

1. Bilag 1.

Metodebeskrivelse for overvågning af mikroplast i marint sediment



Forfattere: Jes Vollertsen og Fan Liu

Gyldig fra: 04.04.2024

Omfang: 22 sider

Indhold

1.	Indledning	3
1.1.	Begreber	3
2.	Metode	4
2.1.	Prøvetagning	4
2.1.1.	Station for prøvetagning	4
2.1.2.	Udtagning af sedimentprøver	4
2.1.3.	Blankprøver under prøvetagningen	5
2.2.	Analyse af sedimentprøver	5
2.2.1.	Prøveforberedelse og oparbejdning	5
2.2.2.	Kemisk analyse af mikroplast i oprensede prøver	6
2.2.3.	Definition af mikroplaststørrelse der analyseres for	7
2.2.4.	Definition af polymertyper der skal indgå i analysen	7
2.2.5.	Definition af partikelbeskrivelse der skal indgå i analysen	7
2.2.6.	Kvalitetskontrol (blankprøver samt genfinding)	8
2.3.	Sedimentparametre	8
3.	Databehandling og indrapportering	9
4.	Referencer	10
	Bilag 1: Baggrund for anvisningens tekniske detaljer	11
	Bilag 2: Databehandling af indrapportering	12
	Fortolkning af data fra den kemiske analyse	12
	Format for afrapportering	12
	Data omfang	12
	Bilag 3: Prøveforberedelse og oparbejdning	14
	Bilag 4: Kemisk analyse af mikroplast i oprensede prøver	18
	Kemisk analyse af mikroplast 500– 5000 µm	18
	Kemisk analyse af mikroplast 10 – 500 µm	19
	Bilag 5: Oversigt over versionsændringer	22

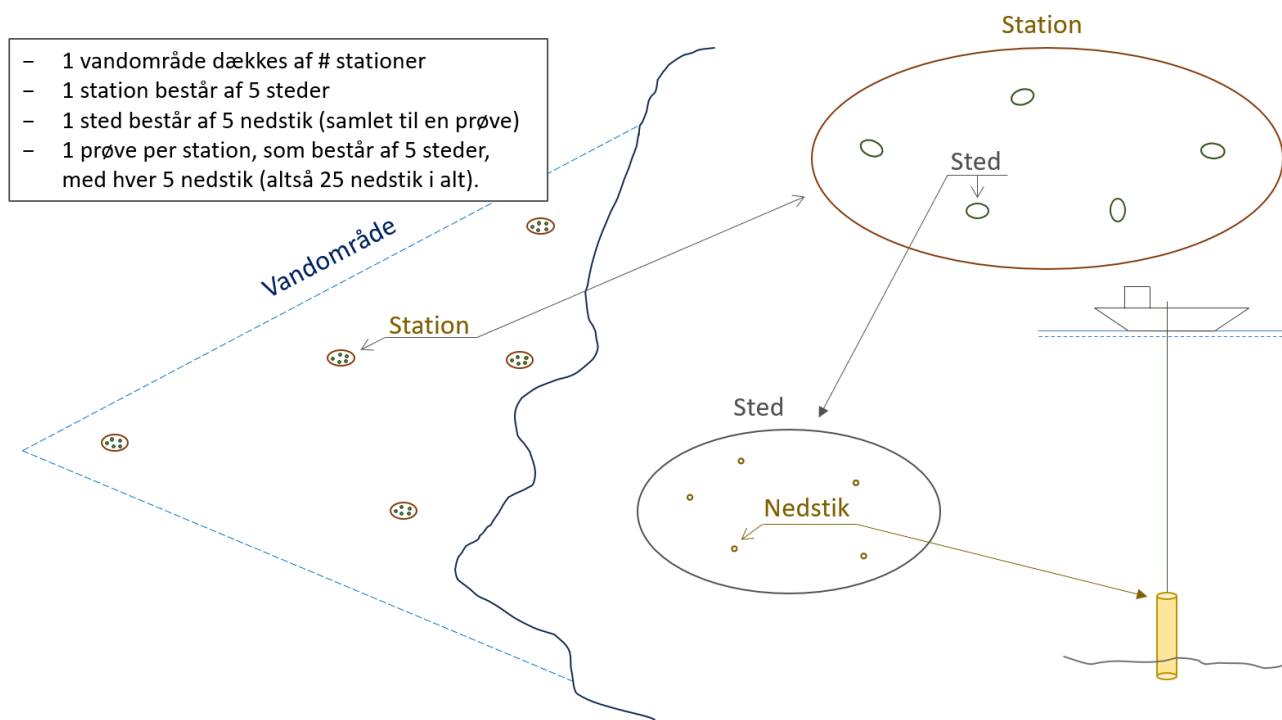
2. Indledning

Denne metodebeskrivelse omfatter prøvetagning, analyse, databehandling og -rapportering for overvågning af mikroplast i dansk marint sediment. Beskrivelsen er målrettet Miljøstyrelsen miljøovervågning i henhold til EU's havstrategidirektiv, hvor mikroplast i sediment skal overvåges.

Prøvetagning for mikroplast tilstræber at tage højde for, at der er en væsentlig naturlig variabilitet i mikroplastindholdet i marint sediment, med en høj variation i koncentration og sammensætning over selv korte afstande. Dette sker ved at tage mange sedimentprøver over et område, og blande dem til én prøve per station. Analysen af sedimentprøverne sker ved at udtage en delprøve af den indsamlede prøvemængde per station. Hele delprøven oparbejdes derefter til et koncentrat beriget på mikroplast. Fra dette koncentrat tages der delprøver, der analyseres kemisk for indholdet af mikroplast. Udkommet af analysen opfylder specifikationer sat af HELCOM, OSPAR og den Europæiske Kommissions Joint Research Centre (JRC), og data generes i et format, der er egnet til indlæsning i EMODnet.

2.1. Begreber

- Mikroplast:** Partikler mellem 1 og 5000 μm i største dimension, bestående af eller indeholdende væsentlige mængder af antropogene polymerer eller modificerede naturlige polymerer.
- Vandområde:** Området der dækkes af en serie prøver, jf. overvågningsprogram.
- Nedstik:** En prøve hentet ved at gøre ét nedstik med en prøvehenter (Figur 1).
- Sted:** Blanding af prøver fra flere nedstik på et geografisk præcist defineret sted (Figur 1).
- Station:** Området som én mikroplastanalyse repræsenterer. Prøver fra flere steder blandes til én prøve per station (Figur 1). En station består af et område på cirka 1 km^2 . Et vandområde består således af flere stationer.



Figur 1. Skitse til forklaring af begreberne vandområde, nedstik, sted, samt station.

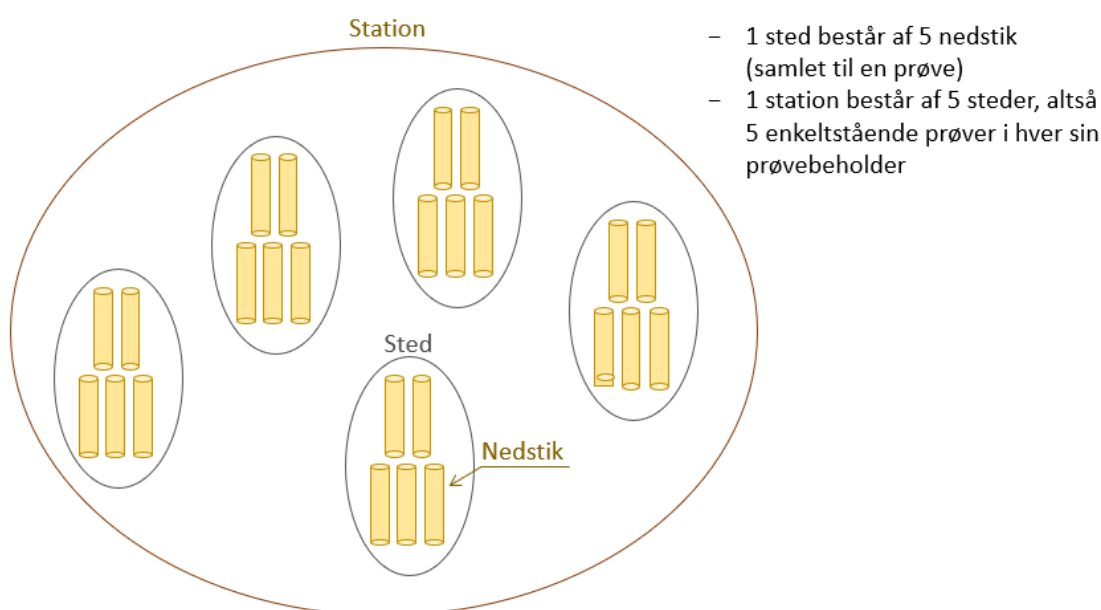
3. Metode

3.1. Prøvetagning

Under prøvetagningen skal man være opmærksom på, at der kan komme mikroplast fra skibet (fx maling) samt fra personalet (fx tøj), og prøverne skal derfor tages så denne kontaminering begrænses mest muligt. Dette sker blandt andet ved at holde prøvebeholdere lukkede så meget af tiden som muligt, rengøre prøvetagningsgrejet grundigt mellem prøvetagninger, fx ved skylning af mindre grej i partikelfrit vand, placere prøvebeholdere på rent underlag, fx stanniol, og lignende.

3.1.1. Station for prøvetagning

Hver station tilstræbes at dække mellem en og nogle få kvadratkilometer. Der udtages prøver fra 5 steder inden for stationen, så jævnt fordelt som muligt. Hver prøve udtages som 5 nedstik (Figur 1, Figur 2), og udføres som beskrevet i afsnit 3.1.2.



Figur 2. Skematisk oversigt over station, sted og nedstik.

3.1.2. Udtagning af sedimentprøver

- Hvis det er muligt, skal prøven udtages direkte fra sedimenthenteren. Sedimentet indsamles enten med Box-corer, Van Veen grab eller HAPS fra skib eller Kajak- eller HAPS-rør af dykker.
- Sedimentprøven udtages fra sedimenthenteren med en metalske. Hvis sedimentet udtages som en kerne (fx med HAPS) kan man enten i) skubbe prøven op, så sedimentoverfladen står i toppen af røret, hvorefter prøven udtages eller ii) suge overflade vandet væk med en silikoneslange og derefter udtage prøven. Skeen pakkes ind i stanniol mellem prøvetagninger for at undgå forurening. Eventuelt vaskes den i partikelfrit vand eller havvand (OBS på ikke at bruge havvand tæt på skibet). Der tages en ny ske i

brug for hver station. Prøvetagningsmaterialer skal være rensset/skyllet grundigt i partikelfrit vand inden brug (leveres rensset af analyselaboratoriet).

- Ifald der skal tages andre prøver fra sedimenthenteren end for mikroplast, udtages mikroplastprøven altid som den første.
- På hvert sted udtages en sedimentprøve som mindst udgør 5 individuelle nedstik. Fra hvert nedstik udtages de øverste 1-2 cm af overfladesedimentet, dog maksimalt 150-200 mL vådt sediment. Sedimentet fra de 5 nedstik placeres i en 1-liters prøvebeholder, så der samlet set udtages 0,7-0,9 L sediment per sted. Hvis 5 nedstik ikke er tilstrækkeligt for at opnå den samlede mængde på 0,7-0,9 L, foretages yderligere nedstik.
- Prøvebeholderen skal være af glas eller metal uden nogen form for plast eller gummi (teflon og silikone kan dog accepteres). Beholderne skal være vasket og rengjort i partikelfrit vand før prøvetagningstogtet (leveres rensset af analyselaboratoriet). Låget skal være uden plastpakning, eventuelt kan en pakning af teflon eller silikone accepteres. Bruges syltetøjsglas uden pakning, dækkes glasset af med stanniol før låget lukkes. Prøvebeholdere åbnes kun under selve prøvetagningen. Den øvrige tid holdes de lukket.
- Prøverne holdes på køl eller fryses efter udtagningen, og nedfryses senest når prøverne ankommer til laboratoriet.
- Rengjort materiel til at opbevare prøver i og rengjorte skeer til prøvetagningen leveres af analyselaboratoriet.

3.1.3. Blankprøver under prøvetagningen

- Under prøvetagningen udtages mindst tre blankprøver (feltblanke) per vandområde. Til blankprøver benyttes de samme prøvetagningsbeholdere som til sedimentprøverne. Alternativ kan der bruges en petriskål. Alle beholdere holdes åbne mens beholderne for sedimentprøver er åbne. Den øvrige tid skal de være lukkede. I øvrigt behandles de på samme vis som sedimentprøverne, men behøver ikke opbevares på køl/frys. Noter gerne ned, hvor lang tid blankprøven stod åben.
- Rengjorte prøvetagningsbeholdere til blankprøver leveres af analyselaboratoriet.

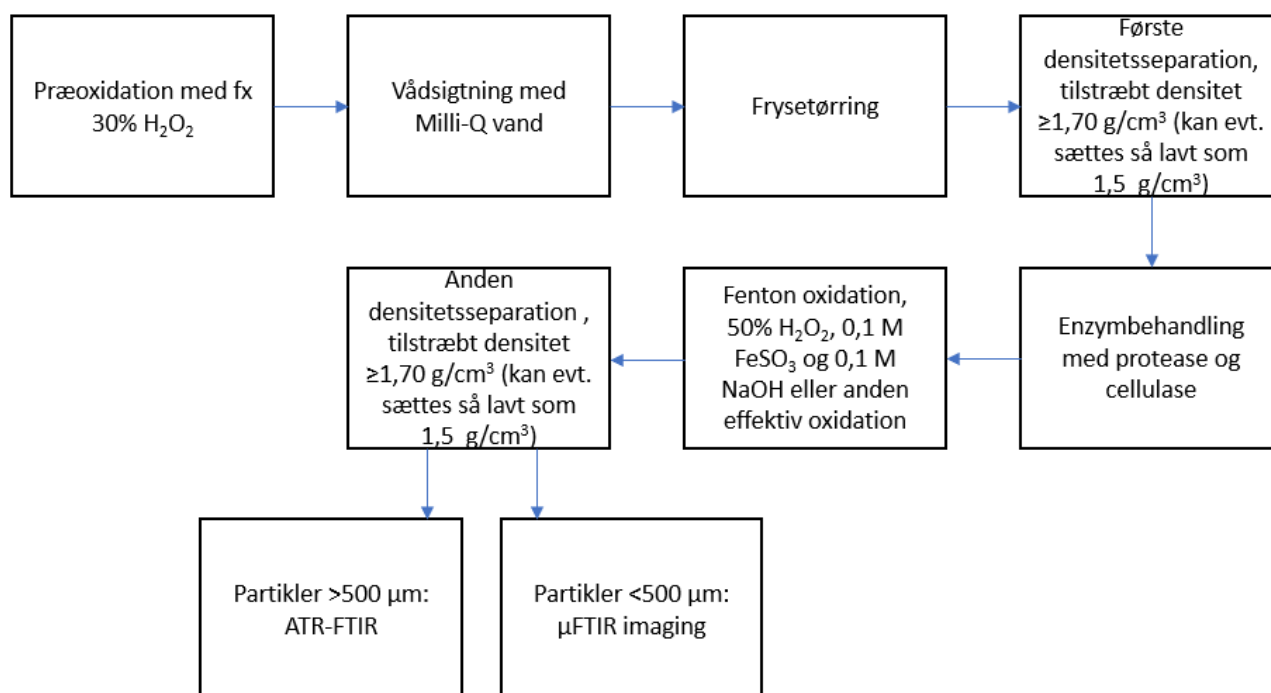
3.2. Analyse af sedimentprøver

3.2.1. Prøveforberedelse og oparbejdning

Analysemetoden skal være kompatibel med tidligere udførte målinger for mikroplast i regi af eller relateret til Danmarks havstrategiprogram (Liu et al., 2021; 2022; 2023).

Prøver fra de 5 steder per station, hver på 0,7-0,9 L, blandes grundigt til én prøve. Herfra tages omkring 250 g tørvægt i arbejde.

Oprensning af sedimentprøver følger protokollen: Præoxidation med brintoverilte, vådsigtning på fx 500 μm sigte, frysetørring, densitetsseparation (densiteten skal være mindst 1500 kg m^{-3} , men det tilstræbes at den er $\geq 1700 \text{ kg m}^{-3}$ for at minimere tab af tungere plastpartikler som fx PVC og PET), enzymatisk behandling med som minimum protease og cellulase, Fenton oxidation, en yderligere densitetsseparation med samme densitet som brugt til første separation, koncentrering af de oprensede partikler i et kendt volumen (Figur 3).



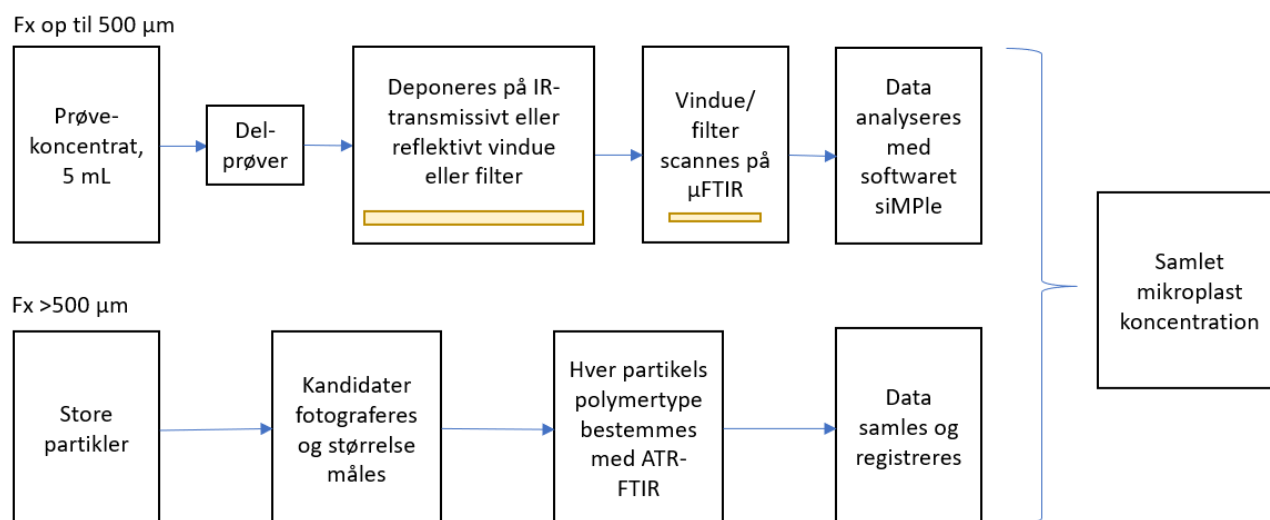
Figur 3. Protokol for prøveforberedelse til oparbejdning af marine sedimentprøver til analyse med Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Se desuden afsnit 3.2.2.

Protokollen for prøveforberedelse og oparbejdning fremgår af Bilag 3.

3.2.2. Kemisk analyse af mikroplast i oprensede prøver

Potentielle mikroplastkandidater, fx $\geq 500 \mu\text{m}$, sorteres ud af den oprensede prøve. Hver mikroplastkandidat analyseres med ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopi) for at bestemme dets materiale.

Analyse af mikroplast fx $< 500 \mu\text{m}$ sker med μFTIR hyperspektral billedannelse (FTIR microscopy hyperspectral imaging). Sidstnævnte skal have en nedre detektionsgrænse på $20 \mu\text{m}$ eller bedre. Analysen følger en protokol som illustreret i Figur 4. Det IR-transmissive eller -reflektive medie til scanning skal tillade et bølgenummerinterval på mindst $900\text{--}3750 \text{ cm}^{-1}$ at blive målt. Analysen udføres på tre delprøver af partikelekstraktet fra prøveforberedelsen.



Figur 4. Protokol for kemisk analyse med μ FTIR og efterfølgende datainterpretation. Se desuden Bilag 4.

Protokollen for kemisk analyse af mikroplast i oprensede prøver fremgår af Bilag 4.

3.2.3. Definition af mikroplaststørrelse der analyseres for

Analysemetoden skal som nedre grænse for partikelstørrelse kunne detektere partikler med længde på mindst 20 μ m og bredde på mindst 10 μ m. Mikroplast rapporteres som antal partikler i følgende størrelsesintervaller, hvor intervallet angiver partiklernes længste dimension: 20-49 μ m; 50-99 μ m; 100-299 μ m; 300-999 μ m; 1000-4999 μ m. Derudover kan mikroplast <20 μ m rapporteres.

Herudover kan masse estimeres ud fra de spektroskopiske målinger. Hvis dette gøres, skal der anvendes samme størrelsesintervaller som ovenfor beskrevet.

3.2.4. Definition af polymertyper der skal indgå i analysen

Polymergrupperne for rapportering følger HELCOM's anvisning, nærmere betegnet mikroplast baseret på acrylonitril, cellulose (modificeret fra naturlig cellulose), polyamid, polycarbonat, polychlorinerede polymerer, polyester, polyethylen, polyfluorinerede polymerer, polymeth(ester)acrylat, polypropylene, polystyren, polyurethan, gummi fra transportsektoren (SBR, naturgummi), lak og maling (hvor de kan skelnes fra andre polymertyper), andet plastik, andet gummi (hvor de kan skelnes fra andre polymertyper), andet semisyntetisk plastik (HELCOM (2022)).

3.2.5. Definition af partikelbeskrivelse der skal indgå i analysen

For samtlige identificerede mikroplastpartikler angives: Feret maximum diameter (længde), Feret minimum diameter (bredde), areal (som projekteret på en 2D flade under analysen). Partiklernes volumen kan estimeres ud fra partiklens størrelse samt areal, og gøres i givet fald ved at antage, at partiklerne er ellipsoider med den længste diameter lig Feret maximum diameter og et projekteret areal svarende til det målte. Volumen estimeres ved at antage ellipsoidens tredje diameter ud fra viden om den første og anden diameter. Fx ved at antage, at den tredje diameter er 60% af den anden diameter. Massen kan estimeres

ved at benytte det således estimerede volumen med densiteten for den rene polymer, som bestemt ved FTIR.

3.2.5.1. Morfologi

Partikelmorfologi følger så vidt muligt EMODnet's inddeling i filamenter (fibre), fragmenter, film, skum, pellet, granulat og udefineret. Dette er dog kun delvist muligt, idet kategorierne ikke beskriver geometriske forme, men er en vurdering baseret på et sæt mere eller mindre vage kriterier. Flere af kriterierne kræver desuden, at partiklerne kendes i tre dimensioner. Dette kan i et vist omfang lade sig for de større partikler undersøgt under mikroskop og ATR-FTIR, men kan ikke lade sig gøre for små partikler bestemt ved μ FTIR hyperspektral billedannelse eller lignende teknologier, idet disse opererer med 2-dimensionale projektioner af partiklerne. En undtagelse er identifikation af filamenter (fibre), der kan defineres som partikler med forholdet mellem Feret maximum og minimum diameter på mindst 3:1.

Ved rapportering skal der derfor som minimum skelnes mellem fibre og udefineret, hvor fibre defineres som partikler med forholdet mellem Feret maximum og minimum diameter på mindst 3:1, og udefineret defineres som alle andre partikler.

3.2.6. Kvalitetskontrol (blankprøver samt genfinding)

3.2.6.1. Blankprøver

De mindst tre blankprøver per vandområde analyseres for mikroplast med samme teknologier som beskrevet i afsnit 3.2.2.

Herudover skal laboratoriet kunne dokumentere kontaminering (blankværdier) for den anvendte analyseprotokol.

3.2.6.2. Genfinding

Laboratoriet skal kunne dokumentere genfinding for den anvendte analyseprotokol. Genfindingen skal ske med mindst to typer plast og to partikelstørrelser, altså fire forskellige partikeltyper. Hvad partikelstørrelser angår, skal der bruges partikler i den nedre del af størrelsesintervallet, gerne omkring 50 μ m og 80-100 μ m Feret maksimum diameter. Der kan med fordel benyttes standard plastperler (beads) hertil. Genfindingen bør udføres på mindst to typer marint sediment, dækkende sandede og mudrede sedimenttyper. En gennemsnitlig genfinding på 50-70% kan betragtes som en god genfinding.

3.3. Sedimentparametre

For hver mikroplastanalyse analyseres desuden for følgende:

- Vandindhold som målt før tørring ved 105°C, jævnfør ISO 11465:1993 (2020).
- Tørstof målt efter tørring ved 105°C, jævnfør ISO 11465:1993 (2020).
- Glødetab som målt ved udglødning ved 550°C af sediment tørret ved 105°C.

4. Databehandling og indrapportering

Data behandles og afrapporteres således, at de kan indrapporteres til EMODnet, se bilag 2. Desuden følges HELCOM's anvisning om at data ikke korrigeres for blankværdier fundet ud fra blankprøver, men i stedet afrapporteres sammen med de fundne koncentrationer i sedimentprøverne

5. Referencer

HELCOM (2022). HELCOM Guidelines on monitoring of microlitter in seabed sediments in the Baltic Sea. Helsinki Commission – HELCOM, Authors: Elke Kerstin Fischer, Laura Polt, Madina Dolle. Pp. 17

Liu F, Lorenz C, Vollertsen J (2021). Havstrategi – Analyse af mikroplast-partikler i sedimenter. Rapport til Miljøstyrelsen, pp. 63.

Liu F, Lorenz C, Vollertsen J (2022). Havstrategi 2022 – mikroplast i marine sedimenter. Rapport til Miljøstyrelsen, pp. 66.

Liu F, da Silva VH, Chen Y, Lorenz C, Simon M, Vollertsen J, Strand J (2023). R&D project regarding development of methods for sampling and analysis of microplastics in Danish waters. Rapport til Miljøstyrelsen, pp. 81

ISO 11465. Soil quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method.

Bilag 1: Baggrund for anvisningens tekniske detaljer

Under udarbejdelse af anvisningen, har væsentlige elementer af følgende dokumenter været inddraget i overvejelserne omkring tekniske detaljer vedrørende overvågningen.

- HELCOM (2022). HELCOM Guidelines on monitoring of microlitter in seabed sediments in the Baltic Sea. Helsinki Commission – HELCOM, Authors: Elke Kerstin Fischer, Laura Polt, Madina Dolle. Pp. 17
- JRC (2023). Draft on Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas. MSFD Technical Group on Marine Litter, Joint Research Centre (JRC), the European Commission's science and knowledge service. Pp. 225
- Liu F, Lorenz C, Vollertsen J (2020). Havstrategi – Analyse af mikroplast-partikler i sedimenter. Rapport udarbejdet af Aalborg Universitet, Forskningsgruppen for mikroplast, for Miljøstyrelsen, Miljø- og Fødevareministeriet, for arbejde udført i løbet af oktober 2019 til januar 2020. Pp. 27.
- Liu F, Lorenz C, Vollertsen J (2021). Havstrategi – Analyse af mikroplast-partikler i sedimenter. Rapport udarbejdet af Aalborg Universitet, Forskningsgruppen for mikroplast, for Miljøstyrelsen, Miljø- og Fødevareministeriet, for arbejde udført i løbet af september 2020 til december 2021. Pp. 64.
- Liu F, Lorenz C, Vollertsen J (2022). Havstrategi 2022 – mikroplast i marine sedimenter. Rapport udarbejdet af Aalborg Universitet, Forskningsgruppen for mikroplast, for Miljøstyrelsen, Miljø- og Fødevareministeriet, for arbejde udført i løbet af 2022. Pp. 66.
- Liu F, da Silva VH, Chen Y, Lorenz C, Simon M, Vollertsen J, Strand J (2023). R&D project regarding development of methods for sampling and analysis of microplastics in Danish waters. Rapport udarbejdet af Aalborg Universitet, Forskningsgruppen for mikroplast samt Aarhus University, Department of Ecoscience, for Miljøstyrelsen, Miljø- og Fødevareministeriet. Pp. 81.
- OSPAR (2023). Draft on Guidelines for the monitoring of microlitter (including microplastics) in seafloor sediments for the OSPAR Maritime Area. OSPAR Microplastic Expert Group (MPEG). Pp. 39

Bilag 2: Databehandling of indrapportering

Fortolkning af data fra den kemiske analyse

Alle koncentrationer opgives i forhold til sedimentet tørstof.

Data skal ikke korrigeres for blankværdier fundet ud fra blankprøver. I stedet afrapporteres disse sammen med de fundne koncentrationer i sedimentprøverne.

Format for afrapportering

Data indlæses i EMODnet, <https://www.emodnet-ingestion.eu/>, omfattende de nedenfor beskrevne parametre.

Data omfang

Det obligatoriske dataomfang følger specifikationer sat af HELCOM, OSPAR og den Europæiske Kommissions Joint Research Centre (JRC), og omfatter:

Overskrift, dansk	Overskrift, engelsk (Header)	
Togt	Cruise	
Station	Station	
Type	Type	Sættes til "B" for alle prøver
Start tidspunkt	YYYY-MM-DDThh:mm:ss.sss	Start tidspunkt for prøvetagning
Længdegrader	Longitude	
Breddegrader	Latitude	Start punkt
LOCAL_CDI_ID	LOCAL_CDI_ID	
EDMO_code	EDMO_code	EDMO_CODE for data centret der distribuerer dataene
Bunddybde	Bot. depth	Tom hvis ingen data findes
Minimum vanddybde i området	MinimumObservation Depth	
Maksimum vanddybde i området	MaximumObservation Depth	
Prøve ID	SampleID	
Type	Microlitter_Type	Form, jf. afsnit 3.2.5.1
Størrelse	Microlitter_Size	Længde, jf. afsnit 3.2.3
Antal	Microlitter_Count	I kategorier, jf. afsnit 3.2.3
Slut tidspunkt	EventEndTime	
Slut længdegrader	End longitude	Kan undlades
Slut Breddegrader	End latitude	Kan undlades
Partikellængde	Microlitter length	Jævnfør afsnit 3.2.5
Partikelbredde	Microlitter width	Jævnfør afsnit 3.2.5
Farve	Microlitter_Color	Kan undlades
Gennemsigtelighed	Microlitter_Transparency	Kan undlades
Polymer type	Microlitter_Polymer_type	Jævnfør afsnit 3.2.4
Vejrforhold	WMO_Sea_State	Kan undlades
Vindretning	Wind_direction	Kan undlades
Vindhastighed	Wind_speed	Kan undlades
Prøvetagningsprotokol	Sampling_protocol	Nærværende anvisning
Titel på datasæt	Title of dataset	En kortfattet titel, som karakteriserer datasættets emne godt
Resume af datasættet	Narrative summary	Kort beskrivelse af datasættet der rapporteres
Kvantifikationsmetode	Processing method	Kort beskrivelse af analysemetode og protokol, henvisning til nærværende anvisning
Datasæt format	Dataset format	Kan være et eller flere formater

Oplysninger om datakvalitetsbehandling	Data quality processing information	Sammenfatning af datakvalitetsbehandling
Datasæt tilgængelighed	Dataset availability	Vælg en åben licens eller en licens, som skal være kompatibel med åben datadefinition
Datoer	Dates	Dato for oprettelse af datasæt
Observationstype	Observation type	Vælg en relevant parametergruppe fra den medfølgende liste
Geografisk afgrænsningsramme	Geographic bounding box	Tegn et rektangel på kortet for at angive det område, som datasættet dækker
Havområder	Sea areas	Vælg havområder, der er dækket af datasættet
Periode dækket af datasættet	Period covered by the dataset	Angiv start- og slutdatoer i formatet 'åååå-mm-dd'

Herudover rapporteres til Miljøstyrelsen prøvernes:

- Vandindhold
- Tørstof
- Glødetab

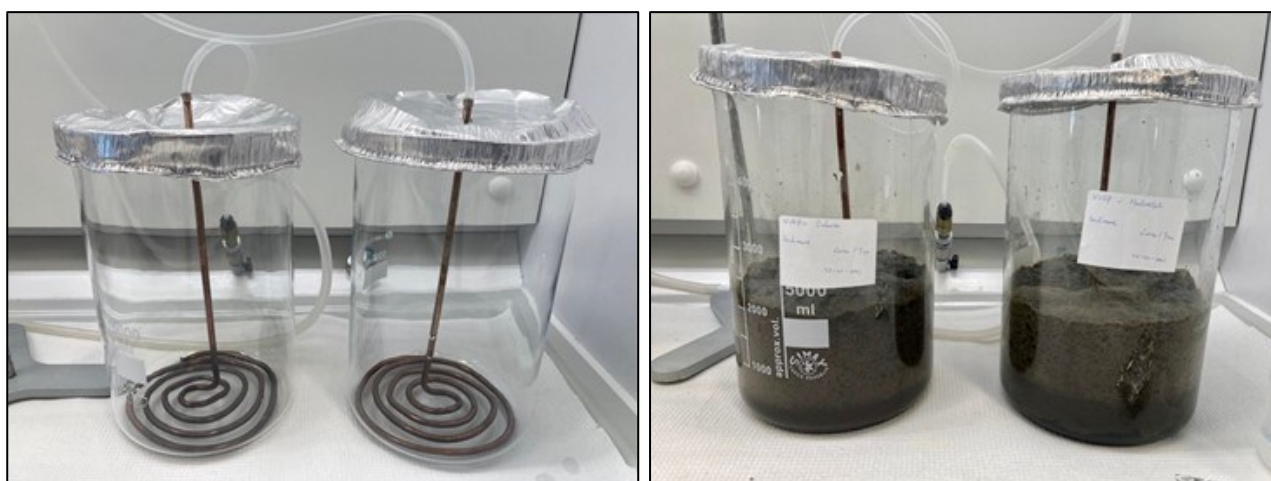
Bilag 3: Prøveforberedelse og oparbejdning

Prøveforberedelsesprotokollen omfatter følgende trin:

- a) Al modtaget sediment oparbejdes, på nær nogle få gram til at bestemme vandindhold og indhold af organisk stof.
- b) Sedimentet præoxideres ved gentagne gange at tilsætte mindre mængder af et oxidationsmiddel, fx H_2O_2 , til en våd prøve. Under forudgående projekter har der været optimeret på præoxideringsmetoden for at reducere det mekaniske slid på mikroplast partiklerne. Der blev udviklet en skånsom fremgangsmåde til omrøring, hvor filtreret og komprimeret luft sendes gennem en specialudviklet spiralformet luftfordeler (Figur 5). Fordeleren er udført i rustfri stål og placeres på bunden af bægeret for at optimere effektiviteten og undgå dødzoner hvor partikler kan aflejres.
Prøvernes volumen på cirka 1 L hver kræver, at hver prøve fordeles på flere bægerglas med beluftere. Konkret overføres cirka 3 skefulde sediment til hver sit 5 L bægerglas, og 150 mL demineraliseret vand (præfiltreret på 1,2 μm GF filter) tilsættes for at gøre prøven mere flydende, samt sikre, at luftfordeleren er ordentligt dækket. Herpå tilsættes oxidationsmiddel, fx 10 mL 30% H_2O_2 , og beluftningen startes (Figur 5).
Efter 4 timer tilsættes yderligere oxidationsmiddel, fx 10 mL 30% H_2O_2 , for at oxidere prøven yderligere. Dette trin gentages, indtil der ikke observeres nogen oxidationsreaktion, indikeret ved at der ikke længere dannes skum. Herefter overføres alle oxiderede prøver til et andet rengjort 5 L bægerglas. Det tømte bægerglas med luftfordeleren genbruges til en anden delprøve fra samme prøve, og disse trin gennemføres til hele prøven er præoxideret. Afhængig af mængden af organisk stof i prøven, tager præoxideringen op til en uge.
- c) Alt det præoxiderede sediment vådsigtets på en 2 mm sigte ved brug af Milli-Q vand (filtreret på 1,2 μm GF filter) til at vaske prøven gennem filteret. Partikler på sigten samles i en petriskål og undersøges visuelt for partikler, der muligvis kunne være plast (Figur 6). Alle potentielle kandidater analyseres efterfølgende på ATR-FTIR. Resten af partiklerne, altså dem mindre end 2 mm, frysetørres forud for densitetsseparation (Figur 7).
- d) Herpå overføres det frysetørrede sediment til 2 L separationstragte (Figur 8) og tragtene fyldes delvist op med væske med høj densitet, fx SPT-opløsning (sodium polytungstate) eller zinkklorid-opløsning. Væskens densitet skal være på mindst 1,50 g/cm^3 , og det tilstræbes at densiteten er 1,75 g/cm^3 , hvorpå tragten beluftes nedefra med tør, filtreret luft i 30 minutter. Tragten henstår derpå til sedimentation natten over.
- e) Partikler der flyder på eller lige under overfladen (indtil cirka 3 cm under overfladen) opsamles for videre analyse. Partikler der sidder på tragtens glasvæg vaskes omhyggeligt ned og medtages i den videre analyse.
- f) Det bundfældede materiale tappes af, opsamles og separationen gentages (skridt d og e).
- g) Den aftappede væske filtreres på et 10 μm stålfilter (Figur 9), og filteret vaskes ren for overskydende SPT.
- h) Materialet på filteret tages af ved en kort sonikering, hvorpå prøven inkuberes i en tris-buffer med protease ved pH 8 og 50°C i 48 timer.
- i) Væsken filtreres igen og filtratet overføres til en acetat-buffer med cellulase ved pH 4 og inkuberes ved 50°C i 48 timer.
- j) For at fjerne yderligere organisk stof filtreres prøven igen, og filtratet oxideres ved en Fenton proces (jernsulfat katalyseret H_2O_2 oxidation) (Figur 10) som følger: 146 mL 50% H_2O_2 , 63 mL 0,1 M FeSO_4 og 65 mL af 0,1 M NaOH. Temperaturen holdes på 15-30°C ved i begyndelsen at placere bægeret i

et isbad (da processen er stærkt exoterm), og siden blot i et vandbad (når reaktionen er faldet til ro) og oxidationen forløber over 24 timer. Eventuelt kan der anvendes en anden type effektiv oxidation, som er dokumenteret ikke at påvirke mikroplast partiklerne.

- k) For at fjerne rester af ler og silt fra prøven, gennemførtes endnu en flotering, men denne gang i en 100 mL separationstragt. Også denne beluftes i 30 minutter, prøven henstår over nat, og flotatet tages fra til videre analyse.
- l) Efter denne sidste flotering bliver flotatet filtreret på et 500 μm filter og de store partikler gemmes for senere analyse på ATR-FTIR.
- m) Flotatet bliver igen filtreret på et 10 μm filter, og materialet overført til 50% etanol. Prøven inddampes og præcis 5 mL 50% etanol tilsættes, hvorefter prøven gemmes til efterfølgende analyse på μFTIR (10-500 μm) (afsnit 2.5). Figur 11 viser koncentratet fra to sådanne prøver.
- n) Store partikler tørres i ovn ved 55°C før analyse på ATR-FTIR.



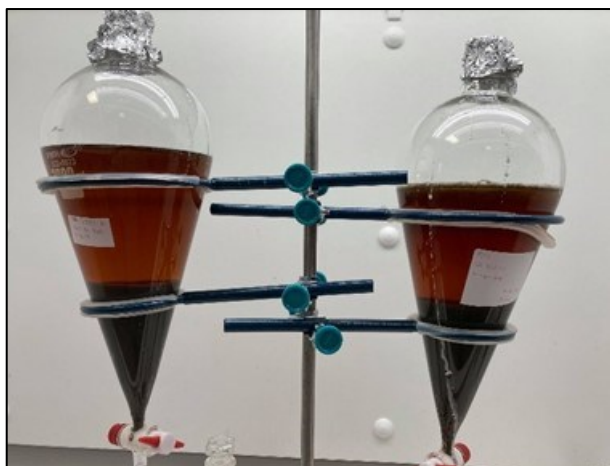
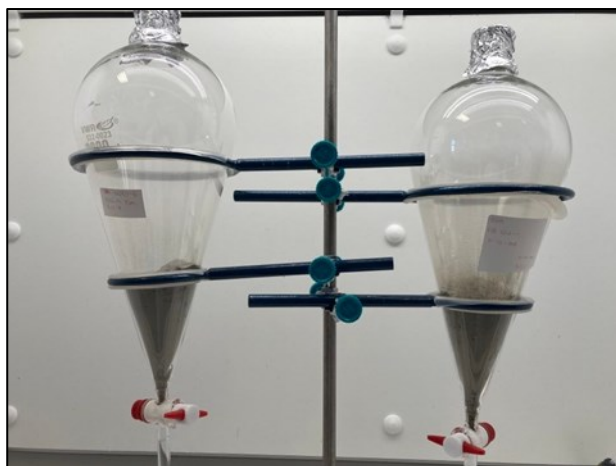
Figur 5. Specialdesignet luftfordeler (venstre billede), præoxidering af sedimenter ved tilsætning af 30% H_2O_2 (højre billede)



Figur 6. Materiale samlet på 2 mm sigte, der derpå manuelt sorteres i mulige kandidater for mikroplast



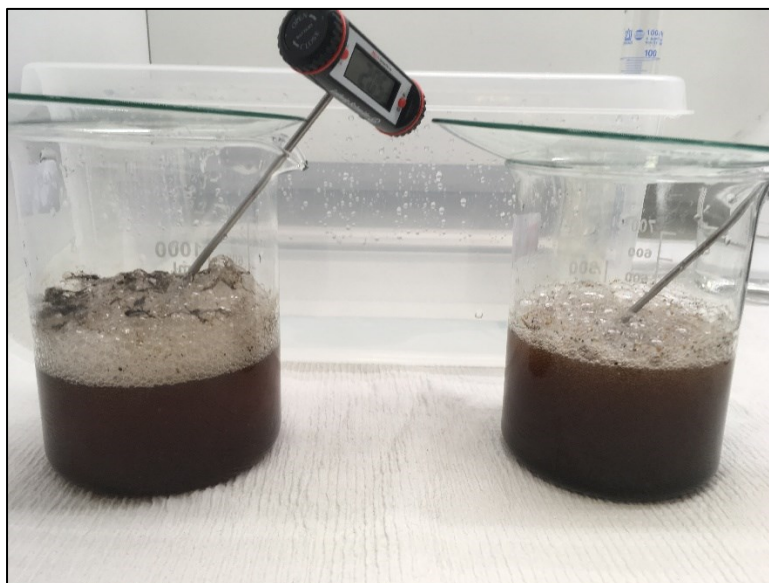
Figur 7. Frysetørring af partikler <2 mm efter vådsigtning



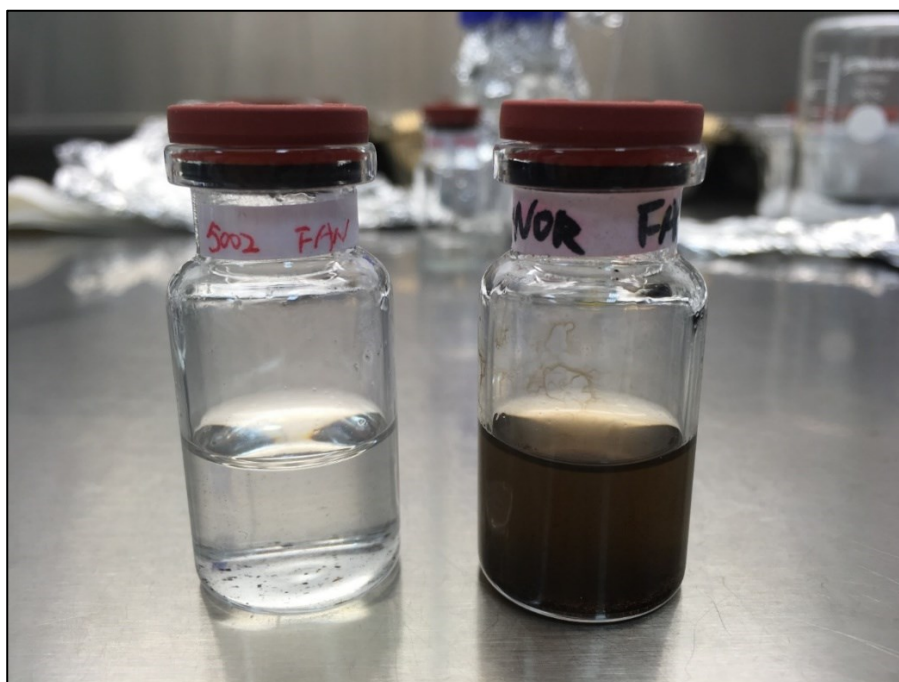
Figur 8. Frysetørret sediment fyldt på separationstragte (venstre billede), og efter tilsætning af SPT opløsning (højre billede)



Figur 9. Materiale på et Ø47 stålfilter med 10 μm porestørrelse



Figur 10. Fenton oxidation



Figur 11. Partikelkoncentrat klar til scanning på μFTIR . Væsken til venstre stammer fra Sønderborg Fjord svarende til cirka 200 g prøve, mens væsken til højre stammer fra Frederikshavn/Kattegat med knap 1000 g prøve

Prøverne behandles i videst muligt omfang under ren-rumslignende forhold. Rum hvori der analyseres for mikroplastik kan udstyres med kontinuert luftrensning (fx Dustbox®), mens mere følsomme dele af prøveforberedelsen kan foregå i et støvfrit laminært flowskab (Figur 12). Påklædning bør bestå af bomuld (laboratoriekitter, T-shirts, bukser). Al materiale, der bruges i analysen, bør bestå af metal, glas eller polymerer, der ikke indgår i analysen (teflon, idet teflon har en densitet på 2.2 g/cm^3 og derfor alligevel ikke kan separeres ud fra de uorganiske partikler).

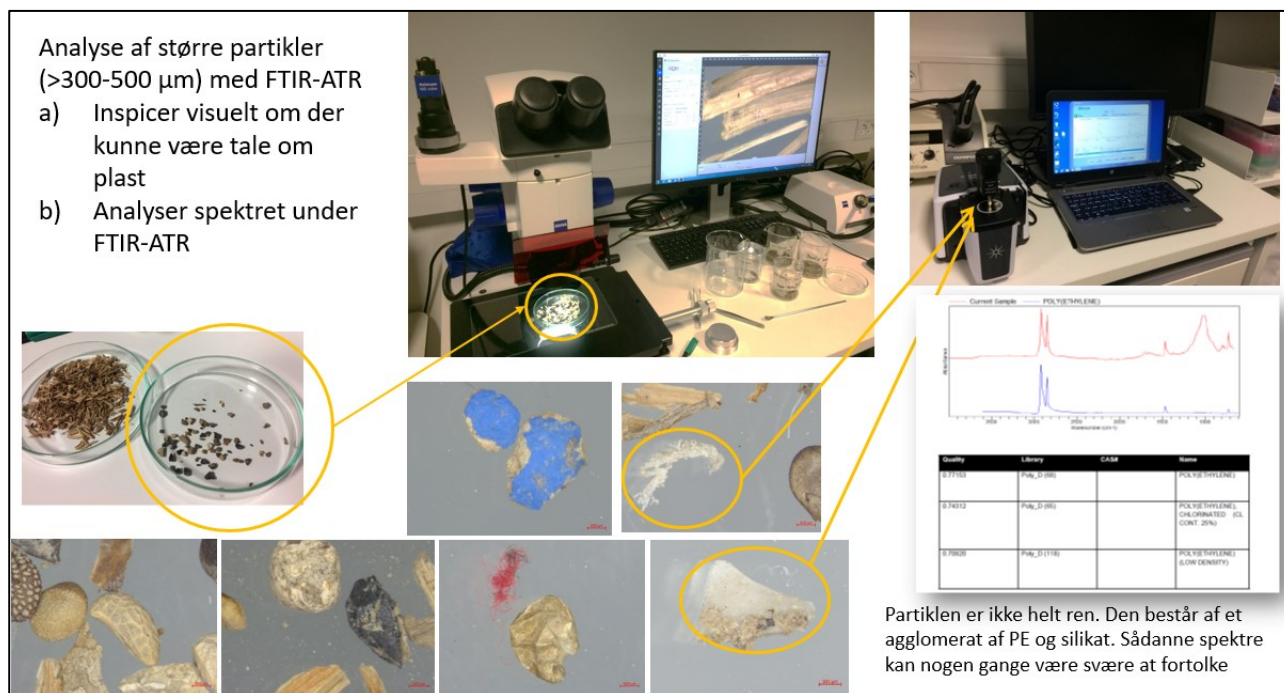


Figur 12. Laminært flowskab med luftrensning til at sikre renrumsforhold under mikroplast analyse

Bilag 4: Kemisk analyse af mikroplast i oprensede prøver

Kemisk analyse af mikroplast 500– 5000 μm

- Alle partikler der måske kan være af plast sorteres ud, og der tages et billede under stereomikroskop med størrelsesskala for at kunne bestemme partiklens størrelse.
- Partiklens kemiske sammensætning analyseres med ATR FTIR som illustreret i Figur 13
- Hvis der er tale om en plast partikel, bruges dimensionen til at estimere partiklens masse, på samme vis som for de mindre partikler (afsnit 3.2.5).
- Partikler der ikke kan analyseres med ATR FTIR, fx fordi de er for små i den mindste dimension (fx fibre), samles og analyseres efterfølgende som beskrevet i afsnit "Kemisk analyse af mikroplast 10 – 500 μm "
- Ud fra mikroskopibilledet, FTIR-analysen, samt massen registreres følgende: Hver enkelt partikels størrelse (maksimal og minimal Feret diameter (dvs. længde og bredde)), polymertype, farve (hvis denne kan identificeres), form, samt partiklens masse.

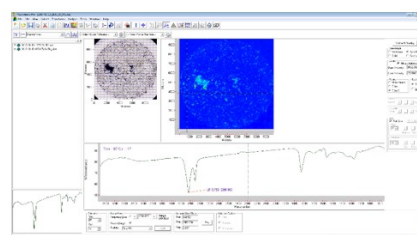
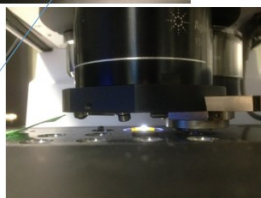
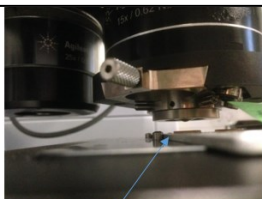
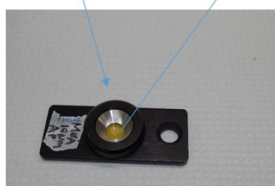


Figur 13. FTIR-ATR analyse af partikler >500 μm

Kemisk analyse af mikroplast 10 – 500 μm

- En delmængde af prøven koncentreret i 5 ml 50% etanol deponeres på et IR transparent eller reflektivt medie, der tillader analyse i bølgeområdet 900 – 4000 cm^{-1} . Mediet scannes på en μFTIR hyperspectral imaging maskine med en pixel-opløsning på mindst 10 μm . Fremgangsmåden er illustreret i Figur 14
- Der scannes mindst tre medier /sammenhængende områder af mindst 75 mm^2 . Andelen af prøvekoncentratet der kan scannes på tre medier, afhænger af hvor rent koncentratet er for interfererende partikler. I praksis kan nogle prøvetyper oprenses til et ganske rent koncentrat, mens andre er stort set umulige at få gjort helt rene. For de værste prøver, fx mudrede og lerholdige sedimenter, eller sedimenter indeholdende kul, siger erfaringen, at det nogle gange kun er muligt at deponere 50-100 μL per prøve, mens andre kan være så rene, at der kan deponeres 100-1000 μL per prøve. Det tilstræbes at der deponeres så meget som muligt på de tre medier der scannes, og at der som minimum scannes mindst 300 μL ud af de 5 mL, også selvom dette måtte betyde, at der scannes flere medier end de ovenfor nævnte tre.
- Data fra scanningen overføres til et egnet software, fx siMPLe, der kan downloades på www.simple-plastics.eu, og analyseres ved brug af et referencebibliotek indeholdende relevante plastmaterialer samt naturlige materialer, der kan forveksles med plast. Softwaren beregner størrelse og form, og estimerer volumen, og herfra hver enkelt partikels masse. Metoden er illustreret i Figur 15 og Figur 16.

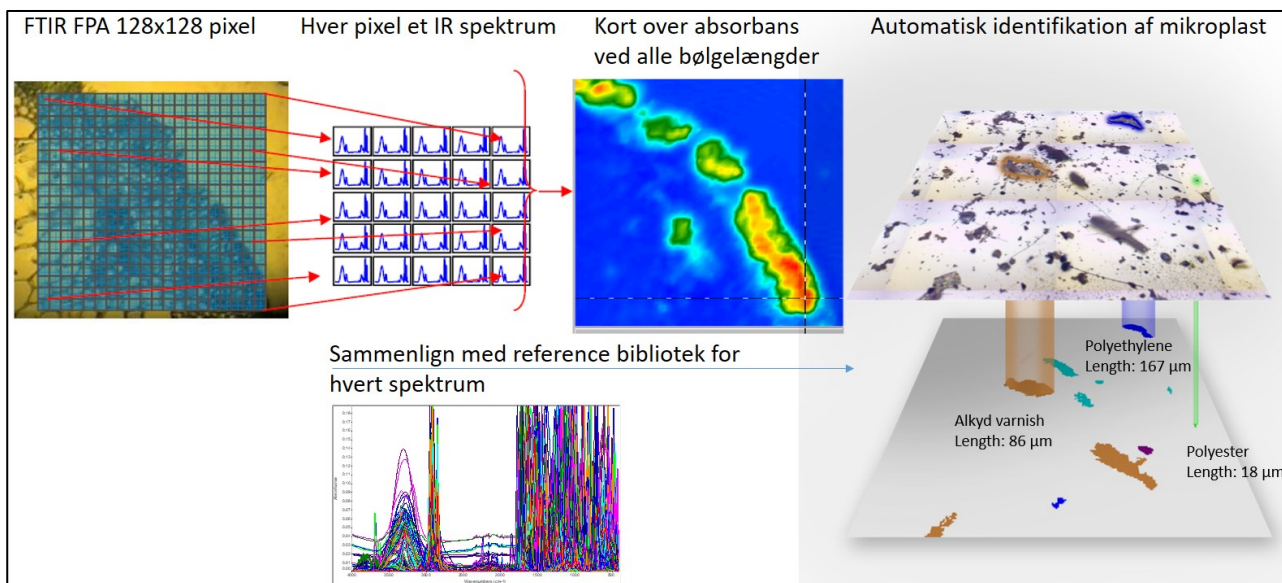
Efter prøveforberedelse deponeres en delmængde på et IR-transmisivt vindue eller filter, hvorpå prøven scannes



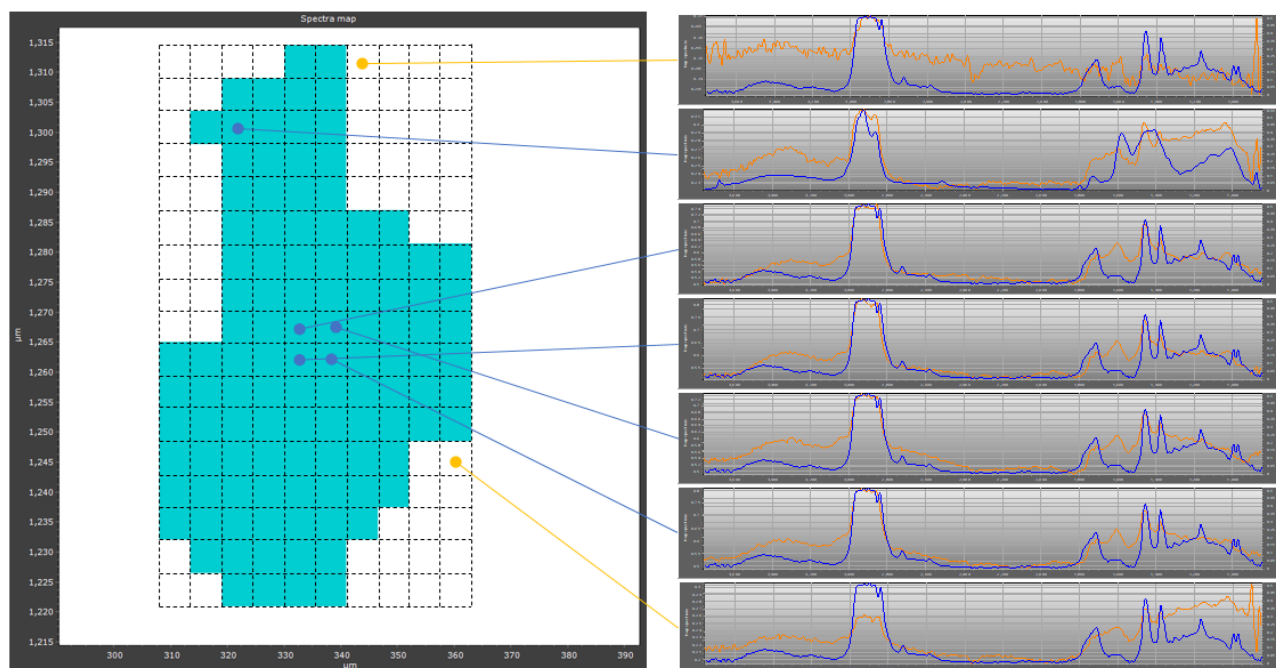
ET godt spektrum af hvad der formentlig er zink stearat

Et nogenlunde spektrum af hvad der formentlig er polypropylen

Figur 14. Scanning for partikler <500 μm



Figur 15. Princippet for fortolkning af μFTIR imaging data



Figur 16. Bygge partikler ud fra individuelle spektre: Hver pixel har et individuelt spektrum opnået ved μ FTIR analysen. Alle pixel-spektre sammenlignes med et bibliotek, og det bedste fit findes for hver pixel (de blå cirkler viser eksempler på rimeligt fit til plastik). For hver polymertype (i dette tilfælde PP) er der mange spektre i biblioteket, så nogle gange er det det ene PP-spektrum, nogle gange det andet, der passer bedst. Men da de alle er PP, ses partiklen som PP. De pixel hvor fittet er for ringe (fx dem markerer med orange cirkler), er ikke en del af partiklen

Bilag 5: Oversigt over versionsændringer

Version 1.0, dateret den 01.01.2024 er på Miljøstyrelsens foranledning blevet lettere modificeret den 04.04.2024.