

# Andromeda

## Analysis techniques for quantifying nano- and microplastic particles and their degradation in the marine environment

### Context

Dit rapport vat de projectresultaten samen van ILVO en VLIZ binnen het JPI OCEANS project ANDROMEDA. In het Andromeda-project wordt een breed gamma aan analysemethodes voor microplastics (MPs) in het mariene milieu geoptimaliseerd, gevalideerd en geharmoniseerd.

Het werk van ILVO en VLIZ focust zich voornamelijk op zogenaamde kosteneffectieve analyses, in het bijzonder de optimalisatie van een methode om MPs te identificeren met Nijl rood-kleuring (NR - *Nile Red*). Kosteneffectieve analyses zijn analysemethoden die met een relatief (in vergelijking met de huidige veelgebruikte methoden) beperkte apparatuur- en werkingskost een robuuste identificatie en kwantificatie toelaten van MPs relevante marine matrices (bijv. water, sediment en biota). Dit is een uitdagende doelstelling, aangezien ook deze methodes een aanvaardbaar niveau van accuraatheid en precisie dienen te halen en in staat moeten zijn om een breed gamma aan polymeren te identificeren met een laag risico voor contaminatie .

Het fluorescent maken van MPs met behulp van de hydrofobe kleurstof NR laat toe om milieustalen snel te screenen op de aanwezigheid van MPs met fluorescentiemicroscopie. NR-kleuring heeft aangetoond efficiënt te zijn in het onderscheiden van MPs van niet-plastic partikels zoals amfiboden, algen, zeewieren, hout, veren, schelpen, kalk of zand. . Bovendien zorgt de interactie van NR met verschillende types polymeren voor een verschil in kleur, waardoor NR ook kan gebruikt worden om polymeren te onderscheiden op basis van fluorescentie.

De automatisering van goedkope fluorescentiekleuringstechnieken als alternatief voor vaak gebruikte, op spectroscopie gebaseerde methodieken is in het verleden al aangehaald en beperkte getest als veelbelovende alternatief voor de ontwikkeling van kosteneffectieve screeningsmethoden voor MPs analyse. De meeste van deze benaderingen zijn echter alleen gericht op MP-detectie en gebruiken "black-box" modellen in plaats van "white-box" modellen, welke een transparante interne structuur hebben en informatie op een visuele en duidelijke manier weergeven. Bovendien was bij de start van het project de interactie tussen NR en polymeren op basis van hun chemische eigenschappen nog niet grondig onderzocht en biedt dit mogelijkheden voor de ontwikkeling van geavanceerdere high-throughput, kosteneffectieve analysemethoden die zowel MP-detectie als polymeeridentificatie mogelijk maken.

### Objectieven

De belangrijkste projectdoelstellingen voor ILVO en VLIZ in het Andromeda-project waren:

#### 1. Microplasticanalyse met behulp van fluorochromen

- De ontwikkeling van een efficiënte, semi-automatische, ex-situ methode om MPs te identificeren gebaseerd op NR-kleuring, waarbij ook de verschillende polymeren kunnen onderscheiden worden.

- Het optimaliseren van de analyseprotocollen voor NR-gebaseerde methodes voor MP-extractie uit zeewater, sediment en biota, alsook het valideren van de analyseprotocollen.
- Het toepassen van de ontwikkelde en gevalideerde methodes op reële stalen, waardoor een beter beeld wordt gevormd van microplasticvervuiling op het Belgisch Deel van de Noordzee, meer specifiek op de afval-hotspot Loswal Zeebrugge-Oost en referentiezones.
- Het uitvoeren van een verkennende studie naar de combinatie van flowcytometrie met microplastickleuring om een tijdsefficiënte, semi-automatische in-situ analyse te bekomen om microplastic in zeewater te kunnen analyseren aan boord van schepen.

## 2. Kosteneffectiviteitsanalyse

- Het uitvoeren van een kost-effectiviteitsanalyse van veel gebruikte methodes voor de analyse van MPs in zeewater. De analyse is gebaseerd op data gegenereerd door middel van een enquête ingevuld door experts in deze analyses. Dit dient te leiden tot waardevolle informatie voor wetenschappers, beleid en andere stakeholders die dienen te kiezen voor de meest optimale methode om hun doelstellingen te realiseren.

## **Conclusies**

De belangrijkste uitkomst van de ILVO-VLIZ samenwerking binnen het Andromeda-project is de optimalisatie en validatie van een NR-gebaseerde analysemethode voor de identificatie van MPs in verschillende mariene matrices. Een 2-staps semi-automatische classificatiemethode werd ontwikkeld die kwantificatie op basis van RGB-kleuren combineert met geautomatiseerde beeldanalyse van NR-gekleurde partikels, gefotografeerd onder een fluorescentiemicroscop. Dit gebeurt op basis van een gesuperviseerde machinaal leren classificatie met een beslissingsboom-model, ontwikkeld in een open-source omgeving gebruik makend van de softwarepakketten ImageJ and Rstudio. Twee modellen werden ontwikkeld: een eerste model, het plasticdetectiemodel (PDM) kan met hoge accuraatheid een onderscheid maken tussen plastic en non-plastic partikels gebaseerd op de fluorescentie (95,8% correct geclassificeerde items, het tweede model, het polymeeridentificatiemodel (PIM), laat toe om plastic polymeren te onderscheiden (88,1% correct geclassificeerde items).

Aanvullende testen met artificieel verwerde plastics toonden een verlaagde accuraatheid van de ontwikkelde modellen. Voor verdere optimalisatie werd de dataset uitgebreid van 2x60 tot 2x500 partikels (PDM) en van 7x30 tot 7x200 partikels (PIM). Bovendien werd een random forest algoritme toegepast, wat leidde tot hogere accuraatheid dan beslissingsboommodellen (>90% and >80% accuraatheid voor PDM en PIM, respectievelijk). Dit verbeterd model werd toegepast voor verdere microplasticanalyse.

Door bepaling van de laagst detecteerbare partikelgrootte, kon aangetoond worden dat partikels tot kleiner dan 10  $\mu\text{m}$  met grote accuraatheid konden bepaald worden. Een tweede reeds van random forest modellen werd gebouwd door middel van beelden met fluorescentiestereomicroscop in plaats

van fluorescentiemicroscoop, wat de analyse van een volledige filter in 1 beeld mogelijk maakt. Testen van de modellen op beide toestellen toonde aan dat toestelspecifieke trainingdatasets noodzakelijk zijn om een hoge accuraatheid en een betrouwbaar analyseresultaat te halen.

De protocollen werden geoptimaliseerd voor de detectie van MPs in mariene matrices zeewater, sediment en mariene biota (mosselen, zwemkrab). De protocollen werden gevalideerd en speciale aandacht werd besteed aan de kwaliteitscontrole. De protocollen werden succesvol toegepast om MPs te extraheren uit stalen van en nabij de baggerloswal Zeebrugge Oost, alsook op referentielocaties. De analyse van de microplasticvervuiling op deze locaties is momenteel lopende.

Experimenten werden opgezet die flowcytometrie met NR-kleuring combineerden, om een in-situ methode te ontwikkelen om MPs tot 1  $\mu\text{m}$  grootte te detecteren, zonder staalvoorbereiding. Verkennende resultaten toonden aan dat de bekomen fluorescentiesignalen toelaten om MPs en organisch materiaal te onderscheiden, gebruik makend van het K-Nearest Neighbors (K-NN) algoritme, een eenvoudig, gesuperviseerd machine learning algoritme.

Tot slot werd een voorspellende applicatie ontwikkeld om de kost-effectiviteit van een methode voor MP-analyse te evalueren. Dit gebeurde op basis van de resultaten van een enquête die werd uitgezonden naar Europese experts in MP-analyse. In de toekomst zal deze applicatie onderzoekers, beleidsmakers en innovatoren een overkoepelend inzicht geven in de optimale te gebruiken methode om hun project- of monitoringsdoelstellingen te realiseren, specifiek voor de analyse van zeewaterstalen. De methode kan bovendien ook van hulp zijn voor beleid en marien management.

### **Keywords**

Microplastics, Fluorescentiemicroscopie, Nijl rood, Machine learning, Artificial intelligence, Verweerde plastics, Validatie, kost-effectiviteitsanalyse.