

Forslag til målemetode til brug for undersøgelser af mikroplast i taphanevand

Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 22. januar 2018

Jakob Strand

Institut for Bioscience

Rekvirent:
Miljøstyrelsen
Antal sider: 11

Faglig kommentering:
Karsten Dahl
Kvalitetssikring, centret:
Susanne Boutrup



AARHUS
UNIVERSITET

DCE - NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Tel.: +45 8715 0000
E-mail: dce@au.dk
<http://dce.au.dk>

Indhold

1	Baggrund	3
2	Beskrivelse af metode	4
2.1	Prøvetagning	4
2.2	Klargøring af prøvetagnings- og analyseudstyr	4
2.3	Analysemetode	4
3	Validering af målemetoden	6
3.1	Vedr. analyse af mikroplastpartikler med størrelser på <math><100\ \mu\text{m}</math>	9
4	Konklusion	10
5	Reference	11

1 Baggrund

DCE har for Miljøstyrelsen i perioden oktober 2017 – januar 2018 arbejdet på udvikling af en pålidelig metode til analyse af mikroplast i drikkevand. Udgangspunktet har været, at der som en del af metoden skulle udvikles prøvetagningsudstyr, der kan sættes direkte på de vandhaner (taphaner), som prøverne tages fra for at eliminere risikoen for forurening af prøverne under prøvetagningen mest muligt.

Fokus har i første omgang være på analyser af mikroplastpartikler som fragmenter og fibre med størrelser/længder på mere end 100 μm . Denne nedre grænse for partikelstørrelser er samme grænse som i de tidligere omtalte danske og amerikanske undersøgelser af drikkevand (Strand 2017a,b).

2 Beskrivelse af metode

2.1 Prøvetagning

Det udviklede prøvetagningsudstyr er baseret på følgende dele

- Et vandretliggende konisk filtreringskammer af rustfrit stål, hvori partikler med både høj og lav densitet vil blive tilbageholdt.
- Et filter bestående af et rustfrit trådstålnet med maskestørrelse på 20 µm til opsamling af partikler.
- En flowmåler påsat vandudtaget efter filtreringen til måling af det volumen, der har passeret filtreringskammeret i tidsrummet for prøveopsamlingen.

Med dette system filtreres vandprøverne direkte ved udtaget fra taphaner. Prøvevolumenet har indtil videre været på 50 liter. Prøverne er blevet udtaget med et vandflow på ~2,5 liter per minut, dvs. over en periode på ca. 20 minutter. Større prøvetagningsvolumener kan dog også tages i brug, hvis det vurderes relevant.

Efter endt prøvetagning vendes prøvetagningssystemet om, så systemet kan skylles rent bagfra (modsat retning af prøveopsamlingen). Først tilsættes bagfra 20 ml filtreret koncentreret detergentopløsning (sulfo), hvorved plastpartikler nemmere vil slippe overflader, som de kan have sat sig på. De på stålfilteret opsamlede partikler opsamles derefter på et hvidt MCE filter (mixed cellulose ester, som består af nitrocellulose, ADVANTEC) med porestørrelse på 5 µm ved igen at skylle systemet i modsat retning med 5-10 liter filtreret vand.

Både det anvendte skyllevand og detergent opløsning er filtreret med 5 µm filtre før brug.

2.2 Klargøring af prøvetagnings- og analyseudstyr

Prøvetagningskammer og 20 µm filtre af rustfrit stål rengøres før brug, først ved vask i detergent opløsning, efterfulgt af skylning i filtreret vand og til sidst indpakket i alufolie og opvarmet til 550°C i 2 timer i muffelovn for at fjerne eventuelt forekommende organisk materiale og dermed undgå intern kontaminering med mikroplast. Al anvendt glasudstyr (petriskåle, flasker mm) bliver rengjort på samme måde. Sorte gummipakninger, som er anvendt til at tætte prøvetagningssystemet, skylles rent før brug, først i en filtreret sulfoopløsning med ultralydsbehandling og derpå i filtreret vand. Under opbevaring indpakkes følsomme overflader og åbninger i prøvetagningsudstyret i alufolie indtil udstyret tages i brug. De anvendte MCE filtre rengøres før brug ved mikrostøvsugning under stereomikroskop for at fjerne eventuelle interfererende partikler.

2.3 Analysemetode

Analysemetoden baseres på to trin.

Første trin består af en visuel karakterisering og kvantificering af potentielle mikroplastpartikler på MCE filtre ved brug af stereomikroskop med 10 - 100 gange forstørrelse. De potentielle mikroplastpartikler karakteriseres og kvantificeres i henhold til anbefalinger til analyser af mikroplast i akvatiske miljøprøver fra JRC (2013), dvs. i henhold til deres type (fx fibre, fragmenter, film mm.), farve og størrelsesfraktion. Generelt vurderes det, at kun partikler med størrelser på $>100 \mu\text{m}$ med rimelig sikkerhed kan visuelt karakteriseres på denne måde.

Andet trin består af validering af den visuelle karakterisering af de potentielle mikroplastpartikler ved hjælp $\mu\text{FT-IR}$ mikroskopi. Herved kan det verificeres, om de fundne partikler består af plastikpolymerer eller primært af andre materialetyper (fx cellulose, protein, metaller mm.).

DCE anvender til disse analyser instrumentet Agilent Cary 6210/670 med FPA (Focal Plane Array), som dækker bølglængdeområdet $875 - 3800 \text{ cm}^{-1}$. Med $\mu\text{FT-IR}$ kan analyserne udføres med instrumentet indstillet til enten transmission, reflektans eller med μATR . Partiklerne overføres til relevante disks (fx ZnSe eller MirrIR) afhængigt af, om de analyseres i transmission eller reflektans. Den foretrukne opsætning er, at analyserne udføres i transmission ved brug af ZnSe disks.

Partikler inden for et "field of view" med et areal på $704 \mu\text{m} \times 704 \mu\text{m}$ (pixel resolution på $5,5 \times 5,5 \mu\text{m}$) kan ved spektroskopisk kortlægning analyseres enten én ad gangen eller flere partikler ad gangen, fx hvis der laves en mosaik, der dækker et større areal sammensat af flere "fields of view".

Eventuelle større partikler ($>500\mu\text{m}$) kan med fordel analyseres med normal FT-IR med ATR detektor, da det giver bedre kvalitetsspektre, dækker et større bølglængdeområde på $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ og er en hurtigere analysemetode.

Selve identifikationen af partiklernes sammensætning udføres enten ved en erfaringsbaseret visuel genkendelse af de optagne spektre, eller i mere usikre tilfælde ved at sammenholde de optagne FT-IR spektre med spektre for kendte materialer samlet i en biblioteksdatabase, som består dels af laboratoriets egen database over referencespektre og dels en kommerciel database (Know it all) med spektre for polymerer og andre materialer. Den endelige bestemmelse af partiklernes bestanddele skal dog stadig omfatte en afsluttende ekspertvurdering af kvaliteten af biblioteks-søgningens match.

Partiklerne identificeres som mikroplast, hvis deres primære bestanddele udgøres af syntetiske polymermaterialer, som fx PE, PP, PET, PVC, PTFE, PA, PS, PU, PB, EVA PMMA, akrylat m.fl., hvorimod partikler, der består af naturlige eller semisyntetiske polymerer som cellulose (fx bomuld) eller viskose (rayon), ikke karakteriseres som mikroplast.

Det vurderes at den nuværende arbejdsgang for identifikation af potentielle mikroplastpartikler med stereomikroskopi (trin 1) tager ca. $\frac{1}{2}$ arbejdsdag per prøve, mens $\mu\text{FT-IR}$ analyser af 10 - 20 potentielle mikroplastpartikler (trin 2) vil tage ca. 1 arbejdsdag. Det anbefales derfor af kosteffektive grunde, at der per prøve FT-IR analyseres op til 10 - 20 repræsentative partikler, som er karakteriseret som potentielle mikroplastpartikler i forbindelse med den visuelle identifikation.

3 Validering af målemetoden

Valideringen af målemetoden (prøvetagning og analyse) har omfattet følgende fire trin:

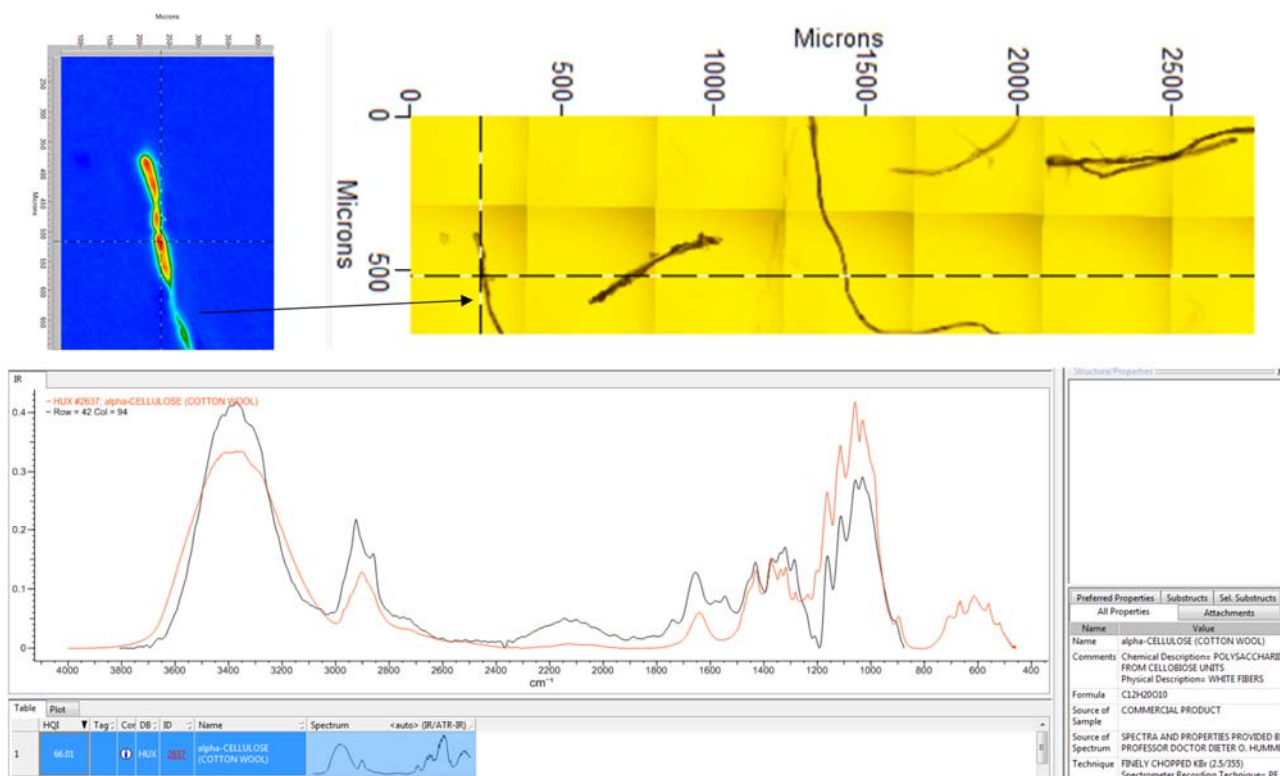
1. Bestemmelse af genfindingsprocenter og reproducerbarhed i det udviklede prøvetagningssystem ved tilsætning af forskellige typer og størrelser af referencepartikler, som kvantificeres vha. stereomikroskopi.
2. Undersøgelser af blindprøver til vurdering af eventuel intern kontaminering, fx af luftbårne partikler eller partikler fra det filtrerede skyllevand.
3. Sammenligning af prøvetagning med prøvetagningsudstyr direkte påsat taphaner med situationer, hvor prøvetagning er baseret på stikprøver af vandprøver opsamlet med udglødede 5 liter glasflasker (red cap).
4. Afprøvning af prøvetagningsproceduren med indledende undersøgelse af mikroplast i drikkevand fra 3 udvalgte taphaner.

Ad 1. Som opstart blev der udført en række afprøvninger med et forholdsvis simpelt konstrueret prøvetagningssystem med brug af 20 µm trådnetfiltre med diameter på ca. 20 mm indsat i en ½ tomme VVS-fitting mellem 2 gummemembraner. Denne model viste sig at give problemer med at opnå tilstrækkelig gode genfindinger med referencepartikler. Det skyldtes, at en betydelig del af de anvendte PE kugler (microspheres fra Cospheric), der blev anvendt som referencepartikler, blev slået i stykker, sandsynligvis pga. en høj strømhastighed og turbulens inde i filtersystemet. Derfor blev der efterfølgende konstrueret prøvetagningsudstyr med 20 µm filtre, men med større diameter, på 90 mm, hvor også strømhastigheden bedre kunne nedjusteres.

Undersøgelserne med brug af referencepartikler viste, at det nye prøvetagningsudstyr havde bedre tilbageholdelseseffektivitet for mikroplastpartikler. Genfindingsprocenterne var på mere end 90% for 4 af de 5 anvendte referencepartikler. Den laveste genfinding på 75,0 ± 14,1 % blev fundet for de tynde fibre (tabel 1). Genfindingsprocenten for de tynde fibre kan måske forbedres, hvis der anvendes filtre med maskestørrelse på 10 µm i stedet for på 20 µm.

Tabel 1. Genfindingsprocenter for referencepartikler tilsat det udviklede prøvetagningsudstyr.

Partikeltype	Størrelse	Polymermateriale	Genfinding (%)
Kugler	60-70 µm	PE	98,2 ± 2,0
Kugler	210-220 µm	PE	95,6 ± 3,8
Kugler	500-600 µm	PE	97,5 ± 4,3
Fragmenter	~80 x ~500 µm	PP	86,9 ± 11,4
Fibre	10 x ~1000 µm	PET	75,0 ± 14,1



Figur 1. μ FT-IR identifikation af fibre fra blindprøver, her bestemt som bestående af cellulose og bekræftet med bibliotekssøgning på 1. derivativ af deres spektre.

Ad 2. Undersøgelser af blindprøver for forekomst af potentielle mikroplastpartikler, som fx fibre og fragmenter viste, at nogle fibre kan forekomme på MCE filtrene selv om rengøring af prøvetagningsudstyr og håndtering af MCE filtre foretages med stor omhyggelighed.

I gennemsnit er der indtil videre fundet 3,9 (range 0 – 8) mikroplast-lignende fibre per blindprøve med farverne transparent, grå, blå eller sort. Af disse er 19 fibre blevet analyseret med μ FT-IR, og alle blev identificeret til at bestå af cellulose-lignende materialer, og kan dermed ikke karakteriseres som mikroplast. Det er pt. vanskeligt at vurdere, i hvilke dele af målemetodens trin kontamineringen med disse fibre bliver introduceret.

Ud over fibre forekom der i blindprøverne også forholdsvis mange små uorganiske, herunder metalliske, fragmenter. Disse vurderes at komme fra enten prøvetagningsudstyret, alufolie eller rørsystemet, hvorfra det filtrerede skyllevand udtages.

Det vurderes, at data for blindprøverne er af tilstrækkelig kvalitet, især hvis μ FT-IR analyser efterfølgende anvendes til at validere de visuelt fundne partikler som mikroplast, hvilket især er relevant for fibre.

Ad 3. Til sammenligning er genfinding undersøgt ved prøvetagning baseret på stikprøver af vandprøver opsamlet i udglødede 5 liter glasflasker (red cap). Dette viste, at der var genfinding på >90% for 3 af de 4 anvendte typer af referencepartikler, hvilket ligeledes var god kvalitet. Den laveste genfinding var for de tynde fibre ligesom for det udviklede prøvetagningsudstyr til påsætning på taphaner. Data for blindprøver var også generelt gode med kun 0 – 3 mikroplastlignende fibre per blindprøve, som alle med μ FT-IR kunne identificeres til at bestå af cellulose, som den primære bestanddel. Undersøgelser af

taphanevand (drikkevand) indsamlet med de samme 5 liters glasflasker ved tre husstande viste i første omgang, at ud over enkelte cellulosefibre kunne der i prøverne også forekomme andre typer af potentielle mikroplastpartikler. Disse blev med μ FT-IR identificeret som værende hvide PTFE fibre (teflon) og røde termoplastiske PET-fragmenter. Tilsvarende partikler blev efter sammenlignende FT-IR analyser vurderet til at stamme fra plastikmaterialer i glasflaskernes låg (red cap låg), som derved peger på, at der her er en risiko for intern kontaminering i prøvetagningsprocessen.

Det vurderes at udtagning af vandprøver med tapning i rengjorte glasflasker er en mulighed som alternativ til det udviklede prøvetagningsudstyr til påsætning på taphaner, men man skal være opmærksom på en risiko for intern kontaminering fra bl.a. plastiklåg, samt de højere detektionsgrænser på grund af det mindre prøvetagningsvolumen, der normalt tages i brug.

Ad 4. En indledende undersøgelse af forekomst og analyse af mikroplastpartikler med størrelser på $>100 \mu\text{m}$ i tre udvalgte prøver fra taphaner blev til sidst udført til afprøvning af prøvetagningsproceduren. Taphanerne blev udvalgt på baggrund af intern logistik og ud fra kriterier om, at de repræsenterede forskellige typer af vandforsyninger. Taphanerne var placeret ved køkkenvaske på tre sjællandske lokaliteter i hhv. Roskilde (Risø campus), Ølstykke og Amagerbro, København. Ved hver lokalitet blev der filtreret 50 liter vand. Undersøgelserne viste, at der i alle tre prøver forekom 4 – 7 mikroplastlignende fibre og ingen fragmenter per 50 liter prøve (tabel 2). Disse niveauer var sammenlignelige med forekomsten af fibre i blindprøverne. μ FT-IR identifikation viste også, at alle fibre primært bestod af cellulose med undtagelse af en enkelt egentlig mikroplastfiber, der bestod af PET. Denne blev fundet i analysen af vandprøven fra Amagerbro.

Tabel 2. Fund af mikroplast (MP)-lignende partikler med størrelser på >100 og deres primære bestanddel identificeret med μ FT-IR opsamlet efter filtrering af 50 liter taphanevand fra tre lokaliteter på Sjælland.

Lokalitet	Antal MP-lignende fibre	Antal MP-lignende fragmenter	μ FT-IR identifikation af primær bestanddel
Risø campus	4	0	Cellulose (4)
Ølstykke	7	0	Cellulose (7)
Amagerbro	5	0	Cellulose (4), PET (1)

Niveauerne af mikroplastlignende partikler beskrevet i de tidligere omtalte danske og amerikanske undersøgelser af mikroplast i drikkevand omtalt i bl.a. Strand (2017a,b) kunne således ikke umiddelbart bekræftes med disse tre analyser. I denne sammenhæng er det dog vigtigt at nævne, at de tre prøver ikke kan anses for at være repræsentative for alle typer af vandforsyninger i Danmark, hvor også variationer over tid måske kan forventes. Derudover kan det heller ikke udelukkes, at mikroplast med størrelser $<100 \mu\text{m}$ kan forekomme i prøverne, da disse ikke har indgået i analysen.

3.1 Vedr. analyse af mikroplastpartikler med størrelser på <100 µm

Den her beskrevne målemetode er udviklet og valideret for partikler >100 µm. Hvis fremtidige analyser af taphanevand også skal omfatte analyser af partikler med størrelser <100 µm (fx i størrelsesintervallet 20 - 100 µm), kan det ikke anbefales, at dette baseres på et indledende trin, der omfatter en visuel identifikation af potentielle mikroplastpartikler med stereomikroskopi. I stedet vil det være nødvendigt med en spektroskopisk kortlægning af alle de opsamlede partikler med µFT-IR. Desuden vil det være en fordel at bruge filtre af rustfrit stål med mindre maskestørrelse på fx 10 µm.

En spektroskopisk kortlægning med µFT-IR af alle de tilstedeværende partikler opsamlet på de anvendte filtre i prøvetagsudstyret indebærer, at de først skal overføres til enten en disk eller et filter, der er forenelig med analyse med µFT-IR. En sådan prøveopsamling kan omfatte filtrering af hele prøven med fx et særligt Anodisc membranfilter (fx med 5 µm porestørrelse, Whatman) eller settling af partikler i en delprøve på fx 50 µl af en opløst partikel suspension i ethanol på en ZnSe disk. Både ZnSe disk og Anodisc filtre er kompatible med µFT-IR målinger udført i transmission.

Der er dog også nogle begrænsninger ved disse metoder. Brug af Anodisc afgrænser det spektroskopiske bølglængdeområde, der kan optages med FT-IR til 1300 - 3800 cm⁻¹. Det betyder, at information i fingerprintområdet <1300 cm⁻¹, som kan være vigtig for at foretage en tilstrækkelig sikker identifikation for flere typer af polymermaterialer, fx PET, PVC, akrylat, PTFE m.fl., ikke kommer med.

Ulempen ved brug af settling af partikler i en delprøve på fx 50 µl af en opløst partikelsuspension i ethanol på en ZnSe disk er, at der kan være forholdsvis stor usikkerhed på de kvantitative bestemmelser. Dette skyldes, at det kan være vanskeligt at udtage en repræsentativ delprøve fra en partikelsuspension bestående af en kompleks blanding af forskellige typer af partikler med forskellige størrelser og densitet.

På sigt kan udviklingen af "large area µATR" også være en mulighed ved analyse af komplekse blandinger af de små mikroplastpartikler. DCE forventer at påbegynde afprøvning af denne nye detektionsmetode i løbet af det kommende års tid.

Det skal derudover også bemærkes, at µFT-IR kortlægning er en tidskrævende metode til identificering af, hvilke af de små partikler der er mikroplast og deres polymerbestanddele i en kompleks prøve. Der bør udvikles mere automatiserede metoder til at håndtere de store datamængder, som tilvejebringes, og som skal tolkes som en del af analysen. Derfor kan det afhængig af sammensætning og antallet af partikler tage adskillige arbejdsdage at gennemgå en enkelt prøve.

4 Konklusion

Det vurderes på baggrund af den gennemførte validering, at den af DCE udviklede målemetode (prøvetagning og analyse) har en tilstrækkelig god kvalitet til at kunne anvendes til analyse for mikroplast i taphanevand, og at en metode som denne derfor kan tages i brug, hvis en egentlig undersøgelse af forekomst og sammensætning af mikroplastik i taphanevand i Danmark skal igangsættes. Målemetoden baseres på prøvetagning med filtrering af vandet gennem et prøvetagningskammer, der sættes direkte på taphaner. Dette vurderes at være et bedre alternativ til først at udtage vandprøver, der aftappes i rengjorte prøvetagningsflasker af glas.

For partikler med størrelser på $>100\ \mu\text{m}$ kan en indledende karakterisering og kvantificering af potentielle mikroplastpartikler udføres visuelt ved brug af stereomikroskopi, men der er behov for en efterfølgende validering ved brug af $\mu\text{FT-IR}$ spektroskopi for at verificere, at de pågældende partiklers bestanddele består af plastik-polymerer. Dette er bl.a. vigtigt for at udelukke, at der er tale om partikler, der består af naturlige og semisyntetiske polymerer eller andre materialer. Eksempelvis kan fibre bestående af cellulose forekomme i prøver på grund af en mindre baggrundskontaminering.

Undersøgelse af forekomsten af de mindre mikroplastpartikler med størrelser på $<100\ \mu\text{m}$ kan også igangsættes. Det er dog nødvendigt at være opmærksom på, at der stadig er nogle metodemæssige udfordringer her, bl.a. pga. af en forholdsvis stor usikkerhed på de kvantitative bestemmelser. Det er desuden en betydelig mere arbejdskrævende proces at analysere for mikroplastpartikler med størrelse på $<100\ \mu\text{m}$, og det vil derfor have betydning for hvor lang tid en undersøgelse vil tage.

5 Reference

JRC (2013). A guidance document within the Common Implementation Strategy for the Marine Strategy Framework Directive MSFD Technical Subgroup on Marine Litter, JRC Scientific and Policy Reports, Joint Research Centre (JRC) Report EUR 26113 ENLink: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC83985/lb-na-26113-en-n.pdf>.

Strand (2017a). Udtalelse om validiteten af målemetode anvendt i amerikansk undersøgelse, der viser mikroplast i drikkevand verden over. Faglig redegørelse fra DCE, 6 s., sep. 21, 2017.

Strand (2017b). Udtalelse om validiteten af målemetode anvendt i dansk undersøgelse, der viser mikroplast i drikkevand fra taphanprøver i 16 husstande i Københavnsområdet. Faglig redegørelse fra DCE. 6 s., 21. september, 2017.