microplastics in the marine environment (2023) Andreas Gondikas, Karin Mattsson and Martin Hassellöv. *Frontiers in Environmental Chemistry*, 4:1090704.
- Shades of grey – Tire characteristics and road surface influence tire & road wear particle (TRWP) abundance and physicochemical properties (2023) Tim Wilkinson, Juliana Aristeia De Lima, Ida Järtskog, Mats Gustafsson, Yvonne Andersson-Sköld, Martin Hassellöv. *Frontiers Environmental Science* (inskickat manuskript).
- Tyre and road wear particles from source to sea. (2023) Karin Mattsson, Juliana Aristéia de Lima, Tim Wilkinson, Ida Järtskog, Elisabet Ekstrand, Yvonne Andersson-Sköld, Mats Gustafsson och Martin Hassellöv *Microplastics and Nanoplastics* (2023) 3:14.

Rapporten uttrycker nödvändigtvis inte Naturvårdsverkets ställningstagande. Författaren svarar själv för innehållet och anges vid referens till rapporten.

Utveckling av analysmetoder för mikroplast i miljöprover för forskning och miljöövervakning

För att förstå vilken miljöpåverkan som mikroplast orsakar och vilka åtgärder som är lämpliga är tillförlitliga mätmetoder av yttersta vikt. Trots att det länge varit ett prioriterat område är forskningsbehovet fortfarande stort.

Mätmetoder för mikroplaster är en utmaning i sig och inom miljöövervakning vill man dessutom att metoden ska vara enkel, robust och kostnadseffektiv. Det här forskningsprojektet har undersökt användningen av så kallad korrelativ mikroskopi, med målet att ta fram förenklade metoder att användas i miljöövervakning.

För miljöövervakningsbehov har en mätmetod runt en ny kortvågsinfraröd hyperspektralkamera utvecklats, med goda preliminära resultat. Metoden kan skilja mikroplast från naturliga partiklar samt i viss mån urskilja olika polymerer från varandra. Nästa steg blir att integrera kameran i ett motoriserat mikroskop.

Dessutom har flera olika metoder för forskningsbehov tagits fram. Bland annat har ett nytt nano-platinabelagt filter utvecklats, liksom infraröd absorptionsspektroskopi (FTIR) med avseende på mjukvarukontroll av mikroskop. Även bildupptagning och dataanalys med en öppen källkodsmjukvara har tagits fram.

För vissa specialfall, till exempel båtbottnfärgpartiklar eller däckslitagepartiklar, har det visat sig att varken FTIR eller Ramanmikroskopi är särskilt effektiva identifieringsmetoder, men att en kombination av ljus- och svepelektronmikroskopi kunnat identifiera partiklarna.