

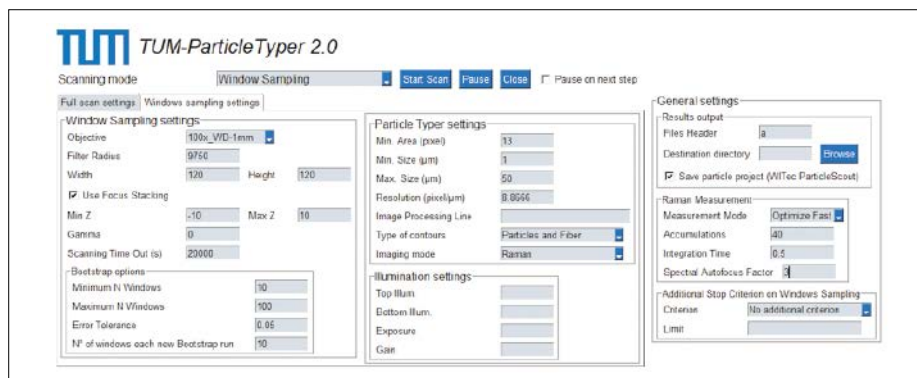
Automatisierte Partikelanalyse

Mikroplastikpartikel und -fasern bis zur Größe von 1 µm

Oliver Jacob¹ und Natalia P. Ivleva¹

Eine repräsentative und zuverlässige Analytik, insbesondere die Bestimmung der Partikelanzahl, Größenverteilung und der Polymerentypen in Umwelt- und Lebensmittelproben, bildet die Grundlage für die Beurteilung des Gefahrenpotentials von Mikroplastik (Plastikpartikel von 1 µm bis 1 mm). Die Identifizierung einzelner Partikel bis zu einer Größe von 1 µm gelingt mit Raman-Mikrospektroskopie. Die Software TUM-ParticleTyper 2 ergänzt diese Technik zu einem vollautomatischen Verfahren zur Quantifizierung von Mikroplastik über den gesamten definierten Größenbereich. Die Software setzt zufallsbasierte Stichprobenbildung mit kleinen Messfenstern und eine darauf basierende Konfidenzintervallschätzung um und bietet einen neuen Ansatz zur Deagglomeration sowie – verglichen mit dem Vorgängerprogramm zur Analyse von Partikeln > 10 µm – erweiterte Methoden der Bildverarbeitung und Fasererkennung. Wiederholungsmessungen an Referenzproben zeigen die Präzision des gesamten Verfahrens.

Kunststoffabfälle zeichnen sich durch eine hohe Persistenz in der Umwelt aus [1–4] und unterliegen zugleich fortwährender Fragmentierung. Erreicht die Größe dieser Fragmente den Bereich 1 µm bis 1 mm, werden sie als Mikroplastik (MP) bezeichnet [5–8]. Deren Gefahrenpotential vermittelt sich etwa durch den physikalischen Einfluss auf Lebewesen oder die Fähigkeit, als Träger von (an)organischen Schadstoffen [9, 10] und (pathogenen und/oder antibiotikaresistenten) Mikroorganismen [11, 12] zu fungieren. Die Anzahl der Mikroplastikpartikel und somit die verfügbare Kontaktfläche, die Größenverteilung (Zugänglichkeit) und die chemische Zusammensetzung sind in diesem Zusammenhang relevante Informationen. Die Analyse selbst – im Sinne einer statischen Bildanalyse zur Partikelgrößenanalyse (ISO 13322-1) [13] in Kombination mit Raman-Mikrospektroskopie – beginnt mit dem Ablagern der in einer wässrigen Probe suspendierten Partikel auf einer Filteroberfläche, welche dann mikroskopisch unter Dunkelfeldbeleuchtung abgebildet wird. TUM-ParticleTyper 2 ist die Software zur Partikelerkennung in solchen Bildern und zur Initiierung der anschließenden Raman-



Messungen an den ermittelten Positionen auf dem Filter. Im Folgenden soll nun die Vorgehensweise bei der Bildbearbeitung, der Objekterkennung sowie zur repräsentativen Stichprobenbildung näher erläutert werden.

Die Durchführung im Einzelnen

Die Kernfunktion der Software – die Objekterkennung und -klassifizierung – stützt sich auf Funktionen der „Open Source Computer Vision Library“ (OpenCV) für Python. Nach Verarbeitung des Originalbildes (Fourier-Filter, Zylinderhütentransformation, morphologisches Öffnen) werden die Konturen gefundener Objekte, die nun als „Partikel“ interpretiert werden, für alle weiteren Berechnungen verwendet. Letztere sind im Einzelnen in Tabelle 1 genannt. Um die Raman-Messzeit auf ein erträgliches Maß zu verkürzen – bei einer realistischen Dauer von

20 s pro Partikel könnte die Analyse einer einzigen Probe sonst mehrere Wochen dauern – kann zwischen zwei Varianten zur Auswahl einer zu messenden Untermenge gewählt werden: (1) „Ziehen ohne Zurücklegen“ (*random sampling*, RS) [14] – dies ist bei Kenntnis aller Partikelpositionen auf der Filteroberfläche möglich – und (2) zufälliges Platzieren kleiner Messfenster (*random window sampling*, RWS) [15]. Die Hochrechnung auf die Gesamtpartikelzahl erfolgt dann über den abgebildeten Flächenanteil und ist so auch ohne Kenntnis des Verteilungsmusters der Partikel auf der Filteroberfläche möglich.

Spezielle Maßnahmen zur korrekten Partikelerkennung

Für den Bereich der unteren Grenze des Mikroplastikgrößenbereichs (1 µm) kann die notwendige Bildauflösung – ein Objekt soll

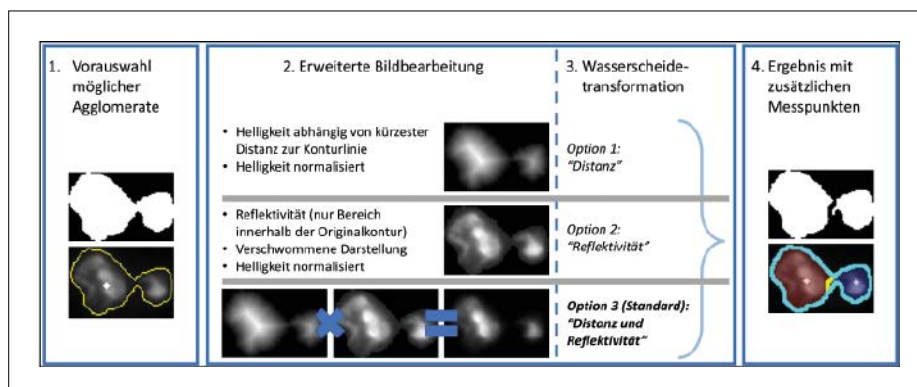


Abb. 1: Beschreibung der „Adaptiven Deagglomeration“. Die Schritte 2 und 3 werden nur auf jene Objekte angewendet, die zuvor als potenzielle Agglomerate klassifiziert worden sind (Schritt 1). Entnommen aus [20]. Copyright: Jacob, O. et al.

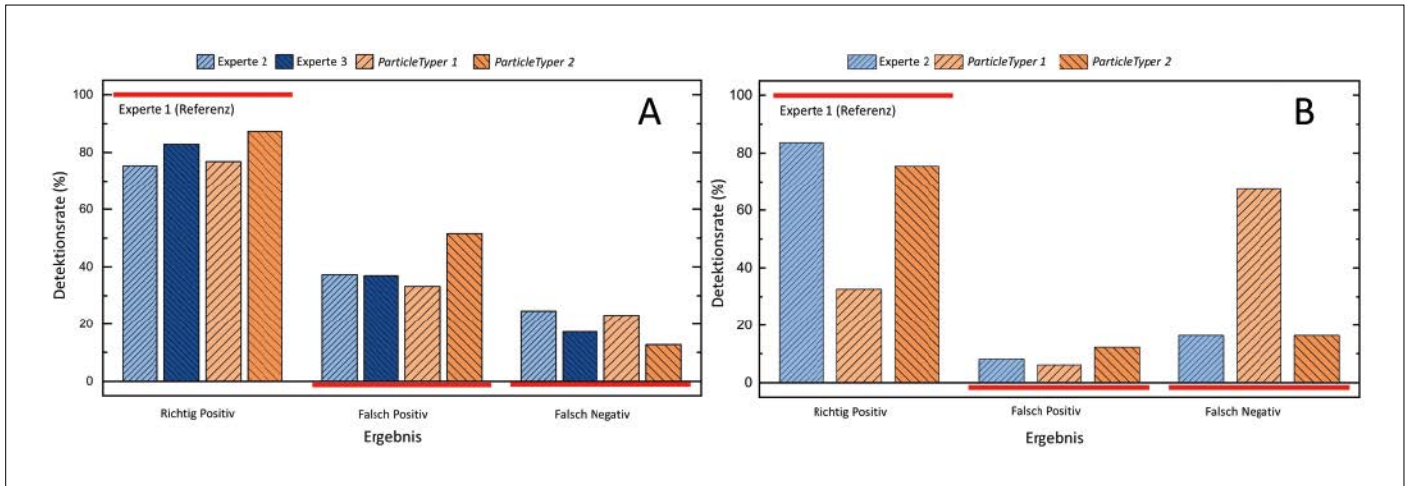


Abb. 2: Vergleich der Detektionsraten dreier Experten (A), der (manuellen) Faserklassifizierung durch zwei Experten (B) und der jeweiligen Ergebnisse der TUM-ParticleTyper-Versionen 1 und 2. Das Ergebnis des ersten Experten bildet die Referenz. Entnommen aus [20]. Copyright: Jacob, O. et al.

durch mindestens 13 Pixel repräsentiert sein [14] – grundsätzlich durch den Wechsel auf ein Objektiv mit stärkerem Vergrößerungsfaktor erreicht werden. Dadurch wachsen jedoch in Relation auch die Einflüsse einer gleichbleibend ungenauen Positionierung des Mikroskopkreuztisches an. Die Lösung besteht in einer Beschränkung der Anzahl „vermittelnder“ Bewegungen zwischen dem Erkennen aller Objekte und dem anschließenden Anfahren zwecks Raman-Messungen; dies wird durch den RWS-Ansatz erreicht.

Die stärkere Vergrößerung lässt aber auch Merkmale des Hintergrunds – die Filteroberfläche – deutlicher werden. Abhilfe schafft die vor der eigentlichen Objekterkennung durchgeführte Bildverarbeitung. Neben dem Einsatz von Rangordnungsfiltern – die Medianfilterung, angewendet in Version 1 [14], ist in Version 2 der Software zur „morphologischen Öffnung“ ergänzt worden – erlaubt vor allem das „Filtern in der Frequenzdomäne“ (hier Fourier-Filter genannt) die gezielte Abschwächung häufig vorkommender Objekte ähnlicher Größe. Im konkreten Falle sind dies Filterporen, die sich sonst störend auf die Partikelerkennung auswirken.

Ein weiteres Problem betrifft das Agglomerieren der Partikel auf der Filteroberfläche, in dessen Folge die Anzahl der Partikel unterschätzt, die Größenklassen verschoben und darüber hinaus auch Fasern fehlerhaft beziehungsweise nicht erkannt werden. Bei der Bilderkennung können diese Auswirkungen durch die „Deagglomeration“ abgemildert werden [16, 17]. Ihr Kern, die Wasserscheidetransformation [18], ist allerdings wiederum anfällig für „Überfragmentieren“ und somit eine deutliche Überschätzung der Partikelanzahl. Die mögliche manuelle Korrektur oder „Führung“ [17] ist zeitaufwendig

und kommt für eine iterative automatisierte Prozedur, wie hier gezeigt, nicht infrage.

In Version 2 der Software beinhaltet die Deagglomerationsmethode deshalb ein Auswahlverfahren für Objekte mit ausgeprägten konkaven Formen. Die bereits zuvor klassifizierten Fasern, die durch die Wasserscheidetransformation stark fragmentiert werden

können, bleiben grundsätzlich unberücksichtigt. Das grundsätzliche Problem des besonders „effektiven“ Agglomerierens in Gegenwart vieler Fasern auf dem Filter kann dadurch zwar auch nicht gelöst werden, die Resultate der Bilderkennung können sich durch diese „adaptive Deagglomeration“ dem wahren Wert dennoch annähern und

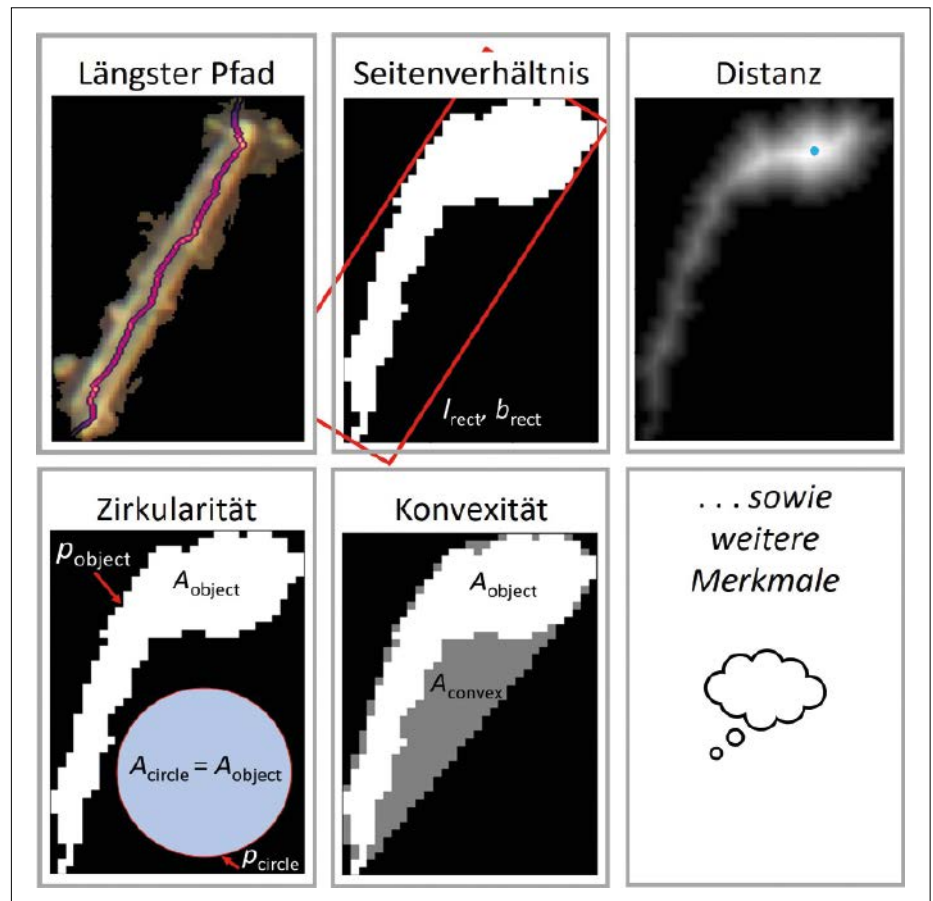


Abb. 3: Illustration einiger für die Fasererkennung verwendbarer Objektmerkmale. Entnommen aus [20]. Copyright: Jacob, O. et al.

Tab. 1: Zusammenfassung aller Bearbeitungsschritte in TUM-Particle Typer 2.

1	Adaptiver Schwellwert	Binarisierung des originalen Mikroskopbildes
2	Erfasse Konturen	Eingrenzung heller Bildbereiche (= Objekte)
3	Topologische Auswertung	Nur äußerste Konturen erhalten, „Löcher“ geschlossen
4	Minimal notwendige Objektfläche	Nur Objekte mit mindestens 13 Pixeln erhalten
5	Filterung nach Durchmesser	Nur Objekte innerhalb des definierten Größenbereichs erhalten
6	Filterung nach Lage	RWS-Variante: Nur Objekte innerhalb des Messfensters erhalten
7	Formklassifizierung	Einteilung in die Kategorien Partikel und Faser (sowie Ausschlussmöglichkeiten)
8	Adaptive Deagglomeration	Separierung sich berührender Partikel (nicht in der Kategorie „Faser“)
9	Messpunktkoordinaten	Geeignete Positionen für Raman-Punktmessungen (eine pro Partikel)
10	Stichprobenbildung Ziehen ohne Zurücklegen	Begrenzung der Anzahl der Raman-Messungen (in RWS-Variante nicht vorgesehen)
11	Realkoordinaten	Umrechnung aller Längen in μm , entsprechend der gegebenen Auflösung

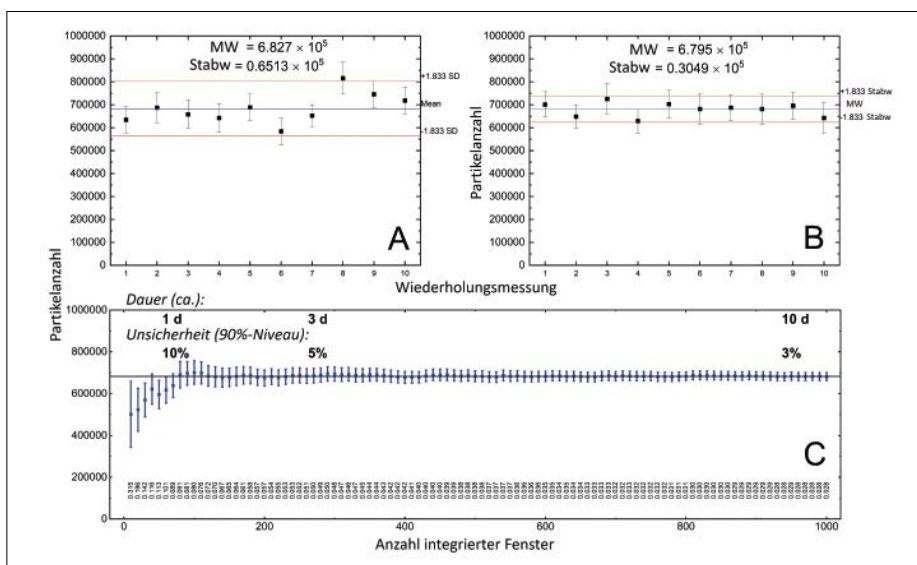


Abb. 4: Ergebnisse von zehn Wiederholungsmessungen (RWS-Modus mit je 100 Fenstern) an Mikroplastikpartikeln $> 1 \mu\text{m}$ (PS, PET, PLA) (A), Ergebnisse für zehn „virtuelle“ Messungen (nach Mischen der insgesamt 1000 Fenster) (B) und Entwicklung des geschätzten Konfidenzintervalls (die 1000 Fenster bilden nun ein gemeinsames Ergebnis) (C). Entnommen aus [20]. Copyright: Jacob, O. et al.

sind zudem reproduzierbar und automatisierbar, da menschliches Eingreifen nicht mehr nötig ist. Abbildung 1 zeigt beispielhaft die einzelnen Schritte dieses Verfahrens. Um dies auch nach wissenschaftlichen Aspekten zu verankern, muss der „entscheidende“ Schritt im weitesten Sinne „auf einen Standard rückführbar“ sein. Dies ist hier erreicht worden, indem die „ausgeprägten konkaven Formen“ – das heißt Objekte, die wahrscheinlich Agglomerate sind – anhand einer Referenz definiert werden, die durch einen (menschlichen) Experten – im Zusam-

menhang mit „Objekterkennung“ der „Goldstandard“ – erstellt worden ist.

Mensch vs. Maschine – Detektionsraten im Vergleich

Wie bereits von der Esch et al. (2020) zeigen, ist das Ergebnis der Objekterkennung durch TUM-ParticleTyper 1 [14] vergleichbar mit den Ergebnissen zweier Experten und somit valide. Um auch die Auswirkungen der bereits beschriebenen erweiterten

Bildverarbeitung zu zeigen, wird nun der gleiche Ansatz gewählt. Hierfür wurden sechs Bildauschnitte, die typischen Fragmente unter Dunkelfeldbeleuchtung zeigen, zum einen von drei Experten manuell bewertet und zum anderen durch beide Softwareversionen analysiert. Wie Abbildung 2 (A) zeigt, führt die neue Programmversion zu einer höheren „Richtig-Positiv-Rate“, die nun näher bei Experte Nr. 1 liegt als diejenigen der beiden anderen Experten. Das ist möglich, weil Version 2 insgesamt mehr Objekte findet und somit auch vermehrt falsch-positive Ergebnisse verzeichnet. Dies bedeutet aber nicht zwangsläufig eine hohe Anzahl von „Zufallsfunden“, sondern kann auch durch eine höhere (und gleichbleibende) Empfindlichkeit gegenüber besonders schwach abgebildeten Partikeln erklärt werden, die von den Experten übersehen worden sein könnten.

Die bereits erwähnte Unterscheidung zwischen Fasern und (sonstigen) Partikeln wird in vergleichbaren Programmen gelegentlich durch einen Schwellwert (etwa 4) für das Seitenverhältnis erreicht. Nach Ansicht der Autoren ist ein einzelner solcher Parameter jedoch nicht genug: Das Seitenverhältnis eines umschließenden Rechtecks etwa kann irreführend sein, wenn die Faser gekrümmt auf dem Filter liegt. Erst durch die Kombination mehrerer geeigneter Parameter (Abbildung 3) in Verbindung mit geeigneten Schwellwerten, die für TUM-ParticleTyper 2 durch maschinelles Lernen (*random forest classifier*) und wiederum auf Basis einer „menschlichen Referenz“ ermittelt worden sind, klappt die Klassifizierung hinreichend zuverlässig (Abb. 2B).

Welche Präzision kann erreicht werden? – Ergebnisse der Wiederholungsmessungen

Im RWS-Modus kann dank „Bootstrap“, einem Verfahren, mit dem lediglich auf der Grundlage einer einzelnen Probenanalyse zahlreiche „Varianten“ des Endergebnisses generiert werden [15], das Konfidenzintervall des Ergebnisses geschätzt werden. Wird nun die konkrete Schwankung über zehn Wiederholungsmessungen an selbsthergestellten Referenzpartikeln [19] – geeignete zertifizierte Referenzmaterialien (und somit die Möglichkeit der vollständigen Validierung des Verfahrens) existieren bis dato nicht – mit den jeweiligen Schätzungen verglichen (Abb. 4), so zeigt sich zwar einerseits eine zusätzliche „Schwankungskomponente“ (A), andererseits aber nach vorherigem virtuellen „Mischen“ der Messfenster deren Richtigkeit (B). Die Prä-

zision ist dabei unter Berücksichtigung des gesamten Ablaufs (Objektdetektion, raman spektroskopische Identifizierung und Quantifizierung der Fragmente) beurteilt worden.

Zusammenfassung

Die hier vorgestellte Methode zur (Mikroplastik-) Partikelanalyse kombiniert Partikelerkennung in optischen Bildern mit ramanmikroskopischen Punktmessungen. Um alle Partikel innerhalb des gesamten definierten Größenbereichs ($> 1 \mu\text{m}$) erfassen zu können, müssen insbesondere Aspekte wie Repräsentativität oder technische Beschränkungen des Instruments (z.B. die Präzision des Mikroskopisches) beachtet werden. Die Lösung ist das zufällige Positionieren kleiner

Messfenster, was zudem die Abschätzung der Unsicherheit auf der Basis eines „Bootstrap“-Verfahrens ermöglicht. Die Software besteht aus einem erweiterten Verfahren für die Bildverarbeitung, einem neuen Ansatz für die sogenannte „adaptive Deagglomeration“ sowie einer neuen Methode zur Unterscheidung von Partikeln und Fasern. Die Abschätzung der Unsicherheit ist durch wiederholte Messungen an derselben Probe überprüft worden. Insgesamt wird somit eine repräsentative und zuverlässige quantitative chemische Analyse von Mikroplastikpartikeln und -fasern bis zu einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ ermöglicht.



Weitere Beiträge zum Thema:
<https://bit.ly/WAS-Mikroplastik>

Zugehörigkeit

¹ Institut für Wasserchemie & Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie, TUM School of Natural Sciences, Technische Universität München

● KONTAKT |

PD Dr. Natalia P. Ivleva

Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie
& Institut für Wasserchemie
TUM School of Natural Sciences
Technische Universität München, Deutschland
ORCID: 0000-0002-7685-5166
natalia.ivleva@tum.de

[1]

Literatur:
<https://bit.ly/GIT-Ivleva>