

Быстрый автоматизированный анализ микропластиков с помощью системы визуализации химических свойств на основе прямой лазерной ИК-спектроскопии (LDIR)

Характеризация и количественное определение микропластиков в пробах морской воды



Авторы

Lars Hildebrandt (Ларс Хильдебрандт), Fadi El Gareb (Фади Эль Гарерб), Tristan Zimmermann (Тристан Циммерман), Ole Klein (Оле Кляйн), Kay-Christian Emeis (Кай-Кристиан Эмаис), Daniel Proefrock (Даниэль Профрок),¹ Andreas Kerstan (Андреас Керстан)²

¹ Институт береговых исследований, Helmholtz-Zentrum. Geesthacht, Германия

² Agilent Technologies.

Введение

По разным оценкам более 75% из 8,3 миллиардов тонн пластика, произведенных за последние 65 лет, превратились в отходы (1). Ежегодно в мировой океан попадает до 13 тонн этих отходов (2), и, по последним оценкам, в нем уже плавает более 5,25 миллиардов отдельных частиц пластика (3).

Исследования показали пугающую повсеместную распространенность и устойчивость частиц пластика в водных экосистемах (4). Модели предсказывают, что приблизительно 14% всего пластикового мусора в приповерхностных слоях мирового океана можно отнести к категории т. н. микропластиков, к которым обычно относят частицы размером от 1 мкм до 5 мм (5). Эти не перевариваемые и потенциально вредные для организма частицы образуются в результате вызванного ультрафиолетом механического и биологического разложения крупного мусора (6). Для проверки этих оценок и для того, чтобы иметь возможность выполнить требования вступающих вскоре в действие нормативных актов, таких как билль сената Калифорнии № 1422 или директивы MSFD и 2008/56/EC, необходимы точные, быстрые и надежные методики и методы анализа.

Подходящие методы должны быть способны определить размер, форму и тип полимера, из которого состоят микрочастицы пластика, а также быстро определить количество микрочастиц каждого типа. На момент написания этой статьи отсутствие гармонизации и типовых регламентов привело к тому, что многие исследования полагаются либо на визуальную идентификацию, либо на анализ возможных микрочастиц пластика вручную с помощью инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (FTIR) или спектроскопии комбинационного рассеяния. Эти методы отнимают много времени и подвержены ошибкам оператора. В данной работе мы представляем инновационную методику анализа микрочастиц пластика, использующую метод визуализации химических свойств на основе прямой лазерной ИК-спектроскопии (LDIR).

Экспериментальная часть

Отсутствие типовых регламентов испытаний для подготовки и анализа проб микрочастиц пластика привело к появлению множества прикладных методик, которые зачастую приводят к загрязнению пробы, отнимают много времени или позволяют обрабатывать только недостаточные для того, чтобы быть репрезентативными, объемы воды (7). В данной работе мы разработали и применили на практике процедуры для всех этапов анализа, в том числе отбора проб, минерализации и микроспектроскопического анализа методом LDIR. Во время работы принимались самые строгие меры, чтобы предотвратить загрязнение и расслоение проб. Для количественного определения оставшихся загрязнений использовались процедурные холостые пробы. Вся лабораторная работа проводилась на чистых столах (в ламинарных шкафах), как в лаборатории, так и на борту исследовательского судна. Используемые ламинарные шкафы обеспечивали очистку воздуха от порядка 99,995% частиц размером более 0,1 мкм (согласно требованиям стандарта EN1822 1). Кроме того, воздух в лабораториях пропускаться через фильтры для очистки воздуха Dustbox¹.

Отбор проб

Пробы отбирались в Индийском океане во время перехода Sonne 270 (2019 г.) из Гонконга в Порт-Луи (рис. 1). Пробы отбирались в обширной области океана, простирающейся от западного побережья индонезийской части о. Суматра до восточного побережья о. Мадагаскар.



Рис. 1. Места отбора проб во время перехода через Индийский океан

¹ www.dustbox.de.

Пробы отбирались с помощью системы фракционирования микрочастиц пластика Geesthacht (GIMPF), показанной на рис. 2, которая позволяла выделять из морской воды большие объемы взвешенных твердых частиц размером 10 мкм и более. Двухканальная система GIMPF позволяла в поточном режиме разделять взвешенные твердые частицы на две фракции (по размеру ячеек сетки фильтров в патронах из нержавеющей стали) — более 300 мкм и от 10 мкм до 300 мкм включительно. В проточную систему подавалась морская вода из водолазной шахты судна, находившейся на глубине 6 м ниже уровня моря. Вся система отбора проб была выполнена из нержавеющей стали AISI-316L и смонтирована на алюминиевой плите. Все уплотнения защищались фторопластовыми чехлами для снижения риска загрязнения системы отбора проб. После отбора пробы в каждой из точек система промывалась в обратном направлении через фильтры размером 2 мкм в задней части GIMPF. Суммарный объем всех взятых проб воды составил 61 м³. Из фильтрующих патронов пробы переносились путем фильтрования под вакуумом на фторопластовые и поликарбонатные мембранные фильтры с размером пор 5 мкм и хранились в бутылках из янтарного стекла.



Рис. 2. Вид спереди и сзади системы фракционирования микрочастиц пластика Geesthacht (GIMPF)

Пробоподготовка и валидация методики

Вся лабораторная посуда перед использованием ополаскивалась три раза очищенной водой из установки Milli Q и профильтрованным 30% этанолом. Для удаления мешающих органических и неорганических компонентов матрицы фракция с размером частиц 10–300 мкм минерализовалась по ферментной и окислительной методике. Пробы обрабатывались протеиназой K, H₂O₂ с Fe²⁺ в качестве катализатора и хитиназой (рис. 3), после чего разделялись по плотности в растворе ZnCl₂ с плотностью $\rho = 1,7$ г/мл⁻¹.

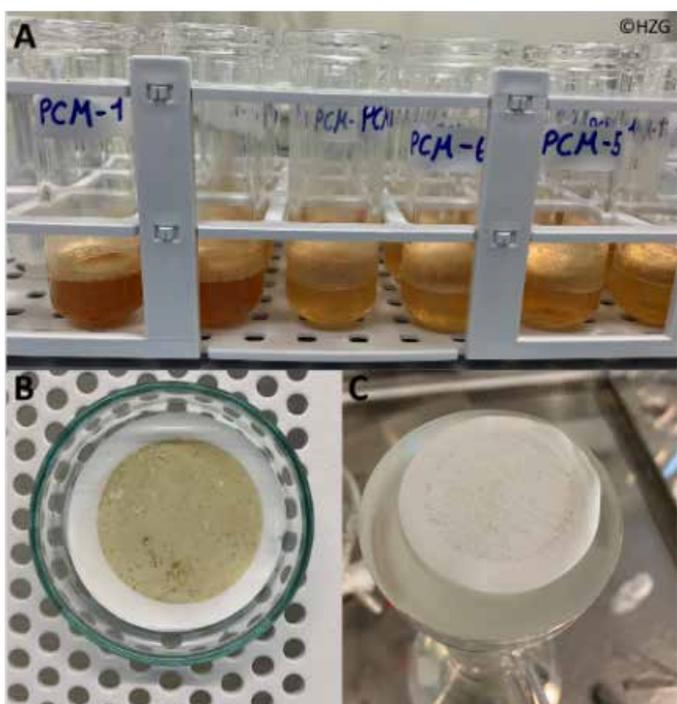


Рис. 3. Ферментная и окислительная минерализация. **А:** каталитическое разложение остатка H_2O_2 добавлением Fe^{2+} . **В:** проба до минерализации матрицы (на мембранном фильтре из ПТФЭ). **С:** проба после минерализации матрицы

Оборудование

Для идентификации и количественного определения микропластиков в пробах использовалась лазерная система визуализации химических свойств на основе прямой лазерной ИК-спектроскопии (LDIR) Agilent 8700. Метод LDIR, как следует из его названия, использует в качестве источника излучения квантово-каскадный лазер. Это полупроводниковый лазер, в котором электроны излучают свет, туннелируя через ряд квантовых колодцев, что позволяет быстро изменять длину волны лазера в широком диапазоне значений волновых чисел (λ^{-1}), в данном случае от 1 800 до 975 cm^{-1} . В сочетании с охлаждаемым точечным детектором на теллуриде кадмия-ртути (МСТ) и быстросканирующей оптикой это позволяет реализовать два режима работы. В первом LDIR выбирает одну длину волны и сканирует через объектив, в то время как он с большой скоростью перемещается над пробой (режим трансфлексии ИК-излучения через образец). Во втором режиме объектив остается в одной точке, в то время как лазер сканирует диапазон длин волн, снимая полный спектр менее чем за одну секунду.

В методике анализа микропластиков используются оба этих режима. Сначала в режиме сканирования поверхность пробы быстро сканируется на одной длине волны. Полученное ИК-изображение используется для того, чтобы найти частицы на поверхности пробы, и для того, чтобы охарактеризовать их размер и форму. После того как все частицы найдены, LDIR быстро и автоматически перемещает объектив к каждой из них, чтобы снять полный спектр в диапазоне длин волн лазера. Полученный спектр частицы немедленно, в режиме реального времени, сравнивается с библиотекой спектров микропластиков. Для каждой частицы находится и выводится спектр, максимально совпадающий с библиотечным.

Библиотека скомпилирована по данным из надежных источников и включает в себя набор спектров, нужных для анализа микропластиков в пробах морской воды.

Прибор использует широкоугольную камеру для получения изображения пробы в целом и объектив класса микроскопа для получения изображений с большим увеличением по мере необходимости. Полностью автоматизированный анализ 800 частиц и сравнение снятых с них спектров с базой данных занимает около одного часа.

Анализ проб

Очищенные пробы (с частицами размером менее 300 мкм) диспергировались в 50% этаноле и осаждались на предметные стекла с отражающим ИК-излучение покрытием (7,5 × 2,5 см, MirrIR, Kevley Technologies). Затем предметные стекла анализировались в режиме трансфлексии ИК-излучения через пробу автоматизированной системой LDIR с квантово-каскадным лазером (Agilent 8700 производства Agilent Technologies). Для всех анализов применялся протокол, имеющийся в программе Agilent Clarity версии 1.1.2, управлявшей прибором LDIR. Чувствительность устанавливалась на максимум, а спектральное разрешение — на 8 cm^{-1} . В данной работе анализировались частицы размером 20–5 000 мкм, однако в автоматическом режиме методику можно применять для анализа частиц размером до приблизительно 10 мкм.

Автоматизированная методика программы Agilent Clarity снимает ИК-спектр каждой частицы и в режиме реального времени выполняет поиск по базе данных (более 420 эталонных спектров) и обработку данных. Статистическая обработка, а также пороговые значения для регистрации совпадения спектров были адаптированы к целям анализа. После выполнения автоматизированной методики результаты проверялись вручную в режиме трансфлексии ИК-излучения через пробу, а также выборочно с использованием функции микро-НПВО прибора LDIR.

Потенциальные микропластиковые волокна размером более 300 мкм анализировались с помощью ИК-Фурье-спектроскопии в режиме НПВО (на алмазном или германиевом кристалле), а также с помощью LDIR в обоих режимах — трансфлексии ИК-излучения через пробу и микро-НПВО. Полученные в режиме НПВО ИК-Фурье-спектры сравнивались с базой данных siMPle (<https://simple-plastics.eu>). Однако в данной работе мы не будем подробно рассматривать фракции с размером частиц более 300 мкм.

Валидация методики

На текущий момент на рынке недоступны сертифицированные эталонные стандарты микропластиков. Поэтому для валидации методики применялись полученные на месте эталонные частицы полиэтилена, полиэтилентерефталата, полипропилена и поливинилиденхлорида размером 20–500 мкм (7). Описанная выше методика позволила правильно идентифицировать более 95% частиц. В работе также использовался сертифицированный эталонный стандарт с совпадающей матрицей (планктон, BCR-414, JRC) (рис. 4). Для обоих анализов использовалась расширенная библиотека спектров LDIR Agilent 8700 с добавлением спектров частиц пластиков природного и антропогенного происхождения.

Таблица 1. Объем профильтрованной воды, место отбора пробы и количество микрочастиц пластика в каждой пробе. В этой же таблице приведен самый распространенный тип полимера в каждой пробе

| Проба | Объем пробы (м ³) | Координаты | Количество частиц и волокон | Количество микрочастиц и микроволокон пластика | Тип наиболее распространенных микрочастиц пластика (кол-во) | Концентрация микрочастиц пластика (1/м ³) |
|-------|-------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|--|---|---|
| 1 | 2,3 | 07°17,86' ю. ш., 97°45,85' в. д. | 3 150 | 47 | ПЭТ (20) | 21 |
| 2 | 5,7 | 07°33,607' ю. ш. 95°59,252' в. д. | 524 | 54 | ПЭТ (32) | 10 |
| 3 | 1,1 | 08°08,165' ю. ш. 92°05,016' в. д. | 2 112 | 67 | ПП (22) | 62 |
| 4 | 1,3 | 08°20,93' ю. ш. 90°38,76' в. д. | 16 687 | 293 | Акрилаты/полиуретаны/ лаки (116) | 226 |
| 5 | 1,3 | 08°55,25' ю. ш. 86°45,32' в. д. | 2 938 | 109 | ПЭТ (40) | 86 |
| 6 | 1,4 | 09°06,639' ю. ш. 85°27,92' в. д. | 5 110 | 239 | Акрилаты/полиуретаны/ лаки (69) | 165 |
| 7 | 1,4 | 09°32,11' ю. ш. 82°34,58' в. д. | 857 | 15 | ПС (5) | 11 |

В отличие от других исследований, в которых анализировалась только часть суспендированной пробы или небольшая площадь отфильтрованной пробы (9, 10), протокол минерализации и метод LDIR в сочетании с предметным стеклом большого размера позволили проанализировать каждую пробу целиком. Этот метод измерения позволяет снизить погрешность, вносимую экстраполяцией.

Как показано на рис. 8, очень важно анализировать спектр каждой частицы, не ограничиваясь только визуальной идентификацией, так как зачастую бесцветные частицы очень похожи на частицы природного происхождения (даже для округлых частиц).

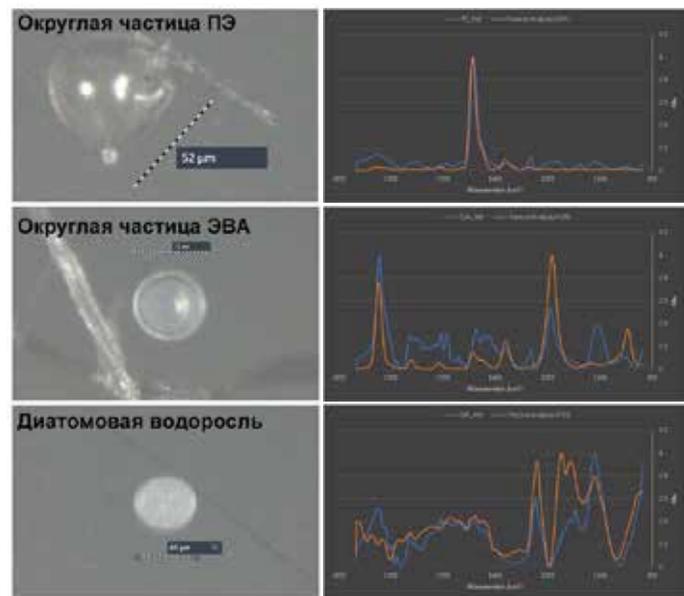


Рис. 8. Изображения (слева) и ИК-спектры (в сравнении с наилучшим совпадением из библиотеки) двух округлых микрочастиц пластика (полиэтилена и этиленвинилацетата). На нижнем изображении показана диатомовая водоросль, идентифицированная в пробе с помощью анализа LDIR

На рис. 9 показан пример микрочастицы пластика, соединенной с природной частицей, в данном случае – диатомовой водорослью. В этом примере для того, чтобы подтвердить тип полимера, применялась функция микро-НПВО (очень хорошее совпадение с библиотечным спектром). Нам даже удалось прижать кристалл непосредственно к частице, прикрепленной к диатомовой водоросли, чтобы проверить результат автоматизированного анализа.

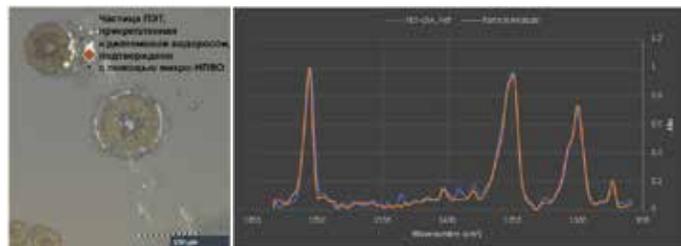


Рис. 9. Видимое изображение (слева) и ИК-спектр, полученный с помощью функции микро-НПВО (в сравнении с лучшим совпадением из библиотеки) частицы ПЭТ (помеченной оранжевым маркером), соединенной с диатомовой водорослью

Учитывая коэффициент вытянутости (соотношение сторон), равный 3 (11), большинство микрочастиц пластика были фрагментами, а не микроволокнами. Распознавание волокон – непростая задача, особенно для подходов, использующих распознавание по одной точке, однако LDIR позволяет легко идентифицировать волокна (как показано на рис. 6) в образцах из окружающей среды.

Существует научный консенсус по вопросу погрешности измерения из-за взвешенных в воздухе волокон (12). Поэтому использование ламинарных шкафов может объяснить низкую долю микроволокон по сравнению с другими исследованиями.

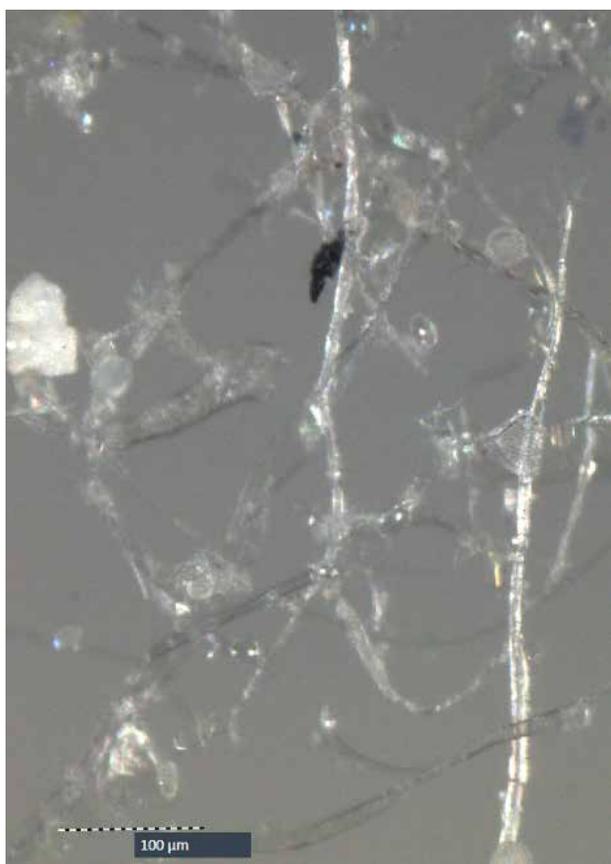


Рис. 10. Видимое изображение агрегата волокон целлюлозы и природных частиц, записанное LDIR

Для анализа запутанных волокон (на присутствие включений полимеров), а также агрегатов частиц (рис. 10) применяется функция сканирования на длине волны выбранного вручную пика (рис. 11) или функция гиперспектрального сканирования прибора LDIR.

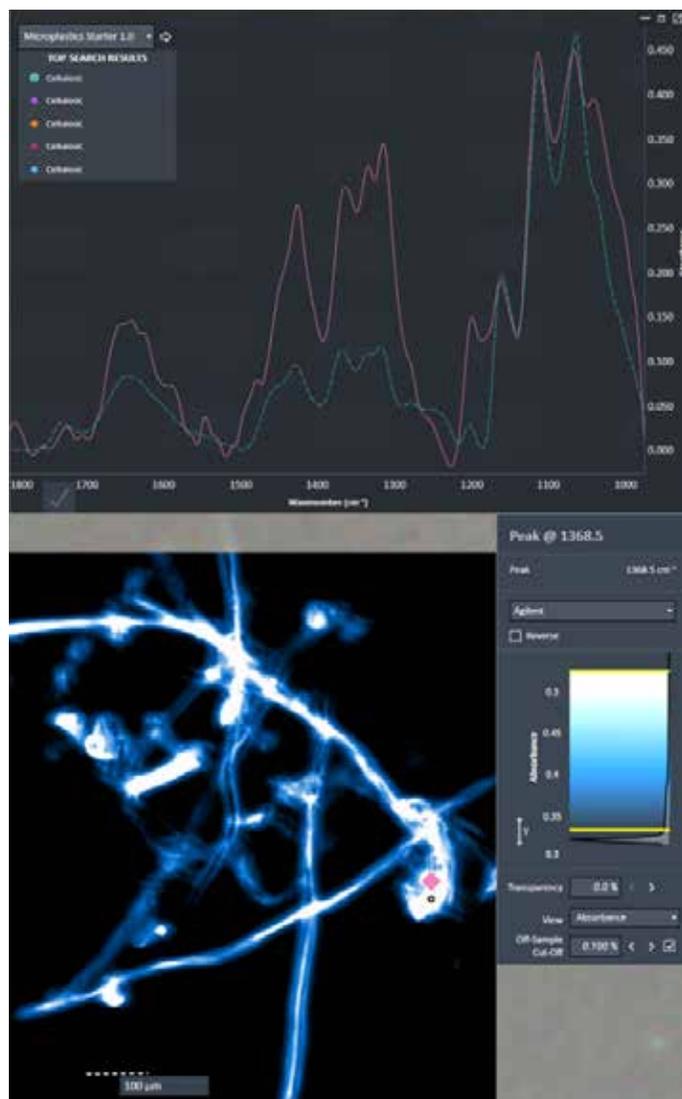


Рис. 11. ИК-изображение на длине волны выбранного пика ($\tilde{\nu} = 1\,368,5\text{ см}^{-1}$) (внизу справа) и ИК-спектр (вверху) агрегата волокон целлюлозы и частиц природного происхождения, показанного на рис. 10

Многопиковый анализ в сочетании с режимом микро-НПВО позволяет получить ценную информацию о частицах, выборочно покрытых биопленками. Например, на рис. 12 показана большая частица полиуретана, некоторые участки которой показывают отчетливый ИК-спектр целлюлозы, в то время как другие — спектры полиуретана и акрилата. Оба результата были подтверждены анализом вручную в режимах трансфлексии ИК-излучения через пробу и микро-НПВО. LDIR не только позволяет хорошо разделить спектры от таких участков разного состава агрегированных частиц из окружающей среды, но и дает возможность изучать частицы, состоящие из смесей полимеров и композитов. Многопиковый анализ помогает идентифицировать различные компоненты таких смесей в микрочастицах пластиков из окружающей среды.

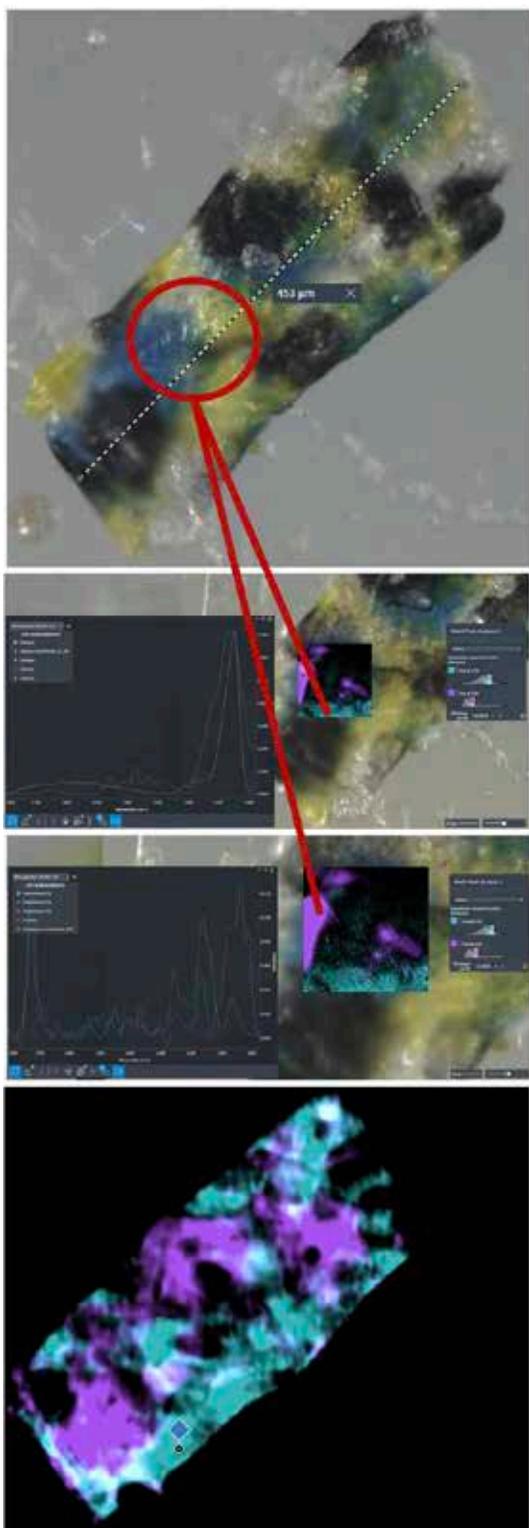


Рис. 12. Предположительно частично покрытая биопленкой частица полиуретана (вверху) во время анализа в многопиковом режиме (внизу) демонстрирует сильное поглощение при $\tilde{\nu} = 1\,045\text{ см}^{-1}$ и $\tilde{\nu} = 1\,730\text{ см}^{-1}$ (в середине). Спектр фиолетовых участков хорошо согласуется с эталонным спектром целлюлозы (второй рисунок), а голубых — со спектром полиуретана и акрилатов (третий рисунок)

Сравнение с другими исследованиями микропластиков

Несмотря на то что взаимному сравнению исследований мешает применение различных методик отбора и анализа проб, найденная нами концентрация ($10\text{--}226\text{ л/м}^3$) хорошо согласуется с другими исследованиями, которые использовали ИК-Фурье или Рамановскую микроспектроскопию. Lorenz *et al.* (2019) нашли в образцах рыболовецких сетей, использовавшихся в приповерхностных слоях южной части Северного моря, от 0,1 до $245,4\text{ л/м}^3$ микропластиков (9). Enders *et al.* (2015) обнаружили в пробах, взятых в Атлантическом океане (3 м ниже поверхности воды) с помощью фракционирующего фильтрующего устройства, от 13 до 501 л/м^3 микропластиков (13). Согласно данным моделирования и наблюдений, концентрация микропластиков в приповерхностных слоях может быть до 30 раз выше, чем в толще воды (14–16). Поэтому вполне вероятно, что места отбора проб отличаются относительно высоким загрязнением частицами пластика, которые в основном концентрируются на поверхности моря.

Мы считаем, что обнаруженные во время исследования типы полимеров поддерживают эту гипотезу. Плотность второго (ПЭТ), третьего (хлорированный полиэтилен) и четвертого (поливинилхлорид) наиболее распространенных типов полимеров, найденных в ходе этого исследования, как правило превышают плотность морской воды (наиболее распространенный тип полимера — акрилаты/полиуретаны/лаки — имеют значительно более широкий разброс плотностей). Интересно отметить, что полимеры низкой плотности, полиэтилен и полипропилен, которые вместе занимают порядка 50% всего объема производимых полимеров, среди обнаруженных микропластиков составляли только 5,2% каждый. Эти полимеры остаются на поверхности до тех пор, пока биологическое обрастание не приведет к их затоплению и они не опустятся на дно моря. Однако эта гипотеза требует проверки, например путем отбора проб на разной глубине (глубинное профилирование).

Выводы

Метод визуализации химических свойств на основе прямой лазерной ИК-спектроскопии (LDIR) был успешно применен для поиска и характеристики микропластиков и микроволокон пластика в пробах морской воды большого объема.

Результаты указывают на сравнительно высокую загрязненность взятых проб микропластиками.

Результаты автоматизированной методики были тщательно проверены визуальными наблюдениями как минимум пятью измерениями вручную в режиме трансфлексии ИК-излучения и выборочно анализом в режиме микро-НПВО. Для фракции с размером частиц более 300 мкм результаты LDIR, полученные с использованием признанной базы данных спектров микропластиков, и результаты традиционного ИК-Фурье-анализа в режиме НПВО хорошо совпадали друг с другом. Расширение базы данных типичными спектрами матрицы позволило дополнительно повысить точность методики.

Благодаря высокой скорости и высокой степени автоматизации этот метод демонстрирует хороший потенциал и может стать стандартным микроспектроскопическим методом исследования, например в ходе крупномасштабных исследований микропластиков пластика или для целей мониторинга, для которых скорость сбора данных имеет решающее значение.

Литература

1. Geyer, R., J.R. Jambeck, and K.L. Law, *Production, use, and fate of all plastics ever made*. Science Advances, **2017**, 3(7): p. e1700782.
2. Jambeck, J.R., R. Geyer, C. Wilcox, T.R. Siegler, M. Perryman, A. Andrady, R. Narayan, and K.L. Law, *Plastic waste inputs from land into the ocean*. Science, **2015**, 347(6223): p. 768.
3. Eriksen, M., L. Lebreton, H. Carson, M. Thiel, C. Moore, J. Borerro, F. Galgani, P. Ryan, and J. Reisser, *Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea*. PLoS ONE, **2014**, 9.
4. Ivleva, N.P., A.C. Wiesheu, and R. Niessner, *Microplastic in Aquatic Ecosystems*. Angewandte Chemie International Edition, **2017**, 56(7): p. 1720-1739.
5. Koelmans, A., M. Kooi, K. Law, and E. Seville, *All is not lost: Deriving a top-down mass budget of plastic at sea*. Environmental Research Letters, **2017**, 12.
6. Song, Y.K., S.H. Hong, M. Jang, G.M. Han, S.W. Jung, and W.J. Shim, *Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion on Microplastic Fragmentation by Polymer Type*. Environmental Science & Technology, **2017**, 51(8): p. 4368-4376.
7. Hildebrandt, L., N. Voigt, T. Zimmermann, A. Reese, and D. Proefrock, *Evaluation of continuous flow centrifugation as an alternative technique to sample microplastic from water bodies*. Marine Environmental Research, **2019**, 151: p. 104768.
8. Domogalla-Urbansky, J., P.M. Anger, H. Ferling, F. Rager, A.C. Wiesheu, R. Niessner, N.P. Ivleva, and J. Schwaiger, *Raman microspectroscopic identification of microplastic particles in freshwater bivalves (Unio pictorum) exposed to sewage treatment plant effluents under different exposure scenarios*. Environ Sci Pollut Res Int, **2019**, 26(2): p. 2007-2012.
9. Lorenz, C., L. Roscher, M.S. Meyer, L. Hildebrandt, J. Prume, M.G.J. Löder, S. Primpke, and G. Gerdt, *Spatial distribution of microplastics in sediments and surface waters of the southern North Sea*. Environmental Pollution, **2019**, 252: p. 1719-1729.
10. Domogalla-Urbansky, J., P.M. Anger, H. Ferling, F. Rager, A.C. Wiesheu, R. Niessner, N.P. Ivleva, and J. Schwaiger, *Raman microspectroscopic identification of microplastic particles in freshwater bivalves (Unio pictorum) exposed to sewage treatment plant effluents under different exposure scenarios*. Environmental Science and Pollution Research, **2019**, 26(2): p. 2007-2012.
11. Cole, M., *A novel method for preparing microplastic fibers*. Scientific Reports, **2016**, 6(1): p. 34519.
12. Prata, J.C., J.L. Castro, J.P. da Costa, A.C. Duarte, T. Rocha-Santos, and M. Cerqueira, *The importance of contamination control in airborne fibers and microplastic sampling: Experiences from indoor and outdoor air sampling in Aveiro, Portugal*. Marine Pollution Bulletin, **2020**, 159: p. 111522.
13. Enders, K., R. Lenz, C.A. Stedmon, and T.G. Nielsen, *Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10\mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution*. Marine Pollution Bulletin, **2015**, 100(1): p. 70-81.
14. Kooi, M., J. Reisser, B. Slat, F.F. Ferrari, M.S. Schmid, S. Cunsolo, R. Brambini, K. Noble, L.-A. Sirks, T.E.W. Linders, R.I. Schoeneich-Argent, and A.A. Koelmans, *The effect of particle properties on the depth profile of buoyant plastics in the ocean*. Scientific Reports, **2016**, 6(1): p. 33882.
15. Brunner, K., T. Kukulka, G. Proskurowski, and K.L. Law, *Passive buoyant tracers in the ocean surface boundary layer: 2. Observations and simulations of microplastic marine debris*. Journal of Geophysical Research: Oceans, **2015**, 120(11): p. 7559-7573.
16. Lenaker, P.L., A.K. Baldwin, S.R. Corsi, S.A. Mason, P.C. Reneau, and J.W. Scott, *Vertical Distribution of Microplastics in the Water Column and Surficial Sediment from the Milwaukee River Basin to Lake Michigan*. Environmental Science & Technology, **2019**, 53(21): p. 12227-12237.

Дополнительная информация

Данная методика включает в себя незаконченную работу, в том числе разработку методики и большой набор данных, которые планируется опубликовать в рецензируемых научных журналах.

www.agilent.com/chem

DE.6083912037

Информация в этом документе может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2020
Напечатано в США 12 октября 2020 г.
5994-2421RU