



Technische Universität München  
Fakultät für Chemie  
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie  
Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie

## **Strategien zur Analyse von Mikroplastik mittels RAMAN-Mikrospektroskopie**

**Philipp Maximilian Anger**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Schuster  
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Reinhard Nießner  
2. apl. Prof. Dr. Thomas Baumann

Die Dissertation wurde am 09.01.2020 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 28.02.2020  
angenommen.



„Die höchste Lust haben wir ja an den Fragmenten, wie wir am Leben ja auch dann die höchste Lust empfinden, wenn wir es als Fragment betrachten, und wie grauenhaft ist uns das Ganze und ist uns im Grunde das fertig Vollkommene.“

*Thomas Bernhard, Alte Meister*



## Danksagung

An erster Stelle danke ich besonders Herrn Prof. Reinhard Nießner für das mir entgegengebrachte Vertrauen, seine fachliche Unterstützung und die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl die Doktorarbeit zu beginnen und unter seiner kritischen Begutachtung zu vollenden.

Herrn apl. Prof. Thomas Baumann danke ich für die vielen hilfreichen Diskussionen unter anderem zur statistischen Bewertung der Mikroplastik-Analytik. Ganz besonders danke ich ihm für seine Bereitschaft meine Dissertation zu prüfen.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Martin Elsner, der es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit am Lehrstuhl abzuschließen. Ich danke ihm auch besonders für die sehr hilfreichen Empfehlungen bei bisher zwei Veröffentlichungen.

Bei Frau Dr. Natalia P. Ivleva bedanke ich mich für die außerordentlich erfolgreiche Zusammenarbeit und ihre mir entgegengebrachte Unterstützung und Förderung.

Herrn apl. Prof. Christoph Haisch danke ich für seine hilfreichen Kommentare zur statistischen Bewertung der Mikroplastik-Analytik und seine Unterstützung für unser Doktoranden-Seminar zum Thema Datenauswertung.

Ich danke außerdem meinen Projektpartnern Herrn Prof. Martin Jekel und Dr. Aki Sebastian Ruhl für die Koordination des BMBF-Projektes "MiWa – Mikroplastik im Wasserkreislauf" und stellvertretend für die gute Zusammenarbeit mit allen Projektpartnern.

Bei meinen Co-Autoren Dr. Hannes Imhof, Prof. Christian Laforsch, Dr. Julia Schwaiger, Dr. Janina Domogalla-Urbansky, Hermann Ferling und Florian Rager bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und die gemeinsamen Publikationen. Ebenfalls danke ich Frau Alexandra C. Wiesheu für die erfolgreiche Zusammenarbeit während meiner Bachelor- und Masterarbeit.

Ich danke meinen Studentinnen und Studenten, deren Arbeiten ich betreuen durfte und die ich allesamt für ihre hohe Motivation und ihre kreativen Ideen in guter Erinnerung behalten werde: Constanze Neumann, Leonhard Prechtel, Sonja Hoffmann, Natalie Rosen, Carsten Aulenbacher und Margit Aust.

Herrn Leonhard Prechtel hebe ich hierbei hervor und danke ihm besonders für seine Programmierkünste, die die Publikation zur Implementierung von OTSU's Algorithmus ermöglicht haben.

Ein ganz besonders großer Dank gebührt Frau Carolin Hartmann für ihren unermüdlichen Einsatz zur qualitativen Verbesserung meiner Arbeiten, zahllose kurzweilige fachliche und nichtfachliche Diskussionen und die freundschaftliche Rivalität am und außerhalb des IWC.

Ein weiterer besonderer Dank geht an Frau Elisabeth von der Esch für die exzellente und freundschaftliche Zusammenarbeit, die sich insbesondere, aber nicht nur, in der gemeinsamen Publikation *RAMAN microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis* widerspiegelt.

Frau Lisa Göpfert danke ich zuerst einmal für viele, bestimmt sehr mühsame, Korrekturarbeiten. Ich danke ihr aber auch besonders für ihre sehr herzliche Art, die meine Zeit am IWC außerordentlich bereichert hat.

Ich danke herzlichst allen meinen lieben Kolleginnen und Kollegen am IWC, den IWC'lern, die meine drei Jahre Promotion zu einer unvergesslichen, Ereignis- und Kaffee-reichen Zeit gemacht haben. Namentlich bedanke ich mich besonders bei Jessica Beyerl und Katharina Zirngibl, bei David Bauer, Oleksii Morgaienko, Christian Schwaferts, Ruben Weiß, Cornelia Popp und Christine Beese.

Herrn Marco Pittroff danke ich für die vielen gemeinsamen Diskussionen und guten Erinnerungen an Projekttreffen und diverse Tagungen.

Herrn Sebastian Wiesemann und Herrn Roland Hoppe danke ich besonders für die vielen Arbeitsstunden, die sie für die Umsetzung gemeinsamer Ideen eingesetzt haben bzw. für die Konstruktion des in dieser Arbeit gezeigten Filterhalters.

Zum Schluss danke ich in ganz besonderem Maße meinen Eltern und Großeltern, meiner Schwester und meiner Verlobten, die mich all die Jahre ausgehalten, in jeder erdenklichen Art unterstützt und es mir damit letztendlich ermöglicht haben, diese Arbeit zu schreiben.

## Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Philipp M. Anger**<sup>1</sup> und Elisabeth von der Esch<sup>1</sup>, Thomas Baumann, Martin Elsner, Reinhard Niessner, Natalia P. Ivleva, *RAMAN microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis*, Trends in Analytical Chemistry, (109) **2018**, 214-226, DOI: 10.1016/j.trac.2018.10.010

**Philipp M. Anger**<sup>1</sup> und Leonhard Precht<sup>1</sup>, Martin Elsner, Reinhard Niessner, Natalia P. Ivleva, *Implementation of an open source algorithm for particle recognition and morphological characterisation for microplastic analysis by means of Raman microspectroscopy*, Analytical Methods, **2019**, DOI: 10.1039/c9ay01245a

Weitere Publikationen:

Hannes K. Imhof<sup>1</sup> und Christian Laforsch<sup>1</sup> und Alexandra C. Wiesheu<sup>1</sup>, Johannes Schmid, **Philipp M. Anger**, Reinhard Niessner, Natalia P. Ivleva, *Pigments and plastic in limnetic ecosystems: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes*, Water Research, (98) **2016**, 64-74, DOI: 10.1016/j.watres.2016.03.015

Alexandra C. Wiesheu, **Philipp M. Anger**, Thomas Baumann, Reinhard Niessner, Natalia P. Ivleva, *RAMAN microspectroscopic analysis of fibres in beverages*, Analytical Methods, **2016**, 5722-5725, DOI: 10.1039/c6ay01184e

Janina Domogalla-Urbansky<sup>1</sup> und **Philipp M. Anger**<sup>1</sup>, Hermann Ferling, Florian Rager, Alexandra C. Wiesheu, Reinhard Niessner, Natalia P. Ivleva, Julia 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, (26) **2019**, 2007-2012, DOI: 10.1007/s11356-018-3609-3

Hannes K. Imhof, Alexandra C. Wiesheu, **Philipp M. Anger**, Reinhard Niessner, Natalia P. Ivleva, Christian Laforsch, *Variation in plastic abundance at different lake beach zones – A case study*, Science of the Total Environment, (613-614) **2018**, 530-537, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.300

<sup>1</sup>geteilte Erstautorenschaft

## Kurzfassung

Mikroplastik (MP, Kunststoffpartikel mit einer Größe von  $1\ \mu\text{m}$  –  $1\ \text{mm}$ ) ist ein aktuell in den Medien sehr präsender Umweltkontaminant. Das von ihm ausgehende Risiko beschäftigt die Wissenschaft. Eine sinnvolle Risikobewertung kann nur basierend auf einer aussagekräftigen Analytik der MP-Gehalte in der Umwelt stattfinden. Zurzeit werden verschiedene thermoanalytische und spektroskopische Methoden zur Analyse von MP eingesetzt. Die RAMAN-Mikrospektroskopie (RM) wurde für diese Arbeit gewählt, da sie MP-Partikel bis  $1\ \mu\text{m}$  analysieren kann. Ausgehend von IMHOF et al. 2016 [1] wurden in dieser Arbeit Empfehlungen hinsichtlich der Wahl der Laserwellenlänge ( $532\ \text{nm}$  oder  $633\ \text{nm}$ ), der Laserleistung (ca.  $0,4\ \text{mW}$  –  $10,8\ \text{mW}$ ), des zu verwendenden Objektivs ( $20\times$  oder  $50\times$  LWD), des zu untersuchenden spektralen Bereichs ( $200\ \text{cm}^{-1}$  –  $3200\ \text{cm}^{-1}$ ), des optischen Gitters ( $300\ \text{Linien/mm}$  oder  $600\ \text{Linien/mm}$ ) und der Messzeit (ca.  $10\ \text{s}$  –  $30\ \text{s}$ ) erarbeitet. Die Entwicklung eines Filterhalters ermöglicht, durch die damit erzielte geringe Rauigkeit der eingespannten Filter, eine optimale RAMAN-mikroskopische Analyse. Für die Anwendung dieser Arbeit kann angenommen werden, dass nur innerhalb eines z-Achsen-Abschnitts von ca.  $22\ \mu\text{m}$  –  $48\ \mu\text{m}$  Signal generiert und von der Optik gesammelt wird. Diese geringe Rauigkeit wird mit Polycarbonat-Filtern mit Goldbeschichtung im Filterhalter und mit Silicium-Filtern erreicht. Es wurden außerdem verschiedene Beleuchtungsmodi des eingesetzten RAMAN-Systems getestet, wobei sich die Dunkelfeld-Beleuchtung als beste Wahl herausstellte. Die so optimierten Parameter wurden in der vom BMBF organisierten Elb-Schwimmstaffel eingesetzt. Es zeigte sich noch weiterer Optimierungsbedarf, insbesondere hinsichtlich Zahl zu messender Partikel und statistischer Aussagekraft des Ergebnisses. Zusätzlich wurden zehn verschiedene Klebebänder für das *Tape Lift Screening* als Methode zur Erkennung von Kontaminationen während der Probenvorbereitung untersucht. Um die Partikelerkennung zu objektivieren und zu beschleunigen wurde eine *Open Source Software*, basierend auf OTSU's Algorithmus, auf ihre Eignung für die MP-Analytik hin geprüft. Mit diesem frei zugänglichen Programm können die Gesamtpartikelzahl auf einem Filter, morphologische Charakteristika wie Durchmesser nach FERET, sowie die Koordinaten der Partikel bestimmt werden. Damit ist eine vergleichbare und reproduzierbare Partikelerkennung für verschiedene Proben, aber prinzipiell auch für verschiedene Labore möglich. Im letzten Teil der Arbeit wird eine Möglichkeit zur Bestimmung einer minimal zu messenden Partikelzahl vorgestellt, die es ermöglicht, eine statistische Aussage über den ganzen Filter zu treffen. Die erzielten Verbesserungen wurden schließlich in Vergleichsuntersuchungen eingesetzt. Insgesamt konnte die MP-Analytik mittels RM deutlich weiterentwickelt werden, allerdings gibt es immer noch Potential für weitere Verbesserungen.

## Abstract

Microplastics (MP, synthetic polymers in the size range 1  $\mu\text{m}$  – 1 mm) are a so-called emerging contaminant and a very frequent topic in public media. In science, there is an ongoing debate about the imposed risk. A serious assessment of the risk is only possible if the data for its occurrence in the environment are sound, which implies great efforts for the improvement and validation of the analytical methods in question. Currently thermoanalytical methods and spectroscopic methods are applied. For this work RAMAN microspectroscopy (RM) was the method of choice, as it allows the analysis of MP particles down to 1  $\mu\text{m}$ . As a starting point the publication of IMHOF et al. [1] from 2016 was chosen. Based on the presented work following, recommendations for the choice of the laser wavelength (532 nm or 633 nm), the laser power (around 0.4 mW – 10.8 mW), the objective lens (20 $\times$  or 50 $\times$  LWD, long working distance), the spectral region (200  $\text{cm}^{-1}$  – 3200  $\text{cm}^{-1}$ ), the optical grating (300 lines/mm or 600 lines/mm), and for the measurement time (10s – 30s) were compiled. Furthermore, in order to enable a very smooth filter surface a filter holder was developed. For the application in this work an excitation along the optical axis at a length of around 22  $\mu\text{m}$  – 48  $\mu\text{m}$  can be assumed. This is reachable with a gold coated polycarbonate filter clamped into the filter holder and with a silicon filter. For the illumination of the sample different modes for the used RAMAN system were tested. Dark field illumination was found to be the best suited illumination type. These optimized parameters were applied in a swim relay on the river Elbe organized by the BMBF. Although improved, the method showed drawbacks regarding the overall number of particles that can be analyzed and the statistical significance of the result. Additionally, Tape Lift Screening as a method for the detection of contaminations during sample preparation was evaluated. Ten different tapes were compared among each other. To facilitate a more reliable and faster particle recognition a software package for particle detection based on the algorithm of OTSU was validated. The open source software package enables the determination of the overall particle number on the filter, as well as morphological particle characterization (e.g. FERET diameter) and the calculation of particle coordinates. This enables comparable and reproducible particle detection for different samples and in principle also for different labs. In the last part of this work a possibility to calculate the necessary number of particles that need to be analyzed for a statistical meaningful result is described. The overall improvements were applied within a comparative study. Although the development compared to 2016 are substantial, there is still potential for further optimization.

# Inhaltsverzeichnis

<b>DANKSAGUNG</b> .....	I
<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	III
<b>KURZFASSUNG</b> .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	VI
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
<b>2. AUFGABENSTELLUNG</b> .....	3
<b>3. THEORETISCHER HINTERGRUND</b> .....	5
<b>3.1. Der Analyt Mikroplastik</b> .....	5
3.1.1. Definieren des Analyten Mikroplastik .....	5
3.1.2. Vorkommen, Toxikologie und Risiko von Mikroplastik .....	10
3.1.3. Probenahme für die Mikroplastik-Analytik .....	12
3.1.4. Probenaufbereitung für die Mikroplastik-Analytik .....	14
3.1.5. Die verschiedenen analytischen Techniken im Vergleich .....	16
<b>3.2. Allgemeine Grundlagen der RAMAN-Spektroskopie und Mikroskopie</b> .....	22
3.2.1. Räumliches Auflösungsvermögen der RAMAN-Mikrospektroskopie .....	26
3.2.2. Zeitlicher Aspekt der RAMAN-Messung für Mikroplastik-Partikel .....	30
<b>3.3. Kontaminationskontrolle für die Mikroplastik-Analytik</b> .....	33
<b>3.4. Partikelerkennung</b> .....	39
<b>3.5. Repräsentativität der Messung</b> .....	43
<b>4. EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	45
<b>4.1. Optimierung verschiedener RAMAN-Parameter</b> .....	45
4.1.1. Entwicklung und Validierung von Filterhaltern für die RAMAN-Analyse .....	45
4.1.2. Vergleich verschiedener Beleuchtungsmodi .....	48
4.1.3. Vergleich verschiedener Filtermaterialien.....	51
<b>4.2. Kontaminationskontrolle für die Mikroplastik-Analytik</b> .....	52
4.2.1. Erkennen von Kontaminationen mittels UV/Weißlicht .....	52
4.2.2. Erkennen von Kontaminationen mittels Tape-Lift-Screening .....	53

4.3.	Evaluierung einer Partikelerkennung basierend auf OTSU's Algorithmus.....	56
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
5.1.	Optimierung verschiedener RAMAN-Messparameter .....	58
5.1.1.	Entwicklung und Validierung von Filterhaltern für die RAMAN-Analyse.....	59
5.1.2.	Vergleich verschiedener Beleuchtungsmodi .....	63
5.1.3.	Vergleich verschiedener Filtermaterialien .....	65
5.1.4.	Zusammenfassung der optimierten Parameter .....	66
5.2.	Anwendung in der Analyse der BMBF Elb-Schwimmstaffel-Proben.....	68
5.3.	Kontaminationskontrolle für die Mikroplastik-Analytik.....	71
5.3.1.	Erkennen von Kontaminationen mittels UV/Weißlicht .....	71
5.3.2.	Erkennen von Kontaminationen mittels Tape-Lift-Screening .....	72
5.4.	Evaluierung einer Partikelerkennung basierend auf OTSU's Algorithmus.....	79
5.5.	Repräsentativität der Messung.....	90
5.6.	Anwendung in der Analyse der BMBF Vergleichsversuchs-Proben.....	92
5.7.	Vergleich der Mikroplastik-Analytik 2016 und 2019 und anwendbare Arbeitsvorschrift.....	96
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>99</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>106</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>109</b>
	<b>GERÄTE UND CHEMIKALIEN .....</b>	<b>111</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>113</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>115</b>
	<b>ANHANG – A – OPTIMIERUNG VERSCHIEDENER RAMAN-PARAMETER .....</b>	<b>124</b>
	<b>ANHANG – B – KONTAMINATIONSKONTROLLE .....</b>	<b>132</b>
	<b>ANHANG – C – PARTIKELERKENNUNG.....</b>	<b>134</b>
	<b>ANHANG – D – PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>154</b>



# 1. Einleitung

Das Schlagwort Mikroplastik (MP, Kunststoffpartikel mit einer Größe von 1 µm – 1 mm) umfasst ein in der Öffentlichkeit homogen wahrgenommenes Verschmutzungsproblem und in der Wissenschaft eine divers und kontrovers diskutierte Gruppe von Umweltkontaminanten stark unterschiedlicher Eigenschaften.

In die öffentliche Wahrnehmung gelangt MP sehr oft durch spektakuläre Nachrichten über Funde in vormals MP-freien Matrices. Ein Beispiel hierfür ist MP in Stuhlproben: „Mikroplastik im Menschen – Schöne Scheiße mit dem Plastik“ (taz.de, 23.10.2018), „Erstmals Mikroplastik in menschlichen Stuhlproben nachgewiesen“ (Spiegel online, 23.10.2018), „Forscher finden erstmals Mikroplastik in Stuhlproben von Menschen“ (Zeit online, 23.10.2018), oder aber auch „Mikroplastik in menschlichen Stuhlproben nachgewiesen“ (aerzteblatt.de, 23.10.2018). Diese Nachrichten beruhen allesamt auf einer Pilotstudie des Umweltbundesamtes Österreich und der Medizinischen Universität Wien, die unter anderem aus 8 [sic!] Probanden hochrechnet, dass 50 % der Weltbevölkerung MP im Stuhl haben könnten [2, 3].

Ein weiteres Beispiel für die Wahrnehmung spektakulärer Funde ist eine Studie des Alfred-Wegener-Instituts in der MP-Partikel in Schnee nachgewiesen wurden [4]. Die Mengen bewegten sich zwischen  $0,02 \times 10^3$  Partikeln/L und  $154 \times 10^3$  Partikeln/L. Die verschiedenen größeren Medien schrieben: „Es schneit Plastik“ (Süddeutsche Zeitung online, 15.8.2019), oder „Mikroplastik in Schnee von Bayern bis in die Arktis gefunden – Forscher sind entsetzt“ (Focus online, 14.8.2019).

In der Wissenschaft liegt ein wesentlicher Fokus der Diskussion auf der Relevanz von MP als Kontaminant. Ein Beispiel hierfür ist eine Reihe von Meinungsartikeln, die in *Environmental Science & Technology* erschienen sind. Der erste Artikel von BURTON [5] trägt den Titel „*Stressor Exposures Determine Risk: So, Why Do Fellow Scientists Continue To Focus on Superficial Microplastics Risk?*“. Er führt an, dass MP kein Risiko darstellen kann, da die in der Umwelt gefundenen Konzentrationen zu niedrig sind, um relevant zu sein. Die Antwort darauf lieferte HALE [6] mit seinem Meinungsartikel „*Are the Risks from Microplastics Truly Trivial?*“. Er führt vor allem an, dass die MP-Gehalte unterschätzt werden und in Zukunft stark steigen werden. Ein weiterer Beitrag kam

von KRAMM et al. [7] unter dem Titel „*Superficial or Substantial: Why Care about Microplastics in the Anthropocene?*“. Die Autoren äußern Verständnis für beide Seiten und ziehen den Schluss, dass das bisherige Wissen nicht ausreicht, um das Risiko durch MP bewerten zu können.

Die Meinungen über die Toxikologie gehen zwar auseinander, Konsens besteht jedoch bei der Wichtigkeit belastbarer MP-Gehalte. Neben den toxikologischen Befunden stellen diese die zweite Säule einer Risiko-Abschätzung dar. Gegenwärtig werden MP-Proben vor allem rein optisch, mithilfe der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR), der RAMAN-Mikrospektroskopie (RM), sowie den Massebasierten Methoden Pyrolyse-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (Pyr-GC-MS) und Thermo-extraktions-Desorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (TED-GC-MS) analysiert. In dieser Arbeit wird RM als Methode der Wahl untersucht. Die RM besitzt unter anderem den besonderen Vorteil gegenüber allen anderen eingesetzten Methoden, die besonders kleinen MP-Partikel unterhalb ca. 20 µm analysieren zu können [8].

## 2. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Analytik von MP mittels RM auf eine solide Basis zu stellen und die Verlässlichkeit der Gehaltsbestimmungen zu erhöhen. Dies wurde innerhalb des BMBF-Projektes „MiWa – Mikroplastik im Wasserkreislauf“ durchgeführt. Ausgangspunkt ist der Stand der Technik in 2016, der konkret durch die Publikation von IMHOF et al. [1] repräsentiert wird. In dieser Arbeit wurden sowohl die Partikeldetektion, als auch die sich anschließende RM-Messung manuell durchgeführt, wie es für Publikationen aus dieser Zeit üblich war [9, 10]. Es konnten damit ca. 300 Partikel innerhalb von 2 Messtagen analysiert werden [1]. Ein Teil der Arbeit ist daher der Automatisierung gewidmet, um die Zahl der messbaren Partikel zu erhöhen. Für die Wahl der verschiedenen RAMAN-Parameter wurde vor dieser Arbeit noch auf Erfahrungswerte zurückgegriffen. Zunächst sollten daher für diese RAMAN-Parameter (Laserwellenlänge, Laserleistung, Objektiv, zu untersuchender spektraler Bereich, optisches Gitter und Messzeit) möglichst gute Empfehlungen entwickelt werden.

Außerdem sollten weitere relevante Parameter der Messung untersucht werden. So wurden in IMHOF et al. [1] Partikel auf Quarzfaserfiltern gemessen. Diese weisen, bedingt durch ihren aus Fasern bestehenden Aufbau, eine raue Oberfläche auf. Für eine manuelle Messung ist das kein größeres Problem, da jeder Partikel manuell fokussiert wird. Um jedoch eine automatisierte Messung zu ermöglichen, ist eine möglichst glatte Filteroberfläche von Vorteil, da hierdurch im besten Fall nur eine einmalige Fokussierung nötig ist. Um diese zu erreichen, sollte ein Filterhalter entwickelt und validiert werden.

Die Erkennung der Partikel auf dem Filter ist sowohl für eine manuelle, als auch für die automatisierte Messung von großer Wichtigkeit. In IMHOF et al. [1] wurden die Proben unter Hellfeldbeleuchtung betrachtet. Für die manuelle Messung ist diese zumindest ausreichend. Um einen potentiell besseren Beleuchtungsmodus zu finden, sollten die am für diese Arbeit eingesetzten RAMAN-System (*alpha300R*, WITec GmbH, DE) zur Verfügung stehenden Beleuchtungsmodi miteinander verglichen werden. Diese sind: Dunkelfeld, Hellfeld sowie Fluoreszenzanregung bei 592 nm mit einer Breite von 24 nm (Emission bei 675 nm mit einer Breite von 100 nm) und bei 470 nm mit einer Breite von 40 nm (Emission bei 525 nm mit einer Breite von 50 nm). Außerdem sollte

die Eignung verschiedener Filtermaterialien hinsichtlich ihrer Rauigkeit und der Erkennbarkeit verschiedenster Polymertypen unter den 4 verschiedenen Beleuchtungsmodi getestet werden.

Aufgrund der großen Zahl an Partikeln auf einem Filter (bis zu  $10^6$  Partikel) und der Tatsache, dass die manuelle Partikelerkennung sehr zeitaufwendig ist, sollte eine schnellere und am besten auch objektivere Partikelerkennung entwickelt werden. Hierzu sollte ein frei zugängliches Software-Paket zusammengestellt und auf seine Eignung für die MP-Analytik mittels RM hin geprüft werden.

Etwaige Kontaminationen im Analytischen Labor können die erhaltenen Ergebnisse drastisch beeinflussen. Es wurden bereits von verschiedensten Gruppen Maßnahmen [11] und Protokolle entwickelt, um Proben frei von Artefakten zu halten. Entwicklungspotential für diese Arbeit wurde im sogenannten *Tape-Lift-Screening* (TLS) erkannt. Diese Methode aus der Forensik [12] wurde innerhalb der MP-Analytik bis dato nur für die Analyse von Fasern mittels IR-Spektroskopie genutzt [13]. In dieser Arbeit sollte das TLS für die MP-Analytik mittels RM für Partikel und Fasern optimiert und validiert werden. Es sollten dazu verschiedene Klebebänder anhand der Kriterien Partikelsichtbarkeit, Partikelaufnahme und -wiederfindung, Klebedauerhaftigkeit, sowie spektraler Hintergrund bewertet werden.

Unabhängig aller zu erzielenden Verbesserungen ist klar, dass für eine Probe mit  $10^6$  Partikeln nicht in vertretbarer Zeit alle Partikel gemessen werden können. Folgerichtig sollte die Frage nach einer mit statistischer Sicherheit behafteten Zahl an zu messenden Partikeln, die hinreichend groß genug ist, um eine belastbare Aussage über die Probe treffen zu können, beantwortet werden.

Die im ersten Abschnitt zu optimierenden Parameter, der zu entwickelnde Filterhalter sowie die zu entwickelnde und zu bewertende Partikelerkennung zusammen mit der statistischen Berechnung der Größe der zu messenden Stichprobe sollten zum Abschluss der Arbeit in einem internen Vergleichsversuch des vom BMBF geförderten Projektes „MiWa – Mikroplastik im Wasserkreislauf“ zum Einsatz kommen.

## 3. Theoretischer Hintergrund

### 3.1. Der Analyt Mikroplastik

Mikroplastik (MP) entsteht häufig aus größeren Müllfragmenten. Funde von größerem Plastikmüll sind bis in die frühen 1970er bzw. sogar späten 1960er Jahre zurückzudatieren. So wurden bereits 1969 Plastikteile in den sterblichen Überresten von jungen Albatrossen gefunden [14] und zwei Jahre später erstmals synthetische Fasern in der Umwelt [15]. Der erste belegte Fund von MP stellt die 1972 veröffentlichte Studie von CARPENTER et al. [16] dar. Weitere frühe Funde im Oberflächenwasser des Nordatlantik [17] und an Stränden Neuseelands [18] folgten. 2002 kam MP als potentieller Umweltkontaminant erneut auf die Agenda der Umweltforschung [19] und wurde 2004 mithilfe der IR-Spektroskopie in Umweltproben nachgewiesen und erstmals als „*microplastic*“ bezeichnet [20]. Die Zunahme der Funde ist zum Teil auf die gesteigerte Aufmerksamkeit zurückzuführen. So ist die Zahl der Publikationen stark gestiegen, was durch eine Suche im *web of science* im November 2019 nach dem Schlagwort „*microplastics*“ ermittelt wurde. Insgesamt zu finden sind ca. 2200 Artikel, davon 617 in 2018 und 823 im November für 2019. Die ersten Übersichtsartikel zu fragmentierten Plastikmüll erschienen in den späten 2000er und Anfang der 2010er Jahren [21-29], aber auch in den letzten Jahren sind viele lesenswerte Übersichtsartikel erschienen [9, 30-37]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist jedoch auch die stark steigende Kunststoff-Produktion von 225 Millionen Tonnen im Jahr 2004 [38] auf 348 Millionen Tonnen im Jahr 2017 [39].

#### 3.1.1. Definieren des Analyten Mikroplastik

Manch aufmerksamer Leser ist vielleicht der Meinung, die Überschrift dieses Kapitels müsste richtigerweise „**Definition** des Analyten Mikroplastik“ heißen. Im Fokus dieses Kapitels liegt aber neben der Definition des Untersuchungsgegenstandes MP, auch die große Spannweite und die damit zum Ausdruck gebrachte Schwierigkeit, sich

innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft auf eine gültige Definition zu einigen. Daher ist das Kapitel mit „**Definieren** des Analyten Mikroplastik“ überschrieben.

Die erste Erwähnung des Wortes Mikroplastik ist in der 2004 erschienenen Publikation von THOMPSON et al. [20] zu finden. Eine Größendefinition wird nicht gegeben. Es wird lediglich erwähnt, dass es sich bei dem „*microplastics*“ um Partikel mit einem Durchmesser von ca. 20 µm handelt. Bereits ein Jahr zuvor wird „*microlitter*“, das als Vorläuferbezeichnung von MP gelten kann, als der nur schwer mit dem bloßen Auge zu identifizierende Abfall bezeichnet, der ein 500-µm Sieb passiert, aber von einem 67-µm Sieb aufgehalten wird [40]. CARPENTER et al. [16] beschrieben 1972 Plastikpartikel mit einer Größe von 2,5 mm – 5 mm. Den Autoren der Studie nach ist es die erste Erwähnung dieser Art von Partikeln. Die weitverbreitete Obergrenze von 5 mm ist auf den Tagungsband „*Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris*“ der *National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)* [41] zurückzuführen. In diesem wird festgehalten, dass die Tagungsteilnehmer MP-Partikel als Plastik-Partikel kleiner 5 mm definieren. Eine Untergrenze wird zwar nicht als notwendig erachtet, da aber zum Zeitpunkt der Tagung die Probenahme hauptsächlich mit Neuston-Netzen stattfand, wird deren Maschenweite von 333 µm, als Untergrenze empfohlen. Die weniger verbreitete Obergrenze von 1 mm wird mit der Tatsache begründet, dass Partikel, die größer als 1 mm sind, von Hand gesammelt und mit dem bloßen Auge identifiziert werden können. Wohingegen Partikel, die kleiner als 1 mm sind, nicht individuell gesammelt werden können und nur in einem Labor mit entsprechenden Gerätschaften wie z.B. einem Mikroskop analysiert werden können [42]. Diese sehr pragmatische Begründung führte an anderer Stelle zu einer Obergrenze von 500 µm [43, 44]. Eine Obergrenze von 1 mm schlägt z.B. auch das *Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas*“ der *Marine Strategy Framework Directive (MSFD)* der Europäischen Kommission vor [45]. Sie empfehlen außerdem eine Untergrenze von 20 µm, da das die damals technisch erreichbare Untergrenze der FT-IR-Spektroskopie darstellte. Mittlerweile wird diese aber mit 11 µm angegeben [4, 46]. Nach dieser Argumentation wäre auch 1 µm möglich, da die Auflösung der RM oft mit 1 µm und darunter angegeben wird [33, 44]. Allerdings sind im Prinzip auch Partikel, die nur einen Durchmesser von 300 nm besitzen, mit RM analysierbar [8]. In der Kopplung aus Rasterkraftmikroskopie und RM ergäbe sich danach sogar eine Untergrenze von 10 nm

[36, 47]. Eine weitere Möglichkeit die Untergrenze anzugeben, gibt die IUPAC, die Mikropartikel, in Abgrenzung zu Nanopartikeln, als Partikel zwischen 100 nm und 100 µm definiert [48]. Ein aktueller Versuch der Definition nach HARTMANN et al. [49] sieht als Grenzen 1 nm bis < 1000 nm für Nanoplastik und der Möglichkeit dies noch einmal in Nanoplastik (1 nm bis < 100 nm) und Submikroplastik (100 nm bis < 1000 nm) zu unterteilen, vor. Mikroplastik-Partikel hätten demnach 1 µm bis < 1000 µm, Mesoplastik 1 mm bis < 10 mm und Makroplastik wären alle Partikel  $\geq 1$  cm.

Neben der Größe ist auch die Definition von Plastik als chemischer Stoff Teil der Diskussion. In der „*Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas*“ der MSFD der Europäischen Kommission wird Plastikmüll in Abgrenzung zu Glas-, Metall- und Papier-Müll angeführt [45]. Nach HARTMANN et al. [49] werden neben der Größe der Partikel noch sechs weitere Kriterien formuliert, nach denen MP definiert werden sollte. Eine Übersicht gibt Tabelle 1, die aus der Originalpublikation übersetzt wurde.

Tabelle 1: Sieben Kriterien zur Definition von MP aus HARTMANN et al. [49] übersetzt.

Kriterium	Empfehlung	Beispiele
I: Chemische Zusammensetzung		
Ia: Polymere	Alle synthetischen Polymere	
✓ Enthalten	Thermoplasten	Alle Bedarfsartikel aus Plastik
	Thermosets	Polyurethane, Melamin
	Elastomere	Synthetischer Gummi
	Anorganische/Hybride	Silikon
✓ Enthalten	Stark modifizierte natürliche Polymere (semi-synthetisch)	Vulkanisierter natürlich vorkommender Gummi, regenerierte Cellulose
× Ausgenommen	Wenig modifizierte natürliche Polymere	Gefärbte natürliche Fasern
Ib: Additive		
✓ Enthalten	Alle Polymere aus Ia, unabhängig ihres Additiv-Gehaltes	Plastifiziertes PVC mit mehr als 50% Additiv-Gehalt

Ic: Copolymere		
✓ Enthalten	Alle Copolymere	ABS, EVA, SBR
Id: Verbundwerkstoffe		
✓ Enthalten	Alle Verbundwerkstoffe, die ein synthetisches Polymer als essentiellen Bestandteil beinhalten	Verstärkte Polyester und Epoxidharze
✓ Enthalten	Alle Oberflächenbeschichtungen, die ein synthetisches Polymer als essentiellen Bestandteil beinhalten	Farben die Polyester, PUR, Alkydharze, oder Epoxidharze enthalten und Acrylfarben
✓ Enthalten	Reifenabrieb (und Straßenabrieb)	-
? Offene Frage	Ist es notwendig, einen minimalen Polymer-Gehalt zu definieren?	
II: Feste Phase		
✓ Enthalten	Alle Polymere mit $T_m$ oder $T_g > 20^\circ\text{C}$	Siehe Ia
× Ausgenommen	Polymer-Gele	PVA, PEG
? Offene Frage	Sollen Wachs-artige Polymere ( $T_g < 20^\circ\text{C}$ ) enthalten sein?	
III: Löslichkeit		
✓ Enthalten	Alle Polymere mit einer Löslichkeit $< 1 \text{ mg L}^{-1}$ bei $20^\circ\text{C}$	Siehe Ia
IV: Größe		
	Nanoplastik: $1 - < 1000 \text{ nm}$	
	Mikroplastik: $1 - < 1000 \mu\text{m}$	
	Mesoplastik: $1 - < 10 \text{ mm}$	
	Makroplastik: $1 \text{ cm}$ und größer	

	Die größte Dimension bestimmt die Kategorie. Eine umfassende Dokumentation multipler Dimensionen ist bevorzugt (z.B. für Fasern)
<b>V: Form und Struktur</b>	
	Sphären: Jeder Oberflächenpunkt hat denselben Abstand zum Zentrum
	Sphäroid: unvollendet, aber annäherungsweise sphärisch
	Zylindrisches Pellet: Stabförmiges zylindrisches Objekt
	Fragment: Partikel mit unregelmäßiger Form
	Folie: Eben und in einer Dimension deutlich kleiner als in den übrigen zwei
	Faser: Signifikant länger in einer als breit in zwei Dimensionen
	Zusätzliche Informationen zur Struktur (z.B. Porosität) können hinzugefügt werden
<b>VI: Farbe</b>	
	Nicht wesentlich, aber nützlich in einigen biologischen Zusammenhängen. Empfohlen wird eine standardisierte Farbpalette
<b>VII: Herkunft (optional)</b>	
	Primär: Gewollt in einer bestimmten Größenklasse produziert
	Sekundär: Durch Fragmentierung in der Umwelt oder durch die Benutzung entstanden
	Die Herkunft sollte nur genannt werden, wenn die primäre Herkunft bestimmt werden kann

In dieser Arbeit wird die vorgeschlagene Unterteilung von HARTMANN et al. [49] genutzt. Die Größe der Partikel wurde in dieser Arbeit als maximaler FERET-Durchmesser angegeben [50, 51]. Der FERET-Durchmesser ist definiert als arithmetisches Mittel der Abstände zweier Parallelen, zwischen die ein Partikel genau reinpasst. Durch Drehen

des Partikels werden verschiedene Abstände erhalten, woraus das arithmetische Mittel gebildet wird. Die in dieser Arbeit gezeigte Partikelerkennung gibt den minimalen und den maximalen FERET-Durchmesser aus [52]. Eine einfache, aber nicht ganz exakte Umschreibung ist die größte Abmessung eines Partikels, die bereits im Konferenzband der ersten Tagung zu MP zu finden ist [41].

### 3.1.2. Vorkommen, Toxikologie und Risiko von Mikroplastik

Das Vorkommen von MP wurde schon an den verschiedensten und abgelegensten Orten dokumentiert. Erste Funde wurden in der Sargassosee [16] und an Stränden Neuseelands [18] beschrieben. Weitere marine Fundorte liegen z.B. in Singapur [53], Brasilien [42], den Malediven [54], sowie an Stränden in Spanien, Portugal, Frankreich, Italien, Griechenland, Türkei, Deutschland, Island, Dänemark, Norwegen, Israel, Bosnien und Herzegowina, Niederlande und Lettland [55]. Aber auch in der Tiefsee [56], allen fünf Meeresstrudeln [57], sowie der Antarktis [58] und Arktis [4, 46, 59] wurde bereits MP nachgewiesen.

Funde in limnischen Systemen sind ebenfalls dokumentiert. Einer der ersten Funde wurde im Gardasee gemacht [1, 60]. Im selben Jahr wurde im Huronsee in Kanada ebenfalls MP entdeckt [61]. Weitere Fundorte sind Frankreich [62], Großbritannien [63], Deutschland [64, 65] oder die Großen Seen in Tansania [66]. Daneben wird MP auch häufig in Kläranlagenabläufen nachgewiesen [67-73]. Das Vorkommen von MP in den verschiedensten Umweltkompartimenten wurde bereits in vielen Übersichtsartikeln [32, 43, 74-80] und auch Büchern [44, 81] diskutiert.

Die Toxikologie von MP ist ein kontrovers diskutierter Teil der Forschung zu MP. Es gibt Berichte, die MP als potentiell gefährlich einstufen. Analog zu größerem Plastikmüll werden physikalische Schäden im Verdauungstrakt angenommen [24]. Allerdings befinden sich z.B. in 1 mL Salzwasser bereits ca.  $10^6 - 10^7$  andere Partikel [23]! Ein paar Hundert oder Tausend inerte Partikel mehr in einem mL sind daher vermutlich völlig bedenkenlos. MP könnte jedoch negative Effekte auslösen, da es als Vektor für persistente organische Stoffe (*engl. persistent organic pollutants, POPs*) dienen kann [23]. MP ist zwar ein potentieller Vektor, jedoch ist seine Relevanz für den

globalen *POP*-Haushalt vernachlässigbar [82]. Mögliche weitere toxikologisch relevante Aspekte könnten enthaltene Additive [23] oder nicht abreagierte Monomere [83] sein, die aus dem Polymer austreten. Letzteres ist ein bekanntes Problem in der Polymerindustrie. Durch verschiedene chemische und physikalische Verfahren werden die Monomergehalte auf unter 100 ppm gedrückt [84]. Außerdem wurde diskutiert, ob sich Pathogene auf MP ansiedeln [85], was aber durch die zum Stand dieser Doktorarbeit aktuellsten Ergebnisse verneint werden muss [86].

Risiko wird als Funktion der Belastung und der Toxikologie eines Stoffes beschrieben [34]. Nur durch die kombinierte qualitative und quantitative Beschreibung beider Einzelaspekte kann ein Risiko sinnvoll abgeleitet werden. In einigen Meinungs- bzw. Übersichtsartikeln wurde das Risiko von MP abgeschätzt. Einige dieser Autoren kommen zu dem Schluss, dass MP möglicherweise auch die menschliche Gesundheit gefährden könnte [87, 88], andere sehen die Gefahren weniger durch MP, sondern eher durch Nanoplastik verursacht [89]. Die Fokussierung auf toxikologische Effekte durch MP auf die menschliche Gesundheit wurde von RIST et al. [90] kritisiert. Es sind den Autoren nach zwar toxikologische Effekte zu erwarten, jedoch steht die daraus entstehende mediale Beachtung des Themas in keinem Verhältnis zu den wenigen wissenschaftlichen Belegen.

Eine sehr starke Position gegen die Toxizität von MP wird im kritischen Artikel von OGONOWSKI et al. [34] vertreten. Es werden verschiedenste Punkte aufgezählt, die die Aussagekraft der untersuchten Studien deutlich reduzieren. So sind z.B. Effekte, die in der partikulären Natur von MP begründet werden, auch durch andere partikuläre Substanzen induzierbar. Solch ein Effekt ist die verminderte Nahrungsaufnahme aufgrund von nichtverwertbaren Bestandteilen im Magen-Darm-Trakt. Meist werden Effekte von MP im Vergleich zu Partikel-freiem Wasser abgeleitet. Eine Kontrolle mit anderen Partikeln fehlt jedoch. Dies führt notwendigerweise zu einer Überschätzung des Effekts von MP und stellt außerdem keine reale Umweltbedingung dar.

Der Übersichtsartikel von TRIEBSKORN et al. [37] wirft ebenfalls Fragen auf, inwieweit die veröffentlichten Studien die Toxizität von MP richtig einschätzen. In ihrer Arbeit wird vor allem auf das Verhältnis zwischen untersuchten MP-Gehalten und den in der Umwelt gefundenen eingegangen. Meist liegen die MP-Gehalte zwischen  $10^{-2}$  –  $10^2$  Partikeln in einem Kubikmeter Wasser. Extremwerte von  $10^5$  MP-Partikeln in

einem Kubikmeter Wasser werden insbesondere für Partikel  $< 20 \mu\text{m}$  gefunden. Die Grundlage der Bewertung von TRIEBSKORN et al. [37] stellt eine Untersuchung der Elbe dar. In dieser wurden insgesamt  $10^{11}$  Partikel in einem Kubikmeter Wasser gefunden, von denen zwischen  $10^5$  und  $9 \times 10^5$  Partikel als MP identifiziert wurden. In 18 der untersuchten Studien waren die Partikel-Gehalte angegeben und nur in drei davon wurden umweltrelevante Gehalte getestet. Nur in einer einzigen der drei Studien wurde ein negativer Effekt festgestellt. In 11 der übrigen 15 Studien wurden zwar ebenfalls adverse Effekte beobachtet, doch diese Studien setzten zu hohe MP-Gehalte an. Bemerkenswert ist jedoch, dass in vier Studien, die zwar zu hohe Konzentrationen getestet hatten, trotzdem jedoch keine Effekte gefunden wurden. Der Effekt verschiedener Chemikalien auf die Toxizität von MP wurde ebenfalls diskutiert. Hier zeigte sich, dass in den meisten Fällen die Chemikalien allein eine höhere Toxizität aufweisen.

Wie KRAMM et al. [7] schreiben, kommen Wissenschaftler, denen dieselben Fakten bekannt sind, zu verschiedenen Schlussfolgerungen, was die Toxizität von MP angeht. Dies spricht, den Autoren nach, dafür, die Forschung an MP weiter zu intensivieren.

### 3.1.3. Probenahme für die Mikroplastik-Analytik

MP wird in den verschiedensten Matrices nachgewiesen. Für jede Matrix gibt es spezifische Probenahme-Methoden und -Strategien. Nach HIDALGO-RUZ et al. [26] wird zwischen selektiver Probenahme, Massenprobe (engl. *bulk*) und Volumen-reduzierter Probenahme unterschieden. Bei der selektiven Probenahme werden einzelne als potentielle MP-Partikel identifizierte Objekte von Hand oder mit Pinzetten gesammelt. Bei der *bulk* oder Massenprobe wird eine Teilprobe des zu untersuchenden Umweltkompartiments entnommen, ohne diese bereits am Ort der Probenahme in ihrer Gesamtheit zu verändern. Ein Beispiel hierfür ist das Entnehmen einer definierten Menge Sediment ohne Aussortieren größerer Steine. Bei der Volumen-reduzierten Probenahme wird genau dies jedoch durchgeführt. Es handelt sich somit um eine Probenahme mit einer Art vor-Ort-Probenaufbereitung. Ein Beispiel hierfür ist die Probenahme an Oberflächengewässern mittels Netzen. Die Maschenweite des Netzes ist das Auswahlkriterium, nach dem die Volumenreduktion durchgeführt wird.

Die wichtigsten Empfehlungen zur Probenahme sind vom „*Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas*“ der *Marine Strategy Framework Directive (MSFD)* der Europäischen Kommission veröffentlicht worden [45]. Sie unterteilen die marine Umwelt in die Kompartimente Wasseroberfläche, Wassersäule, Sediment und Biota. Selektive Probenahme wird nur für Partikel größer als 1 mm empfohlen, da diese Methode für kleinere Partikel fehleranfällig ist.

Um Strände zu beproben, wird empfohlen, den obersten Teil des Strandes zu beproben. Hierbei sollen die obersten 5 cm des Sediments entnommen werden. Um Repräsentativität zu gewährleisten, sollen mindestens 5 Proben, die jeweils 5 m voneinander getrennt sind, genommen werden. Diese können als stratifizierte Stichproben über die verschiedenen Teile des Strandes verteilt sein oder nur einen bestimmten Teil des Strandes widerspiegeln. Für MP zwischen 1 mm und 5 mm wird eine Kombination aus zwei Metall-Sieben, mit diesen Maschenweiten empfohlen. Kleinere Partikel (20 µm – 1 mm) sollen ebenfalls aus den oberen 5 cm des Sediments mithilfe eines metallenen Löffels (15 mL) beprobt werden. Insgesamt sollen 250 mL pro Probe entnommen werden [45].

In einer Studie von IMHOF et al. [91] zu Stränden des Gardasees wurden drei Zonen des Ufers unterschieden. Vom Wasser am weitesten entfernt befindet sich das Supralitoral oder die Spritzwasserzone (engl. *high-water line*), die den höchsten Bereich darstellt, der durch Extremereignisse erreicht werden kann und durch die am weitesten vom Ufer entfernte Ansammlung von Treibgut erkennbar ist. Eine deutlich erkennbare Ansammlung von Treibgut unterhalb der Spritzwasserzone, das sogenannte Eulitoral oder auch die Brandungszone (engl. *drift line*), stellt die zweite, mittlere untersuchte Uferzone dar. Die dem Wasser am nächsten liegende Zone ist die Wasserlinie (engl. *water line*), also der Teil des Ufers, der ständig dem Wellengang ausgesetzt ist. Die Studie fand nur in der Brandungszone in jeder Probe MP. Da diese Zone relativ gut erkennbar ist und Proben auch relativ leicht aus dieser entnommen werden können, wird diese als zu beprobende Zone empfohlen.

Sowohl Proben von der Wasseroberfläche, als auch aus der Wassersäule werden meist mithilfe von Netzen gewonnen. Für erstere werden Neuston-Netze, für zweites Zooplankton-Netze eingesetzt. Diese Netze sollten möglichst eine Maschenweite von ca. 333 µm und eine maximale Länge von 6 m besitzen. Die Dauer mit der diese Netze

durch das Wasser gezogen werden sollte 30 min entsprechen und das gefilterte Wasservolumen mitbestimmt werden [45]. In einer 2016 veröffentlichten Studie der „Arbeitsgruppe 40“ der Vereinten Nationen wurde festgehalten, dass die meisten Studien Netze mit der geforderten Maschenweite einsetzen. Dies hat jedoch den großen Nachteil, dass MP-Partikel kleiner als 333 µm nicht quantitativ gesammelt werden [92].

Für die Beprobung von sublitoralen, also sich unter der Wasseroberfläche befindlichen Sedimenten werden alle Ansätze, die den Meeresboden bei der Entnahme möglichst wenig beeinflussen, empfohlen. Hierzu gehören z.B. der VAN-VEEN-Greifer oder Sedimentbohrer. Für MP auf dem Meeresboden gilt, wie auch für MP kleiner als 1 mm an Land, dass die obersten 5 cm und insgesamt 250 mL gesammelt werden sollten [45].

Das *Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas*“ der *Marine Strategy Framework Directive (MSFD)* erkennt die Wichtigkeit von Biota als Indikatoren an. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung war jedoch die wissenschaftliche Grundlage zur Bestimmung von einzelnen Indikator-Spezies nicht gegeben [45]. Eine gute Übersicht unter anderem zur Probenahme für Biota geben LUSHER et al. [93]. Sie weisen außerdem darauf hin, dass gerade die Bestimmung der MP-Gehalte und deren Zusammensetzung in wild lebenden Tieren für die Risiko-Abschätzung von nicht zu vernachlässigender Wichtigkeit ist, aber auch die größten Schwierigkeiten bereitet.

#### 3.1.4. Probenaufbereitung für die Mikroplastik-Analytik

Im Gegensatz zur Probenahme, bei der für jede Matrix stark unterschiedliche Methoden angewandt werden, ähneln sich die Methoden der Probenaufbereitung für die verschiedenen Matrices sehr viel mehr. Dies liegt vor allem daran, dass aus wässrigen Proben durch Sieben oder Filtrieren auch ein Sediment gewonnen wird, das weiter aufgearbeitet wird.

Bei der Isolierung von MP wird vor allem zwischen der Entfernung von anorganischen und organischen Matrixbestandteilen unterschieden [35]. Für die Entfernung von anorganischer Matrix wird meist auf die Dichtentrennung gesetzt. Bei dieser Methode wird der Dichteunterschied zwischen der anorganischen Matrix (ca. 2,65 kg/L) und MP

(ca. 0,90 kg/L und 2,30 kg/L) ausgenutzt. Das Trennfluid sollte eine Dichte zwischen diesen Werten haben. MP schwimmt auf, während anorganische Bestandteile absinken [26, 32]. Um diese Trennung apparativ umzusetzen, wurde der Münchner-Plastik-Sediment-Separator (*munich plastic sediment separator* – MPSS) entwickelt. Dieser weist eine Wiederfindung bei Einsatz einer ZnCl<sub>2</sub>-Lösung ( $\rho = 1,7 \text{ kg/L}$ ) für MP-Partikel größer 1 mm von 100 % und für kleinere MP-Partikel eine Wiederfindung von 95,5 % auf [94]. Eine weitere apparative Möglichkeit zur Durchführung der Dichtentrennung ist die *Sediment Microplastic Isolation* Einheit, die aus einfach zu erhaltenen PVC-Rohren und –Bauteilen zusammengebaut ist. Dieser Separator weist eine Wiederfindung bei Einsatz einer ZnCl<sub>2</sub>-Lösung ( $\rho = 1,5 \text{ kg/L}$ ) von 95,8 % für MP kleiner als 1 mm auf [95].

Nach RENNER et al. [35] kommt in 53 % der untersuchten Studien NaCl als Trennfluid zum Einsatz, darauf folgen NaI (14 %), H<sub>2</sub>O (15 %), ZnCl<sub>2</sub> (7 %) und Polywolframat (5 %). Die Trennfluide haben verschiedene Vor- und Nachteile. Mit ZnCl<sub>2</sub>, Polywolframat und NaI lassen sich beispielsweise höhere Dichten als mit NaCl (max. 1,2 kg/L) oder Wasser einstellen. Allerdings sind letztere deutlich günstiger und sehr viel weniger oder gar nicht toxisch relevant.

Das „*Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas*“ der *Marine Strategy Framework Directive (MSFD)* empfiehlt für die Dichtentrennung NaCl, da es kostengünstig, sehr gut verfügbar, ungiftig und am weitesten verbreitet ist [45]. Wie die „Arbeitsgruppe 40“ der Vereinten Nationen jedoch richtigerweise darauf hinweist, werden damit dichtere Polymertypen, wie z.B. PVC oder PET von der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen. Diese reichern sich aber vermutlich in Sedimenten an, wodurch es zu einer deutlichen Unterbestimmung kommt [92].

Zur Entfernung der organischen Matrix kommen verschiedenste Chemikalien zum Einsatz. Nach RENNER et al. [35] wird am häufigsten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (41 %) eingesetzt. Es folgen KOH und HNO<sub>3</sub> (jeweils 13 %), NaOH und enzymatische Aufbereitungen (jeweils 12 %), HClO<sub>4</sub> (4 %) und HCl (2 %). Der Gebrauch von Ultraschallbädern zur Verstärkung der jeweiligen Chemikalien-Wirkung ist nicht zu empfehlen, da hierbei aus größeren MP-Partikeln kleinere entstehen können [44]. Alle diese Chemikalien greifen auf die ein oder andere Art verschiedene Polymertypen an. DEHAUT et al. [96] verglichen verschiedene Protokolle zur Aufarbeitung von Meeresfrüchten. Einzig das

Protokoll mit 10 %-iger KOH-Lösung wurde von ihnen als geeignet empfohlen. Nicht zu empfehlen waren dagegen Protokolle basierend auf 65 %-iger HNO<sub>3</sub> oder einer Mischung aus 65 %-iger HNO<sub>3</sub> und 65 %-iger HClO<sub>4</sub>. Außerdem hatte 10M NaOH, im Gegensatz zu KOH, eine gehaltsmindernde Wirkung auf PET. Als letzte getestete Methode wurde auch die Verwendung von 0,27M K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> und 0,24M NaOH verworfen.

Das „*Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas*“ der *Marine Strategy Framework Directive (MSFD)* empfiehlt nur NaCl zur Probenaufbereitung und keine weiteren Schritte zur Entfernung von organischen Matrixbestandteilen [45].

Eine vielversprechende Aufbereitungsmethode stellen Reagenzien nach FENTON dar. Insbesondere wurde eine Mischung aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Fe(II) getestet. Fe(II) wird zu Fe(III) oxidiert und bildet dabei Hydroxy-Anionen und Hydroperoxy-Radikalen. Mit dieser Methode kann eine schonende, aber effektive Isolierung von MP erreicht werden [97].

### 3.1.5. Die verschiedenen analytischen Techniken im Vergleich

Für die MP-Analytik werden die verschiedensten analytischen Techniken eingesetzt, die bereits in zahlreichen Publikationen [26, 32, 35, 78, 93, 98-100] diskutiert wurden. Die vier wichtigsten sind die RAMAN-Mikroskopie oder RAMAN-Mikrospektroskopie (RM), die Mikro-Fourier-Transformations-Infrarotmikroskopie ( $\mu$ -FT-IR), die Pyrolyse-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (Pyr-GC-MS) und die Thermoextraktions-Desorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (TED-GC-MS). Außerdem gibt es noch Arbeiten, in denen Rasterelektronenmikroskopie (REM, *engl. Scanning Electron Microscopy, SEM*) und energiedispersive Röntgenanalyse (EDA, *engl. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, EDS* oder *EDX*) [101], Thermogravimetrie gekoppelt mit dynamischer Differenzkalorimetrie [102] oder Färbung mit Nilrot und anschließender Fluoreszenzmikroskopie [103] zum Einsatz kamen.

Im Großteil der veröffentlichten Arbeiten wurde MP jedoch rein optisch, also mit bloßem Auge oder unter einem Mikroskop analysiert. Nach RENNER et al. [35] sind dies 79 % aller Studien. Diese Methode ist nicht besonders zuverlässig [26, 101, 104-106]. HIDALGO-RUZ et al. [26] berichteten beispielsweise eine Fehlerrate von 70 %. Eine

Empfehlung zur optischen Analyse von MP existiert, beschränkt sich aber auf den Bereich von Partikeln  $> 500 \mu\text{m}$  [45]. Zwar wurden Protokolle vorgeschlagen, um die Fehlerrate zu senken [26, 45, 105], diese werden jedoch nach RENNER et al. [35] nur in einem Viertel der Studien auch erwähnt.

Eine diskutierte Möglichkeit, die Fehlerrate bei der optischen Identifikation zu verringern, ist die Färbung von Partikeln und Fasern mit Bengalrosa (4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein), wie es in einer Studie zur Belastung von Bier mit synthetischen Fasern zum Einsatz kam [107]. Alle gefärbten Fasern wurden als Cellulose, alle nicht gefärbten Fasern als synthetische klassifiziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass insbesondere Cellulose-Fasern von Kleidungsstücken mit dem Protokoll aus [107] nicht gefärbt werden und damit zu einer Überbestimmung des MP-Gehalts führen [108].

Die vier wichtigsten Analysemethoden sind in zwei Gruppen unterteilbar. Zunächst werden die Methoden Pyr-GC-MS und TED-GC-MS diskutiert, die beide Zersetzungsprodukte der Polymere und deren Massen-Signatur zur Identifikation nutzen. Das Ergebnis beider Methoden ist eine Angabe des MP-Gehalts als Massenanteil der Probe. Sofern nicht einzelne Partikel vor der Analyse mit einem Mikroskop vermessen und dann einzeln analysiert werden, was extrem zeitaufwendig wäre und damit unpraktikabel ist, gehen mit diesen Methoden Informationen über die Partikelgröße und die Größenverteilung verloren [8, 32].

Pyr-GC-MS nutzt die thermischen Abbauprodukte der Pyrolyse, die auf einer GC-Säule getrennt werden und schließlich im Massenspektrometer analysiert werden [96, 109, 110]. Es können hierbei sowohl das Pyrogramm, also die Summe der Signale im Massendetektor und das sich ergebende spezifische Muster, als auch einzelne Massen zur Identifikation genutzt werden [96, 110, 111]. Mit dieser Methode werden einzelne Partikel analysiert [96, 105, 109, 111]. Die simultane Analyse mehrerer Polymertypen kann z.B. durch einen thermochemolytischen Schritt ermöglicht werden. Hierbei handelt es sich um eine Methylierung während der Pyrolyse, mithilfe von  $(\text{CH}_3)_4\text{NH}_4\text{OH}$  (Tetramethylammoniumhydroxid) [110]. Durch die Kopplung mit einer thermischen Desorptionseinheit (TD-Pyr-GC-MS) können außerdem Kunststoffadditive auf der GC-Säule getrennt und ebenfalls identifiziert werden [105, 109, 111]. Die Pyr-GC-MS kann auch zur Identifikation von Mikro- und Nanoplastik in

Fraktionen eingesetzt werden, die aus der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung erhalten werden [112].

Eine Weiterentwicklung der TD-Pyr-GC-MS ist die Kopplung mit Thermogravimetrischer (TGA) Festphasenextraktion zur TED-GC-MS [113, 114]. Mithilfe der TGA wird das thermische Verhalten von Polymeren bestimmt. Konventioneller Weise werden die gasförmigen Zersetzungsprodukte mit FT-IR oder MS analysiert [113]. Für die TED-GC-MS werden die gasförmigen Produkte der Thermogravimetrie auf einer Festphase (Polydimethylsiloxan [115, 116]) gesammelt, nach erfolgter Zersetzung der Probe desorbiert, auf der GC-Säule getrennt und im Massenspektrometer detektiert [113]. Sowohl die TGA-FT-IR als auch die TGA-MS können kleine Zersetzungsprodukte (bis ca. 200 m/z) gut nachweisen, haben jedoch Probleme bei simultan entstehenden aliphatischen Zersetzungsprodukten. Kleinste Zersetzungsprodukte (H<sub>2</sub>O, CO, etc.) werden mit der TED-GC-MS nicht erfasst. Jedoch hat diese Methode den sehr großen Vorteil, überlappende Produktsignale aufzutrennen, die bei den alternativen Methoden (TGA-FT-IR, TGA-MS und Pyr-GC-MS) eine eindeutige Identifizierung verhindern würden. Im Vergleich zur (TD-)Pyr-GC-MS ist die reproduzierbare Zersetzung der Probe durch die stabileren Temperaturprogramme in der TGA, der geringere Wartungsaufwand, die reproduzierbarere Überführung in das GC-MS-System vorteilhaft, und ermöglicht in der Praxis niedrigere Nachweisgrenzen [113] (TED-GC-MS – 1 µg; Pyr-GC-MS – 4 µg [8]). Außerdem ist die analysierbare Masse um das bis zu 200-fache (0,5 mg zu 100 mg) größer und heterogenere Matrices sind analysierbar [114, 115, 117]. Als heterogene Matrices sind z.B. ein Verbundwerkstoff aus Holz und Polymeren sowie Schwebstoffe aus der Donau zu nennen [117]. Eine gut beschriebene Analyse von Huminstoff-reichen Matrices, die besonders problematisch ist, findet sich jedoch bisher nicht in der wissenschaftlichen Literatur. Mit der TED-GC-MS wurde neben den Massenkunststoffen auch Reifenabrieb analysiert [116].

Nach RENNER et al. [35] ist mit 28 % die am häufigsten eingesetzte analytische Methode, abgesehen von einer rein optischen Begutachtung, die (µ-)FT-IR-Spektroskopie. Sind für eine Probe die Parameter Partikelzahl und Partikelgröße relevant, so sind die beiden mikrospektroskopischen Methoden, µ-FT-IR oder RM, am besten geeignet. Die µ-FT-IR-Spektroskopie wurde bereits 2004 eingesetzt [20]. Die Theorie der FT-IR ist

Gegenstand zahlreicher Lehrbücher [118-122]. Zur Analytik von MP eignet sie sich, da das durch die Absorption von Licht im infraroten Wellenlängenbereich entstehende Spektrum, über einen Datenbankabgleich eine Zuordnung der verschiedenen Polymertypen ermöglicht [26, 32, 35, 78, 93, 98-100]. Mit der ( $\mu$ -)FT-IR-Spektroskopie können zunächst einmal nur einzelne Partikel analysiert werden. Mit dem Einsatz des sogenannten *Focal Plane Array* Detektors, der aus einer Vielzahl von miteinander verschalteten Detektoren besteht, ist es aber möglich, Flächen und damit eine große Zahl von Partikeln simultan zu analysieren [123]. Neuere Entwicklungen fokussieren sich auf Software-Aspekte wie Datenbankoptimierung zum Spektren-Abgleich [124] oder automatische Auswertung der FT-IR-Spektren [125, 126].

Die zweite Spektroskopie-basierte Methode ist die RAMAN-Spektroskopie, die nach RENNER et al. [35] in 14 % der untersuchten Studien zum Einsatz kam. Details zum physikalischen Hintergrund werden in Kapitel 3.2 näher erläutert und waren bereits Thema zahlreicher Lehrbücher [118-122, 127-132]. MP kann mit dieser Technik analysiert werden, da Polymere eingestrahltes Laserlicht inelastisch und vor allem charakteristisch streuen [26, 31, 32, 35, 78, 93, 98-100, 133].

Alle vier Methoden (RM, ( $\mu$ -)FT-IR, TED-GC-MS und Pyr-GC-MS) eignen sich zur Analytik von MP. Jede setzt einen anderen Fokus und ist abhängig von der Fragestellung gegenüber den anderen Methoden vorteilhaft. Dies ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Vergleich der vier zur Identifikation von MP am häufigsten eingesetzten analytischen Methoden RM, ( $\mu$ -)FT-IR, TED-GC-MS und Pyr-GC-MS. Alle Angaben basieren, wenn nicht anders angegeben, auf Übersichtsartikeln [26, 32, 35, 78, 93, 98-100].

	RM	( $\mu$ -)FT-IR	TED-GC-MS	Pyr-GC-MS
Form der Probe	Partikel auf Filter	Partikel auf Filter	Pulver oder Einzelpartikel	Pulver oder Einzelpartikel
Signal-Überlagerungen durch Matrix	gering	gering	mittel [113]‡	hoch [113] ‡
Erhöhung der Messzeit durch Matrix †	hoch	hoch	hoch	hoch

Wartungsintensität	niedrig	niedrig	mittel [113]	hoch [113]
Information über Additive	Vor allem Pigmente [134]	Vor allem Polymerbinder [134]	Keine Beschreibung gefunden	Vor allem organische Additive [109]
Partikelgröße bestimmbar?	Direkt über Mikroskopie	Direkt über Mikroskopie	Nicht möglich	Nicht möglich
Partikelmasse bestimmbar?	Indirekt, über Umrechnung aus Größe und Abschätzung der Dichte	Indirekt, über Umrechnung aus Größe und Abschätzung der Dichte	Über Kalibriergerade Angabe der Gesamtmasse möglich [114]	Über Kalibriergerade Angabe der Gesamtmasse möglich [110]
Detektionslimit für PE nach Masse [8]	14 fg	4,1 ng	1,6 µg [116]	4 µg [110, 112]
Detektionslimit für PE nach Partikelgröße [8]	300 nm	20 µm [123]	145 µm	197 µm
Max. Probenmasse	Nicht beschränkt*	Nicht beschränkt*	0,5 mg [115]	100 mg [115]
Problematische Probeneigenschaften	Fluoreszenz	Stark absorbierende (dunkle) Proben, bei Transmissionsmessung auch dicke Proben	Komplexe Matrix, wie z.B. Huminstoffe	Komplexe Matrix (schwerwiegender als bei TED-GC-MS), wie z.B. Huminstoffe
Präferierte Fragestellung	Besonders sehr kleine Partikel (<	Partikelgröße und -verteilung	schnelle Analyse bei hohem MP-	schnelle Analyse bei hohem MP-

	20 µm) von Interesse, Partikelgröße und -verteilung wichtig	wichtig, sehr kleine Partikel (< 20 µm) spielen keine Rolle, etwas schneller als RM	Anteil, Massen-Anteil von Interesse, Partikelgröße und -verteilung spielen keine Rolle	Anteil, Massen-Anteil von Interesse, Partikelgröße und -verteilung spielen keine Rolle
--	---	---	--	--

‡Einfluss von Huminstoffen bisher nicht in wissenschaftlicher Literatur ausreichend diskutiert. Einfluss möglicherweise sehr hoch.

†Allen Methoden gemein ist, dass die Analyse eines Matrixpartikels oder einer bestimmten Matrixmasse die gleiche Zeit in Anspruch nimmt, wie ein MP-Partikel. Daher sind für alle Methoden eine effektive Probenaufbereitung und damit hohe Konzentration des Analyten gleichermaßen notwendig.

\*Beschränkung nur durch limitierte Bewegung des motorisierten Tisches gegeben, aber in der Praxis nicht mit MP-Filterproben erschöpft.

RM ist die Methode der Wahl, wenn sehr kleine (< 1 µm) Partikel analysiert werden sollen. Keine der anderen Methoden kann derart kleine Partikel in realen Proben identifizieren. Sind Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilung von Interesse, so sind die zwei mikrospektroskopischen Methoden µ-FT-IR (> 20 µm) und RM klar zu favorisieren [8, 33]. Die µ-FT-IR besitzt gegenüber der RM durch den *Focal Plane Array* Detektor einen Geschwindigkeitsvorteil [123]. Noch schneller ist die Analyse mittels der MS-basierten Methoden Pyr-GC-MS und TED-GC-MS, solange die Matrix nicht entfernt werden muss. Dies ist jedoch meist nur bei einfacheren Proben gegeben. Beide sind in der Lage vergleichsweise schnell Informationen über die MP-Massenanteile in der Probe zu generieren. Informationen über die Partikelgrößen und deren Verteilung können jedoch nicht erhalten werden [8]. Die TED-GC-MS scheint nach gegenwärtigem Stand der Technik etwas robuster gegenüber Matrixinterferenzen und auch etwas weniger wartungsintensiv zu sein als die Pyr-GC-MS [113, 117]. Dies wird mit der auf ca. 250°C – 300°C limitierten Temperatur der Transferkapillare der Pyr-GC-MS erklärt. Viele Pyrolyseprodukte (aus MP und Matrix) haben Siedepunkte oberhalb 300°C und können daher in der Transferkapillare kondensieren, was bei der TED-GC-MS, durch die höheren Temperaturen (bis zu 1000°C), nicht der Fall ist [117].

### 3.2. Allgemeine Grundlagen der RAMAN-Spektroskopie und Mikroskopie

Kurz gesagt, handelt es sich beim RAMAN-Effekt um die inelastische Streuung von Licht an Materie. Dieser Effekt wurde 1923 von ADOLF SMEKAL vorhergesagt [135] und 1928 von CHANDRASEKHARA VENKATA RAMAN erstmals in Experimenten beschrieben [136], die er zusammen mit verschiedenen Mitarbeitern durchführte. Zu nennen ist vor allem K.S. KRISHNAN, mit dem er diesen Effekt auch weitergehend untersuchte [137]. Zeitgleich wurde die inelastische Streuung auch von GRIGORY LANDSBERG und LEONID MANDELSTAM beschrieben [138]. Benannt wurde der Effekt jedoch nach seinem indischen Entdecker.

Die allgemeine Theorie des RAMAN-Effekts und die technischen Hintergründe der RAMAN-(Mikro-)Spektroskopie sind in zahlreichen Lehrbüchern beschrieben [118-122, 127-132]. Die Schwingungs-RAMAN-Spektroskopie beruht auf der Veränderung der Polarisierbarkeit, also der Verschiebung der Elektronenwolke, aber nicht zwingend einer Ladungstrennung, während der Schwingung kovalent gebundener Atome. Dies ermöglicht die Analyse von homonuklearen Molekülen wie z.B.  $N_2$ , was mit IR-Spektroskopie nicht möglich ist, da diese auf der Veränderung des Dipolmoments während der Schwingung beruht.

Für die MP-Analytik eignet sich die RM im Besonderen, da die RAMAN-Spektren eine eindeutige Identifizierung der verschiedenen Polymere und auch eine Unterscheidung von Matrixbestandteilen ermöglichen. Es wird hier häufig von Fingerabdruck-Spektren gesprochen. Außerdem stört Wasser die Analyse nicht, da es nur ein sehr schwaches RAMAN-Signal zeigt. Daher können auch feuchte Proben analysiert werden. Im Prinzip ist auch keine spezielle Probenvorbereitung notwendig, solange der Analyt dem Laser zugänglich ist, also nicht durch Matrixpartikel überlagert ist. Problematisch hingegen ist die bei der Messung auftretende Fluoreszenz, die die Analyt-Signale überdecken kann [8, 32, 35].

Die Erscheinung des RAMAN-Spektrums wird im Allgemeinen durch die Zahl der möglichen Schwingungen bestimmt, die für nichtlineare Moleküle mit  $3N - 6$ , wobei  $N$  die Zahl der Atome darstellt, berechnet werden kann. Polymere bestehen aus ca.  $10^3$  Atomen, weshalb, unter Beachtung von Kombinations- und Obertonschwingungen,  $10^4 - 10^5$  Banden erwartet werden können, die es unmöglich machen würden, ein

Spektrum auszuwerten. Dies ist jedoch nicht der Fall, da Polymere aus repetitiven Einheiten bestehen, die selbst nur aus  $10^1$  Atomen bestehen und damit die Komplexität extrem reduziert wird [139].

Polyethylen (PE) ist zwar das einfachste der Polymere, jedoch hat die Zuordnung der beobachteten Banden zu vorhergesagten Schwingungsmoden 23 Jahre (1949 – 1972) benötigt. In Abbildung 1 ist das Spektrum von PE gezeigt. In Tabelle 3 sind die wichtigsten Signale und ihre Zuordnung gegeben. PE besitzt keine polaren Gruppen und daher nur schwache intermolekulare Kräfte. Die stärksten entstehenden Signale sind vor allem auf Grundswingungen der isolierten Kette zurückzuführen. Schwächere Signale werden durch Obertöne und Kombinationsschwingungen erzeugt. Schließlich werden noch sehr schwache Signale durch Defektstrukturen im kristallinen Anteil von PE und durch Endgruppen hervorgerufen [139].

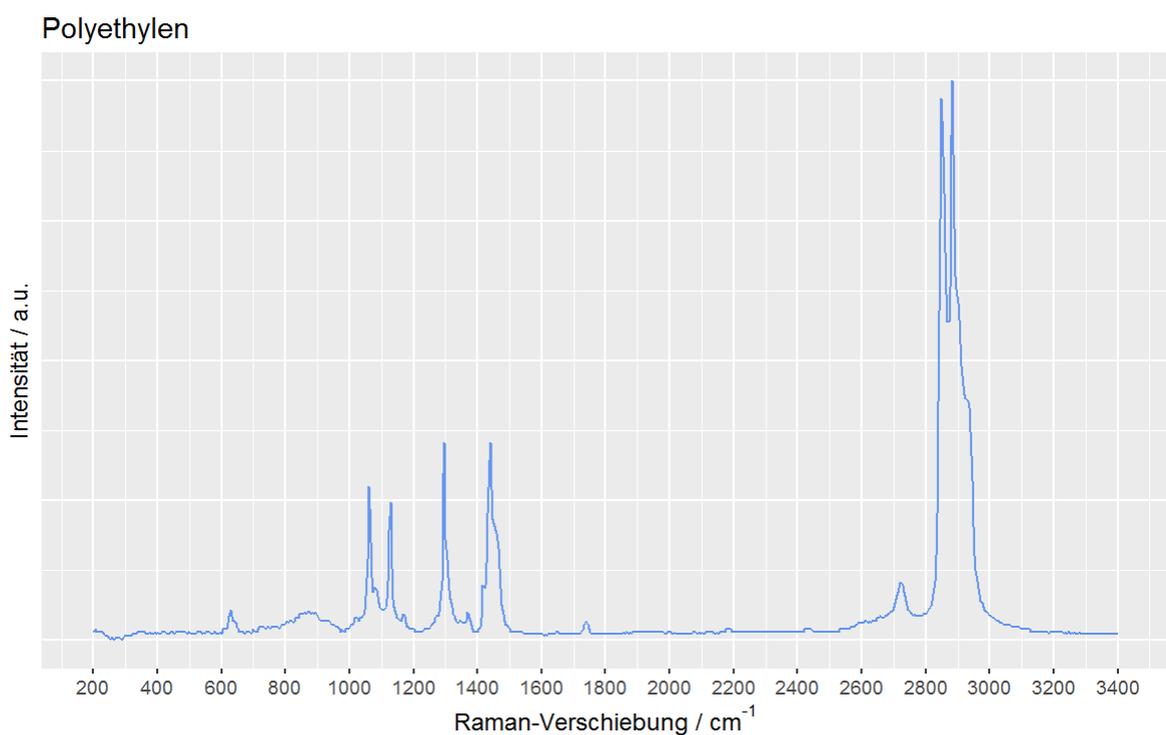


Abbildung 1: RAMAN-Referenzspektrum von PE aus *Spectral ID 3.03* (Thermo Electron Corporation, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

Tabelle 3: Beschreibung der wichtigsten auftretenden Schwingungen von PE und der zugehörigen Wellenzahl, bei der diese Schwingung im Spektrum auftritt.

Beschreibung der Schwingung	Wellenzahl der Schwingung / $\text{cm}^{-1}$
asymmetrische Streckschwingung $\text{CH}_2$	2883
symmetrische Streckschwingung $\text{CH}_2$	2848
Spreizschwingung $\text{CH}_2$ ( <i>bending</i> )	1416 und 1440
Kippschwingung $\text{CH}_2$ ( <i>wagging</i> )	1370
Torsionsschwingung $\text{CH}_2$ ( <i>twisting</i> )	1296
Pendelschwingung $\text{CH}_2$ ( <i>rocking</i> )	1170
Gerüst- oder Skelettschwingung	1133 und 1067

Die sehr prominente Doppelbande knapp unter  $3000 \text{ cm}^{-1}$  kann der asymmetrischen ( $2883 \text{ cm}^{-1}$ ) und symmetrischen ( $2848 \text{ cm}^{-1}$ ) Valenz- oder Streckschwingung der H-C-H-Bindungen zugeordnet werden. Die in der Ebene liegenden Deformations- oder Beugeschwingungen der H-C-H-Bindungen befinden sich bei  $1416 \text{ cm}^{-1}$  und  $1440 \text{ cm}^{-1}$  (Spreizschwingung) und  $1170 \text{ cm}^{-1}$  (Pendelschwingung). Die außerhalb der Ebene liegenden Deformations- oder Beugeschwingungen der H-C-H-Bindungen sind bei  $1370 \text{ cm}^{-1}$  (Kippschwingung) und  $1296 \text{ cm}^{-1}$  (Torsionsschwingung) zu finden. Weitere Signale sind Kombinationsschwingungen und Obertöne. Für eine detaillierte Diskussion aller Banden sei das Buch von BOWER und MADDAMS empfohlen [139].

Eine Übersicht über verschiedene Polymerspektren gibt Abbildung 2. Jedes Spektrum zeigt charakteristische Banden, die es von den anderen, zum Teil chemisch sehr ähnlichen Polymeren, unterscheidbar macht.

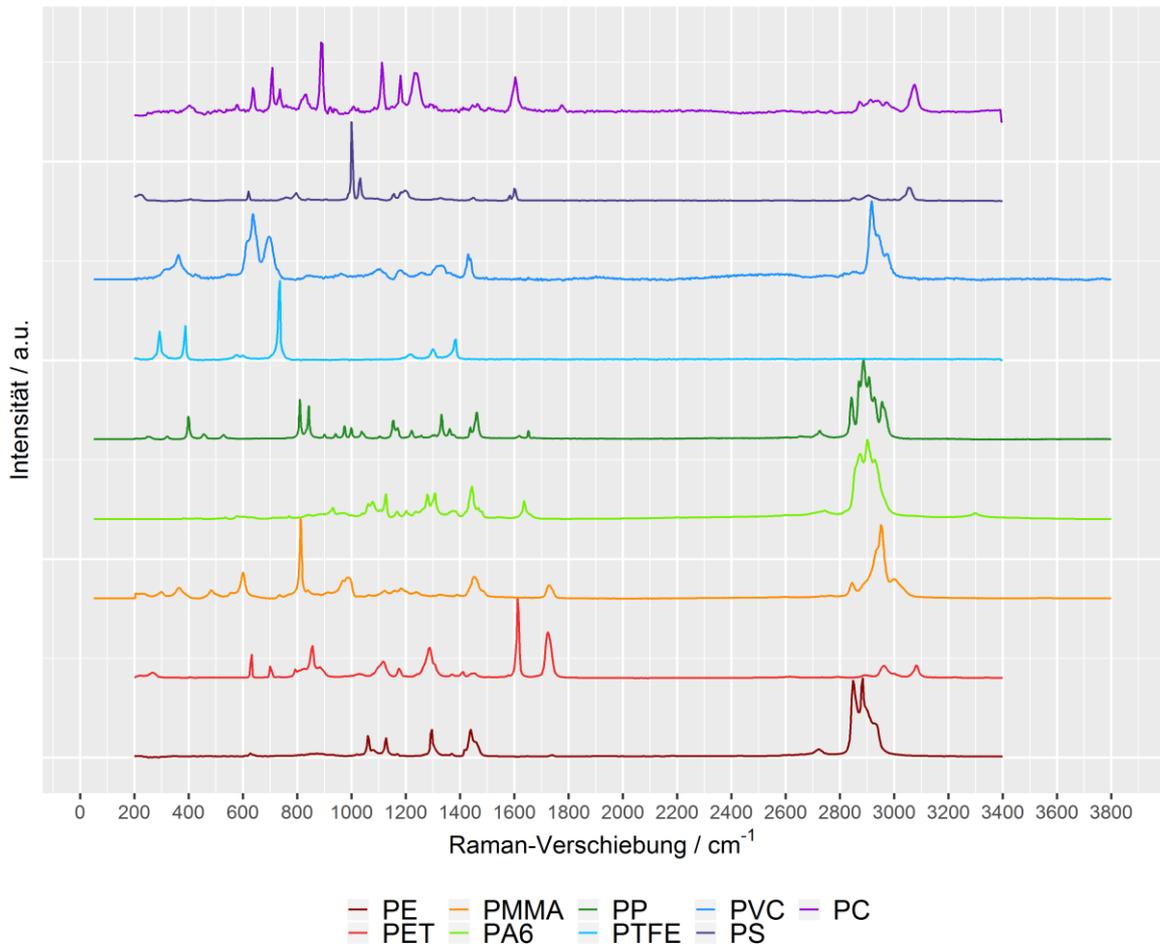


Abbildung 2: RAMAN-Referenzspektren verschiedener Polymere aus *Spectral ID 3.03* (Thermo Electron Corporation, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Mit RM können außerdem verschiedene Pigmente und organische Farbstoffe identifiziert werden, wie in Abbildung 3 zu sehen ist.

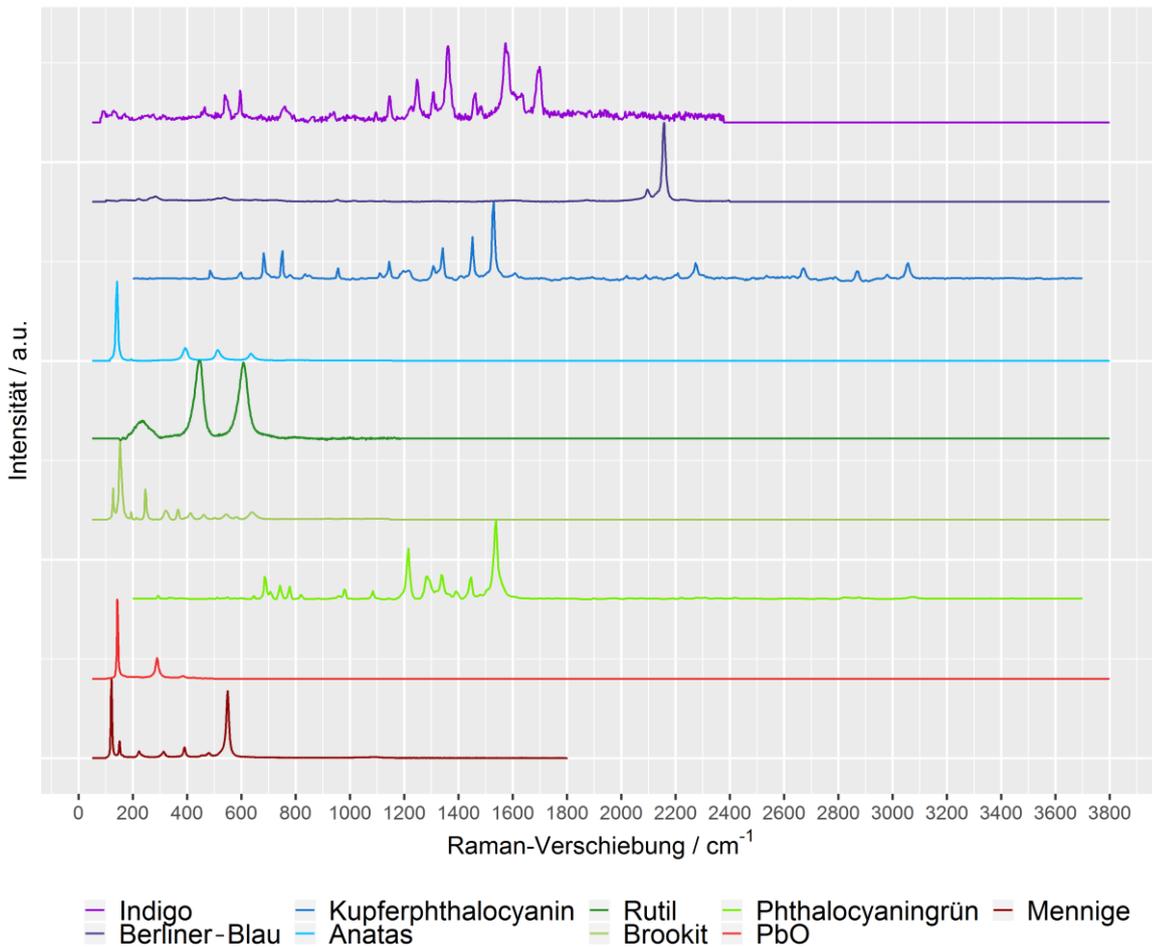


Abbildung 3: RAMAN-Referenzspektren verschiedener Pigmente und Farbstoffe aus *Spectral ID 3.03* (Thermo Electron Corporation, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

### 3.2.1. Räumliches Auflösungsvermögen der RAMAN-Mikrospektroskopie

Die Überlegungen zum räumlichen Auflösungsvermögen in diesem Kapitel sind bereits in ANGER und VON DER ESCH et al. [8] veröffentlicht worden und basieren auf den Lehrbüchern von TURRELL und CORSET [132], sowie SCHRADER [121]. Wie in Tabelle 2 gezeigt wurde, besteht der große Vorteil der RM in der Analyse sehr kleiner Partikel. Das Auflösungsvermögen wurde mit 300 nm angegeben. In diesem Kapitel wird gezeigt, wie dieser Wert berechnet werden kann.

Das Auflösungsvermögen setzt sich bei der RAMAN-Mikroskopie aus dem Auflösungsvermögen des RAMAN-Teils und des Mikroskopie-Teils zusammen. Die laterale Auflösung  $d$  in der Mikroskopie ist durch das Abbe- oder Beugungs-Limit gegeben. Dieses wiederum ist abhängig von der numerischen Apertur  $NA$ , und der beobachteten Wellenlänge  $\lambda$  (Formel 1).

$$d_{Abbe} = \frac{\lambda}{2 NA} \quad \text{Formel 1}$$

Dieses Limit kann nur mit kohärentem Licht erreicht werden. Licht, das durch eine kreisförmige Apertur geleitet wird, bricht und formt ein Beugungsscheibchen (engl. *Airy Disk*). Die Auflösung wird mit dem Durchmesser des Beugungsscheibchens berechnet, das durch das erste Minimum begrenzt wird (Formel 2).

$$d_{Airy} = \frac{1,22 \lambda}{NA} \quad \text{Formel 2}$$

Das Auflösungsvermögen kann noch einmal durch verschiedene Kriterien präzisiert werden. Das RAYLEIGH-Kriterium beispielsweise definiert zwei Objekte als voneinander getrennt, wenn das Maximum des Beugungsscheibchens des einen Objektes sich auf dem ersten Minimum des Beugungsscheibchens des zweiten Objektes befindet (Formel 3).

$$d_{Rayleigh} = \frac{0,61 \lambda}{NA} \quad \text{Formel 3}$$

Die Auflösung des RAMAN-Teils wird in erster Näherung durch den Durchmesser des Laserpunktes bestimmt. Dieser formt ebenfalls ein Beugungsscheibchen. In zweiter Näherung kann ebenfalls das RAYLEIGH-Kriterium zur Berechnung des Auflösungsvermögens zweier Objekte herangezogen werden (Formel 3). In Tabelle 4 ist das laterale Auflösungsvermögen für verschiedene Konfigurationen aufgelistet.

Tabelle 4: Laterales Auflösungsvermögen  $d_{RALYVEIGH}$  für verschiedene Laserwellenlängen und Objektive mit unterschiedlichen numerischen Aperturen berechnet nach Formel 3. LWD = *long working distance*.

Laserwellenlänge / nm	NA = 0,13 (5×)	NA = 0,40 (20×)	NA = 0,55 (50× LWD)	NA = 0,90 (100×)	NA = 1,0 (z.b. 100×)
532	2,5 μm	0,81 μm	0,59 μm	0,36 μm	0,32 μm
633	3,0 μm	0,97 μm	0,70 μm	0,43 μm	0,39 μm
785	3,7 μm	1,2 μm	0,87 μm	0,53 μm	0,48 μm

Der niedrigste Wert mit 320 nm wird in der Konfiguration mit einer Laserwellenlänge von 532 nm und einem Objektiv mit einer NA = 1,0 erreicht. Gängige Objektive (20× und 50× LWD) erreichen mit den meist verwendeten Laserwellenlängen (532 nm und 633 nm) alle ein Auflösungsvermögen unterhalb 1 μm. Das Abbe-Limit kann mit nicht-linearen Techniken noch unterschritten werden. Dies wurde z.B. von ARAUJO et al. [31, 133] für die Analytik von MP und allgemeiner von OPILIK et al. [140] und STEWART et al. [141] tiefergehend diskutiert.

Neben der lateralen Auflösung spielt auch die Auflösung entlang der optischen Achse, also die axiale Auflösung, eine wichtige Rolle für die Analyse von MP-Partikeln. Der konfokale Aufbau des RAMAN-Mikroskops bedingt, dass ein definiertes Volumen mit einer endlichen Tiefe im Bereich von wenigen Mikrometern angeregt wird. Geräteseitig kann mithilfe einer Lochblende nur der Teil des zurückgestreuten Lichtes gesammelt und zum Detektor geführt, der innerhalb einer bestimmten Länge entlang der optischen Achse seinen Brennpunkt hat. Derselbe Effekt kann auch durch Verwendung einer faseroptischen Auskopplung des gesammelten RAMAN-Signals nach der Optik des Mikroskops erzielt werden. Dies bedeutet für die MP-Analytik, dass eine Fokussierung auf die zu untersuchenden Partikel notwendig ist. Die axiale Auflösung ist im Vergleich zur lateralen deutlich schwieriger zu quantifizieren, da sie in großem Maße von der Probe und deren Eigenschaften wie beispielsweise der optischen Dichte abhängt [142].

Die Feldtiefe des konfokalen Volumens  $L$  kann anhand von Formel 4 berechnet werden [142].

$$L = \frac{4n\lambda}{NA^2} \quad \text{Formel 4}$$

Hierbei gibt  $n$  den Brechungsindex der Probe,  $\lambda$  die Wellenlänge der eingesetzten Laserquelle und  $NA$  die numerische Apertur des verwendeten Objektivs an. In der Praxis wird das Auflösungsvermögen durch verschiedene Kriterien, wie z.B. das bereits weiter oben definierte RAYLEIGH-Kriterium bestimmt. Dies gilt allerdings in erster Linie nur für die Mikroskopie. Werden Spektren von zwei transparenten und übereinanderliegenden Objekten dieses Abstandes aufgenommen, sind keine reinen Spektren zu erwarten. Vielmehr werden zuerst verstärkt die Signale des obenliegenden Objektes, dann Mischspektren und schließlich verstärkt die Signale des untenliegenden Objektes erhalten. Dies bedeutet, dass im Übergangsbereich, allein aus der spektralen Signatur, keine Unterscheidung zwischen Einzelobjekten und gemischten Objekten (also z.B. einem Co-Polymer) möglich ist. Daher sind die mit dem RAYLEIGH-Kriterium nach Formel 4 errechneten Werte ( $2n\lambda/NA$ ) in der Praxis oft irreführend. Diese Überlegung soll in erster Linie das Problem der Bestimmung der axialen Auflösung bewusst machen [142].

Für die MP-Analytik ist die Identifizierung von Polymerpartikeln das übergeordnete Ziel. Es ist daher zunächst einmal unerheblich, ob dabei Reinspektren oder Mischspektren interpretiert werden. Entscheidend ist damit nur die absolute Feldtiefe, die daher für diese Arbeit mit Formel 4 hinreichend genau berechnet werden kann. Für verschiedene Konfigurationen ist die Feldtiefe  $L$  in Tabelle 5 gegeben.

Tabelle 5: Feldtiefe  $L$  für verschiedene Laserwellenlängen und Objektive mit unterschiedlichen numerischen Aperturen. Für den Brechungsindex  $n$  wurde der Wert von 1,53 für Polyethylen hoher Dichte eingesetzt [143].

Laserwellenlänge / nm	NA = 0,13 (5×)	NA = 0,40 (20×)	NA = 0,55 (50× LWD)	NA = 0,90 (100×)	NA = 1,0 (z.B. 100×)
532	$1,9 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$	4,0	3,3
633	$2,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^1$	$1,3 \times 10^1$	4,8	3,9
785	$2,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$	5,9	4,8

Üblicherweise werden Objektive mit 20× Vergrößerung ( $NA = 0,40$ ) oder 50× Vergrößerung und langem Arbeitsabstand ( $NA = 0,55$ ) sowie Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm oder 633 nm eingesetzt [8]. Die erreichten Feldtiefen erstrecken sich somit von 11  $\mu\text{m}$  (50× LWD und 532 nm) bis 24  $\mu\text{m}$  (20× und 633 nm). Nimmt man nun an, dass sowohl am unteren Ende als auch am oberen Ende der Feldtiefe genügend Signal zur Identifikation eines MP-Partikels generiert wird und vernachlässigt man den Durchmesser des Partikels, ergibt sich ein z-Achsen-Abschnitt von 22  $\mu\text{m}$  – 48  $\mu\text{m}$ . Dieser z-Achsen-Abschnitt stellt die Genauigkeit dar, mit der die Fokussierung auf Partikel stattfinden muss. Die Dicke des Partikels wird vernachlässigt, da Prozesse wie Streuung und Absorption das Signal schwächen. Daher kann der Durchmesser der Partikel nicht direkt in den z-Achsen-Abschnitt mit aufgenommen werden. Um eine prozentuale Gewichtung des Durchmessers zu umgehen, wurde der Fall angenommen, dass kein Streulicht aus einer Schicht dicker als ein paar Nanometern austritt. Dies entspricht nicht der realen Situation, jedoch ist der so berechnete z-Achsen-Abschnitt als konservative Schätzung unabhängig vom Material ansetzbar.

### 3.2.2. Zeitlicher Aspekt der RAMAN-Messung für Mikroplastik-Partikel

Die Überlegungen zur Messzeit in diesem Kapitel sind bereits in ANGER und VON DER ESCH et al. [8] veröffentlicht worden. Es wird insbesondere auf die Messzeit für einen einzelnen Partikel eingegangen. Die Gesamtmesszeit setzt sich aus der Messzeit für einen Partikel multipliziert mit der Anzahl der gemessenen Partikel sowie zusätzlichen zeitbedürftigen Schritten, wie der Bewegung des motorisierten Tisches von Messpunkt zu Messpunkt zusammen.

Die Messzeit für einen einzelnen Partikel muss ausreichend lange sein, um ein auswertbares Spektrum zu generieren. Die Auswertbarkeit des Spektrums kann durch ein hinreichend hohes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis ( $S/R = 3$ ) beschrieben werden. Dieses wiederum ist auch von der Leistung des eingesetzten Lasers abhängig. Des Weiteren ist in gewissem Maße auch die spektrale Auflösung wichtig, um ein auswertbares Spektrum zu erhalten [8].

Eine besonders hohe spektrale Auflösung ist nötig, wenn sehr kleine strukturelle Unterschiede der untersuchten Analyten, wie z.B. Kristallstrukturen von Polymeren, im Spektrum aufgelöst werden sollen. Das vorrangige Ziel der MP-Analytik ist die qualitative Bestimmung des Polymertyps. Daher ist eine spektrale Auflösung von einigen inversen Zentimetern ausreichend. Dies wird mit den gängigen RAMAN-Mikroskopie-Systemen, wie z.B. dem in dieser Arbeit eingesetzten *alpha300R* (WITec GmbH, DE) problemlos erreicht [8].

Die spektrale Breite, die zur Identifizierung eines Polymerspektrums notwendig ist, wird durch den Bereich, auf dem sich spektrale Informationen des Analyten befinden, festgelegt. Für die nach *PlasticsEurope* zwölf häufigsten Polymertypen [39] Polypropylen (PP), Polyethylen mit geringer und sehr geringer Dichte (PE-LD/LLD), Polyethylen mit hoher und mittlerer Dichte (PE-HD/MD), Polyvinylchlorid (PVC), Polyurethane (PUR), Polyethylenterephthalat (PET), Polystyrol (PS), geschäumtes Polystyrol (PS-E), Styrol-Acrylnitrilcopolymer/ Acrylnitril-Polybutadien-Styrolpfropfpolymer (SAN/ABS), Polyamide (PA), Polycarbonat (PC) und Polymethylmethacrylat (PMMA) ist dies der Bereich von  $200\text{ cm}^{-1}$  bis  $3200\text{ cm}^{-1}$  [8]. Im Bereich von  $200\text{ cm}^{-1}$  bis  $1500\text{ cm}^{-1}$  befindet sich der sogenannten Fingerabdruck-Bereich, der insbesondere durch Gerüstschwingungen die einzelnen Polymere unterscheidbar macht. Von  $2800\text{ cm}^{-1}$  bis  $3200\text{ cm}^{-1}$  erscheinen die C-H-Streckschwingungen von Alkyl-, Alken- und Arylgruppen [139]. Beide Bereiche zusammen ermöglichen eine eindeutige Zuordnung.

Die Zeit, um diesen spektralen Bereich aufzunehmen, hängt von der eingesetzten Wellenlänge, der Länge des Strahlenganges im Spektrometer, der Zahl der Linien des optischen Gitters und der Breite der CCD-Kamera ab. Eine optimale Konfiguration sollte den notwendigen spektralen Bereich mit einer Einstellung des optischen Gitters darstellen, da dessen Bewegung und die zusätzliche Aufnahme eines zweiten spektralen Bereichs den zeitbestimmenden Schritt darstellt. Dies kann durch eine möglichst kurze Laserwellenlänge, einem möglichst kurzen Strahlengang, einem Gitter mit möglichst geringer Linienzahl und einer möglichst breiten CCD-Kamera erreicht werden. Der Nachteil ist für alle Konfigurationen die abnehmende spektrale Auflösung, die aber wie schon beschrieben für die MP-Analytik nur von sekundärer Bedeutung ist und daher auf Kosten der spektralen Breite vernachlässigt werden kann [8].

In der Literatur werden meist Gitter mit 300 Linien/mm [144] oder 600 Linien/mm [1, 134, 145] eingesetzt. Durch die Wahl eines Gitters mit 300 Linien/mm kann die Messzeit verkürzt werden. Häufig eingesetzte Anregungs-Laserwellenlängen sind 532 nm [11, 134, 145, 146] oder 633 nm [1, 60]. Die Intensität der Raman-Streuung ist in vierter Potenz indirekt proportional zur Wellenlänge [147]. Auch hier besteht daher durch den Einsatz des Lasers mit 532 nm Potenzial zur Verkürzung der Messzeit.

Um ein ausreichendes S/R-Verhältnis bei kürzerer Messzeit zu erhalten, ist es möglich die Laserleistung zu erhöhen. Generell gilt, dass je höher die Leistung ist, desto mehr Signal wird generiert. Die Laserleistung kann jedoch nicht beliebig erhöht werden, da sonst die Probe zerstört wird. Eine maximale Laserleistung zu berechnen ist äußerst schwierig, da dies von vielen Faktoren wie z.B. Polymertyp oder Partikelgröße abhängt [8]. Einfacher ist es, auf die gesammelte experimentelle Erfahrung in der Literatur zurückzugreifen. Die eingesetzten Laserleistungen schwanken zwischen 0,4 mW (633 nm) [1] und 10,8 mW (532 nm) [146].

Die Messzeit für einen Partikel wird durch die Anzahl der wiederholten Aufnahmen und der Zeitdauer einer Aufnahme bestimmt. Die wiederholte Aufnahme eines spektralen Bereichs kann nötig sein, da der Detektor eines RAMAN-Systems in die Sättigung gelangen kann. CCD-Kameras können auf ihren Pixeln nur eine endliche Zahl von Photonen aufnehmen. Ist das Maximum erreicht bzw. sind die Pixel überfüllt, gehen spektrale Informationen ganz oder teilweise verloren [148]. Die maximale Messzeit kann wie schon die Laserleistung nicht einfach berechnet werden. Auch in diesem Fall ist es daher sinnvoll, sich die Erfahrung aus der Literatur zu Nutze zu machen. Die Messzeiten schwanken in den untersuchten Studien zu Umweltproben zwischen 0,5 s [146] und 500 s [1]. Aus eigener Erfahrung ist eine Messzeit zwischen 10 s und 30 s zu empfehlen. Dies stellt einen guten Kompromiss zwischen Geschwindigkeit der Messung und Auswertbarkeit der Spektren dar. Für einen Filter mit  $10^6$  Partikeln entspricht das allerdings einer Messzeit zwischen 116 Tagen (10 s pro Partikel) und 232 Tagen (30 s pro Partikel) für alle Partikel. Wie diese Messzeit reduziert werden kann, ist in den Kapiteln 3.5 und 5.5 zur Repräsentativität der Messung erläutert.

### 3.3. Kontaminationskontrolle für die Mikroplastik-Analytik

Die Kontaminationskontrolle stellt einen immens wichtigen Teil der Analytik dar. Insbesondere wenn es sich um einen ubiquitären Analyten wie MP handelt. Dies kann am Beispiel fehlender Kontaminationskontrolle gezeigt werden. So wurde in einer Studie unter Missachtung von Blindproben, in einer partikelreichen Umgebung und unter Einsatz einer unzuverlässigen Analysenmethode MP-Fasern in verschiedenen Bieren gefunden [107]. Dies wurde in den Medien folgendermaßen aufgenommen: „Mikroplastik in Bier und Mineralwasser gefunden“ (stern.de, 02.06.2014) oder „Forscher alarmiert: Im Bier dieser Marken schwimmt Plastik“ (Focus online, 04.06.2014). Die Ergebnisse dieser Studie konnten jedoch unter Beachtung von Blindproben, Probenaufbereitung in einer *laminar flow box* und Analytik mittels RM, nicht bestätigt werden [108].

Ein besonders hoher Aufwand zur Verhinderung von Partikel-Kontaminationen wird in der Studie von SCHYMANSKI et al. [11] beschrieben. So werden alle Schritte der Filtration in einer *laminar flow box* durchgeführt. Während der Experimente wurden nur 100 % Baumwollkittel, Partikel-freie Nitril-Handschuhe und armlange Ärmel getragen. Vor jedem Schritt wurden die behandschuhten Hände mit Reinstwasser und Seife gewaschen. Zusätzlich wurden alle eingesetzten Filter vor der Benutzung mithilfe eines RAMAN-Mikroskops auf Kontaminationen geprüft. Die festgestellte Partikelzahl wurde anschließend vom Ergebnis der Analyse abgezogen. Zur Reinigung der eingesetzten Glasgeräte kamen Reinstwasser und ein Ultraschallbad zum Einsatz. Der zeitaufwendigste Schritt ist aber sicher die fortgesetzte Spülung eines Wasch-Filters, bis dieser unter dem RAMAN-Mikroskop keine Zunahme an Partikel mehr zeigt. Erst, wenn dieser Punkt erreicht wurde, wurde der Wasch-Filter durch einen neuen Filter ersetzt [11]. Eine Zusammenfassung verschiedenster Strategien zur Vermeidung von Kontaminationen ist in ANGER und VON DER ESCH et al. [8] zu finden.

In WOODALL et al. [13] wird ein Flussdiagramm zur Vermeidung von Kontaminationen mit Fasern beschrieben. Insbesondere werden aber auch zwei Ansätze zur Erkennung von Kontaminationen beschrieben. Zunächst wird ein befeuchteter Filter während der Analyse der Umgebungsluft ausgesetzt, um alle luftgetragenen Fasern sammeln zu können. Dieser Ansatz wird *Dampened Filter Papers (DPF)* genannt. Der zweite Ansatz

ist das sogenannte *Tape Lift Screening (TLS)*, mit dem Oberflächen auf ihre Kontamination mit Fasern geprüft wurden. Ein Stück Klebeband wird auf die zu beprobende Oberfläche appliziert und wieder abgezogen. Anhaftende Fasern werden einzeln abgenommen und unter einem Polarisationsmikroskop untersucht [13]. *TLS* wurde auch schon in einer anderen Arbeit zur Erkennung von Fasern und Partikeln auf Oberflächen eingesetzt, allerdings auch hier nur in Kombination mit einem Mikroskop [70]. In der Forensik ist es bereits eine etablierte Methode [12].

In dieser Arbeit wird ein möglichst optimales Klebeband für das *TLS* und anschließender Analyse mittels RM evaluiert. Der große Vorteil hierbei ist, dass Fasern und Partikel erkannt und chemisch, sowie morphologisch charakterisiert werden können und für die Analyse nicht vom Klebeband entfernt werden müssen.

Eine sehr viel schnellere und einfachere Methode zur Erkennung von partikulären Kontaminationen auf Laborgeräten, ist die Beleuchtung der zu untersuchenden Oberflächen mit UV- oder Weißlicht, die z.B. in der Reinraumtechnik eingesetzt wird [149] und nach DIN EN 16602-70-50 Teil der Raumfahrtproduktsicherung ist [150]. In letztere wird eine sogenannte Sichtprüfung durchgeführt. Die Oberflächen werden in drei Klassen von „sichtbar, rein“ unterschieden. „Sichtbar, rein-Standard“ entspricht einer sauberen Oberfläche nach Prüfung mit schräg einfallendem Weißlicht einer Beleuchtungsstärke mit mehr als 540 lx bei einem Abstand von 150 cm bis 300 cm. Für „sichtbar, rein-empfindlich“ ändert sich der Abstand zu 60 cm bis 120 cm. Für die höchste Kategorie „sichtbar, rein-hochempfindlich“, ist der Abstand unter Einsatz einer Lampe mit 1080 lx auf 15 cm bis 45 cm verkürzt und optional wird die Beobachtung unter Vergrößerung empfohlen.

Das menschliche Auge kann Objekte erkennen, die entweder selbst leuchten oder Objekte, die auf sie gestrahltes Licht in der einen oder anderen Art zurückwerfen [151]. Werden die zu untersuchenden Objekte mit für das menschliche Auge nicht sichtbarem UV-Licht beleuchtet, können durch Fluoreszenz-Anregung der Partikel und anschließender Emission im sichtbaren Bereich, diese besser sichtbar gemacht werden. Durch Beleuchtung der Oberfläche mit Weißlicht wird Licht an den auf der Oberfläche befindlichen Partikeln durch drei physikalische Streuprozesse, nämlich Reflexion, Brechung und Beugung, zurückgeworfen [152]. Je mehr Licht gestreut wird,

umso mehr wird es dem Experimentator erleichtert etwaige Kontaminationen zu erkennen.

In Abhängigkeit der Partikelgröße wird die Streuung des Lichtes durch verschiedene physikalische Gesetzmäßigkeiten besser beschrieben. Für Partikel deutlich kleiner als die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes wird von RAYLEIGH-Streuung gesprochen. Für Partikel mit einer Größe des 0,1-fachen bis 30-fachen der Wellenlänge wird die Streuung am besten mit der MIE-Theorie beschrieben. Für noch größere Partikel gelten die Gesetze der geometrischen Streuung [152]. Die maximale Sensitivität des menschlichen Auges liegt bei 550 nm [151], damit haben die größten Partikel, deren Streuverhalten mithilfe der MIE-Theorie beschrieben werden, einen Durchmesser von 16,5  $\mu\text{m}$ . Der Größenbereich für MP-Partikel wird damit im unteren Bereich mit der MIE-Theorie und im oberen Bereich mit der geometrischen Streuung beschrieben. Die Streuung an einem 1  $\mu\text{m}$  großen sphärischen Partikel ist schematisch in Abbildung 4 gezeigt. Die Beschreibung des gesamten Streulichts ist eine Superposition aus geometrischer Streuung an der Oberfläche, MIE-Streuung am Partikel über den oberen Halbraum von  $2\pi$  sr, sowie der geometrischen Streuung des Anteils der MIE-Streuung, die in den unteren Halbraum geht und von dort reflektiert wird. Die Beschreibung ist selbst für sphärische Partikel komplex und wird für reale Fälle immer komplexer [152]. Eine genaue Beschreibung ist jedoch nicht notwendig für das Verständnis der Streiflicht-Messungen zur schnellen Qualitätskontrolle von Oberflächen. Für Anwendungen in der Halbleiter-Industrie wäre dies jedoch notwendig.

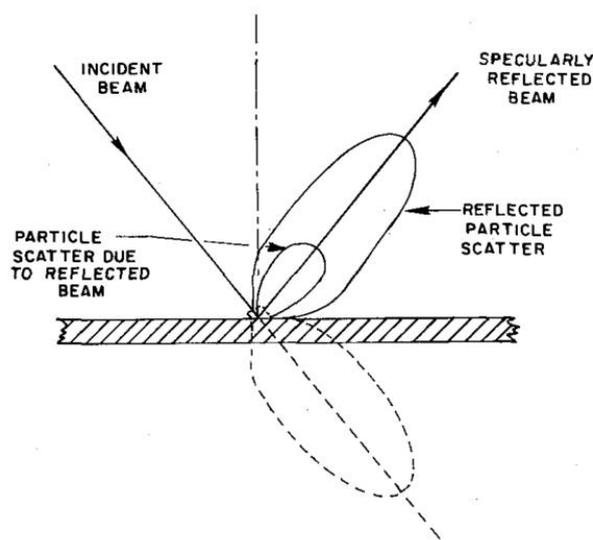


Abbildung 4: Schema der Streuung an einem  $1\ \mu\text{m}$  großen sphärischen Partikel auf einer Oberfläche (zweidimensionale Beschreibung) nach LILIENFELD [152].

Die Frage, die sich ein Analytiker immer stellt, ist die Frage nach den Limitierungen. Für das menschliche Auge als Detektor für MP-Kontaminationen ist daher die naheliegende Frage, ob der gesamte für MP relevante Größenbereich ( $1\ \mu\text{m} - < 1000\ \mu\text{m}$ ) erfasst werden kann. Das untere Limit des Auflösungsvermögens des menschlichen Auges für zwei Punkte kann nach dem RAYLEIGH-Kriterium bestimmt werden. Hierzu ist der Nahpunkt des menschlichen Auges wichtig. Dieser beschreibt den am nächsten liegenden Punkt vor dem menschlichen Auge, der noch scharf gesehen werden kann. Über alle Alterskohorten wird er mit  $25\ \text{cm}$  [151] angegeben. Für 20-29-jährige liegt er bei nur  $9\ \text{cm}$  [153]. Das Auflösungsvermögen errechnet sich zu  $100\ \mu\text{m}$  für  $25\ \text{cm}$  Nahfeld [151] bzw.  $45\ \mu\text{m}$  für  $9\ \text{cm}$  Nahfeld. Kleinere Strukturen werden zwar erkannt, aber können nicht mehr detailliert aufgelöst werden. Tatsächlich sind vermeintlich kleinere Details, keine Strukturen des Objekts, sondern die Wellenbrechung des Lichtes, die als Detail fehlinterpretiert wird [151]. Mithilfe von Lupen können Objekte für das Auge virtuell vergrößert werden. Eine beliebige Vergrößerung ist nicht möglich, wie in Kapitel 3.2.1 näher erläutert wird. Es gilt eine Beschränkung durch die Wellenlänge des Lichtes. Eine sinnvolle maximale Vergrößerung für das menschliche Auge entspricht einem Faktor von  $500$  [151]. Ein

20-29-jähriger kann mit einer handelsüblichen Lupe, die eine 8-fache Vergrößerung aufweist, damit 5,6 µm große Partikel aufgelöst sehen.

Entscheidend für die Detektion von partikulären Kontaminationen auf einer Oberfläche ist aber nicht deren detailliertes Erkennen. Wichtiger ist die Wahrnehmung von Unterschieden zur sonst glatten Oberfläche. Daher können auch noch deutlich kleinere Strukturen als 45 µm ohne Zuhilfenahme einer Lupe detektiert werden. Das menschliche Auge ist in der Lage 5 Photonen aus einer Punktquelle, die innerhalb einer Millisekunde auf die Netzhaut treffen zu registrieren. Dies entspricht gerade einmal  $2 \times 10^{-18}$  Ws. Das Auge funktioniert am besten zur Wahrnehmung von Helligkeitsunterschieden [154]. Für die Wahrnehmung von partikulären Kontaminationen auf Glasgeräten bedeutet dies, dass möglichst viele der an den Partikeln gestreuten Photonen und möglichst wenige der an den Glasgeräten reflektierten Photonen das Auge erreichen sollten. Durch den flachen Einfallswinkel, der am besten fast parallel zur beobachteten Fläche eintrifft, werden außerdem Schatten erzeugt, wodurch sich der Kontrast noch einmal erhöht [150].

Eine Taschenlampe, die einen Lichtstrom  $\phi_v = 440$  lm aufweist, und den Kugelhalbraum von  $2\pi$  sr ausleuchtet, besitzt eine Lichtstärke  $I_v = 440 \text{ lm} / 2\pi \text{ sr} = 70$  cd. In einer Entfernung von 9 cm (Entfernung von Lampe zu Partikel) hat diese Lampe nach dem photometrischen Entfernungsgesetz eine Beleuchtungsstärke  $E_v = (70 \text{ cd} / (0,09 \text{ m})^2) \cdot \cos(0^\circ) = 8645$  lx. Die für die Reinraumtechnik geforderte  $E_v = 1080$  lx wird mit dieser Lampe noch in einem maximalen Abstand von  $(70 \text{ cd} / 1080 \text{ lx})^{1/2} = 25,4$  cm erreicht. Die Annahme, dass die Taschenlampe den Kugelhalbraum von  $2\pi$  sr ausleuchtet, ist die konservativste mögliche Schätzung. In der Praxis konzentriert jede Taschenlampe auf einen deutlich kleineren Raumwinkel. Dadurch wären mit einer Lampe mit 440 lm auch noch bei einem größerem Abstand eine nach DIN EN 16602-70-50 Raumfahrtproduktsicherung [150] hochempfindliche Sichtprüfung möglich.

Anstelle des menschlichen Auges können auch andere Detektoren, z.B. Photomultiplier, eingesetzt werden. So können Si-Wafer mit der als Streulichtverfahren bekannten Methode durch Abrastern mithilfe eines Lasers oder Weißlicht auf Verunreinigungen oder Defekte untersucht werden [152, 155]. Das eingestrahelte Licht wird an der Oberfläche, abhängig von vorhandenen

Verunreinigungen oder Defekten gestreut. Ein sauberer, komplett ebener Wafer verhält sich wie ein ebener Spiegel, daher gilt: Einfallswinkel gleich Reflexionswinkel [151]. Defekte, wie z.B. Kratzer, Partikel oder größere zusammenhängende Unebenheiten, sogenannte Schleier, verursachen davon abweichende Reflexionswinkel. Apparativ kann der Grad der Verunreinigung durch Sammeln des unter abweichenden Winkeln gestreuten Lichtes bestimmt werden. Das grobe Prinzip beruht darauf, dass die zunehmende Intensität der unter abweichenden Winkeln gestreuten Photonen, mit mehr Verunreinigungen gleichgesetzt werden kann. Die genauen Streugeometrien und Intensitäten sind jedoch noch von zahlreichen Partikel- und Apparateigenschaften abhängig (Partikelgröße, Partikelform, Brechungsindex des Partikels, Polarisierung des Laserlichts, Akzeptanzwinkel des Detektors, etc.) [155]. Mit dieser Methode könnten z.B. die auch in dieser Arbeit untersuchten Si-Filter auf Verunreinigungen getestet werden. Für das sonst eingesetzte Laborequipment (Messzylinder, Glasflaschen, Trichter, MPSS, etc.) ist die Kombination aus Taschenlampe und menschlichem Auge besser geeignet. Mit dieser Kombination lassen sich schnell Aussagen über den Grad der Verunreinigung, vor allem auch von nicht planen Oberflächen treffen, ohne großen zusätzlichen apparativen Aufwand betreiben zu müssen.

### 3.4. Partikelerkennung

In der vorliegenden Arbeit wird die Implementierung von OTSU's Algorithmus und einer Wasserscheiden-Transformation zu einem *Open Source* Software-Paket (<https://gitlab.lrz.de/RAMAN-sem-iwc/mipran>) zur Partikelerkennung auf ihre Eignung zur Analytik von MP mittels RM hin untersucht. Diese Arbeit wurde bereits veröffentlicht [52].

Partikelerkennung oder allgemeiner Bilderkennung ist ein Prozess zur Bildbearbeitung. Ein Algorithmus imitiert den menschlichen Beobachter und berechnet basierend auf den Pixel-Eigenschaften Muster, die möglichst genau der menschlichen Wahrnehmung von Objekten entsprechen. Die große Schwierigkeit hierbei besteht in der Evaluierung der Güte der Erkennung [156-160]. Für die Evaluierung werden Kriterien benötigt, die möglichst objektiv ermittelt werden können und gleichzeitig die menschliche Wahrnehmung oder Teile davon möglichst gut wiedergeben. In dieser Arbeit und in der bereits veröffentlichten *Technical Note* [52] werden die Kriterien Genauigkeit (engl. *accuracy/validity*), Verlässlichkeit (engl. *reliability/precision*) und Empfindlichkeit/Sensibilität (engl. *sensitivity*) herangezogen.

Die Genauigkeit beschreibt die Übereinstimmung des Algorithmus zu einer Referenz. Diese Referenz kann entweder ein anderer Algorithmus oder aber ein Experte sein [156]. Die Verlässlichkeit wird durch Vergleichen der wiederholten Anwendung des Algorithmus auf einen stabilen Datensatz bestimmt [156]. Die Empfindlichkeit beschreibt die Anfälligkeit des Algorithmus hinsichtlich kleiner Änderungen im Bild [156]. Der zumeist verwendete Ansatz zur Bewertung von Bilderkennungs-Algorithmen ist die subjektive Bewertung [158, 160]. Dieser Ansatz hat den Nachteil, dass die Grundwahrheit (engl. *ground truth*), nach der die Güte des Ergebnisses bemessen wird, vom Experten abhängt und damit menschlichem *bias* unterworfen ist [158]. Dieser Ansatz ist jedoch hinreichend aussagekräftig, um den hier beschriebenen Algorithmus für die Anwendung zur Partikelerkennung in der MP-Analytik evaluieren zu können.

Für die MP-Analytik sind verschiedene ähnliche kommerzielle oder *Open Source* Programme verfügbar [68, 161-164]. Diese sind jedoch nicht direkt für die RM-

Analytik anwendbar, da sie für die Infrarot-mikroskopische Bildgebung [68, 163] bzw. die Anwendung auf Fluoreszenzbilder [162, 164] entwickelt wurden. Andere verfügen über eine Vielzahl an Parametern, die das Ergebnis der Partikelerkennung maßgeblich beeinflussen [161]. Dies impliziert, dass der Experimentator die Parameter solange einstellt, bis er damit zufrieden ist. Dadurch ist die Analyse wiederum vom Experimentator abhängig. Die hier gezeigte Methode besitzt nur sehr eingeschränkt Möglichkeiten zu Parameter-Variation, was eine objektivere, vom Experimentator unabhängige Analyse ermöglicht. Einige der Programme standen für diese Arbeit außerdem noch nicht zur Verfügung [161, 164].

Der nach NOBUYUKI OTSU benannte Algorithmus zur Schwellwertbestimmung wurde bereits 1979 veröffentlicht [165]. Er ermöglicht eine *unsupervised*, also vom Menschen unabhängige, Einteilung eines Graustufenbildes in zwei (oder mehr) Klassen. Dieser Algorithmus kann somit ein Graustufenbild in Partikel und Hintergrund einteilen. Die Unterteilung basiert auf der unterschiedlichen Intensität der Pixel der Partikel und der Pixel des Hintergrundes. Werden die Pixel-Intensitäten als Histogramm aufgetragen, ist ein Minimum zu erkennen (roter Pfeil in Abbildung 5). Der Algorithmus teilt das Bild an dieser Stelle in zwei Klassen.

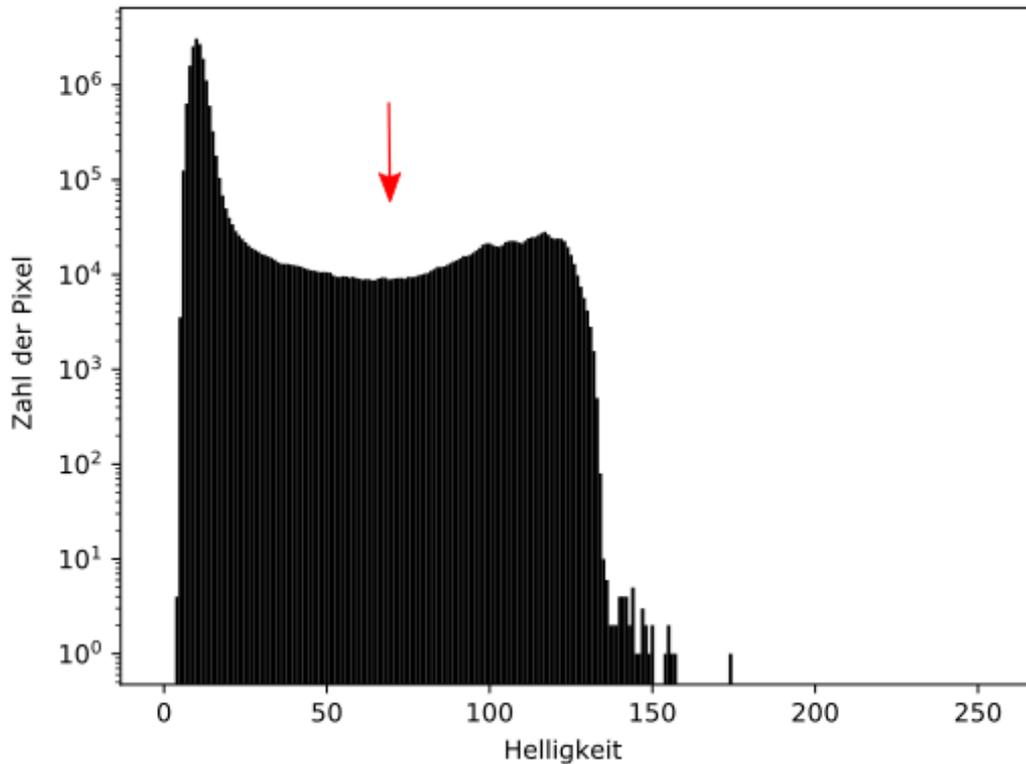


Abbildung 5: Histogramm der Pixel-Intensitäten. Der rote Pfeil markiert die durch OTSU's Algorithmus vorgenommene Unterteilung in Partikel und Hintergrund. Entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry.

OTSU konnte zeigen, dass es zur Bestimmung dieses Minimums hinreichend ist, die intra-Klassen-Varianz zu maximieren. Die genaue Herleitung kann der Originalpublikation entnommen werden [165]. Kurz zusammengefasst wird das Entscheidungskriterium  $\eta$ , das die Klassenunterteilung bemisst, mit Formel 5 berechnet:

$$\eta = \frac{\sigma_B^2}{\sigma_T^2} \quad \text{Formel 5}$$

Wobei  $\sigma_B^2$  die intra-Klassen-Varianz (engl. *between class variance*) und  $\sigma_T^2$  die totale-Klassen-Varianz (engl. *total class variance*) darstellen. Je größer der Wert für das Entscheidungskriterium  $\eta$  ist, desto höher ist die Güte (engl. *goodness*) der Trennung. Die totale-Klassen-Varianz ist unabhängig vom Schwellenwert; die intra-Klassen-Varianz ist abhängig von diesem und daher ist es ausreichend letztere zu maximieren.

Zur Unterteilung von Agglomeraten wurde eine optional zuschaltbare Wasserscheiden-Transformation implementiert. Diese berechnet den Abstand jedes Partikel-Pixels zum nächsten Hintergrund-Pixel im euklidischen Raum (engl. *euclidian distance map*) über den Satz des Pythagoras. Es entsteht so eine Höhenlinienkarte des Bildes: „Berge“ stellen Partikelzentren dar, „Täler“ Partikelränder (Abbildung 6). Entlang der „Täler“ werden schließlich Agglomerate in Partikel geteilt.

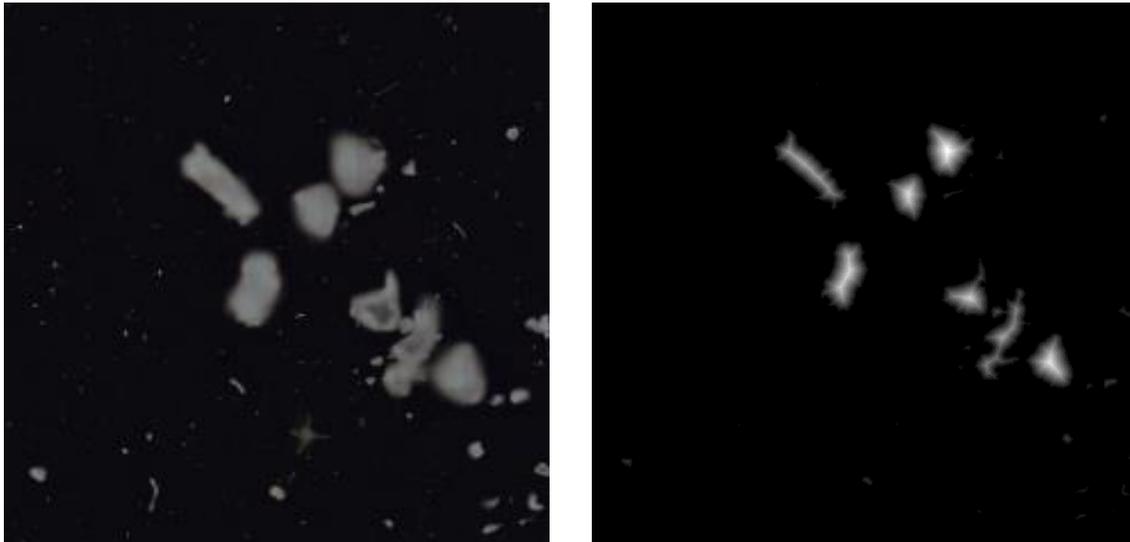


Abbildung 6: links – Originalbild; rechts – Höhenlinienkarte nach Bearbeitung mit der Wasserscheiden-Transformation. Entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Seitenlänge Bild: 4096  $\mu\text{m}$ )

Um eine bestmögliche Partikelerkennung zu gewährleisten, wurden optimierende Arbeiten zur Wahl des Beleuchtungsmodus (z.B. Hellfeld, Dunkelfeld und Fluoreszenz-Mikroskopie) und des Filtermaterials (z.B. PC, PC mit Goldbeschichtung, Silicium, etc.) durchgeführt. Die Beschreibung der Experimente ist in den Kapiteln 4.1.2 und 4.1.3 zu finden. Die Ergebnisse hierzu sind in den Kapiteln 5.1.2 und 5.1.3 diskutiert.

### 3.5. Repräsentativität der Messung

In Kapitel 3.2.2 wurde der große Zeitaufwand, der zur Analyse einer Filterprobe mit bis zu  $10^6$  Partikeln notwendig ist, dargestellt. Um den Gehalt gelöster Analyten zu bestimmen, ist es üblich 3, 5 oder auch mehr Aliquote zu nehmen und einzeln zu analysieren. Daraus können dann z.B. Mittelwert und Standardabweichung berechnet werden. Ein partikulärer Analyt wie MP kann mit dieser Methode nicht so einfach analysiert werden bzw. ist es nicht gleich sinnvoll. Dies liegt unter anderem an der Schwierigkeit gleichwertige Aliquote aus Partikelsuspensionen herzustellen. Es werden also z.B.  $10^6$  Partikel auf 10 Filter verteilt. Die Frage, die sich dann stellt, ist, wie viele der 10 Aliquote müssen gemessen werden. Alternativ wäre die Frage nach der Zahl der zu messenden Partikel in jedem Aliquot. Dies unterscheidet sich aber nicht von der Frage, wie viele der  $10^6$  Partikel gemessen werden sollen. In der Praxis wird die Aufteilung auf Aliquote nur zusätzliche Oberflächenverluste erzeugen. Es bleibt damit immer die Frage wie viele der  $10^6$ -Partikel gemessen werden müssen, um auf den MP-Gehalt dieser Partikelzahl schließen zu können. Diese Überlegungen wurden bereits veröffentlicht [8].

Die Grundidee ist, nur einen Teil der vorhandenen Partikel zu messen und mit diesen Ergebnissen dann auf die Grundgesamtheit des Filters zurückzuschließen. Die Schwierigkeit liegt in der Bestimmung der Zahl der zu messenden Partikeln und der Bestimmung der statistischen Unsicherheit des Ergebnisses. Dieses Problem ist so ähnlich bereits in anderen Gebieten der Wissenschaft gelöst worden [166]. Das Verfahren ist eine einfache Stichprobe ohne Zurücklegen, im englischen *simple random sampling of units selected without replacement (srswor)* [167, 168].

Um es auf mit MP und anderen Partikeln beladene Filterproben anwenden zu können, sind die folgenden Annahmen zu treffen [8]: (i) Alle Partikel auf dem Filter können den Gruppen MP und kein-MP zugeordnet werden, das Problem reduziert sich damit auf ein binäres; (ii) alle Partikel auf dem Filter sind voneinander separiert; (iii) alle Partikel sind über die Fläche des Filters gleichverteilt und damit ist das Verhältnis von MP zu kein-MP in jedem Flächenabschnitt gleich; (iv) eine heterogene räumliche Verteilung der Partikel ist jedoch möglich; (v) alle Partikel werden durch die eingesetzte Partikelerkennung erfasst; (vi) unabhängig von ihrer Größe werden alle

Partikel gleichermaßen als einzelne Messpunkte behandelt; (vii) die Messung durch RM ist einwandfrei. Die Annahmen (iii) & (iv) sind nur für die, sich der Bestimmung der Zahl der zu messenden Partikel, anschließende Auswahl der Partikel auf dem Filter wichtig. Insbesondere dann, wenn die Auswahl nicht durch eine Zufallszahl erfolgt.

Alle Annahmen stellen eine starke Reduktion des realen Problems dar. Jeder aufgeführte Punkt kann nicht vollständig erfüllt werden und führt damit in der Praxis zu einer höheren Zahl an zu messenden Partikeln, als durch diesen Ansatz errechnet. Nichtsdestotrotz gibt dieser Ansatz die Mindestzahl der zu messenden Partikel für eine gewisse statistische Sicherheit an. Dies ermöglicht es die gefundene Zahl an MP-Partikeln als Mindestzahl anzugeben. Die Zahl der zu messenden Partikel  $n_p$  kann anhand von Formel 6 berechnet werden.

$$n_p = \frac{P(1 - P)}{\frac{e^2}{\sigma^2} + \frac{P(1 - P)}{N}} \quad \text{Formel 6}$$

$P$  stellt den Schätzwert des Mikroplastikanteils, angegeben als Dezimalzahl,  $e$  den tolerierten Fehler, ebenfalls angegeben als Dezimalzahl,  $\sigma$  den Sigma-Wert des Voraussage-Intervalls und  $N$  die Gesamtzahl an Partikeln auf dem Filter dar [8].

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1. Optimierung verschiedener RAMAN-Parameter

Zur Optimierung der RM-Messung von MP sind in Kapitel 3.2 bereits einige Punkte zur Wahl der Laserwellenlänge, der Laserleistung, des aufzunehmenden spektralen Bereichs (Wahl des optischen Gitters), der Messzeit und des Objektivs diskutiert worden. In diesem Kapitel werden die Entwicklung und Validierung eines Filterhalters, die Wahl der Beleuchtung und die Eignung von Filtern verschiedener Materialien erläutert.

#### 4.1.1. Entwicklung und Validierung von Filterhaltern für die RAMAN-Analyse

Eine ebene Filterfläche ist Voraussetzung für eine möglichst optimale konfokale RAMAN-Messung (Kapitel 3.2.1). Eine Möglichkeit, um dies zu erreichen, ist den Filter in einem Filterhalter einzuspannen. Am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (IWC), Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie der Technischen Universität München (TUM), wurde durch ROLAND HOPPE ein Filterhalter konstruiert und gefertigt (Abbildung 7 und Abbildung 8).

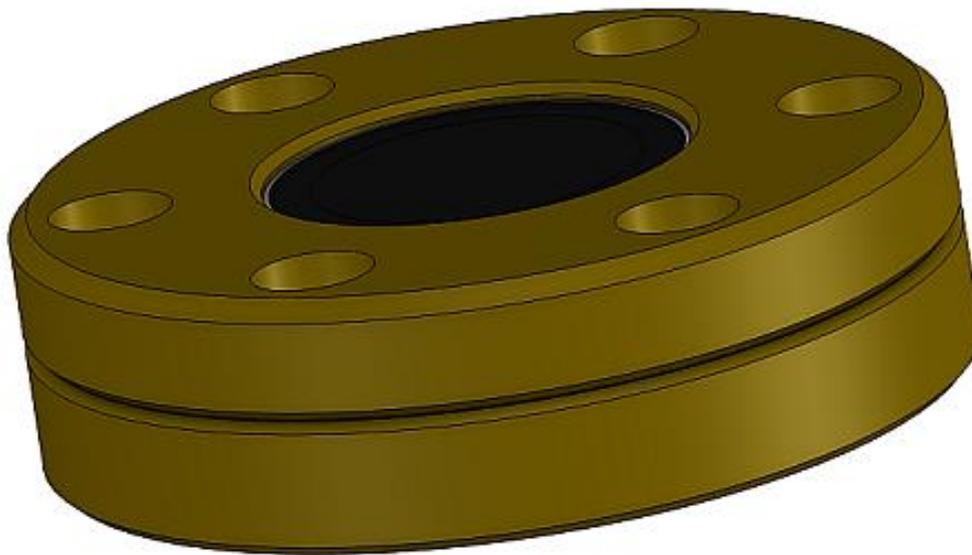


Abbildung 7: Zeichnung des Filterhalters: Konstruiert und gefertigt von ROLAND HOPPE, Werkstatt des IWC-TUM.

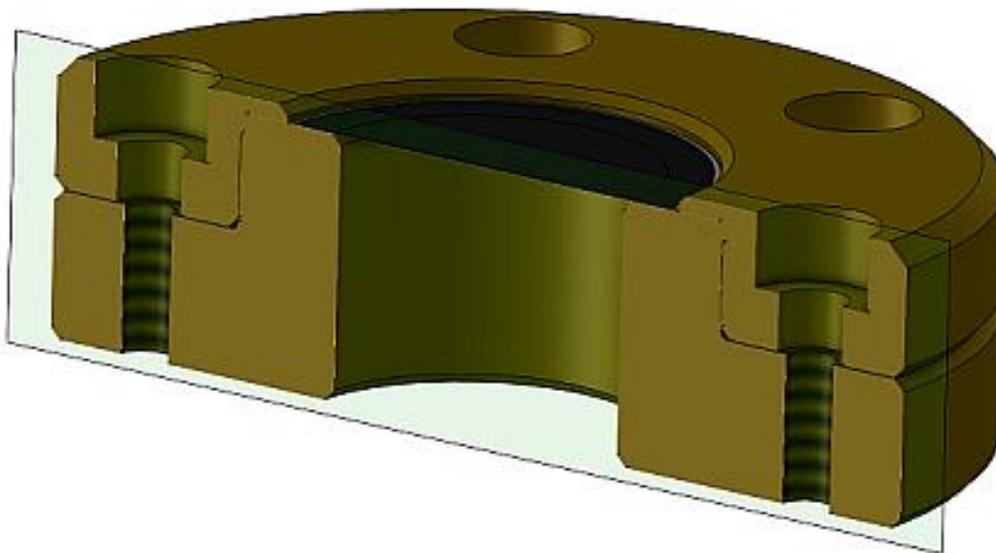


Abbildung 8: Schnitt durch den Filterhalter: Konstruiert und gefertigt von ROLAND HOPPE, Werkstatt des IWC-TUM.

Der Filterhalter wurde in zwei Größen und zwei Ausführungen hergestellt (Abbildung 9). Die Variante mit Aussparung (Abbildung 9c & d) ist für die Beleuchtung von unterhalb der Probe, sowie für Transmissionsmessungen geeignet. Die Filterhalter wurden für Filter mit Durchmessern von ca. 50 mm und ca. 25 mm gefertigt. Die

Filterhalter ermöglichen auch das Einspannen von Filtern mit etwas geringerer oder etwas größerem Durchmesser, z.B. 47 mm für den größeren Filterhalter.

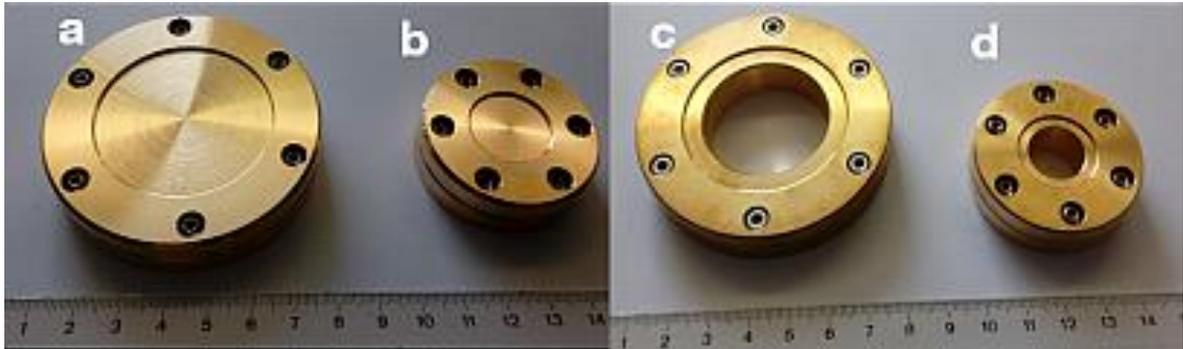


Abbildung 9: Übersicht der verschiedenen Filterhaltermodelle: a) 50 mm, massiv; b) 25 mm, massiv; c) 50 mm, mit Aussparung; d) 25 mm, mit Aussparung.

Um einen Filter in den Filterhalter einzuspannen, wird der obere Ring abgenommen. Auf den unteren Teil des Filterhalters wird der Filter aufgelegt, der obere Ring wird aufgesetzt und die Schrauben schrittweise festgezogen. Hierbei ist darauf zu achten den Filter nicht einseitig einzuspannen, da es so leicht zu Faltenwurf kommt. Empfehlenswert ist es, gegenüberliegende Schrauben in mehreren Einzelschritten anzuziehen.

Die Eignung der Filterhalter zur MP-Analytik mittels RM wurde anhand der Rauigkeit eines eingespannten PC-Filters mit Goldbeschichtung (Filterdurchmesser 25 mm bzw. 50 mm, Porenweite 0,8  $\mu\text{m}$ , Analytische Produktions-, Steuerungs- und Controllgeräte GmbH, DE) bestimmt. Die Rauigkeit wurde sowohl mit sauberen Filtern, als auch mit Filtern, die einer simulierten Benutzung unterzogen wurden, bestimmt. Über „benutzte“ Filter wurde eine Suspension von Huminsäuren (nativ, Carl Roth GmbH + Co. KG, DE) und Bentonit (Montmorillonit, Carl Roth GmbH + Co. KG, DE) in Reinstwasser (Milli-Q<sup>®</sup> Reference, Merck KGaA, DE) filtriert (Glas-Vakuumfiltrationsgerät, 25 mm, 30 mL, mit Glasfritte, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, DE). Der Rückstand wurde anschließend mit Reinstwasser (Milli-Q<sup>®</sup> Reference, Merck KGaA, DE) wieder abgewaschen. Der getrocknete Filter wurde in den Filterhalter eingespannt und mittels *TrueSurface* (WITec GmbH, DE) analysiert. Zum Vergleich wurden die gleichen Filter auf einen Glasträger gelegt bzw. mit einem doppelseitigen Klebeband (tesa<sup>®</sup> Doppelband TRANSPARENT, tesa SE, DE) auf einen Glasträger fixiert und ebenfalls mittels *TrueSurface* (WITec GmbH, DE) deren Oberfläche erfasst.

Die *TrueSurface*-Option des RAMAN-Mikroskops (WITec GmbH, DE) ermöglicht eine topografische Erfassung der Oberfläche. Eine Linse mit hohem chromatischem Fehler erzeugt einen Lichtstrahl mit abstands- und wellenlängenabhängigen Brennpunkten. Es wird bevorzugt Licht derjenigen Wellenlänge reflektiert und am Detektor empfangen, dessen Brennpunkt dem Abstand zur Probenoberfläche entspricht. Daraus lässt sich ein Oberflächenprofil errechnen [169, 170] und daraus die Rauigkeit bestimmen. In dieser Arbeit ist als Maß für die Rauigkeit der Abstand des niedrigsten zum höchsten Punkt, der sogenannte Peak-Peak-Abstand, des Oberflächenprofils gewählt.

Die Rauigkeit der Filter mit einem Durchmesser von 50 mm wurde auf einer Fläche von 30 mm × 30 mm und einer Größe von 100 Pixel × 100 Pixel ermittelt. Für Filter mit einem Durchmesser von 25 mm wurde eine Fläche von 12 mm × 12 mm und eine Größe von 40 Pixel × 40 Pixel gewählt. Die Auflösung betrug somit für beide Filtergrößen 300 µm Pixel<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2. Vergleich verschiedener Beleuchtungsmodi

Für die Beleuchtung der Filterproben unter dem Mikroskop gibt es verschiedene Möglichkeiten. In dieser Arbeit wurden an einem *alpha300R* (WITec GmbH, DE) Hellfeld, Dunkelfeld sowie Fluoreszenzanregung in zwei Wellenlängenbereichen verglichen (Abbildung 10). Für die Fluoreszenzanregung stehen zwei Bandpassfilter zur Verfügung, deren Anregungszentren bei 592 nm mit einer Breite von 24 nm sowie bei 470 nm und einer Breite von 40 nm liegt. Die Emissionsbereiche liegen bei 675 nm und einer Breite von 100 nm, bzw. bei 525 nm und einer Breite von 50 nm.

Für die Fluoreszenzanregung wurde die maximale Intensität gewählt. Für Hell- und Dunkelfeld wurden die Helligkeiten so eingestellt, dass der menschliche Beobachter die Partikel bestmöglich erkennen kann. Physikalische Parameter wie Lichtstrom, Lichtstärke oder Beleuchtungsstärke wurden nicht ermittelt. Es wird daher verglichen, unter welchen der zur Verfügung stehenden Möglichkeiten des *alpha300R* (WITec GmbH, DE) die Partikelerkennung am besten durchgeführt werden sollte.

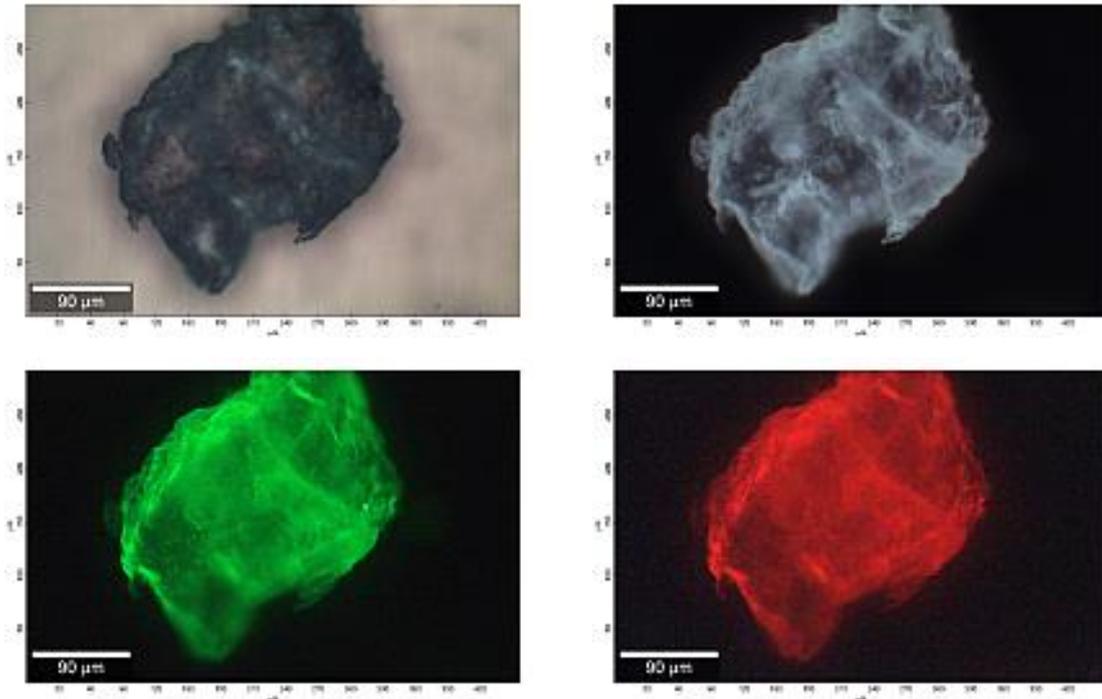


Abbildung 10: Übersicht über die verschiedenen Beleuchtungsmodi anhand eines PET-Partikels. Im Uhrzeigersinn: Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung 592/24 (exc.: 592/24, em.: 675/100) und Fluoreszenzanregung 470/40 (exc.: 470/40, em.: 525/50).

Zum Vergleich der vier verschiedenen Beleuchtungsmodi wurden zwölf verschiedene Polymertypen (PC, PS, PET, PMMA, PA12, PTFE, schwarz-gefärbtes PVC, PVC, PE, PP, PVA und POM) auf sechs unterschiedlichen Filtern (PC-Filtern, PC-Filtern mit Goldbeschichtung, Nitrocellulose, Silicium, PES und PTFE) platziert und mit zwei Objektiven (20× und 50× LWD) Bilder aufgenommen, die mit der Partikelerkennungssoftware aus dieser Arbeit [52] analysiert wurden. In Tabelle 6 sind die Hersteller der eingesetzten Materialien und Geräte aufgeführt. Die überlagerten Bilder wurden auf Übereinstimmung mit den tatsächlich vorhandenen Partikeln ausgewertet. Hierzu wurde ein Punktesystem benutzt, bei dem eine Konfiguration einen Punkt erhält, wenn weniger als 10 % falsch positiv und weniger als 10 % falsch negativ erkannt wurden. Kein Punkt wurde vergeben, wenn die Übereinstimmung für falsch positiv und falsch negativ nicht größer als 30 % und mindestens eine der beiden Fehlerarten 10 % überschritt. Ein Punkt wurde abgezogen, wenn mindestens eine der beiden Fehlerarten schlechter als 30 % war.

Tabelle 6: Auflistung der eingesetzten Materialien und Geräte.

	Bezugsquelle
<b>Polymer-Partikel</b>	
PC – Polycarbonat	TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PS – Polystyrol	TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PET – Polyethylenterephthalat	TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PMMA – Polymethylethacrylat	TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PA12 – Polyamid 12	TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PTFE – Polytetrafluorethylen	TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PVC schwarz – Polyvinylchlorid	TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PVC – Polyvinylchlorid	TU München, WACKER-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie
PE – Polyethylen	TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PP – Polypropylen	TU München, WACKER-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie
PVAc – Polyvinylacetat	TU München, WACKER-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie
POM – Polyoxymethylen	TU München, WACKER-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie
<b>Filter</b>	
PC	Filterdurchmesser 25 mm, Porenweite 0,4 µm, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, DE
PC mit Goldbeschichtung	Filterdurchmesser 25 mm bzw. 50 mm, Porenweite 0,8 µm, Analytische Produktions-, Steuerungs- und Controllgeräte GmbH, DE
Nitrocellulose	Filterdurchmesser 47 mm, Porenweite 0,45 µm, Osmonics Inc., USA
Silicium	Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung, Dr. U. BRAUN
PES	Filterdurchmesser 25 mm, Porenweite 0,45 µm, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, DE
PTFE	Filterdurchmesser 25 mm, Porenweite 1-2 µm, Pieper Filter GmbH, DE
<b>Objektive</b>	
20×	EC Epiplan 20×/0.4 HD M27, Carl Zeiss AG, DE
50× LWD	LD EC Epiplan-Neofluar 50×/0.55 HD DIC M27, Carl Zeiss AG, DE
<b>Beleuchtung</b>	
Alle Modi	WITec GmbH, DE

#### 4.1.3. Vergleich verschiedener Filtermaterialien

Analog zu den Experimenten unter 4.1.1 wurden verschiedene Filtermaterialien in den am IWC-TUM konstruierten Filterhalter gespannt und mittels *TrueSurface* (WITec GmbH, DE) hinsichtlich Rauigkeit analysiert.

Neben den in Kapitel 4.1.1 beschriebenen PC-Filtern mit Goldbeschichtung wurden außerdem noch Nitrocellulose-Filter (47 mm, Osmonics Inc., USA), PC-Filter (47 mm, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, DE), Silicium-Filter (47 mm, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Dr. U. BRAUN), PC-Filter (25 mm, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, DE), PES-Filter (25 mm, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, DE), sowie PTFE-Filter (25 mm, Pieper Filter GmbH, DE) getestet.

Die Rauigkeit der Filter mit 47 mm – 50 mm wurde auf einer Fläche von 30 mm × 30 mm und einer Größe von 100 Pixel × 100 Pixel ermittelt. Für Filter mit einem Durchmesser von 25 mm wurde eine Fläche von 12 mm × 12 mm und eine Größe von 40 Pixel × 40 Pixel gewählt. Die Auflösung betrug somit für beide Filtergrößen 300 µm Pixel<sup>-1</sup>. Die *TrueSurface*-Bilder wurden mittels der Software Project4 (WITec GmbH, DE) ausgewertet. Hierzu wurde die Software-Option *median filter size*, die eine Glättung der Pixel bewirkt auf 0 gesetzt. Die einzige Ausnahme bildet hier der Silicium-Filter, für den dieser Wert auf 1 gesetzt wurde. Dies war nötig, da die Poren des Filters zu Artefakten im Höhenprofil führten. Näheres ist in Anhang – A – Optimierung verschiedener RAMAN-PARAMETER erläutert.

## 4.2. Kontaminationskontrolle für die Mikroplastik-Analytik

Die Kontaminationskontrolle für die MP-Analytik umfasst verschiedene Schritte und Vorkehrungen, die zusammengefasst in Kapitel 5.7 zu finden sind. In diesem Kapitel wird die Erkennung von Kontaminationen mittels UV/Weißlicht-Lampe, sowie die Erkennung von Kontaminationen mittels *Tape Lift Screening* beschrieben.

### 4.2.1. Erkennen von Kontaminationen mittels UV/Weißlicht

Der Einsatz von UV/Weißlicht-Lampen in der Reinraumtechnik und der Raumfahrtproduktsicherung wurde in Kapitel 3.3 bereits dokumentiert und ausführlich diskutiert. In dieser Arbeit wird nur qualitativ die Anwendbarkeit für die MP-Analytik anhand von Beispielbildern gezeigt, da eine allgemeine Anwendbarkeit nicht bezweifelt werden kann.

Für die Experimente kam eine kombinierte UV/Weißlicht-Taschenlampe (*Nitecore CU6*, SYSMAX Innovations Co.Ltd., CN) zum Einsatz. Laut Herstellerangaben besitzt die eingesetzte UV-LED eine Maximalleistung von 3000 mW und hat ihr Emissionsmaximum bei 365 nm. Die CREE CP-G2 LED für die Weißlichtbeleuchtung emittiert 440 Lumen.

#### 4.2.2. Erkennen von Kontaminationen mittels Tape-Lift-Screening

In diesem Kapitel werden für die Erkennung von Kontaminationen mittels *Tape Lift Screening (TLS)* zehn verschiedene Klebebänder miteinander verglichen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Auflistung der zehn untersuchten Klebebänder.

Klebeband	Hersteller	Typ
tesa® Malerband PERFECT	Tesa SE, DE	Malerkrepp, Washi-Papier
LUX Flachkrepp	Emil Lux GmbH & Co. KG	Malerkrepp, Papier
tesa® Doppelband TRANSPARENT	Tesa SE, DE	Doppelseitig
Papiervlies KM 975	Eigenmarke klebeshop24.de	Doppelseitig, Papier
tesa extra Power® Universal	Tesa SE, DE	Gaffer-Klebeband
KS 283-T-19	Eigenmarke klebeshop24.de	Transparentes Klebeband
3M-4828	3M Corp., USA	Transparentes Klebeband
KS-29-T-12	Eigenmarke klebeshop24.de	Transparentes Klebeband
tesafilm® TRANSPARENT	Tesa SE, DE	Transparentes Klebeband
Shurtape J-LAR®	Shurtape Technologies, LLC Inc., USA	Transparentes Klebeband

Die Klebebänder wurden anhand von vier Kriterien bewertet: Partikelsichtbarkeit, Partikelaufnahme und -wiederfindung, Klebedauerhaftigkeit, sowie spektraler Hintergrund des Klebebandes.

Zur Validierung der Partikelsichtbarkeit wurden Mikroskopie-Bilder im Hellfeld und im Dunkelfeld von auf die verschiedenen Klebebänder aufgebrauchten PS-Partikeln angefertigt und vom menschlichen Beobachter in drei Kategorien klassifiziert. Ein gutes Klebeband sollte frei von Luftblasen, Streifen oder anderen Strukturen sein, die

Kontrast erzeugen und daher als Partikel missinterpretiert werden könnten. Ein schlechtes Klebeband hinterlässt Kleberückstände auf der applizierten Oberfläche. Dies führt zu „Löchern“ im Kleberanteil des Klebebandes, was wiederum unter dem Mikroskop als Partikel missinterpretiert werden kann. Ein Klebeband wurde mit „+“ bewertet, wenn es frei von jedweden oben genannten Unzulänglichkeiten ist und es einem erfahrenen Experimentator ermöglicht Partikel, die von der Oberfläche stammen, zu identifizieren. Ein Klebeband wurde mit „0“ klassifiziert, wenn es einen oder mehrere der oben genannten Nachteile aufweist, aber trotzdem noch eine hinreichende Partikelerkennung ermöglicht. Mit „-“ wurden die Klebebänder bewertet, die einem erfahrenen Experimentator keine Partikelerkennung ermöglichen.

Das Kriterium Partikelaufnahme und -wiederfindung wurde anhand einer definierten Zahl an PS-Partikeln, die von einem Glasträger aufgenommen und auf dem Klebeband wiedergefunden wurden, ermittelt. Hierzu wurde ein Glasträger intensiv gereinigt. Am effektivsten erwies sich ein trockenes Abwischen mit einem fusselfreien Tuch (Thorlabs Inc., DE). Unterhalb des Glasträgers war eine Maske aufgeklebt, die einen Bereich von  $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  begrenzt. Dieser Bereich wurde auf Sauberkeit hin unter dem Mikroskop untersucht. Anschließend wurde ein Tropfen der jeweiligen PS-Partikel-Suspension aufgebracht und getrocknet. Da die Partikel Größen zwischen  $30\text{ }\mu\text{m}$  –  $300\text{ }\mu\text{m}$  aufwiesen, war es nicht möglich immer exakt dieselbe Zahl an Partikeln aufzubringen. Es waren jedoch trotz dieser Schwierigkeit immer zwischen 1 und 12 Partikel auf dem Glasträger. Jedes Klebeband wurde mind. drei Mal getestet, wodurch sich die unterschiedlichen Partikelzahlen ausglich. Nachdem die Partikel-Suspension getrocknet war, wurde das zu untersuchende Klebeband über der  $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  großen Fläche aufgeklebt, wieder abgezogen und auf einen zweiten sauberen Glasträger aufgeklebt. Hierzu wurde das Klebeband mit seiner Rückseite auf ein doppelseitiges Klebeband auf einem Glasträger aufgeklebt. Die Partikel befinden sich damit an der Oberfläche. Um eine Verunreinigung aus der Laborluft zu vermeiden, wurde ein Deckglas ( $15\text{ mm} \times 15\text{ mm}$ , Stärke  $0,13\text{ mm}$  –  $0,16\text{ mm}$ , *Carl Roth GmbH + Co. KG*, DE) aufgelegt und angedrückt. Es wurde die Zahl der Partikel, die auf dem Glasträger zurückgeblieben sind, sowie die Zahl der Partikel, die sich auf dem Klebeband befanden, gezählt. Um zu vermeiden, dass Staubpartikel das Ergebnis

verfälschen, wurde mittels RM (*alpha300R*, WITec GmbH, DE) verifiziert, ob es sich um die gesuchten PS-Partikel handelt.

Für die Klebedauerhaftigkeit wurde analog zur Bewertung der Partikelaufnahme und -wiederfindung vorgegangen mit dem Unterschied, dass das Klebeband vor der Applikation auf den Partikeln 10 Mal auf einem sauberen Glasträger appliziert wurde, um das Beprobieren einer größeren Fläche zu simulieren.

Der spektrale Hintergrund wird rein qualitativ hinsichtlich des verwendeten Trägermaterials des Klebebands bewertet. Klebebänder, die auf Polymerbasis hergestellt wurden, werden mit „-“ bewertet, da die Identifikation des eingesetzten Polymertyps nicht mehr möglich ist. Klebebänder, die zwar nicht auf Polymerbasis hergestellt wurden, deren RAMAN-Signale aber typische Polymersignale überdecken, wurden mit „0“ bewertet. Klebebänder, die entweder keine RAMAN-Signale zeigen oder nur Signale erzeugen, die keine Polymer-Signale überdecken, wurden mit „+“ bewertet.

Die wichtigsten Kriterien sind die Partikelsichtbarkeit sowie die Partikelaufnahme und -wiederfindung. Diese Kriterien wurden daher zuerst getestet. Ein Klebeband, das bei einem dieser Tests zu schlecht abschnitt, wurde nicht weiter untersucht.

### 4.3. Evaluierung einer Partikelerkennung basierend auf OTSU's Algorithmus

In der vorliegenden Arbeit wird die Implementierung von OTSU's Algorithmus und einer Wasserscheiden-Transformation zu einem *Open Source* Software-Paket zur Partikelerkennung zur Partikelerkennung auf ihre Eignung zur Analytik von MP mittels RM hin untersucht. Diese Arbeit wurde bereits veröffentlicht [52].

Mittels *Java* werden verschiedene *PlugIns* des frei zugänglichen *ImageJ* 1.5 [171] zu einem *Open Source* Software-Paket zusammengefügt. In diesem Paket befinden sich *PlugIns* für OTSU's Algorithmus, eine Wasserscheiden-Transformation, eine Partikelerkennung, die Pixel zweier Klassen erkennt, sowie einige Pakete zur Bildbearbeitung. Das Programm kann über eine graphische Benutzeroberfläche (engl. *graphical user interface*, GUI) gesteuert werden. Die *ImageJ*-Dokumentation, sowie die *PlugIns* sind online verfügbar (National Institute of Health, 04.03.2019, <https://imagej.nih.gov/ij/developer/api/index.html?overview-summary.html>). Die Kommandozeile wird mittels *Apache Commons CLI Library* interpretiert. Das gesamte Paket kann in der LRZ Gitlab *Repository* <https://gitlab.lrz.de/Raman-sem-iwc/mipran> abgerufen werden. Die Funktionalität ist in Anhang - C - Partikelerkennung erläutert.

Die Mikroskopie-Bilder in Anhang - C - Partikelerkennung zur Evaluierung wurden an einem *alpha300-R* (WITec GmbH, DE) RAMAN-Mikroskop mit einem Objektiv mit 5× Vergrößerung (EC Epiplan, NA = 0,13, HD M27, Carl Zeiss AG, DE) unter Dunkelfeld-Beleuchtung aufgenommen.

Die für die Evaluierung herangezogenen Kriterien Genauigkeit (engl. *accuracy/validity*), Verlässlichkeit (engl. *reliability/precision*) und Empfindlichkeit/Sensibilität (engl. *sensitivity*) wurden bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben. Die ersten beiden Kriterien werden empirisch bearbeitet, die Empfindlichkeit analytisch [159]. Die Genauigkeit wurde bildweise als Übereinstimmung des Algorithmus mit der Klassifizierung eines Experten ermittelt. Die absolute Zahl der Partikel, sowie falsch positive und falsch negative Treffer wurden ermittelt. Falsch positive Treffer sind solche, bei denen der Algorithmus Partikel erkannt hat, aber der Experte nicht. Falsch negative Treffer wiederum sind Partikel, die

der Experte, nicht aber der Algorithmus als solche erkannt hat. Bei dem Experten handelt es sich um den Autor dieser Arbeit. Er besitzt fünf Jahre Erfahrung auf dem Gebiet der MP-Analytik und hat für vier veröffentlichte Studien [1, 91, 108, 172] und zahlreiche weitere Proben eine manuelle Partikelerkennung durchgeführt. Es handelt es sich hierbei grob geschätzt um eine hohe 5-stellige Zahl an Partikeln.

Die Verlässlichkeit wurde ermittelt, indem die Bilder, die schon für die Bestimmung der Genauigkeit analysiert wurden, einmal um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht und einmal vertikal gespiegelt wurden. Die so erhaltenen Bilder wurden analysiert und die Ergebnisse mit denen des Algorithmus angewendet auf das Originalbild verglichen. Die Empfindlichkeit des Algorithmus wurde analytisch bestimmt, d.h. anhand seines Arbeitsprinzips abgeleitet. OTSU's Algorithmus klassifiziert Pixel nach ihrem Kontrast. Besitzen die Partikel einen sehr geringen Kontrast zum Hintergrund wird das Ergebnis schlechter. Dies ist durch eine Auswahl an Einzelbildern mit geringem Kontrast zwischen Partikeln und Hintergrund dargestellt (Kapitel 5.4).

Für die Evaluierung der Partikelerkennung ist ein hinreichend großer Satz an Bildern erforderlich [157]. Hierzu wurden Bilder aus der veröffentlichten Fachliteratur entnommen: OSSMANN et al. 2018 (Abbildung 41, Abbildung 42, Abbildung 43) [145], KÄPPLER et al. 2018 (Abbildung 44, Abbildung 49, Abbildung 50, Abbildung 51) [173], LÖDER et al. (Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 52, Abbildung 53, Abbildung 54, Abbildung 55, Abbildung 61, Abbildung 62) [123], KÄPPLER et al. 2016 (Abbildung 47, Abbildung 48, Abbildung 57, Abbildung 59) [134], FRÈRE et al. (Abbildung 60) [144], DOMOGALLA-URBANSKY und ANGER et al. (Abbildung 63) [172], sowie eigene Bildern für diese Studien (Abbildung 56, Abbildung 58) [52]. In den Bildern wurden die Maßstabsbalken entfernt, da diese sonst als zusätzliche Partikel missinterpretiert worden wären. Alle ausgewerteten Bilder und die Ergebnisse hierzu befinden sich in Anhang – C – Partikelerkennung. Ausgewählte Ergebnisse werden in Kapitel 5.4 diskutiert.

Für alle Bilder, bis auf Abbildung 56, wurden die Voreinstellungen (Anhang – C – Partikelerkennung) der Partikelerkennungs-Software genutzt. Für Abbildung 56 wurde *min. pixel size* von 20 auf 5 gesetzt, da die Partikel im Vergleich zum Gesamtbild sehr klein waren. Alle Bilder wurden einmal mit aktivierter und einmal mit inaktiverter Wasserscheiden-Transformation analysiert. Die bearbeiteten Bilder wurden mit dem Originalbild und untereinander verglichen.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Publikation von IMHOF et al. [1]. In dieser Arbeit wurden MP-Partikel auf einem Quarzfaser-Filter analysiert, der nicht weiter fixiert wurde. Zum Einsatz kam ein Laser mit 633 nm Wellenlänge. Die Partikel wurden vom Experimentator im Hellfeld erkannt und einzeln Raman-mikrospektroskopisch analysiert. Pro Filter wurden im Schnitt ca. 300 Partikel gemessen. Darunter wurden alle Partikel  $> 500 \mu\text{m}$  gemessen. Partikel  $< 500 \mu\text{m}$  wurden auf 5 Bereichen (A-E) wie in Abbildung 11 gezeigt gemessen. Dies entsprach 1,6% der Gesamtfläche.

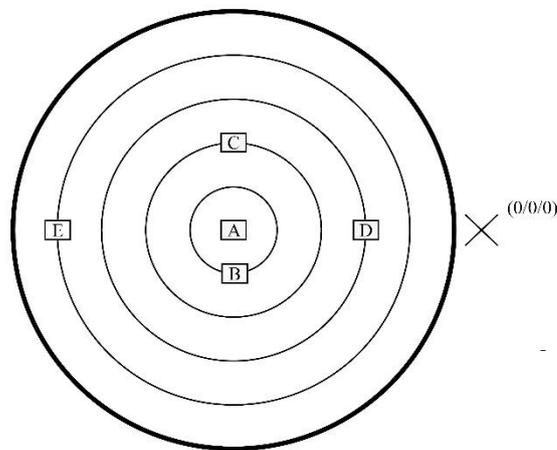


Abbildung 11: Verteilung der Messbereiche für Partikel  $< 500 \mu\text{m}$ .

### 5.1. Optimierung verschiedener RAMAN-Messparameter

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse zur Optimierung der RAMAN-Messung von MP gezeigt. Beginnend mit der Entwicklung eines Filterhalters, über die Wahl des Beleuchtungsmodus und hin zur Wahl des Filtermaterials werden experimentelle Arbeiten diskutiert. Im abschließenden Kapitel werden alle Einzelergebnisse mit theoretischen Überlegungen und Schlussfolgerungen aus Kapitel 3.2 zusammengefasst und eine Empfehlung für die Analyse von MP mittels RM gegeben.

### 5.1.1. Entwicklung und Validierung von Filterhaltern für die RAMAN-Analyse

Die Voraussetzung für eine möglichst optimale konfokale RAMAN-Messung ist eine möglichst ebene Filteroberfläche (Kapitel 3.2.1). Um dies zu erreichen, wurden verschiedene Typen von Filterhaltern entwickelt. Die Güte der Filterhalter wird anhand der Rauigkeit von Filtern, die auf verschiedene Arten fixiert wurden, bewertet. Die Rauigkeit wird durch den maximalen Peak-Peak-Abstand angegeben, der dem Abstand zwischen höchstem und niedrigstem Punkt der Filteroberfläche entspricht und mittels der *TrueSurface*-Option des RAMAN-Mikroskops (WITec GmbH, DE) ermittelt wird. Je geringer der Peak-Peak-Abstand, desto höher die Güte der Fixierungsmethode.

In Tabelle 8 sind die Peak-Peak-Abstände für saubere PC-Filter mit Goldbeschichtung und 50 mm Durchmesser angegeben. Für den Filterhalter ohne Aussparung wurden Mittelwert und zugehöriger Fehler anhand einer dreifachen Messung von jeweils drei Filtern ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung sind in diesem Fall aus neun Einzelwerten gebildet worden. Alle anderen Werte entstammen einer dreifachen Messung eines Filters.

Tabelle 8: Vergleich der Peak-Peak-Abstände für saubere PC-Filter mit Goldbeschichtung und 50 mm Durchmesser; Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus drei *True-Surface*-Messungen an einem Filter bestimmt.

Fixierungsart	Peak-Peak – Mittelwert
Filterhalter ohne Aussparung*	31,2 $\mu\text{m} \pm 7,8 \mu\text{m}$
Filterhalter mit Aussparung	24,0 $\mu\text{m} \pm 1,1 \mu\text{m}$
Auf Glasträger geklebt	589,2 $\mu\text{m} \pm 2,4 \mu\text{m}$
Auf Glasträger gelegt	99,2 $\mu\text{m} \pm 2,6 \mu\text{m}$

\* Die Mittelwerte und die Standardabweichung wurden aus der dreifachen Messung von jeweils drei Filtern ermittelt.

Die Peak-Peak-Abstände der beiden Filterhalter sind vergleichbar. Der massive Filterhalter ohne Aussparung weist einen etwas höheren Wert auf ( $31,2 \pm 7,8 \mu\text{m}$ ) als der Filterhalter mit Aussparung ( $24,0 \pm 1,1 \mu\text{m}$ ). Beide sind um eine Größenordnung weniger rau als der Filter, der auf einen Glasträger geklebt wurde ( $589,2 \pm 2,4 \mu\text{m}$ ). Der saubere Filter, der nur auf einen Glasträger gelegt wurde, besitzt eine im Vergleich zur geklebten Variante relativ geringe Rauigkeit mit  $99,2 \pm 2,6 \mu\text{m}$ . Aber dieser Wert

ist immer noch dreimal so groß wie die Peak-Peak-Abstände, die mit den Filterhaltern erreicht werden. Letztere sind also für saubere Filter den alternativen Fixierungsmöglichkeiten überlegen.

Die Problematik der relativ hohen Werte für die auf Glasträger geklebten Filter ist in Abbildung 12 als Höhenprofil dargestellt. Auch bei sehr vorsichtigem Aufkleben ist ein Faltenwurf nicht zu vermeiden. Da die Klebung außerdem irreversibel ist, ergeben sich notwendigerweise hohe Werte, wie sie in Tabelle 8 gezeigt sind.

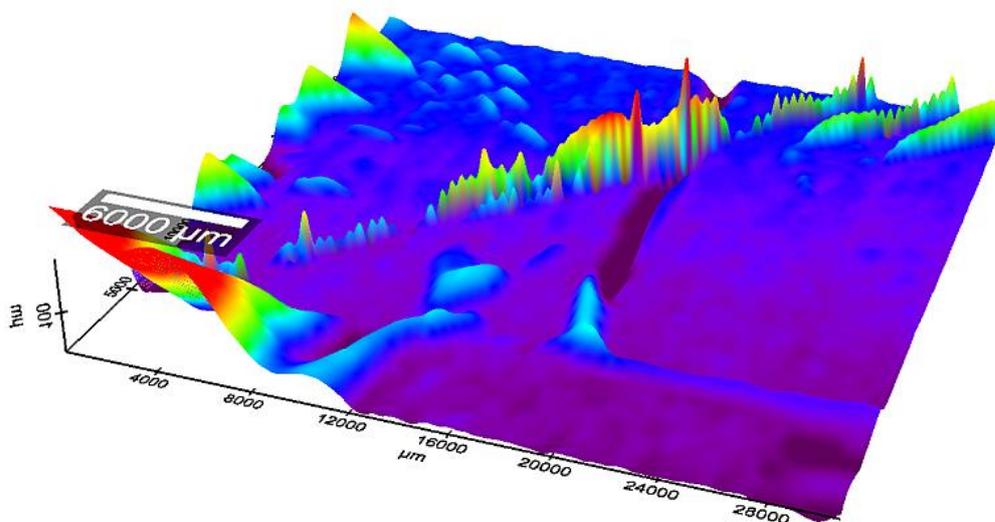


Abbildung 12: Höhenprofil eines sauberen PC-Filters mit Goldbeschichtung und 50 mm Durchmesser, der auf einen Glasträger geklebt wurde.

Beide Filterhalter ermöglichen eine wesentlich weniger raue Oberfläche des Filters. Dies wird unter anderem auch dadurch erreicht, dass die Fixierung im Filterhalter reversibel ist. Sollte also ein erster Fixierungsversuch ein nur unzufrieden stellendes Ergebnis ergeben, kann der Filter gelöst und erneut eingespannt werden, ohne dabei die Probe zu beeinträchtigen.

In Tabelle 9 sind die Peak-Peak-Abstände für PC-Filter mit Goldbeschichtung und 50 mm Durchmesser, die wie unter 4.1.1 mit einer artifiziellen Matrix in Kontakt kamen, angegeben. Der Filterhalter mit Aussparung weist einen Wert von  $34,8 \mu\text{m} \pm 5,0 \mu\text{m}$  auf. Dies ist um eine Größenordnung geringer als die Werte der Filter, die auf einen Glasträger geklebt ( $466,3 \mu\text{m} \pm 1,7 \mu\text{m}$ ) oder gelegt ( $871,4 \mu\text{m} \pm 3,0 \mu\text{m}$ ) wurden. Der Filterhalter mit Aussparung und einem Durchmesser

von 50 mm ist somit für mit artifizieller Matrix belastete Filter alternativen Fixierungsmöglichkeiten überlegen.

Tabelle 9: Vergleich der Peak-Peak-Abstände für PC-Filter mit Goldbeschichtung und 50 mm Durchmesser; Filter kamen wie unter 4.1.1 beschrieben mit artifizieller Matrix in Kontakt; Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus drei *True-Surface*-Messungen an einem Filter bestimmt.

Fixierungsart	Peak-Peak – Mittelwert
Filterhalter mit Aussparung	34,8 $\mu\text{m} \pm 5,0 \mu\text{m}$
Auf Glasträger geklebt	466,3 $\mu\text{m} \pm 1,7 \mu\text{m}$
Auf Glasträger gelegt	871,4 $\mu\text{m} \pm 3,0 \mu\text{m}$

Im Vergleich der Filter, die nur auf den Glasträger gelegt wurden, fällt die große Diskrepanz des Peak-Peak-Abstandes von  $99,2 \mu\text{m} \pm 2,6 \mu\text{m}$  (Tabelle 8) vor der Behandlung mit einer artifiziellen Matrix und  $871,4 \mu\text{m} \pm 3,0 \mu\text{m}$  (Tabelle 9) nach Behandlung, auf. Der Kontakt mit der Probe führt zu einem starken Aufwölben des Filters. Dies zeigt, wie wirksam der Filterhalter für die Glättung des Filters ist.

Für PC-Filter mit Goldbeschichtung und einem Durchmesser von 25 mm sind in Tabelle 10 die Peak-Peak-Abstände gezeigt.

Tabelle 10: Vergleich der Peak-Peak-Abstände für saubere PC-Filter mit Goldbeschichtung und 25 mm Durchmesser; Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus drei *TrueSurface*-Messungen an einem Filter bestimmt.

Fixierungsart	Peak-Peak – Mittelwert
Filterhalter ohne Aussparung*	5,8 $\mu\text{m} \pm 2,1 \mu\text{m}$
Filterhalter mit Aussparung*	10,4 $\mu\text{m} \pm 2,3 \mu\text{m}$
Filterhalter mit Aussparung*†	9,4 $\mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$
Auf Glasträger geklebt	121,4 $\mu\text{m} \pm 2,5 \mu\text{m}$
Auf Glasträger gelegt	63,1 $\mu\text{m} \pm 11,8 \mu\text{m}$

\* Die Mittelwerte und die Standardabweichung wurden aus der dreifachen Messung von jeweils drei Filtern ermittelt.

† Filter kam wie unter 4.1.1 beschrieben mit artifizieller Matrix in Kontakt.

Die Filterhalter zeigen auch für Filter mit einem Durchmesser von 25 mm deutlich niedrigere Peak-Peak-Abstände (massiv –  $5,8 \pm 2,1 \mu\text{m}$ ; mit Aussparung –

$10,4 \pm 2,3 \mu\text{m}$  bzw.  $9,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) als durch Kleben ( $121,4 \pm 2,5 \mu\text{m}$ ) oder Legen ( $63,1 \pm 11,8 \mu\text{m}$ ) auf einen Glasträger erreicht werden kann.

Die untersuchte Fläche für Filter mit einem Durchmesser von 50 mm ist mit  $900 \text{ mm}^2$  6,25-fach größer als die untersuchte Fläche für Filter mit einem Durchmesser von 25 mm. Der Peak-Peak-Abstand des großen massiven Filterhalters ist um den Faktor  $5,4 \pm 2,4$  ( $50 \text{ mm} - 31,2 \mu\text{m}$ ;  $25 \text{ mm} - 5,8 \mu\text{m}$ ) größer, als der des kleinen massiven Filterhalters. Der Peak-Peak-Abstand skaliert daher mit der untersuchten Fläche. Für den Filterhalter mit Aussparung ergibt sich ein Faktor von  $2,3 \pm 0,5$  ( $50 \text{ mm} - 24,0 \mu\text{m}$ ;  $25 \text{ mm} - 10,4 \mu\text{m}$ ). Daher skaliert der Peak-Peak-Abstand nicht mit der Fläche. Eine mögliche Erklärung sind wenige Mikrometer Abweichung bei der Herstellung der Filterhalter.

Die geforderte maximale Rauigkeit von  $22 \mu\text{m}$  wird durch die beschränkte Anregung des konfokalen Volumens mit einer Tiefe von ca.  $11 \mu\text{m} - 24 \mu\text{m}$  und dem z-Achsen-Abschnitt, unter dem angenommen werden kann, dass Signale des Partikels erzeugt werden von ca.  $22 \mu\text{m} - 48 \mu\text{m}$  (Kapitel 3.2.1), bestimmt. Dies wird nur durch die Filterhalter mit 25 mm erreicht. Diese sind daher für die Kombinationen aus Lasern mit 633 nm oder 532 nm mit  $20\times$  ( $\text{NA} = 0,4$ ) oder  $50\times$  LWD ( $\text{NA} = 0,55$ ) vergrößernden Objektiven uneingeschränkt für die MP-Analytik zu empfehlen. Empfehlenswert ist es außerdem, den z-Hub auf den mittleren Wert des Peak-Peak-Abstandes einzustellen. Hierdurch wird am besten eine allgemeine Anregung der vorzufindenden Partikel ermöglicht. Generell gilt jedoch, dass eine Fokussierung auf die Oberfläche des Filters nur für kleine Partikel sinnvoll ist. Je größer die Partikel werden, desto mehr RAMAN-Signal geht durch Streuung oder Absorption innerhalb des Partikels verloren, wenn diese an der der Optik fernen Seite angeregt werden. Für größere Partikel erscheint es daher sinnvoll, den z-Hub anzuheben, damit das erzeugte RAMAN-Signal auch die Partikel verlassen und die Optik erreichen kann. Dasselbe gilt für intransparente Partikel, die den Konfokalpunkt der Laserstrahlung bei Fokussierung im Volumen des Partikels unerreichbar machen. Das nur an der Oberfläche vom unfokussierten Laserstrahl erzeugte RAMAN-Signal ist deutlich schwächer und wird zudem noch von der Optik des RAMAN-Mikroskops nicht gesammelt.

Für Filterhalter mit 50 mm Durchmesser sind die Peak-Peak-Abstände mit  $31,2 \pm 7,8 \mu\text{m}$  und  $24,0 \pm 1,1 \mu\text{m}$  innerhalb des geforderten z-Achsen-Abschnitts von ca.  $22 \mu\text{m} - 48 \mu\text{m}$ . Sie sind also für verschiedene Kombinationen aus Laserwellenlänge und Objektiv geeignet, aber nicht für alle. Durch sektorweise Messung des Filters können die etwas zu hohen Peak-Peak-Abstände jedoch ausgeglichen werden. Da mit den größeren Filtern auch eine größere Probenmenge analysiert werden kann, ist dieses Vorgehen nicht unbedingt nachteilig. Es entspricht vielmehr dem Analysieren mehrerer kleinerer Filter hintereinander. Beide Filterhaltergrößen und beide Filterhalterttypen können daher für die MP-Analytik eingesetzt werden.

#### 5.1.2. Vergleich verschiedener Beleuchtungsmodi

Um den optimalen Beleuchtungsmodus zu ermitteln, sind in Tabelle 11 die Punktwerte der Übereinstimmung der Partikelerkennung mit der tatsächlichen Partikelzahl aus Kapitel 4.1.2 für die vier Beleuchtungsmodi gegen die Filtertypen aufgetragen. Die Ergebnisse der zwölf Polymertypen wurden addiert und ebenso die Ergebnisse der beiden eingesetzten Objektive. Dies ergibt einen Maximalpunktwert von 24 und einen minimalen von -24. In Anhang – A – Optimierung verschiedener RAMAN-PARAMETER sind Beispielbilder und alle Einzelklassifikationen aufgeführt, die die hier gezeigte Punktwertung ergeben.

Tabelle 11: Übereinstimmung der Partikelerkennung mit der tatsächlichen Partikelzahl anhand des Punktesystems aus Kapitel 4.1.2, für die vier verschiedenen Beleuchtungsmodi.

Max.: 24 Min.: -24	PC mit Gold- beschichtung	PC	Nitro- cellulose	Silicium	PES	PTFE
Hellfeld	15	-16	-6	18	11	1
Dunkelfeld	19	18	-16	20	-22	-6
Fluoreszenz (exc.: 592/24, em.: 675/100)	-22	-19	-22	-24	-20	-20
Fluoreszenz (exc.: 470/40, em.: 525/50)	-11	-4	-22	-12	-16	-5

Die Beleuchtung mit beiden Fluoreszenz-Filtern ergibt unabhängig vom verwendeten Filtermaterial nur sehr niedrige Werte. Der höchste erreichte Wert ist -4, die restlichen Werte bewegen sich in der Spanne von -24 bis -11. Diese Beleuchtungsart ist somit nicht zur Analytik von MP mittels RM geeignet. Die Beleuchtung mit Hellfeld ergibt niedrige Werte für PC (-16), Nitrocellulose (-6) und PTFE (1), aber hohe Werte für PES (11), PC mit Goldbeschichtung (15), sowie für Silicium (18) und ist daher für die Anwendung in dieser Konfiguration hinsichtlich Beleuchtung und Partikelerkennung geeignet für die MP-Analyse mit RM. Die besten Ergebnisse wurden mit Dunkelfeld-Beleuchtung erzielt. Für PES (-22), Nitrocellulose (-16), sowie PTFE (-6) wurden niedrige Werte erhalten. Für PC mit Goldbeschichtung (19), PC (18) oder Silicium (20) werden jedoch allesamt höhere Werte im Vergleich zur Hellfeld-Beleuchtung erhalten. Dies macht die Dunkelfeld-Beleuchtung zur bevorzugten Beleuchtungsart.

### 5.1.3. Vergleich verschiedener Filtermaterialien

Die in IMHOF et al. [1] eingesetzten Quarzfaser-Filter wurden für diese Arbeit nicht weiter untersucht, da sehr kleine Partikel (ca. 10 µm) in der Faserstruktur verschwinden können. Außerdem würde die Faserstruktur die Partikelerkennung deutlich erschweren.

Die in Kapitel 5.1.1 diskutierten Filterhalter sind zur MP-Analytik geeignet, da der in Kapitel 3.2.1 geforderte z-Achsen-Abschnitt von 22 µm – 48 µm für PC-Filter mit Goldbeschichtung erreicht wird. Neben diesem Filtermaterial wurden auch andere getestet. In Tabelle 12 sind die Peak-Peak-Abstände für Filter mit 47 mm – 50 mm Durchmesser gezeigt. Sowohl der Nitrocellulose-Filter mit 338,2 µm ± 11,4 µm, als auch der PC-Filter mit 114,4 µm ± 7,5 µm weisen deutlich höhere Peak-Peak-Abstände als der PC-Filter mit Goldbeschichtung auf und erreichen auch nicht annähernd die geforderten 22 µm – 48 µm. Sie sind daher für die Analytik von MP mittels RM ungeeignet. Der Peak-Peak-Abstand des Silicium-Filters liegt mit 32,1 µm ± 7,5 µm in derselben Größenordnung wie der PC-Filter mit Goldbeschichtung und kann daher für die Analytik von MP mittels RM eingesetzt werden.

Tabelle 12: Vergleich der Peak-Peak-Abstände für saubere Filter mit 47 mm – 50 mm Durchmesser; Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus drei *True-Surface*-Messungen an einem Filter bestimmt.

Fixierungsart	Peak-Peak – Mittelwert
PC mit Goldbeschichtung (im Filterhalter mit Aussparung*)	24,0 µm ± 1,1 µm
Nitrocellulose (im Filterhalter mit Aussparung)	338,2 µm ± 11,4 µm
PC (im Filterhalter mit Aussparung)	115,4 µm ± 17,5 µm
Silicium	32,1 µm ± 0,5 µm

\* Die Mittelwerte und die Standardabweichung wurden aus der dreifachen Messung von jeweils drei Filtern ermittelt.

In Tabelle 13 sind die Peak-Peak-Abstände für verschiedene saubere Filter im Filterhalter mit Aussparung gezeigt. Der PC-Filter mit Goldbeschichtung erreicht mit

10,4  $\mu\text{m} \pm 2,3 \mu\text{m}$  den geforderten z-Achsen-Abschnitt von 22  $\mu\text{m}$  – 48  $\mu\text{m}$ , ebenso wie der PC-Filter mit 5,3  $\mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$ . Beide sind daher aus Sicht der geforderten Rauigkeit zur Analyse von MP mittels RM geeignet. Sowohl der PES-Filter mit 89,7  $\mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$ , als auch der PTFE-Filter mit 241,7  $\mu\text{m} \pm 2,6 \mu\text{m}$ , erreichen den geforderten z-Achsen-Abschnitt nicht und sind daher für die MP-Analytik mittels RM ungeeignet.

Tabelle 13: Vergleich der Peak-Peak-Abstände für saubere Filter mit 25 mm Durchmesser; Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus drei *True-Surface*-Messungen an einem Filter bestimmt.

Fixierungsart	Peak-Peak – Mittelwert
PC mit Goldbeschichtung (im Filterhalter mit Aussparung*)	10,4 $\mu\text{m} \pm 2,3 \mu\text{m}$
PC (im Filterhalter mit Aussparung)	5,3 $\mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$
PES (im Filterhalter mit Aussparung)	89,7 $\mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$
PTFE (im Filterhalter mit Aussparung)	241,7 $\mu\text{m} \pm 2,6 \mu\text{m}$

\* Die Mittelwerte und die Standardabweichung wurden aus der dreifachen Messung von jeweils drei Filtern ermittelt.

#### 5.1.4. Zusammenfassung der optimierten Parameter

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Parameter der RM-Analytik von MP optimiert. In diesem Kapitel werden kurz die Ergebnisse aufgezählt.

##### *Laser*

Laserwellenlängen von 532 nm und 633 nm mit Leistungen zwischen 0,4 mW (633 nm) und 10,8 mW (532 nm) sind zu empfehlen (Kapitel 3.2.1 und insbesondere [8]).

##### *Objektiv*

Die bevorzugt eingesetzten Objektive besitzen eine möglichst hohe numerische Apertur bei gleichzeitig ausreichendem Arbeitsabstand. Dies trifft auf Objektive mit 20 $\times$  Vergrößerung und 50 $\times$  Vergrößerung mit großem Arbeitsabstand zu (Kapitel 3.2.1 und insbesondere [8]).

### *Spektrale Breite*

Die spektrale Breite, die abgedeckt werden sollte, beträgt  $3000\text{ cm}^{-1}$  und überstreicht den Bereich von  $200\text{ cm}^{-1}$  bis  $3200\text{ cm}^{-1}$ . Das meist hierfür eingesetzte optische Gitter besitzt 600 Linien/mm, wobei auch ein Gitter mit nur 300 Linien/mm zu empfehlen ist (Kapitel 3.2.2 und insbesondere [8]).

### *Messzeit*

Messzeiten zwischen 0,5 s und 500 s wurden eingesetzt. Empfehlenswert sind Messzeiten die dazwischenliegen, also ca. 10 s – 30 s (Kapitel 3.2.2 und insbesondere [8]).

### *Filterhalter*

Die notwendige Glättung der zu untersuchenden Filter kann mithilfe der in dieser Arbeit beschriebenen Filterhalter ermöglicht werden. Diese Art der Fixierung ist einem bloßen Auflegen des Filters auf einen Glasträger und dem Aufkleben auf einen Glasträger überlegen (Kapitel 5.1.1).

### *Beleuchtungsmodus*

In Kapitel 5.1.2 wurden die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld und zwei Fluoreszenzanregungen des zur Verfügung stehenden Systems *alpha300R* (WITec GmbH, DE) miteinander verglichen. Als am besten zur Partikelerkennung geeignet hat sich die Dunkelfeld-Beleuchtung erwiesen.

### *Filtermaterial*

Um ein optimales Filtermaterial zu ermitteln, wurden sechs Filtertypen miteinander verglichen. Am besten geeignet hinsichtlich Partikelsichtbarkeit (Kapitel 5.1.2) und minimalem Peak-Peak-Abstand (Kapitel 5.1.3) haben sich PC-Filter mit Goldbeschichtung und Silicium-Filter, sowie mit leichten Abstrichen PC-Filter erwiesen.

## 5.2. Anwendung in der Analyse der BMBF Elb-Schwimmstaffel-Proben

Eine Möglichkeit die optimierte Analytik von MP mittels RM zu testen bot die vom BMBF veranstaltete Elb-Schwimmstaffel. Hierbei wurde die Elbe öffentlichkeitswirksam mit einem Forschungsschiff von Bad Schandau bis Geesthacht befahren und von Schwimmern begleitet. Während einzelner Etappen wurde es der TU Berlin (Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL) ermöglicht Proben des Oberflächenwassers zu nehmen. Aus dem Oberflächenwasser wurden die Schwebstoffe direkt auf PC-Filter mit Goldbeschichtung gefiltert, bis mit bloßem Auge eine leichte Belegung sichtbar wurde. Die Filter wurden getrocknet und vor Kontaminationen geschützt verschickt. Zur Analyse wurden die Filter auf einen großen Filterhalter mit Aussparung gespannt und mit dem Messschema aus Abbildung 11 auf einem *alpha300R* (WITec GmbH, DE) analysiert. Im Gegensatz zur Analyse bei IMHOF et al. [1] wurde die analysierte Fläche von 1,6 % auf 2,8 % der Gesamtfläche erhöht. Die Zahl der analysierten Partikel wurde von ca. 300 auf ca. 900 pro Filter erhöht. Der gesamte Messprozess erfolgte semi-automatisch. Die Partikel wurden im Dunkelfeld vom Experimentator ausgewählt (manueller Teil). Die RAMAN-mikrospektroskopische Messung, also das Abfahren der vorher bestimmten Partikelkoordinaten und die Aufnahme der Spektren geschah automatisch (automatischer Teil). Die Spektren wurden mit einem Laser mit 532 nm Wellenlänge und 5 mW Laserleistung aufgenommen. Es wurde eine Messzeit von  $5 \times 5$  s gewählt. Der gesamte zu messende spektrale Bereich von  $200 \text{ cm}^{-1}$  bis  $3200 \text{ cm}^{-1}$  wurde unter Einsatz eines Gitters mit 600 Linien/mm in einem Fenster aufgenommen. Die RAMAN-Spektren wurden schließlich vom Experimentator ausgewertet.

Auf 3 untersuchten Filtern wurden zusammen ca. 2700 Partikel analysiert, aber nur 1 PE-Partikel gefunden. Bei den übrigen Partikeln handelte es sich größtenteils um Calcit oder Quarz und zusätzlich einigen  $\text{TiO}_2$ -Partikeln. Da die Probenahme und -aufbereitung nur aus einer Filtration bestanden, gibt die Probe das Verhältnis zwischen MP-Partikeln und Nicht-MP-Partikeln wieder. In Abbildung 13 sind ausgewählte Spektren der Probe gezeigt.

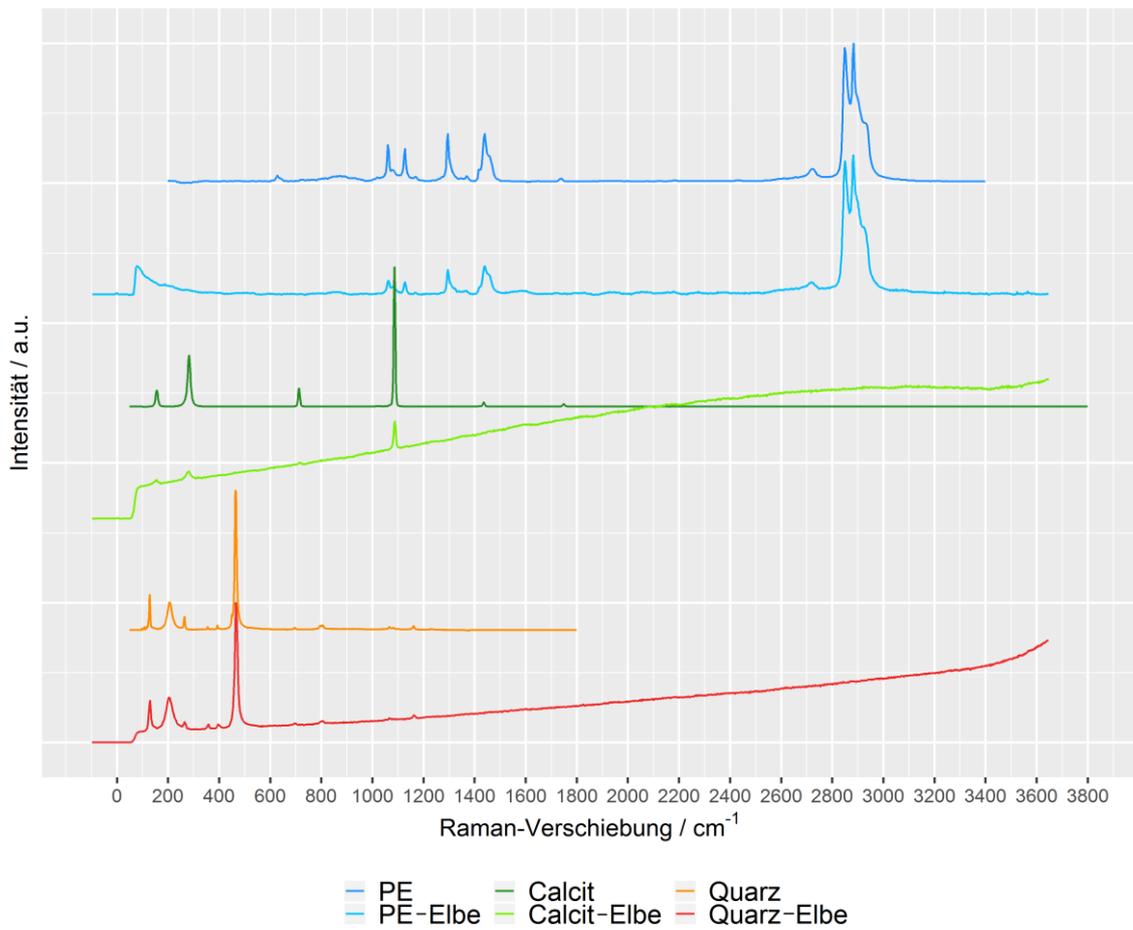


Abbildung 13: Ausgewählte RAMAN-Spektren aus der Elb-Schwimmstaffel. Referenzspektren aus *Spectral ID 3.03* (Thermo Electron Corporation, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Obwohl die Zahl an gemessenen Partikeln verdreifacht werden konnte, ist es wünschenswert noch mehr Partikel messen zu können. Die manuelle Auswahl der zu messenden Partikel durch den Experimentator wurde als zeitaufwendiger Schritt identifiziert, der noch Optimierungspotential birgt. Um diese Auswahl zu beschleunigen und nebenbei auch noch zu objektivieren, wurde die Entwicklung und Validierung einer Partikelerkennungssoftware ins Auge gefasst (Kapitel 5.4). Es wurde außerdem klar, dass unabhängig von der Zahl der gemessenen Partikel, eine statistisch belastbare Aussage über den MP-Gehalt eines Filters, von dem nur ein Teil der Partikel gemessen wird, nötig ist. Hierzu wurde in anderen Gebieten der Wissenschaft nach ähnlichen Problemen gesucht und versucht deren Lösung auf die MP-Analytik mittels RM zu adaptieren (Kapitel 5.5). Ein weiterer Fokus wurde auf die

Kontaminationskontrolle gelegt. Hierzu wurde der Einsatz einer UV/Weißlichttaschenlampe aus der Reinraumtechnik [149] und der Raumfahrtproduktsicherung [150] adaptiert. Zusätzlich wurde das *Tape Lift Screening*, eine Methode der Reinraumtechnik [149] und der Forensik [12] für die MP-Analytik validiert.

Die Rohdaten zu diesem Kapitel sind über ein Repository auf gitlab einsehbar. Der Zugang hierzu wird auf Anfrage über [p.anger@tum.de](mailto:p.anger@tum.de) freigeschalten.

### 5.3. Kontaminationskontrolle für die Mikroplastik-Analytik

#### 5.3.1. Erkennen von Kontaminationen mittels UV/Weißlicht

In Abbildung 14 und Abbildung 15 ist ein frisch aus der Vorratspackung entnommener Glasträger (Thorlabs GmbH, DE) unter UV-Licht bzw. Weißlicht im Streiflicht gezeigt. Unter beiden Beleuchtungsarten sind Partikel zu erkennen. Die unterschiedliche Zahl der erkennbaren Partikel liegt an der unterschiedlichen Beleuchtungsstärke der beiden Lichtquellen. Für die Anwendung kam durch die höhere mögliche Beleuchtungsstärke das Weißlicht im Streiflicht zum Einsatz.

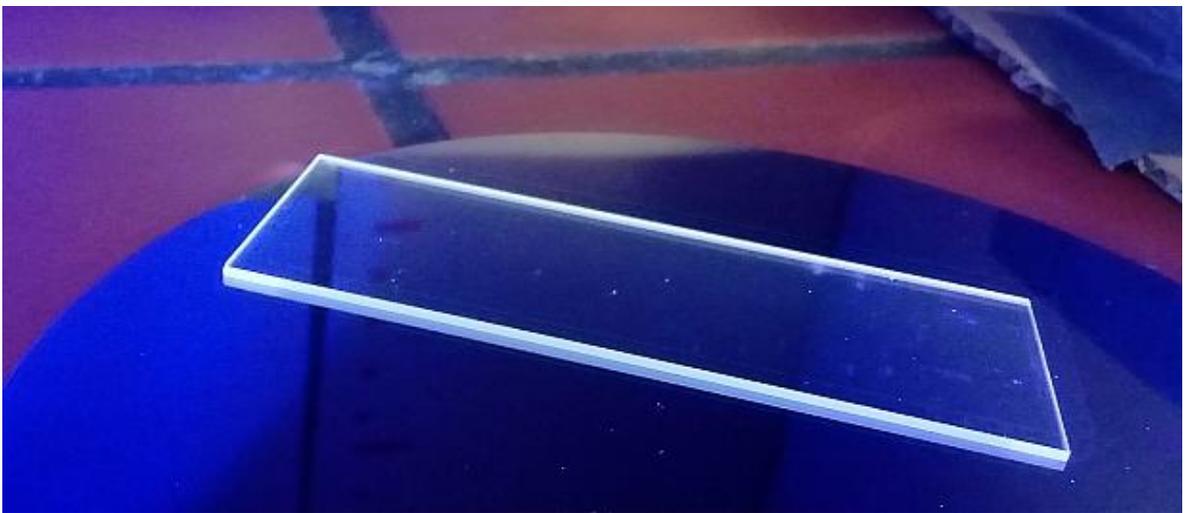


Abbildung 14: Frisch aus der Vorratspackung entnommener Glasträger unter UV-Licht.



Abbildung 15: Frisch aus der Vorratspackung entnommener Glasträger unter Weißlicht im Streiflicht. Abbildung 14 zeigt denselben Glasträger.

### 5.3.2. Erkennen von Kontaminationen mittels Tape-Lift-Screening

Die Ergebnisse aus Kapitel 5.2 lassen keine Kontamination vermuten, da insgesamt nur 1 MP-Partikel gefunden wurde. Generell gilt jedoch, dass für die Kontaminationskontrolle es nicht nur wichtig ist Kontaminationen zu vermeiden, sondern diese auch zu erkennen. Daher wurde das *Tape Lift Screening* auf die Analytik mittels RM hin untersucht und optimiert.

In Kapitel 4.3 wurden die vier Kriterien Partikelsichtbarkeit, Partikelaufnahme und -wiederfindung, Klebedauerhaftigkeit, sowie spektraler Hintergrund des Klebebands definiert.

Zur Illustration des Kriteriums Partikelaufnahme und -wiederfindung, sowie des analog durchgeführten Experiments zur Bestimmung der Klebedauerhaftigkeit, ist in Abbildung 16 eine mikroskopische Aufnahme eines Glasträgers mit getrockneter PS-Suspension, die fünf PS-Partikel aufweist, gezeigt. In Abbildung 17 ist derselbe Glasträger nach Anwendung eines Klebebandes, in diesem Fall das 3M-4828 – Klebeband, gezeigt. In Abbildung 18 ist eine mikroskopische Dunkelfeld-Aufnahme des Klebebandes gezeigt, das auf den Glasträger in Abbildung 16 appliziert wurde und auf einen zweiten Glasträger in der in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Weise geklebt wurde. In Abbildung 19 ist dieselbe Aufnahme unter Hellfeld-Beleuchtung gezeigt. Nur im Hellfeld sind Partikel zu erkennen. Es wurden 2 von 5 Partikeln gefunden und mit RM als PS verifiziert.

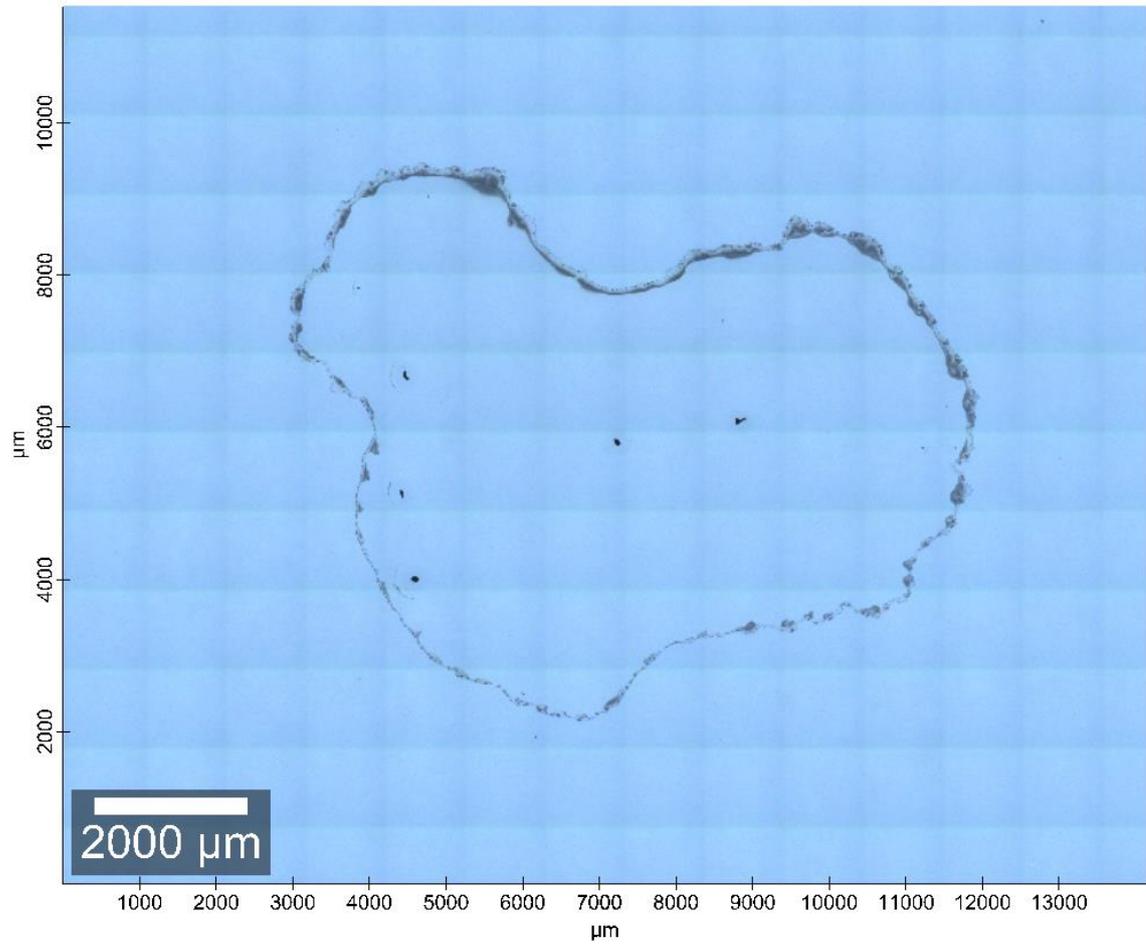


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahme eines Glasträgers mit getrockneter PS-Suspension.

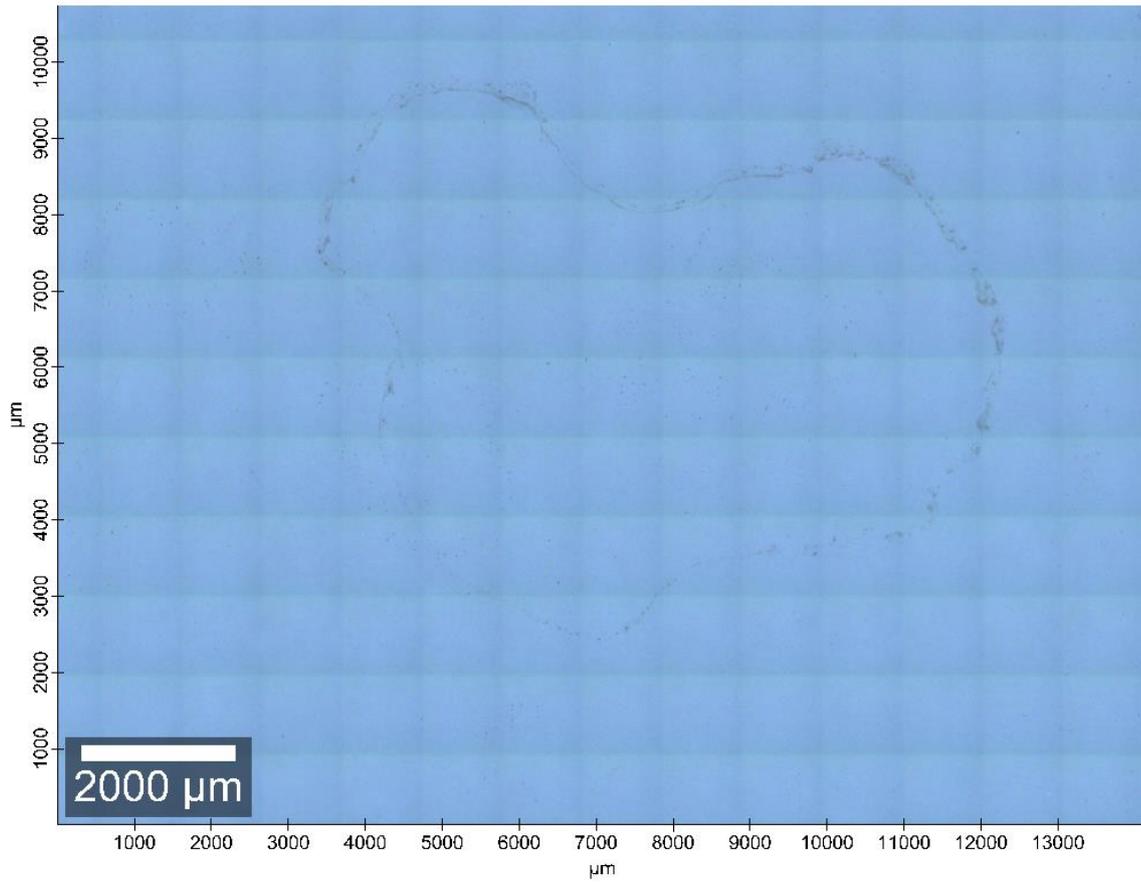


Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahme des Glasträgers aus Abbildung 16 nach Anwendung des 3M-4828 -Klebandes.

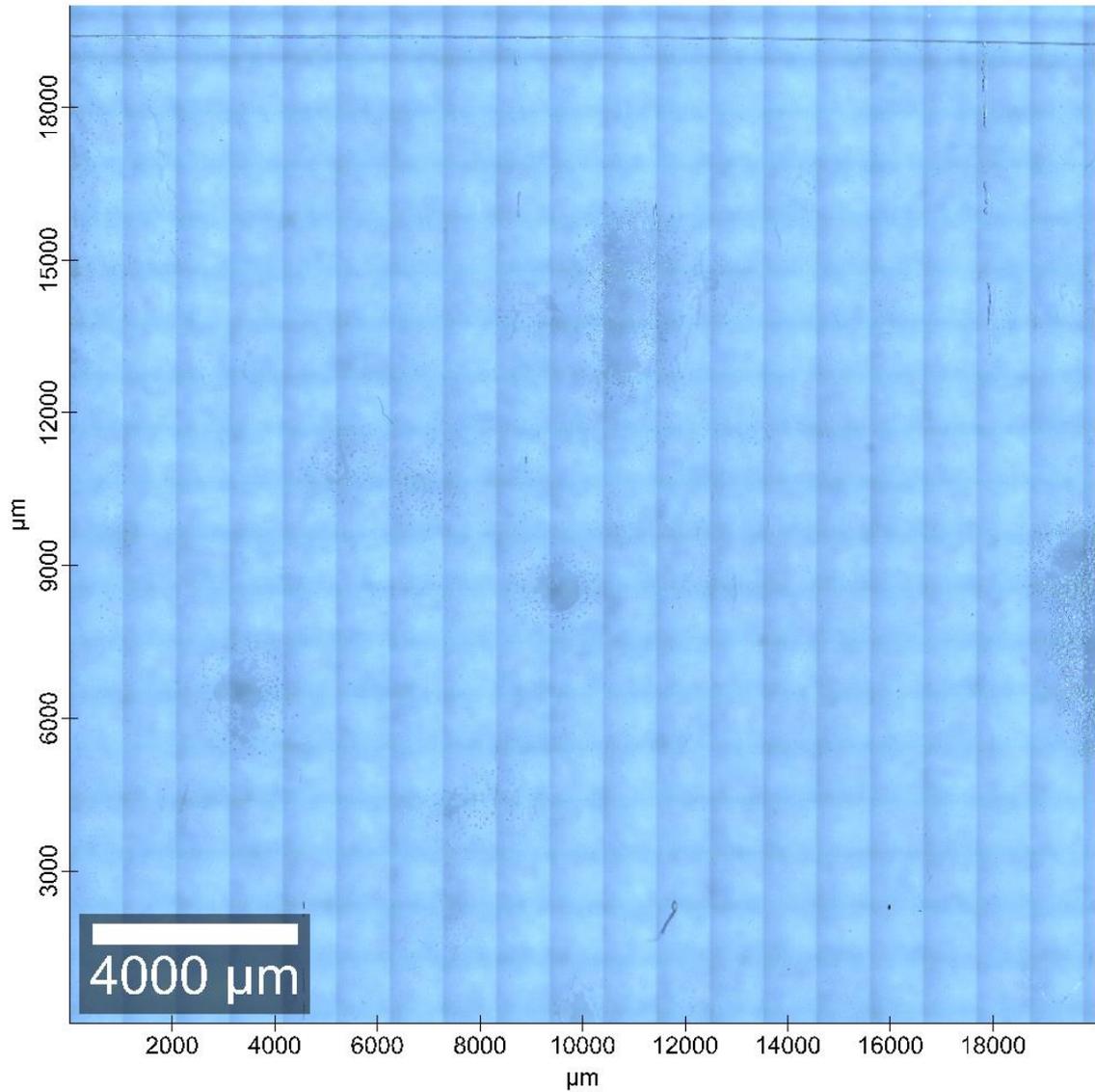


Abbildung 18: Mikroskopische Dunkelfeld-Aufnahme des 3M-4828 -Klebebandes, das auf den Glasträger in Abbildung 16 angewendet und auf einen zweiten Glasträger geklebt wurde.

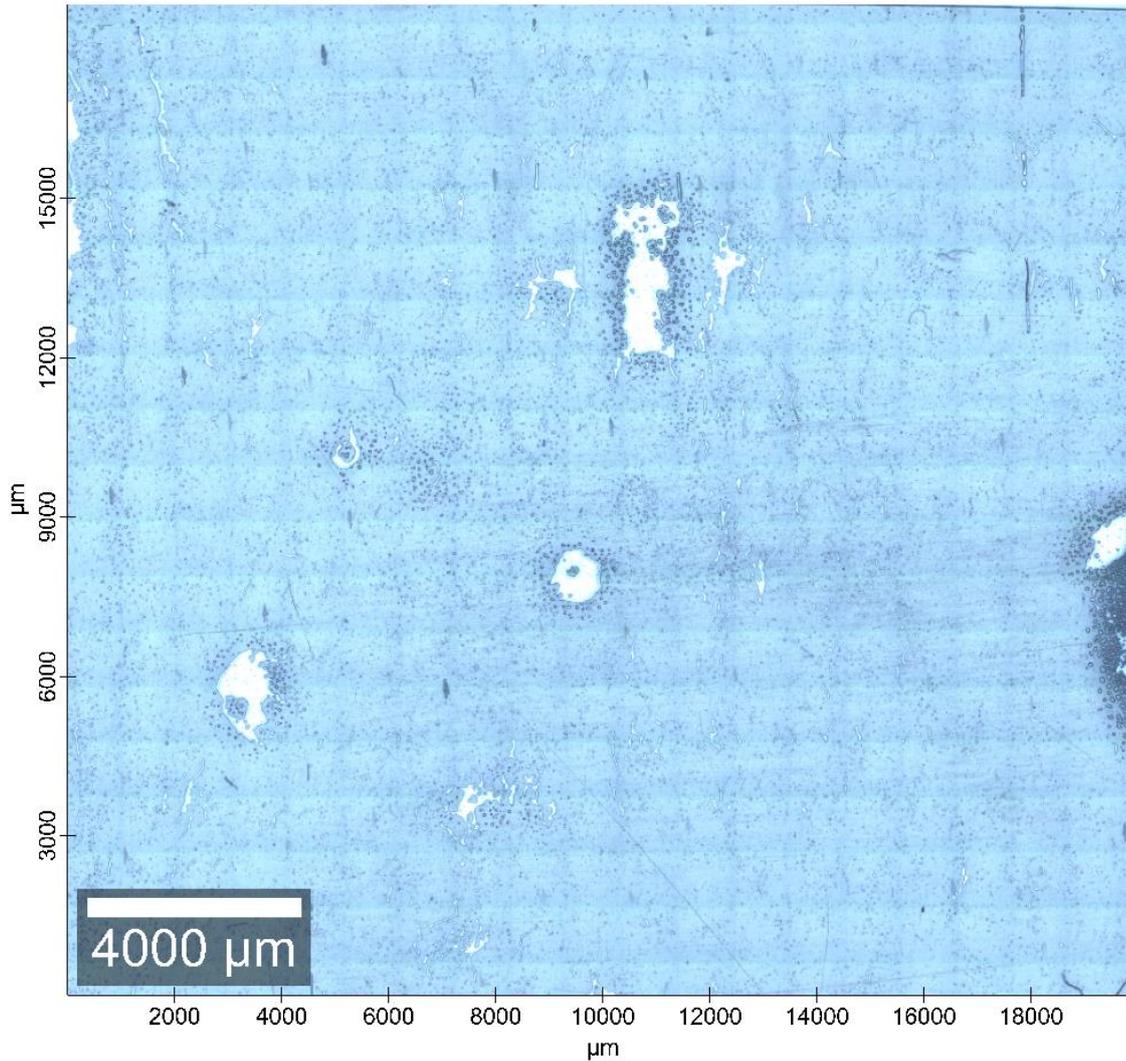


Abbildung 19: Mikroskopische Hellfeld-Aufnahme des 3M-4828 –Klebebandes, das auf den Glasträger in Abbildung 16 angewendet und auf einen zweiten Glasträger geklebt wurde. Eingezeichnet sind die 2 (von 5) wiedergefundenen und mit RM als PS verifizierten Partikel.

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Validierung anhand der vier genannten Kriterien aufgeführt. Die Einzelergebnisse hierzu sind in Anhang – B – Kontaminationskontrolle zu finden.

Tabelle 14: Übersicht der verschiedenen Klebebänder und die Bewertungen nach den vier Kriterien Partikelsichtbarkeit, Partikelaufnahme und -wiederfindung, Klebedauerhaftigkeit und spektraler Hintergrund des Klebebandes.

Klebeband	Typ	Partikel-sicht-barkeit	Partikel-auf-nahme	Klebedauerhaftigkeit	Spektraler Hintergrund
tesa® Malerband PERFECT	Malerkrepp, Washi-Papier	-	/	/	/
LUX Flachkrepp	Malerkrepp, Papier	-	/	/	/
tesa® Doppelband TRANSPARENT	Doppelseitig	-	/	/	/
Papiervlies KM 975	Doppelseitig, Papier	-	/	/	/
tesa extra Power® Universal	Gaffer- Klebeband	-	/	/	/
KS 283-T-19	Transparentes Klebeband	0	/	/	- (PVC)
3M-4828	Transparentes Klebeband	+	26 % ± 13 % (n=3)	45 % ± 18 % (n=3)	- (PE)
KS-29-T-12	Transparentes Klebeband	+	50 % ± 50 % (n=3)	50 % ± 44 % (n=3)	- (PP)
tesafilm® TRANSPARENT	Transparentes Klebeband	+	57 % ± 42 % (n=3)	73 % ± 25 % (n=4)	- (PP)
Shurtape J-LAR®	Transparentes Klebeband	+	78 % ± 26 % (n=3)	96 % ± 6 % (n=3)	- (PP)

Die nicht transparenten Klebebänder sind alle ungeeignet, da sie nur eine unzureichende Partikelsichtbarkeit besitzen. Die beiden Malerkrepp-Klebebänder tesa® Malerband PERFECT und LUX Flachkrepp besitzen eine sehr inhomogene Oberfläche. Außerdem blieben Kleber-Reste auf dem Glasträger zurück. Die doppelseitigen Klebebänder tesa® Doppelband TRANSPARENT und Papiervlies KM 975 zeigten ebenfalls eine sehr inhomogene Oberfläche. Der Kleber löste sich zwar nicht vom Trägermaterial, jedoch behinderte die Faserstruktur des Klebebands die Lokalisation von Partikeln. Das einzige getestete Gaffer-Tape, tesa extra Power® Universal, besitzt sehr viel Eigenstruktur, die das Erkennen von Partikeln erschwert. So wurden keine der aufgenommenen Partikel, im Test der Partikelsichtbarkeit, wiedergefunden. Das transparente Klebeband KS 283-T-19 ermöglicht zwar eine vergleichsweise gute Partikelsichtbarkeit, neigt jedoch sehr stark zum Faltenwurf und weist schlechte Abrolleigenschaften auf. Da eine gute Partikelsichtbarkeit damit meist nicht gewährleistet ist, wurde das Klebeband mit „0“ bewertet und nicht weiter analysiert. Die Werte für die Partikelaufnahme und -wiederfindung, sowie die Klebedauerhaftigkeit zeigen für die vier übrigen transparenten Klebebänder (ohne KS 283-T-19) alle dieselbe Reihenfolge. Am schlechtesten schnitt das 3M-4828-Klebeband ab ( $26 \% \pm 13 \% (n=3)$  und  $45 \% \pm 18 \% (n=3)$ ), gefolgt vom Klebeband KS-29-T-12 ( $50 \% \pm 50 \% (n=3)$  und  $50 \% \pm 44 \% (n=3)$ ). Die zwei am besten geeigneten Klebebänder sind der tesafilm® TRANSPARENT ( $57 \% \pm 42 \% (n=3)$  und  $73 \% \pm 25 \% (n=4)$ ) und insbesondere das Shurtape J-LAR® ( $78 \% \pm 26 \% (n=3)$  und  $96 \% \pm 6 \% (n=3)$ ). Allen transparenten Klebebändern gemeinsam ist, dass sie auf einem Polymerbasierten Träger aufbauen, der die Identifikation für das Klebeband KS-29-T-12, den tesafilm® TRANSPARENT und das Shurtape J-LAR® für PP verhindert. Mit dem 3M-4828-Klebeband kann kein PE und mit dem Klebeband KS-283-T-19 kann kein PVC analysiert werden.

Ein optimales Klebeband ist daher noch nicht gefunden. Das Shurtape J-LAR® ist, abgesehen von der Einschränkung kein PP beproben zu können, jedoch geeignet, um Kontaminationen mit MP im analytischen Labor aufzudecken.

#### 5.4. Evaluierung einer Partikelerkennung basierend auf OTSU's Algorithmus

In der vorliegenden Arbeit wird die Implementierung von OTSU's Algorithmus und einer Wasserscheiden-Transformation zu einem *Open Source* Software-Paket (<https://gitlab.lrz.de/RAMAN-sem-iwc/mipran>) zur Partikelerkennung auf ihre Eignung zur Analytik von MP mittels RM hin untersucht. Diese Arbeit wurde bereits veröffentlicht [52].

Um den Algorithmus zu bewerten, wurde das Ergebnis der Partikelerkennung mit dem Ergebnis eines Experten verglichen. In der Bewertung der falsch positiven und falsch negativen Treffer wurden die falsch negativen Treffer, also diejenigen bei denen der Experte, nicht aber der Algorithmus einen Partikel erkannt hat, schwerer gewichtet. Dies wurde in der Berechnung so umgesetzt, dass von der absoluten Zahl an erkannten Partikel  $N_{Algorithmus}$  die falsch positiven Treffer  $N_{falsch-positiv}$  abgezogen wurden und die Übereinstimmung als Verhältnis zur Zahl der vom Experten gefunden Partikel  $N_{Experte}$  berechnet wurde (Formel 7).

$$\text{Übereinstimmung} = \frac{N_{Algorithmus} - N_{falsch-positiv}}{N_{Experte}} \quad \text{Formel 7}$$

Die falsch negativen Treffer wurden schwerer gewichtet, da sie die mögliche zu findende Zahl an MP-Partikeln reduzieren und damit zu einer Unterbestimmung des Analyten führen. Außerdem haben im Vergleich dazu die falsch positiven Treffer den vergleichsweise geringeren Nachteil, die Messzeit zu erhöhen. Da falsch positive Treffer auch durch falsche Teilung von Partikeln und Agglomeraten entstehen und damit die Partikelgrößenverteilung verfälschen, ist auch diese Fehlerart in der Bewertung der Genauigkeit und der Verlässlichkeit mit angegeben.

Das Ergebnis der Partikelerkennung ist in Abbildung 20 bei inaktiver Wasserscheiden-Transformation und Erkennung von hellen Partikeln (*white particles* aktiv) gezeigt. Dieses Bild ist beispielhaft, um die Möglichkeiten und Einschränkungen des Algorithmus zu zeigen. Die größeren Partikel werden allesamt gefunden. Ein Problem tritt bei kleinen Partikeln auf, die nur einen schwachen Kontrast zum Hintergrund zeigen. Dies ist in Abbildung 21 gezeigt. Ein weiteres Problem sind Agglomerate wie in

Abbildung 20 im rechten Teil des Bildes (roter Kreis) gezeigt. Dieses wird fälschlicherweise als zusammenhängender Partikel erkannt. Um dieses Problem zu umgehen, kann die Wasserscheiden-Transformation angewendet werden. Dies ist in Abbildung 22 gezeigt. Das Agglomerat wird vollständig und korrekt getrennt. Der Nachteil der Anwendung der Wasserscheiden-Transformation ist die Trennung von Partikeln und vor allem von Fasern in mehrere kleinere Partikel. Dies ist anhand des großen länglichen Partikels in der Mitte von Abbildung 22 zu sehen.

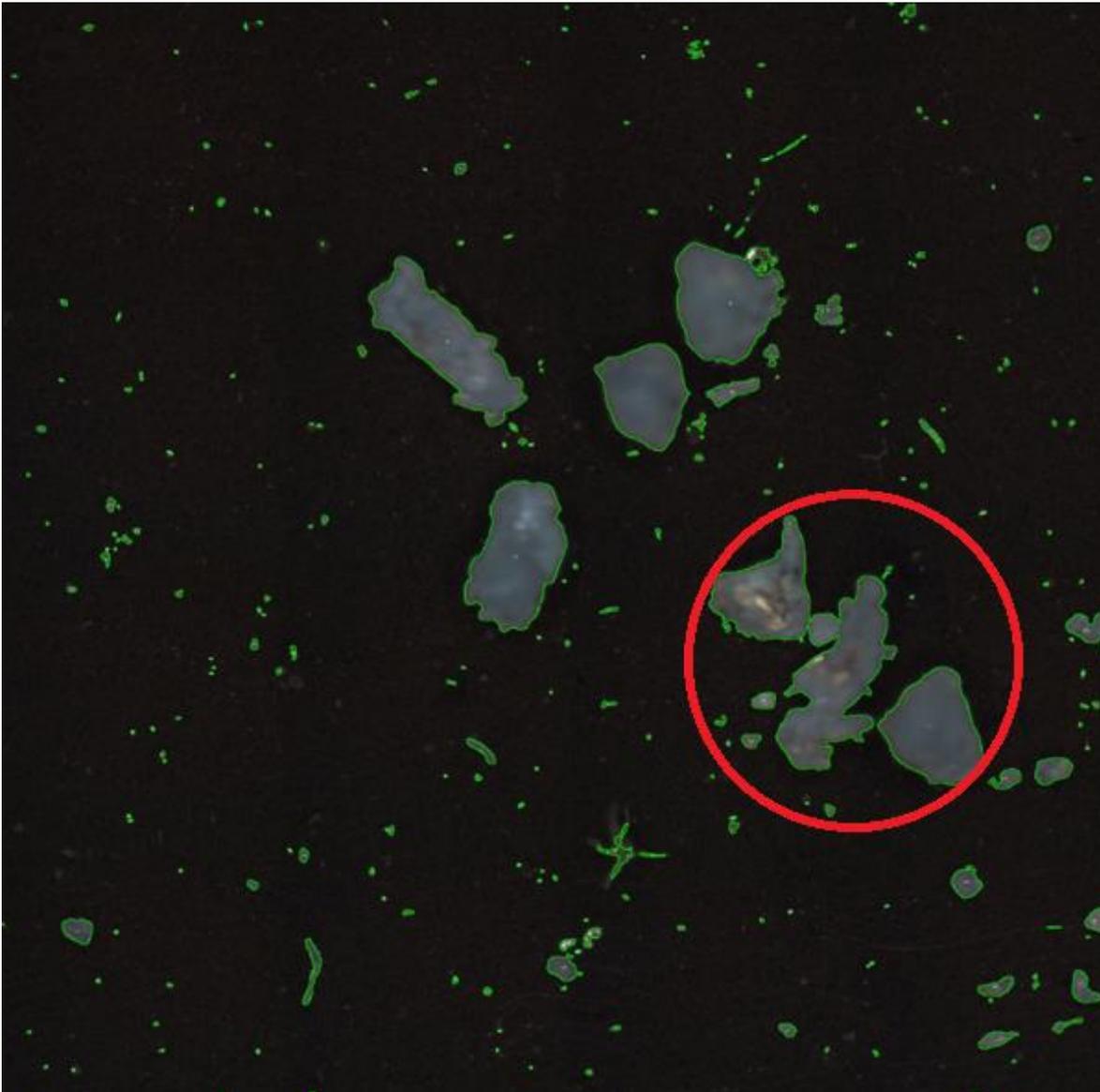


Abbildung 20: Agglomerate, die nicht richtig getrennt wurden (roter Kreis). Abgewandelt aus Anger und Prechtel et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Seitenlänge Bild: 4096  $\mu\text{m}$ )

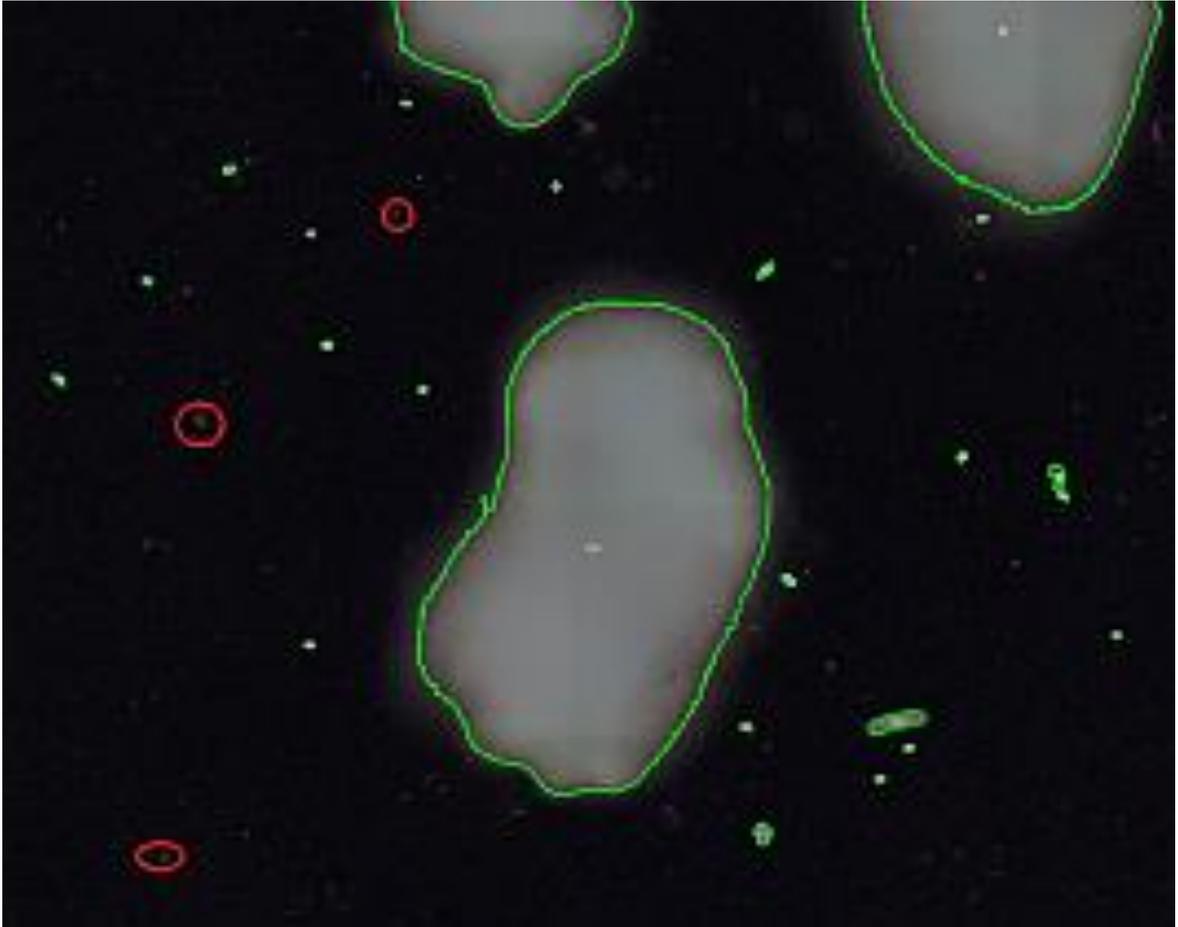


Abbildung 21: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 38e. Entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Abmessungen Bild: 266  $\mu\text{m}$   $\times$  212  $\mu\text{m}$ )

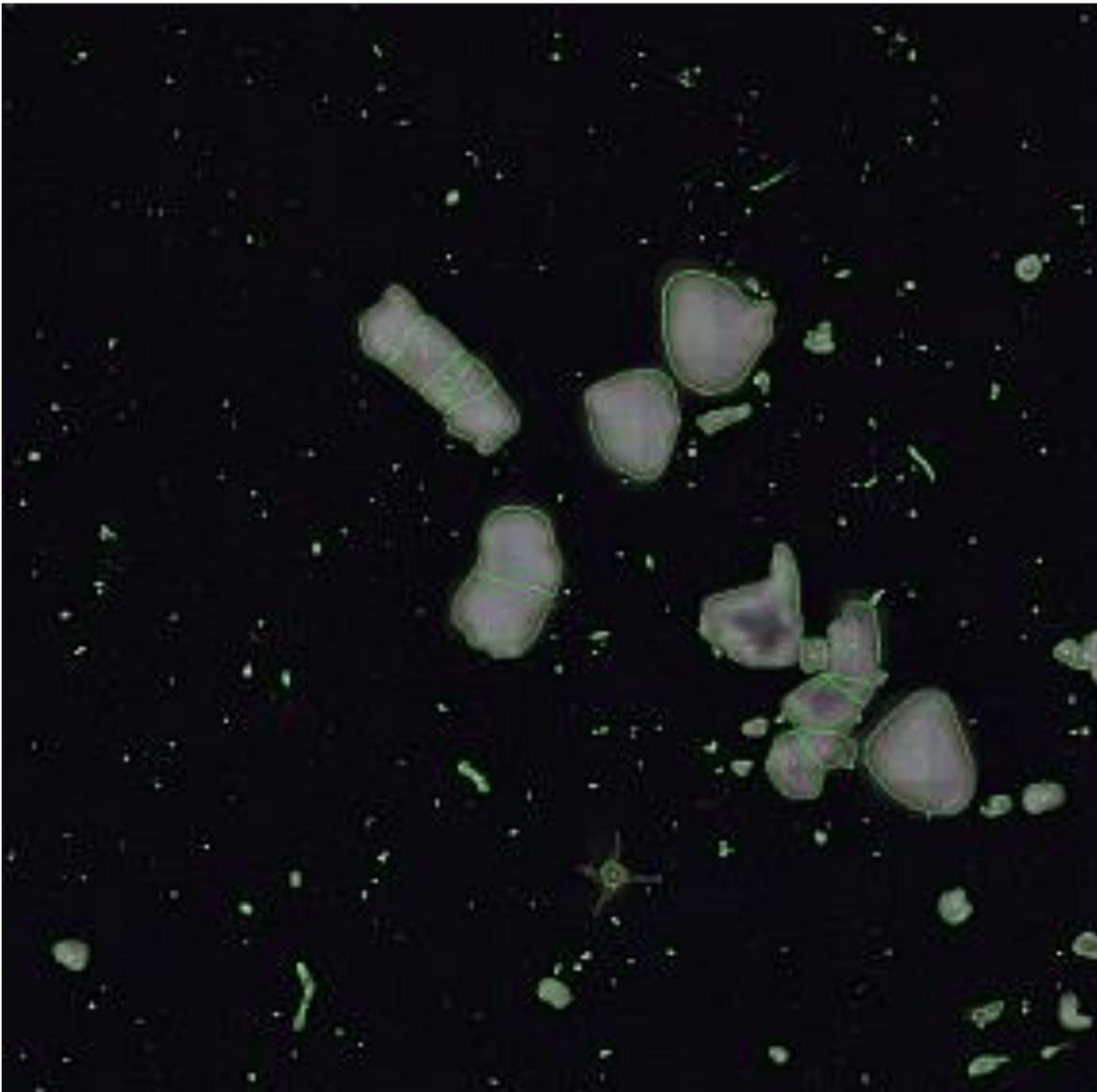


Abbildung 22: Bild aus Abbildung 38 unter zusätzlicher Anwendung der Wasserscheiden-Transformation. Entnommen aus Anger und Prechtl et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Seitenlänge Bild: 4096  $\mu\text{m}$ )

Trotz der hier gezeigten Nachteile des Software-Pakets zur Partikelerkennung zeigt die quantitative Betrachtung eine hohe Übereinstimmung und breite Anwendbarkeit auf unterschiedlichste Arten von Bildern. So sind helle Partikel auf dunklem Hintergrund (Abbildung 41 – Abbildung 44, Abbildung 47 – Abbildung 56), dunkle Partikel auf hellem Hintergrund (Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 57 – Abbildung 63), mehrfarbige Partikel (z.B. Abbildung 44), Partikel unterschiedlicher Transparenz (z.B. Abbildung 45 und Abbildung 46), Partikel unterschiedlicher Form (Fasern, z.B. Abbildung 57 und Abbildung 58, Fragmente, z.B. Abbildung 23, Sphären, z.B. Abbildung 47, und Filme, z.B. Abbildung 49) und Partikel in verschiedenen Anordnungen

(vereinzelte Partikel, z.B. Abbildung 54, und Agglomerate, z.B. Abbildung 47) analysierbar. Die Auswertung aller untersuchten Bilder ist im Anhang – C – Partikelerkennung zu finden. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse diskutiert.

Die Bilderserie aus OSSMANN et al. [145] zeigt, dass Partikel nicht unbedingt besonders hell sein müssen, um erkannt zu werden (Abbildung 23 und Abbildung 24). Die Übereinstimmung in der Genauigkeit liegt zwischen 79,2 % und 100 %.

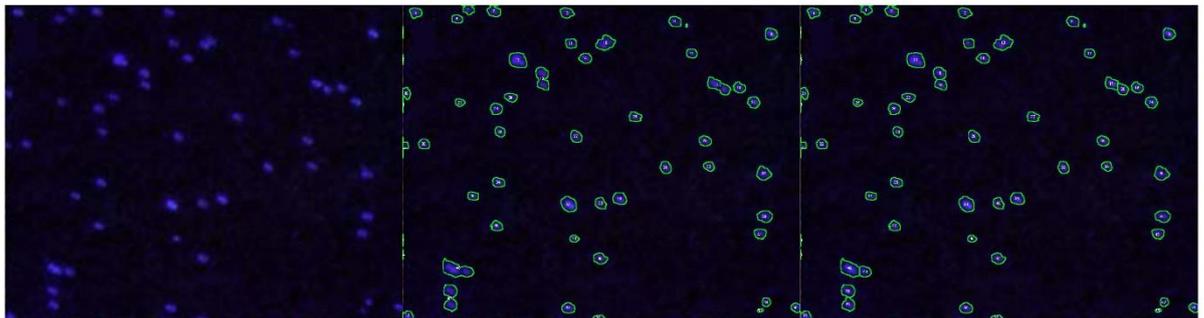


Abbildung 23: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4f; Box “white particles” aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163 µm)

Tabelle 15: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 23

	# Partikel	Übereinstimmung / %	falsch negative	falsch positive
Experte	50			
OTSU	53	92.0	4	7
OTSU + Wasserscheide	57	100	0	7

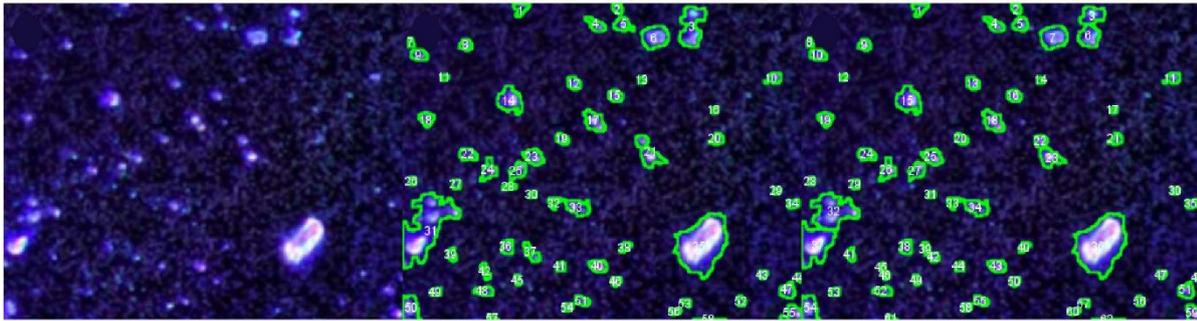


Abbildung 24: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4g; Box “white particles” aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163 µm)

Tabelle 16: Genauigkeit der Bildererkennung in Abbildung 24

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	53			
OTSU	58	79.2	11	16
OTSU + Wasserscheide	62	83.0	9	18

Tatsächlich ist es eher ein Problem, wenn die Partikel zu hell sind, wie in Abbildung 26 deutlich wird. In dieser Abbildung erscheinen selbst die Poren des Filters zu „leuchten“ und werden daher fälschlicherweise als Partikel erkannt.

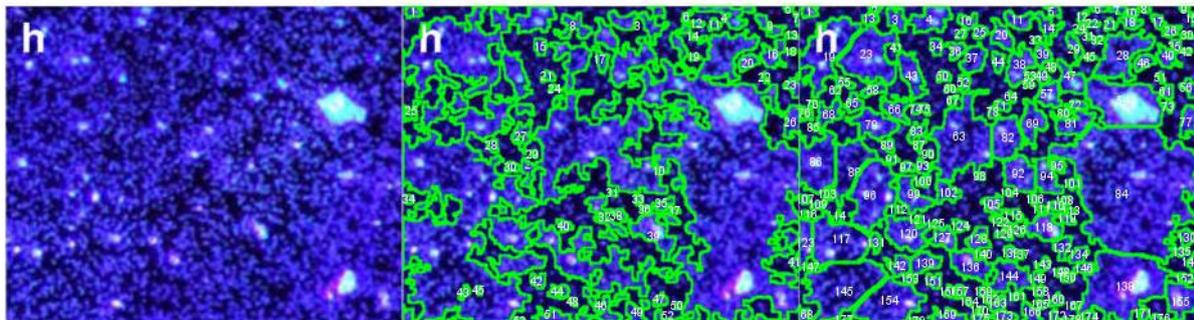


Abbildung 25: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4h; Box “white particles” aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163 µm)

Das zweifarbige Partikel ebenfalls als zusammenhängende Partikel erkannt werden, zeigt eine Bilderserie aus KÄPPLER et al. 2018 [173] (Abbildung 26). Die Übereinstimmung für die Genauigkeit liegt hier bei 100 %.

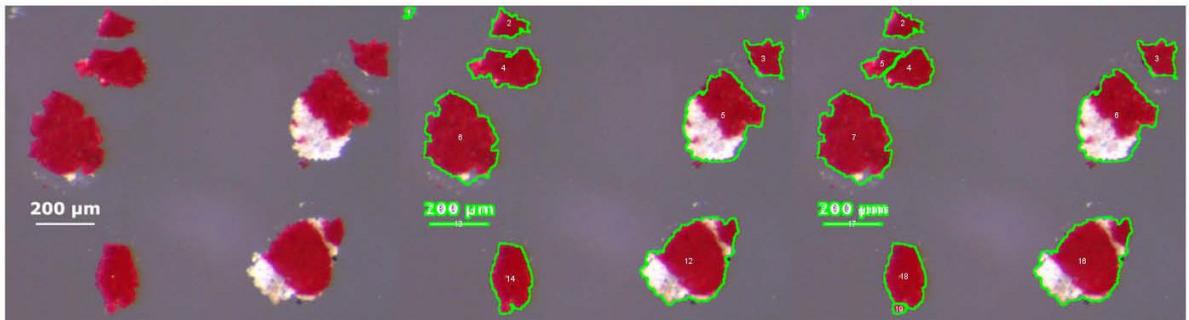


Abbildung 26: Bild aus KÄPPLER et al. 2018 [173], Figure 1c; Box “white particles” aktiv.

Tabelle 17: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 26.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	8			
OTSU	8	100	0	0
OTSU + Wasserscheide	10	100	0	2

Die Grenzen des Algorithmus werden durch Bilder aus LÖDER et al. [123] erreicht (Abbildung 27). In diesem Fall ist der Kontrast der Partikel zum Hintergrund so gering, dass der Algorithmus keine sinnvolle Unterteilung vornehmen kann. Dies führt jedoch nicht dazu, dass keine Partikel gefunden werden, sondern vielmehr zur Identifizierung einer Vielzahl von Partikeln.

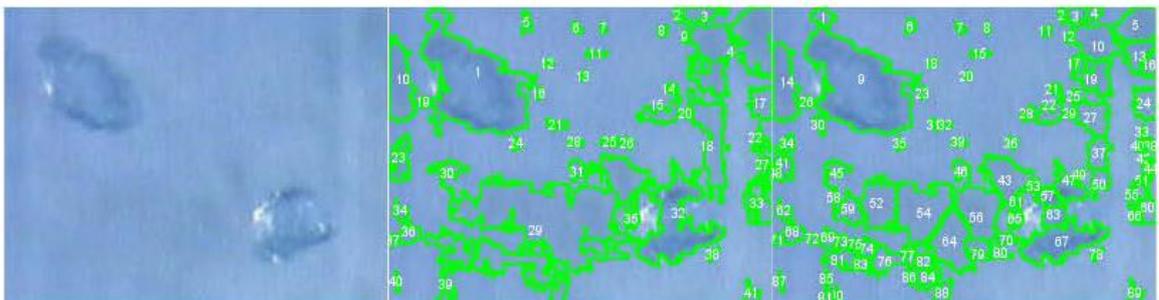


Abbildung 27: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3j; Box “white particles” inaktiv.  
(Lange Seite Einzelbild: ca. 150 µm)

Ein großes Problem stellen Bilder dar, in denen Teile eines Partikels oder ein Teil der Partikel heller und ein anderer Teil eines Partikels oder ein anderer Teil der Partikel dunkler als der Hintergrund sind (Bilderserie aus LÖDER et al. [123] Abbildung 27 und Abbildung 28). Allerdings stellt dies einen Sonderfall dar und allgemein ist es meist möglich, einen guten Kontrast zwischen Partikel und Hintergrund herzustellen.

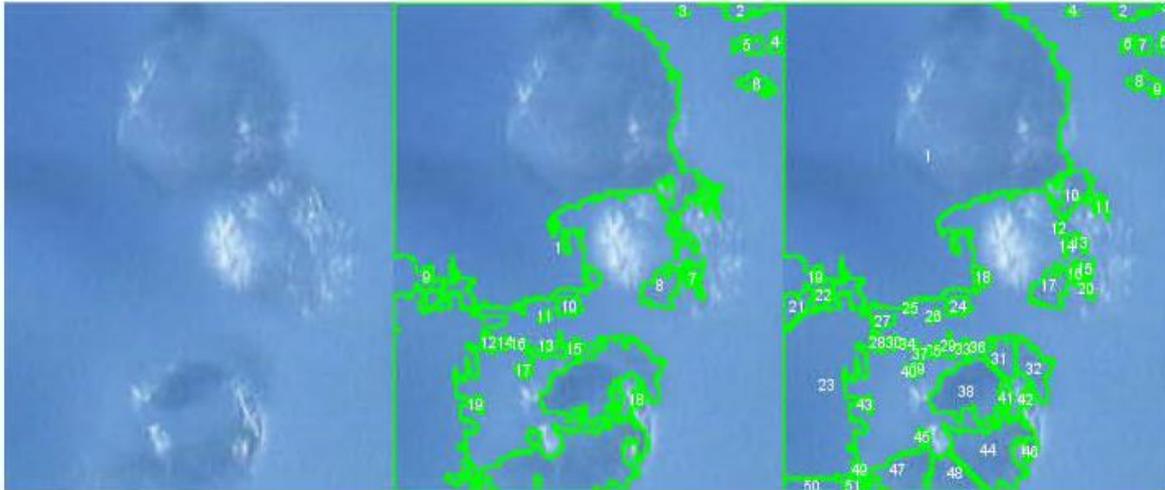


Abbildung 28: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3d; Box “white particles” inaktiv.  
(Lange Seite Einzelbild: ca. 170  $\mu\text{m}$ )

Über alle Bilder hinweg zeigt die Anwendung der Wasserscheiden-Transformation bessere oder zumindest gleich gute Ergebnisse, wie die Anwendung ohne diese Transformation. Nichtsdestotrotz ist die Anwendung dieser Transformation optional. Insbesondere für Faser-reiche Proben ist sie kontraproduktiv und führt über die Trennung der Fasern zu vielen zusätzlichen Messpunkten und einer Verschiebung der Partikelgrößenverteilung hin zu kleineren Größen. Die Bilderserie aus KÄPPLER et al. 2016 [134] (Abbildung 21 und Abbildung 29) und eines der eigenen Bilder [52] (Abbildung 30) illustrieren, wie die Wasserscheiden-Transformation Fasern und faserartige Partikel in mehrere kleine Partikel teilt.

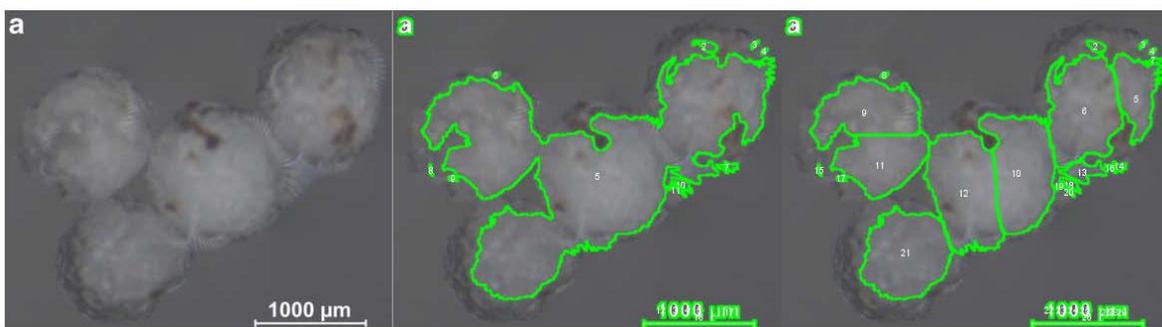


Abbildung 29: Bild aus KÄPPLER et al. 2016 [134] Figure 1a; Box “white particles” aktiv.



Abbildung 30: Beispielhaftes Bild einer PS-faser auf einem PC-Filter unter Hellfeldbeleuchtung; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: ca. 1000  $\mu\text{m}$ )

Besondere Schwierigkeiten würde daher ein hypothetischer Filter bereiten, der mit einer großen Menge von Fasern und Agglomeraten belegt wäre. Mit der Wasserscheiden-Transformation würden zwar die Agglomerate gut getrennt und es käme hier zu einer guten Übereinstimmung in der Genauigkeit der Partikelerkennung. Jedoch wäre das Ergebnis für die Fasern eine große Zahl an zusätzlichen Messpunkten. Wäre die Wasserscheiden-Transformation deaktiviert, würde das Ergebnis zwar die Zahl der Fasern gut wiedergeben, jedoch würden Agglomerate nicht getrennt. Es käme zu einer Unterschätzung der Partikelzahl und einer Verschiebung der Partikelgrößenverteilung hin zu größeren Partikeln.

Die Validierung des Algorithmus hinsichtlich Verlässlichkeit für um  $90^\circ$  gedrehte und an der vertikalen Achse gespiegelte Bilder ergab eine Übereinstimmung für fast alle untersuchten Bilder von 100 %. Einzig bei einem Bild ergab sich ein falsch positiver Treffer (Abbildung 31).

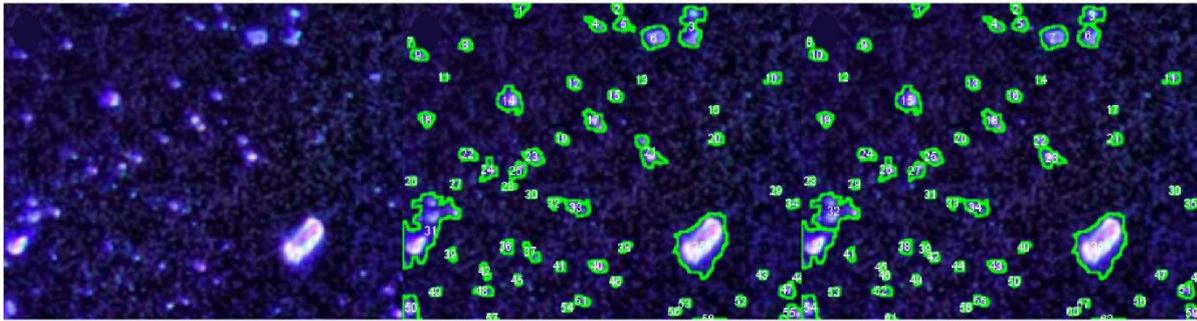


Abbildung 31: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4g; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Bild: 163  $\mu\text{m}$ )

Tabelle 18: Verlässlichkeit der Bildererkennung in Abbildung 31.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU	58			
OTSU Rotation 90°	58	100	0	0
OTSU vertikale Spiegelung	58	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU + Wasserscheide	62			
OTSU + Wasserscheide Rotation 90°	63	100	0	1
OTSU + Wasserscheide vertikale Spiegelung	63	100	0	1

Die Validierung hinsichtlich der Empfindlichkeit basiert auf der Eigenschaft von OTSU's Algorithmus, der sich den Kontrast der Partikel zum Hintergrund zunutze macht. Ist dieser Kontrast nicht hoch genug, so kann keine Trennung des Bildes in Partikel und Hintergrund erfolgen. Dies wird z.B. in der Bilderserie aus LÖDER et al. [123] (Abbildung 27 und Abbildung 28) deutlich. Der mangelhafte Kontrast in diesen Bildern könnte aber z.B. durch Dunkelfeldbeleuchtung erhöht werden.

Zusätzlich lassen sich analytisch relevante Parameter, wie die obere und untere Grenze für die Teilchengröße, sowie die minimale und maximale Belegungsdichte ermitteln. Durch die Einstellung der minimalen und maximalen Größe der Partikel sowie der Auflösung und der minimalen Pixelanzahl für einen Partikel können prinzipiell

beliebige Größen ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden die Voreinstellungen gewählt, die eine Mindest-Pixelzahl von 20, bei einer Pixelgröße von  $1\ \mu\text{m}$ , für die Erkennung eines Partikels festlegen. Dies erfüllt z.B. ein Partikel mit  $4\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  Seitenlänge. Die untere Grenze von  $1\ \mu\text{m}$  ist ohne Probleme zu erreichen, wenn Bilder mit entsprechend hoher Auflösung analysiert werden. In der Praxis muss jedoch die nötige Zeit beachtet werden, die für die Aufnahme eines Bildes mit dieser hohen Auflösung benötigt wird (siehe Kap. 5.6).

Für die Ermittlung der Belegungsdichte gilt die Annahme, dass alle Partikel sich vom Hintergrund unterscheiden und unter der gewählten Auflösung mindestens die minimale Pixelzahl erreichen. Die minimale Belegungsdichte ist damit ein Partikel. Die maximale Belegungsdichte kann für verschiedene Partikelgrößen abgeschätzt werden. Ein Filter mit 50 mm Durchmesser besitzt eine Fläche von ca.  $1960\ \text{mm}^2$ . Die maximale Belegungsdichte wird durch eine Monolage an Partikeln, die sich nur berühren, aber nicht überlappen, erreicht. Um diese Fläche für sphärische Partikel mit  $1\ \mu\text{m}$  Durchmesser zu berechnen, wird die Fläche eines Partikels durch ein Quadrat mit  $1\ \mu\text{m}$  genähert, wie in Abbildung 32 gezeigt ist. Hierdurch wird der Raum zwischen den Partikeln, der nicht belegt ist, aber auch nicht belegt werden kann, mitberücksichtigt. Es ergibt sich eine maximale Anzahl von  $1,96 \times 10^9$  Partikeln und eine maximale Belegungsdichte von  $1\ \text{Partikel} / \mu\text{m}^2$ . Für eine durchschnittliche Partikelgröße von  $50\ \mu\text{m}$  ergibt sich eine Belegung mit ca. 785000 Partikeln und einer Belegungsdichte von  $0,0004\ \text{Partikeln} / \mu\text{m}^2$  bzw.  $1\ \text{Partikel} / 2500\ \mu\text{m}^2$ . In der Praxis wird die maximale Belegung niedriger ausfallen, da reale Partikel verschiedene Formen besitzen und auch übereinander zu liegen kommen können (Kapitel 5.6).

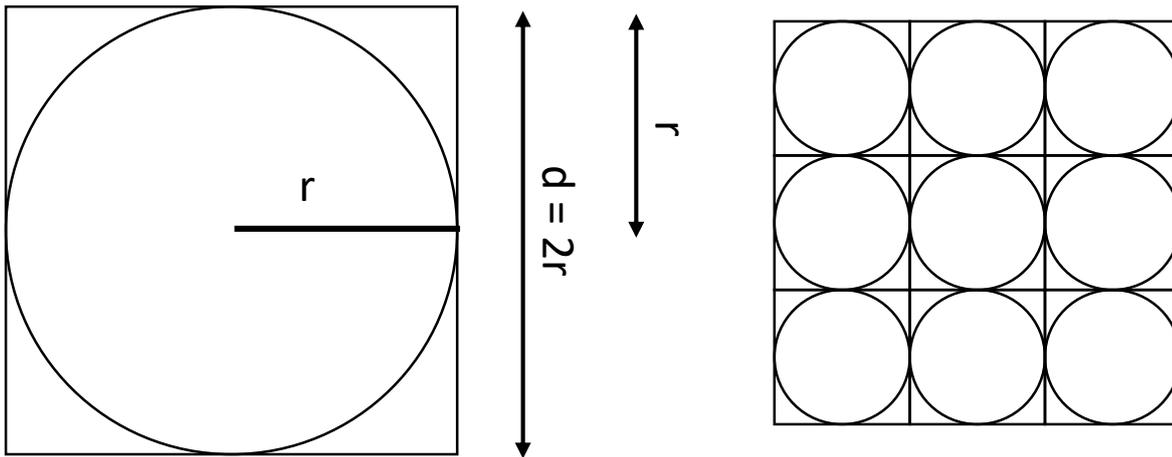


Abbildung 32: Berechnung der Fläche, die durch sphärische, einander berührende Partikel belegt wird. Der Raum zwischen den Kugeln wird durch Berechnung der Fläche eines Quadrats mit Seitenlänge  $d$ , die dem doppelten Radius  $r$  der Kugel entspricht, ermittelt.

### 5.5. Repräsentativität der Messung

Die Ergebnisse in diesem Kapitel wurden bereits veröffentlicht [8]. Mit Formel 6 auf Seite 44 sind für einen theoretischen Filter mit  $N = 10^6$  Partikeln,  $\sigma = 1,65$  (90 % Vertrauensintervall [168]), einem toleriertem Fehler  $e = 10\%$  und variablem angenommenen MP-Anteil, die in Tabelle 19 gezeigten zu messenden Partikel  $n$  berechnet.

Tabelle 19: Zahl zu messender Partikel  $n$  für einen Filter mit  $N = 10^6$ ,  $\sigma = 1,65$  (90 %) und einem toleriertem Fehler  $e = 10\%$ .

Variable	$P = 5\% \text{ MP}$	$P = 0,5\% \text{ MP}$	$P = 0,05\% \text{ MP}$
$e^*$	0,005	0,0005	0,00005
$n \geq$	5147	51394	352428

\* $e$  ist immer 10 % des MP-Anteils  $P$ . Das bedeutet, dass die angegebene Dezimalzahl mit abnehmenden MP-Anteil  $P$  ebenfalls abnimmt.

Die Zahl der zu messenden Partikel  $n$  ist für einen MP-Anteil von 5 % 5147. Für abnehmende MP-Anteile nimmt logischerweise auch  $n$  ab, jedoch nicht linear. Bei einem linearen Zusammenhang wären für  $P = 0,05\%$  514700 zu messende Partikel zu erwarten. Allerdings sind nur 352428 Partikel zu messen. Dies ist auch in Tabelle 20 zu sehen, in der  $e$  für dieselben  $P$  variiert wurde.

Tabelle 20: Zahl zu messender Partikel  $n$  für einen Filter mit  $N = 10^6$ ,  $\sigma = 1,65$  (90 %) und einem toleriertem Fehler  $e = 10$  %.

Variable	$P = 5$ % MP	$P = 0,5$ % MP	$P = 0,05$ % MP
$E$	0,01 (20 %)	0,0015 (30 %)	0,00015 (30 %)
$n \geq$	1292	5984	57022

Die deutliche Zunahme von  $n$  für geringere MP-Anteile  $P$  zeigt wie wichtig eine gute Anreicherung der MP-Partikel in der Probe ist. Da die Zunahme nicht linear ist, zeigt dieses Ergebnis aber auch, dass es auch bei sehr geringem  $P$  nicht notwendig ist, alle Partikel der Filterprobe zu messen. In Abbildung 33 ist dieser Zusammenhang grafisch aufgezeigt. Hier ist gut zu erkennen, dass der Zugewinn an Güte des Ergebnisses, ausgedrückt durch den Fehler  $e$ , mit zunehmender gemessener Partikelzahl immer geringer wird. Dies impliziert ein Optimum zwischen statistischer Aussagekraft des ermittelten MP-Anteils und der Messzeit.

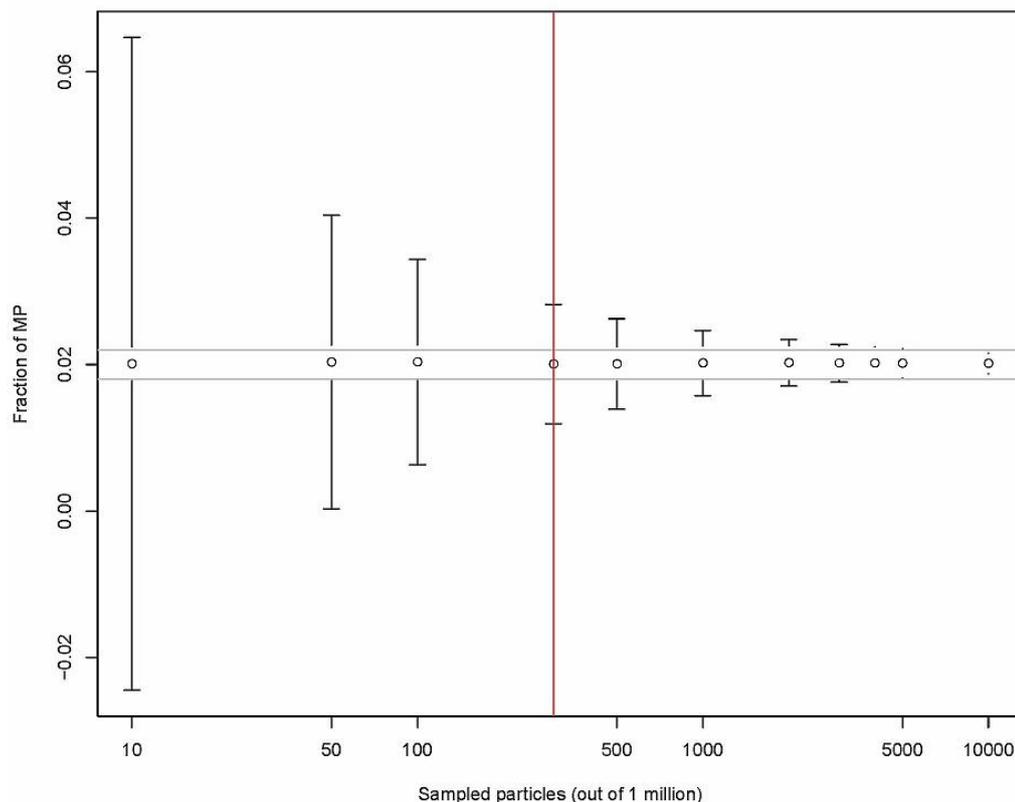


Abbildung 33: Zusammenhang zwischen  $n$  und  $e$  für einen Filter mit  $N = 10^6$  Partikeln und  $P = 2$  %. Der tolerierte Fehler  $e = 10$  % ist durch die zwei grauen vertikalen Linien dargestellt. Die rote Linie stellt  $n$  einer früheren Studie dar [1]. Der gewünschte Fehler  $e$  wird bei  $n = 13000$  erreicht. Entnommen aus ANGER und VON DER ESCH et al. [8].

## 5.6. Anwendung in der Analyse der BMBF Vergleichsversuchs-Proben

Nach der Elb-Schwimmstaffel wurden im Rahmen des BMBF-Projektes MiWa erneut Vergleichsversuche durchgeführt. Hierzu wurden von der TU Berlin (Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL) 3 Sediment-Proben (Sand) mit unterschiedlichen Gehalten an MP hergestellt. Um eine gleichmäßige Beladung der Sedimente zu erreichen, wurden Stammsuspensionen der verschiedenen Polymertypen hergestellt. Die Suspensionen wurden vor der Zugabe geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung in der Probe zu erreichen. Die getrockneten Sedimente wurden in Enghals-Standflaschen an die Projektpartner gesendet.

Die Probenaufbereitung fand in einer *laminar flow box* (Reinraumklasse ISO 5 nach ISO 14644-1) statt. Alle Glasgeräte wurden vor ihrem Einsatz mit einer 0,01 % Novachem SF 100 (Postnova Analytics GmbH, DE) –Lösung im Ultraschallbad gereinigt und mit fusselfreien Tüchern (Thorlabs GmbH, DE) getrocknet und zusätzlich noch einmal ebenfalls mit fusselfreien Tüchern trocken abgewischt. Die Probe wurde mit partikelfreiem Wasser (Milli-Q Reference, Merck KGaA, DE) aus der Enghals-Standflasche gespült. Mithilfe einer Weißlicht-Taschenlampe (Fa. Nitecore, CU6, Cree CP-G2 LED mit 440 lm, SYSMAX Innovations Co. Ltd., CN) wurde die Enghals-Standflasche auf noch nicht ausgespülte Partikel geprüft. Über ein 500- $\mu$ m-Sieb (Retsch GmbH, DE) konnte der Sand und damit annähernd die gesamte Matrix entfernt werden. Die MP-Partikel (und Reste der Matrix) wurden über eine Filtrationsapparatur für Filter mit 25 mm Durchmesser (Glas-Vakuumfiltrationsgefäß, 25mm, 30 mL, mit Glasfritte, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, DE) auf einem PC-Filter mit Goldbeschichtung (25 mm, Analytische Produktions-, Steuerungs- und Controllgeräte GmbH, DE) gesammelt. Der Filter wurde in der *laminar flow box* getrocknet und auf einen kleinen massiven Filterhalter gespannt.

Von dem Filter wurde mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung ein Bild unter Dunkelfeldbeleuchtung aufgenommen. Das Bild hatte eine Auflösung von 1  $\mu$ m / px und wurde mit den Voreinstellungen der Partikelerkennung analysiert. Es wurden zwischen  $2 \times 10^4$  und  $10 \times 10^4$  Partikel auf den 3 Filtern gefunden. Es wurde ein Fehler von 20 % toleriert und ein MP-Anteil von 5 % angenommen. Pro Filter ergab dies eine Zahl von ca. 1200 Partikel, die analysiert wurden. Dies stellt eine weitere Steigerung

der analysierten Partikelzahl dar (Elb-Schwimmstaffel: ca. 900 Partikel, IMHOF et al. [1]: ca. 300 Partikel).

Die Spektren wurden an einem *alpha300R* (WITec GmbH, DE) RAMAN-Mikroskop mit einem Laser mit 532 nm Wellenlänge, 2,5 mW Laserleistung und einem Objektiv mit 20× Vergrößerung aufgenommen. Die im Vergleich zur Elb-Schwimmstaffel niedrigere Laserleistung wurde gewählt, da es bei 5 mW in einigen Fällen zur teilweisen Zerstörung des Filtermaterials kam. Es wurde eine Messzeit von 20 s (2×10 s) gewählt. Die im Vergleich zur Elb-Schwimmstaffel um 5 s kürzere Messzeit wurde gewählt, da auch Spektren mit der kürzeren Messzeit ein ausreichendes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zeigten. Außerdem werden bei ca. 1200 Partikeln 100 min Messzeit pro Filter gespart. Der gesamte zu messende spektrale Bereich von 200 cm<sup>-1</sup> bis 3200 cm<sup>-1</sup> wurde unter Einsatz eines Gitters mit 600 l/mm in einem Fenster aufgenommen. Die RAMAN-Spektren wurden schließlich vom Experimentator ausgewertet.

Das Ergebnis für Probe A, die die meisten MP-Partikel der drei versendeten Proben enthalten sollte, zeigt Tabelle 21.

Tabelle 21: Ergebnisse der MiWa-Vergleichsproben – Probe A.

	n	Hochrechnung (×120)	Mittelwert / μm (maxFeret)	Max / μm (maxFeret)	Min / μm (maxFeret)
Fluoreszenz	679	81480	18,4 ± 15,4	168,2	6,3
Andere	159	19080	25,3 ± 23,9	145,2	6,7
PA	11	1320	19,7 ± 10,9	45,5	9,8
PC (Filter)*	396	47520	16,0 ± 11,6	89,5	5,8
PS	14	1680	46,6 ± 46,3	182,1	8,6
PSPA	1	120	51,1 ± NA	51,1	51,1
uPolymer†	17	2040	30,5 ± 31,6	111,1	6,3
Summe	1277	153240		182,1	6,3

\*PC (Filter): PC-Spektrum, das aber vom Filter stammt.

†uPolymer: Spektrum eines unbekanntes Polymers, das keinem der Massenpolymere (PE, PP, PA, PVC, PS oder PET) zugeordnet werden kann.

Die maximale Belegung wurde in Kapitel 5.4 für Filter mit 50 mm Durchmesser und Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 50 μm zu 785000 Partikeln

und einer Belegungsdichte von 0,0004 Partikeln /  $\mu\text{m}^2$  bzw. 1 Partikel /  $2500 \mu\text{m}^2$  berechnet. Die in dieser Vergleichsprobe untersuchten Filter (Durchmesser 25 mm) hatten eine maximale Belegung mit  $1 \times 10^5$  Partikeln und damit eine Belegungsdichte von 0,0002 Partikeln /  $\mu\text{m}^2$  bzw. 1 Partikel /  $5000 \mu\text{m}^2$ . Der kleinste gefundene Partikel besitzt einen Durchmesser von  $6,3 \mu\text{m}$ . Dies entspricht der Erwartung bei der Aufnahme eines Bildes mit einer Auflösung von  $1 \mu\text{m} / \text{px}$  und stellt damit die untere Grenze der Partikelgröße dar, die mit einer Laserwellenlänge von 532 nm und einem Objektiv mit  $20\times$  Vergrößerung noch detektiert werden kann. Ein höher aufgelöstes Bild war zum Zeitpunkt der Messung zeitlich nicht realisierbar. Die in Probe A enthaltenen Polymertypen (PA und PS) wurden beide gefunden. Jedoch wurden nur 1320 (PA) bzw. 1680 (PS) von den, nach Aussage der TU Berlin, vorhandenen 750000 Partikeln ermittelt. Die Unterbestimmung kann mit Verlusten während der Probenerstellung (Inhomogenitäten in der Stammsuspension, Verluste an Pipettenspitzen), der Probenaufbereitung (Partikelanhaftungen an Glasoberflächen) und einer zu geringen Anzahl an gemessenen Partikeln, begründet werden.

Um den letzten Punkt zu überprüfen, kann Formel 6 von Seite 44 nach dem Fehler  $e$  umgestellt werden, um Formel 8 zu erhalten.

$$e = \sqrt{\left(\frac{P(1-P)}{n} - \frac{P(1-P)}{N}\right) \cdot \sigma^2} \quad \text{Formel 8}$$

Durch Einsetzen von  $n = 1277$  Partikel,  $N = 153240$  Partikel,  $\sigma = 1,65$  (90 % Vertrauensintervall) und  $P = 26/1277 = 2 \%$  ( $11 \times \text{PA}$ ,  $14 \times \text{PS}$  und  $1 \times \text{PSPA}$ ) ergibt sich ein Fehler von 32,2 %. Ein Fehler von ca. 30 % kann eine Unterbestimmung um zwei Größenordnung jedoch nur zum Teil erklären. Da mithilfe von Formel 8 der Fehler nach der Messung ermittelt werden kann, ist es naheliegend die verfügbare Messzeit für jede Probe komplett auszunutzen. Mit der im Moment am IWC-TUM entwickelten Methode ist es möglich innerhalb von zwei Arbeitstagen 7000 Partikeln zu messen. Durch Einsetzen von  $n = 7000$  Partikel,  $N = 10^6$  bzw.  $10^5$  bzw.  $10^4$  Partikel,  $\sigma = 1,65$  (90 % Vertrauensintervall) und abgestuften Gehalten an MP  $P = 5 \%$ ,  $1 \%$ ,  $0,5 \%$  und  $0,05 \%$  werden die Fehler  $e$  in Tabelle 22 erhalten.

Tabelle 22: Berechnete Fehler  $e$  für einen hypothetischen Filter mit  $N = 10^6$  bzw.  $10^5$  bzw.  $10^4$  Partikeln,  $n = 7000$  Partikeln und  $\sigma = 1,65$ .

Variablen	$P = 5 \% \text{ MP}$	$P = 1 \% \text{ MP}$	$P = 0,5 \% \text{ MP}$	$P = 0,05 \% \text{ MP}$
$e$ in % ( $N = 10^6$ )	8,6	19,6	27,7	87,9
$e$ in % ( $N = 10^5$ )	8,3	18,9	26,8	85,0
$e$ in % ( $N = 10^4$ )	4,7	10,8	15,2	48,3

Erwartungsgemäß werden für sehr niedrige MP-Gehalte und hohe Teilchenzahlen im Vergleich zur analysierten Zahl an Partikeln große Fehler erhalten. Interessant ist jedoch, dass sich der Fehler für  $10^5$  Partikel und  $10^6$  Partikel für gleiche MP-Gehalte kaum unterscheidet. Der Fehler wird maßgeblich vom MP-Gehalt der Probe bestimmt. Dies bedeutet, dass die Probenvorbereitung nur das Verhältnis zwischen MP und Nicht-MP in Richtung MP verschieben muss. Es ist weniger effektiv die Zahl der Partikel insgesamt zu verringern. Es erscheint damit zunächst einmal sinnvoll größere Filter zu nutzen. Da aber der Zeitaufwand für die Aufnahme des Mikroskopbildes ungefähr quadratisch mit der Seitenlänge des Bildes zunimmt (doppelte Seitenlänge = vierfache Aufnahmezeit), würde dies die Zahl an messbaren Partikeln im Zeitfenster von 2 Tagen deutlich reduzieren.

Es sind daher weiterhin Filter mit 25 mm Durchmesser zu empfehlen. Diese sollten möglichst mit der theoretisch zu erreichenden Belegungsdichte belegt werden. Für Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von  $50 \mu\text{m}$  wäre dies 1 Partikel /  $2500 \mu\text{m}^2$ , was ca.  $2 \times 10^5$  Partikeln entspricht. Auf den hier getesteten Proben wurden  $1,5 \times 10^5$  Partikel gefunden. Diese Zahl stellt jedoch eine Unterschätzung dar, da nach Aussage der TU Berlin auch Partikel kleiner als die kleinste gefundene Partikelgröße von  $6,3 \mu\text{m}$  enthalten sein sollten. Damit würde sich die experimentelle Zahl der Partikel, der theoretischen Zahl noch weiter annähern. Dies zeigte sich rückblickend auch schon in der Elb-Schwimmstaffel, bei der eine Belegungsdichte von 1 Partikel /  $1960 \mu\text{m}^2$  ermittelt wurde.

Die Rohdaten zu diesem Kapitel sind über ein Repository auf gitlab einsehbar. Der Zugang hierzu wird auf Anfrage über [p.anger@tum.de](mailto:p.anger@tum.de) freigeschalten.

## 5.7. Vergleich der Mikroplastik-Analytik 2016 und 2019 und anwendbare Arbeitsvorschrift

Der hier gezeigte Vergleich der MP-Analytik in 2016 zu 2019 ist zum Teil auch im Abschlussbericht des BMBF-Vorhabens „Mikroplastik im Wasserkreislauf“ (MiWa) enthalten. Der Stand der Analytik in 2019 repräsentiert gleichzeitig auch eine Empfehlung bzw, anwendbare Arbeitsvorschrift zur MP-Analytik mittels RM (Tabelle 23).

In allen Aspekten der MP-Analytik mittels RM wurden erhebliche Fortschritte erzielt, angefangen bei der Fläche des Filters, die analysiert werden kann, über den Grad der Automatisierung bis hin zur Kontaminationskontrolle. Konnten anfangs nur bestimmte Bereiche und nur 1,6 % der Filterfläche analysiert werden, ist es mittlerweile möglich, die gesamte Filterfläche mikroskopisch zu erfassen und so Inhomogenitäten in der Partikelverteilung, die es zweifelsohne auf jedem Filter gibt, zu egalisieren. Die Zahl der möglichen zu analysierenden Partikel ist bei gleicher Messzeit um mehr als das 23-fache gesteigert worden (von ca. 300 Partikel auf 7000 Partikel). Sehr wichtig ist vor allem, dass das erhaltene Ergebnis nun mit einer statistischen Aussage behaftet werden kann. Dies ist von immenser Wichtigkeit für jeden experimentell ermittelten Wert und stellt damit den wohl größten Fortschritt innerhalb der letzten drei Jahre dar. Nicht zu vergessen sind aber auch die vielen kleinen Verbesserungen im Bereich der Kontaminationskontrolle. Insbesondere der aus der Raumfahrtproduktsicherung adaptierte Einsatz von UV/Weißlicht zur schnelle Vorprüfung auf Oberflächenkontaminationen oder dem für die Analyse mit RM optimierten *Tape Lift Screening* verbessern die Probenvorbereitung für die MP-Analytik enorm.

Tabelle 23: Vergleich der MP-Analytik in 2016 [1] mit dem Stand der Technik 2019 (anwendbare Arbeitsvorschrift).

	IMHOF et al. 2016 [1]	Analyseschema 2019
Spezifikationen der RM-Analyse		
Analysierte Fläche/Partikel	5 Bereiche, unterteilt in 9 Unterbereiche, 1,6 % der	Partikel auf dem gesamten Filter können gefunden und ausgewählt werden

	Filterfläche (47 mm Durchmesser)	
RM-Messung	Manuell	Automatisch durch RAMAN-System
Partikel-Erkennung	Manuell	Automatisch durch Software basierend auf OTSU's Algorithmus
Partikelauswahl	Manuell	Automatisch durch Algorithmus*
Partikelanzahl	Ca. 300 Partikel pro Filter	7000 Partikel pro Filter
Benötigte Zeit	2 Arbeitstage für Experimentator	2 Arbeitstage für das RAMAN-System und wenige Stunden für den Experimentator
Statistik	-	Abschätzung des Fehlers aus der einfachen Messung pro Filter
RM-Messung		
Filtermaterial	Quarzfaser	PC mit Goldbeschichtung
Fixierung des Filters	Gelegt	Filterhalter
Beleuchtung	Hellfeld	Dunkelfeld
Laserwellenlänge / nm	633	532
Laserleistung / mW	-	2,5
Messzeit	0,5 s – 500 s	20 s (2×10 s)
Spektraler Bereich	Mind. 200 cm <sup>-1</sup> – 3200 cm <sup>-1</sup>	Mind. 200 cm <sup>-1</sup> – 3200 cm <sup>-1</sup> (z.B. Gitter: 600 l/mm)
Min. Partikelgröße	-	Ca. 5 µm für Filter mit 25 mm Durchmesser; kleiner technisch möglich, aber nur unter hohem Zeitaufwand oder für deutlich kleinere Flächen
Max. Partikelgröße	-	> 1000 µm

Min. Belegungs- dichte	-	1 Partikel, unter den Bedingungen aus Kap. 5.4
Max. Belegungs- dichte	-	Theorie: 0,0004 Partikeln / $\mu\text{m}^2$ bis 1 Partikel / $\mu\text{m}^2$ Praxis: 0,0002 Partikeln / $\mu\text{m}^2$ bis 0,0005 Partikeln / $\mu\text{m}^2$ †

#### Vermeidung von Kontaminationen

Kleidung	Baumwollkittel	Baumwollkittel
Benötigte Flüssigkeiten	Filtration über 0,2 $\mu\text{m}$ PC- Filter	Filtration über 0,2 $\mu\text{m}$ Spritzenfilter
Blind-Probe		Prozess-Blindfilter
Labor		<i>laminar flow box</i> (Reinraumklasse ISO 5 nach ISO 14644-1)
Glasequipment		Gereinigt mit 0,01 % Novachem SF 100 (Postnova Analytics GmbH, DE) –Lösung im Ultraschallbad
		Abschlussreinigung mit fusselfreien Tüchern (Thorlabs GmbH, DE)
		Kontrolle mit Weißlicht-Lampe im Streiflicht (z.B. Fa. Nitecore, CU6, Cree CP-G2 LED mit 440 lm, SYSMAX Innovations Co. Ltd., CN)
		Optionale Kontrolle mit <i>Tape Lift Screening</i>

\*Die automatische Auswahl der Partikel ist nicht in dieser Arbeit gezeigt, sondern bezieht sich auf die Publikation VON DER ESCH und KOHLES et al., die auch die Ergebnisse des in dieser Arbeit gezeigten Filterhalters enthält.

†Die theoretischen Werte beziehen sich auf Berechnungen mit sphärischen Partikeln mit einem Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$  (0,0004 Partikel /  $\mu\text{m}^2$ ) bzw. 1  $\mu\text{m}$  (1 Partikel /  $1 \mu\text{m}^2$ ). Die Werte aus der Praxis stammen für 0,0002 Partikel /  $\mu\text{m}^2$  aus dem MiWa-Vergleichsversuch und 0,0005 Partikel /  $\mu\text{m}^2$  aus der Elb-Schwimmstaffel.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Ausgehend von der MP-Analytik mittels RM nach IMHOF et al. [1] in 2016 wurden in der vorliegenden Arbeit die verschiedensten Aspekte der MP-Analytik mittels RM bearbeitet: Angefangen bei der Optimierung von grundlegenden Parameter der Messung, über das *Tape Lift Screening* als Methode zur Kontaminationskontrolle, hin zu einer objektiven und schnellen Möglichkeit zur Partikelerkennung und schließlich eine statistische Methode zur Ermittlung der minimal zu messenden Partikelzahl bzw. der Bewertung des erhaltenen MP-Gehalts.

Die Optimierung verschiedenster RAMAN-mikroskopischer Parameter ergab Empfehlungen zur Laserwellenlänge von 532 nm oder 633 nm. Weiter sollten Laserleistungen zwischen 0,4 mW (633 nm) und 10,8 mW (532 nm) an der Probe angewendet werden. Höhere Laserleistungen ermöglichen ein besseres Signal-zu-Rauschen-Verhältnis und damit bei gleicher Messzeit eine bessere Interpretation der erhaltenen RAMAN-Spektren, bzw. bei gleichbleibendem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis eine kürzere Messzeit. Abhängig von der Partikelgröße und dem Anteil des absorbierten Laserlichtes kann es jedoch bei Laserleistungen oberhalb der empfohlenen Werte zur thermischen Zerstörung der Probe kommen. Für PC-Filter mit Goldbeschichtung führte bereits eine Laserleistung von 5 mW (532 nm) zur Zerstörung der Filterstruktur. Für diesen Filter kann eine Laserleistung von 2,5 mW empfohlen werden. Andere Filtertypen sind widerstandsfähiger (z.B. Si-Filter) und die tolerable Laserleistung hängt mehr von den Partikeleigenschaften ab. Niedrigere Laserleistungen schonen zwar die Probe, führen aber zu einer Erhöhung der Messzeit oder einem schlechterem S/R und damit einer schwierigeren Interpretation der RAMAN-Spektren. Die Wahl des Objektivs erscheint bei einem Blick in die Literatur sehr eingeschränkt. Zu großen Teilen werden 20× oder 50× LWD Objektive eingesetzt. Diese beiden Objektive erfüllen die Bedingungen einer möglichst hohen numerischen Apertur bei gleichzeitig hohem Arbeitsabstand. Für die in dieser Arbeit ermittelte Arbeitsvorschrift wird ein 20× Objektiv empfohlen, das es mit dem in dieser Arbeit eingesetzten *alpha300R* (WITec GmbH, DE) Raman-Mikroskop die Aufnahme eines 25 mm Filters in vertretbarer Zeit ermöglicht. Die spektrale Breite, die notwendig ist, um ein vollständiges Spektrum abzubilden, beträgt  $3000\text{ cm}^{-1}$  und erstreckt sich von

200 cm<sup>-1</sup> bis 3200 cm<sup>-1</sup>. In diesem Bereich befinden sich alle wichtigen Banden, der sogenannte *fingerprint*-Bereich von 200 cm<sup>-1</sup> bis 1500 cm<sup>-1</sup>, sowie die C-H-Streckschwingungen von Alkyl-, Alken- und Arylgruppen bei 2800 cm<sup>-1</sup> bis 3200 cm<sup>-1</sup>. Um den genannten spektralen Bereich möglichst ohne Verschieben des optischen Gitters auf der CCD-Kamera abbilden zu können, ist es sinnvoll ein Gitter mit möglichst geringer Linienzahl, z.B. 300 Linien/mm oder 600 Linien/mm, zu wählen. Für das *alpha300R* (WITec GmbH, DE) RAMAN-Mikroskop kann ein Gitter mit 600 Linien/mm eingesetzt werden. Die hierbei erhaltene schlechtere spektrale Auflösung ist meist noch ausreichend, um eine Interpretation der RAMAN-Spektren zu ermöglichen. Die zu wählende Messzeit ist ebenso wie die einzusetzende Laserleistung schwer alleine aus theoretischen Überlegungen abzuleiten. In der Literatur zu MP sind Messzeiten zwischen 0,5 s und 500 s zu finden. Eine Empfehlung, basierend auf eigenen Erfahrungen schränkt diesen weiten Bereich noch auf 10 s – 30 s ein. Diese Zeitspanne ist ein Kompromiss zwischen Geschwindigkeit der Messung und Auswertbarkeit der RAMAN-Spektren. Als Empfehlung aus den BMBF-Vergleichsproben sei 20 s (2×10 s) genannt.

Zur besseren Analyse der erhaltenen Filterproben wurde ein geeigneter Filterhalter gefertigt. Bedingt durch die Konfokalität des RAMAN-Mikroskops ist davon auszugehen, dass nur innerhalb eines z-Achsen-Abschnitts von ca. 22 µm – 48 µm RAMAN-Signale der MP-Partikel erzeugt werden können. In diesem Bereich muss sich daher auch die Rauigkeit, die in dieser Arbeit mit dem maximalen Peak-Peak-Abstand eines Höhenprofils des Filters bestimmt wurde, befinden. Es wurden zwei Arten von Filterhaltern in jeweils zwei Größen entwickelt: ein massiver Filterhalter und ein Filterhalter mit Aussparung in der Mitte. Letztere hat den Vorteil, dass beispielsweise Beleuchtung von unterhalb der Probe möglich ist. Die größeren der Filterhalter wurden für Filter mit einem Durchmesser von 47 mm – 50 mm konstruiert. Sie besitzen für saubere PC-Filter mit Goldbeschichtung Peak-Peak-Abstände von  $31,2 \pm 7,8$  µm (massiv) und  $24,0 \pm 1,1$  µm (mit Aussparung). Im Vergleich dazu besitzen die gleichen Filter einen Peak-Peak-Abstand von  $589,2 \pm 2,4$  µm, wenn sie auf einen Glasträger geklebt werden und einen Peak-Peak-Abstand von  $99,2 \pm 2,6$  µm, wenn sie auf einen Glasträger gelegt werden. Wird ein Filter mit artifizieller Matrix beladen und diese wieder abgewaschen, um den Filter anschließend im Filterhalter einzuspannen, bleibt der Peak-Peak-Abstand für den Filterhalter mit Aussparung vergleichbar niedrig mit

$34,8 \pm 5,0 \mu\text{m}$ . Wird dieser Filter auf einen Glasträger geklebt, ergibt sich ein Peak-Peak-Abstand von  $466,3 \pm 1,7 \mu\text{m}$  und ein Peak-Peak-Abstand von  $871,4 \pm 3,0 \mu\text{m}$ , wenn dieser Filter auf einen Glasträger gelegt wird. Der größere Filterhalter ermöglicht somit eine um Größenordnungen bessere Fixierung, als durch Kleben oder Legen auf einen Glasträger möglich ist. Außerdem ist der Peak-Peak-Abstand ausreichend, um der konfokalen Messanordnung des RAMAN-Mikroskops gerecht zu werden.

Der kleinere Filterhalter wurde für Filter mit ca. 25 mm Durchmesser konstruiert. Auch dieser zeigt für saubere PC-Filter mit Goldbeschichtung sehr niedrige Peak-Peak-Abstände mit  $5,8 \pm 2,1 \mu\text{m}$  (massiv) und  $10,4 \pm 2,3 \mu\text{m}$  (mit Aussparung). Werden die gleichen Filter auf einen Glasträger gelegt, erreichen sie nur einen Peak-Peak-Abstand von  $63,1 \pm 11,8 \mu\text{m}$  und auf einen Glasträger geklebt sogar nur  $121,4 \pm 2,5 \mu\text{m}$ . Somit ist auch der kleine Filterhalter den alternativen Fixierungsmethoden deutlich überlegen und zeigt die notwendig niedrigen Peak-Peak-Abstände für die RM-Analyse.

Das für diese Arbeit genutzte *alpha300R* (WITec GmbH, DE) RAMAN-Mikroskop besitzt für die Beleuchtung des Mikroskop-Bildes Hellfeld, Dunkelfeld, sowie Fluoreszenzanregung in zwei Wellenlängenbereichen (Fs 592/24: Anregung – 592 nm mit einer Breite von 24 nm, Emission – 675 nm mit einer Breite von 100 nm; Fs 470/40: Anregung – 470 nm mit einer Breite von 40 nm, Emission – 525 nm mit einer Breite von 5 nm). Um für die MP-Analytik in diesem System die optimale Beleuchtung zu finden, wurden von zwölf verschiedenen Polymertypen auf sechs verschiedenen Filtermaterialien mit zwei verschiedenen Objektiven mikroskopische Aufnahmen angefertigt und diese mit der in dieser Arbeit gezeigten Partikelerkennung analysiert. Basierend auf der Übereinstimmung zwischen gefundenen Partikeln des Algorithmus und der tatsächlich vorhandenen Zahl an Partikeln wurde ein Punktesystem zur Bewertung der vier verschiedenen Beleuchtungsoptionen aufgestellt. Als beste Möglichkeit hat sich die Beleuchtung im Dunkelfeld, gefolgt von Hellfeld-Beleuchtung, insbesondere auf PC-Filtern mit Goldbeschichtung und Silicium-Filtern erwiesen. Diese zwei Filtermaterialien zeigten, zusammen mit dem PC-Filter, auch die niedrigsten Peak-Peak-Abstände im Vergleich der unterschiedlichen Filtermaterialien miteinander.

Der getestete Silicium-Filter mit einem Durchmesser von ca. 47 mm erreichte einen Peak-Peak-Abstand von  $32,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$  und ist damit vergleichbar flach wie der PC-Filter mit Goldbeschichtung im Filterhalter mit Aussparung ( $24,0 \pm 1,1 \mu\text{m}$ ). Der getestete PC-Filter mit 47 mm Durchmesser erreichte nur einen Peak-Peak-Abstand von  $115,4 \pm 7,5 \mu\text{m}$ , der Nitrocellulose-Filter mit 47 mm Durchmesser gar nur  $338,2 \pm 11,4 \mu\text{m}$ . Beide waren im größeren Filterhalter mit Aussparung eingespannt. Für Filter mit 25 mm Durchmesser erreichte der PC-Filter mit Goldbeschichtung  $10,4 \pm 2,3 \mu\text{m}$  im Filterhalter mit Aussparung. Der ebenfalls im Filterhalter mit Aussparung getestete PC-Filter mit 25 mm Durchmesser erreichte mit  $5,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$  sogar einen niedrigeren Wert. Die gleichermaßen getesteten PES- ( $89,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) und PTFE-Filter ( $241,7 \pm 2,6 \mu\text{m}$ ) erreichten nicht annähernd diese niedrigen Peak-Peak-Abstände. Geeignete Filtermaterialien sind nach den Experimenten zu Beleuchtungsmodi und Filterrauigkeit PC-Filter mit Goldbeschichtung und Silicium-Filter unter Dunkelfeld-Beleuchtung.

Die optimierten Parameter, sowie der entwickelte Filterhalter wurden erstmals in der vom BMBF veranstalteten Elb-Schwimmstaffel eingesetzt. Hierbei wurden Schwebstoffe aus der Elbe filtriert und ohne Abtrennung der festen Matrix analysiert. Auf 3 Filtern wurden insgesamt ca. 2700 Partikel RAMAN-mikrospektroskopisch untersucht, dabei jedoch nur ein PE-Partikel gefunden. Dies stellt zwar eine Erhöhung von ca. 300 Partikel pro Filter auf ca. 900 analysierte Partikel pro Filter zur Ausgangspublikation dar, jedoch führte dieses Ergebnis zu dem Schluss, dass die RM-Analytik besonders hinsichtlich der Zahl an messbaren Partikeln weiter verbessert werden muss.

Zusätzlich wurde für die Kontaminationskontrolle und insbesondere das Erkennen von Kontaminationen die Anwendung des sogenannten *Tape Lift Screening* näher betrachtet. Bei dieser Methode wird auf die zu beprobende Oberfläche ein Klebeband appliziert, wieder abgezogen, um die potentiell vorhandenen partikulären Kontaminationen aufzunehmen und sie anschließend RAMAN-mikrospektroskopisch zu analysieren. Diese Methode ermöglicht damit nicht nur die Detektion der Kontaminationen, sondern auch deren chemische Charakterisierung. Eine schnellere Option, die jedoch nur zur Voruntersuchung geeignet ist, ist die Beleuchtung der zu

kontrollierenden Oberfläche mittels Weißlicht im Streiflicht, wie es z.B. in der Raumfahrtproduktsicherung routinemäßig durchgeführt wird [150].

Die Partikelerkennung unter Anwendung von OTSU's Algorithmus, sowie einer Wasserscheiden-Transformation ermöglicht die Erkennung und morphologische Charakterisierung von Partikeln stark unterschiedlicher Erscheinung (Größe, Form, Farbe und Transparenz) und unter verschiedenen Beleuchtungsarten (Hell- und Dunkelfeld). Die Partikelerkennung wurde hinsichtlich Genauigkeit, Verlässlichkeit und Empfindlichkeit validiert. Die Übereinstimmung für die Genauigkeit lag meist bei 90 % oder darüber. Die Übereinstimmung hinsichtlich der Verlässlichkeit gar bei 100 %. Die Schwachstelle des Algorithmus ist die Empfindlichkeit hinsichtlich des Kontrastes der Partikel zum Hintergrund. Ist dieser zu gering oder gar wechselnd, kann keine zuverlässige Partikelerkennung stattfinden.

Ein Vorteil der hier validierten Software-Lösung zur Partikelerkennung ist ihre Einfachheit. Die Möglichkeit Parameter zu ändern ist gering und tatsächlich waren auch die Voreinstellungen für alle bis auf eines der getesteten Bilder ausreichend. Einzig die Unterscheidung, ob Partikel hell oder dunkel sind, sowie eine Entscheidung, ob die Wasserscheiden-Transformation eingesetzt werden soll oder nicht, muss vorgenommen werden. Diese begrenzten Wahlmöglichkeiten machen Ergebnisse in einem Labor und über mehrere Labore hinweg vergleichbar und reproduzierbar. Eine Software-Lösung, die im Gegensatz zur gezeigten, eine fast unbegrenzte Einstellung auch kleiner Parameter zulässt, impliziert, dass für jede Probe eine eigene (optimierte) Einstellung gefunden werden kann. Dies steht jedoch der Idee entgegen, die Partikelerkennung unabhängig vom Experimentator zu machen.

In der Mehrzahl der Fälle zeigte das Programm zufriedenstellende Resultate und kann daher als einfach zu implementierendes Werkzeug und zur Harmonisierung der MP-Analytik eingesetzt werden. Nichtsdestotrotz sind Faser- und Agglomerat-reiche Proben ein noch nicht gelöstes Problem. Hierzu ist ein weiterführender Ansatz vonnöten.

Die Einzelpartikelanalytik mit RM ermöglicht die morphologische und chemische Charakterisierung jedes einzelnen Partikels. Diese hohe Informationsdichte hat den Nachteil des hohen Zeitbedarfs. Es stellt sich bei einem Filter mit  $10^5 - 10^6$  Partikeln

daher die Frage, wie viele der Partikel gemessen werden müssen, um eine Aussage über den MP-Gehalt treffen zu können, die mit einer bestimmten statistischen Sicherheit behaftet ist. Die in dieser Arbeit und bereits in einem *Critical Review* (ANGER und VON DER ESCH et al. [8]) vorgeschlagene Lösung sieht die Berechnung der Größe einer Stichprobe vor. Dieses Verfahren wird einfache Stichprobe ohne Zurücklegen, im Englischen *simple random sampling of units selected without replacement (srswor)* genannt. Um dieses Verfahren anwenden zu können, müssen einige Annahmen getroffen werden, die das reale Problem deutlich vereinfachen. Die ermittelten Werte sind daher als Untergrenze zu verstehen. Mithilfe der durch die Partikelerkennung bestimmten Gesamtpartikelzahl, einer Wahl des Vorhersageintervalls (z.B. 90 %), einer Annahme für den MP-Gehalt in der Probe, sowie einem tolerierbaren Fehler kann die Stichprobengröße berechnet werden. Für einen Filter mit  $1 \times 10^6$  Partikeln, einem angenommenen MP-Gehalt von 2 % und einem tolerierten Fehler von 10 % müssen mindestens 13000 Partikel gemessen werden. Durch die zu treffenden Annahmen wird die Zahl an zu messenden Partikeln zwar unterschätzt, gibt aber eine erste Orientierung über den zu erwartenden Fehler an und ermöglicht damit eine statistische Bewertung des MP-Gehaltes.

Innerhalb von Vergleichsuntersuchungen des BMBF-Projektes „MiWa – Mikroplastik im Wasserkreislauf“ wurden die im ersten Teil optimierten Parameter, der entwickelte Filterhalter und zusätzlich die im zweiten Teil validierte Partikelerkennung sowie die statistische Berechnung der minimal zu messenden Partikel angewandt. Auf einem Filter wurden ca. 1200 Partikel gemessen, was eine erneute Steigerung im Vergleich zu ca. 300 Partikel bzw. 900 Partikeln darstellt. Die ermittelten MP-Gehalte waren jedoch zwei Größenordnungen kleiner als die erwarteten Mengen. Die Gründe hierfür können in der Probenerstellung, der Probenaufbereitung, aber auch in der Analytik liegen. Aus diesen Ergebnissen wurde ein Wert von ca.  $5 \mu\text{m}$  für die minimale Partikelgröße, die von der vorliegenden Methodik erfasst werden kann, ermittelt. Die maximale Belegungsdichte ergibt sich aus den Proben der BMBF-Vergleichsversuche zu  $0,0002 \text{ Partikel} / \mu\text{m}^2$  und zu  $0,0005 \text{ Partikel} / \mu\text{m}^2$  aus der Elb-Schwimmstaffel.

Eine wichtige Schlussfolgerung aus den Ergebnissen der BMBF-Vergleichsuntersuchungen war, die Methode zur Berechnung der notwendigen Partikelzahl einzusetzen, um aus einem bestehenden Messergebnis einen Fehler zu berechnen.

Damit wird das Messfenster von zwei Tagen für jede Probe gleich ausgenutzt. Es können so 7000 Partikel gemessen werden und im Rückschluss kann der Fehler bestimmt werden. Eine Steigerung von 300 Partikel auf 7000 Partikel stellt eine Erhöhung des Probendurchsatzes um das 23-fache dar. Durch die Berechnung des Fehlers und nicht der Zahl an zu messender Partikel ist die Bewertung prinzipiell auch während der Analyse möglich. Dies ermöglicht daher in der Theorie eine zeitoptimierte Messung, bis die gewünschte statistische Sicherheit erreicht ist. Die empfohlene Methode ist jedoch die Festlegung des Zeitfensters für eine Probe und die nachträgliche Bestimmung des Fehlers.

Die MP-Analytik mittels RM hat sich durch die in dieser Arbeit gezeigten Fortschritte in den letzten 3 Jahren erheblich weiterentwickelt. Zukünftige Themen sind die weitergehende Automatisierung der RM-Analytik, z.B. die automatisierte Spektrenauswertung, die noch stark zu optimierende Probenvorbereitung und insbesondere Methodenentwicklungen für Partikel, die kleiner als 1  $\mu\text{m}$  sind, dem sogenannten Nanoplastik oder Submikroplastik. Letztlich wurde mit der hier gezeigten optimierten RM-Methode die Grundlage geschaffen, um optimal aufbereitete Proben messen zu können. Die Analytik schafft damit die Grundlage, um zukünftig Grenzwerte festlegen zu können. MP wird in den verschiedensten Matrices untersucht. Insbesondere Matrices, die chemisch den synthetischen Polymeren sehr ähnlich sind, also z.B. organische Bestandteile in Sedimentproben, stellen eine große Herausforderung dar. Es handelt sich bei der MP-Analytik um die sprichwörtliche Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Um die Nadel besser finden zu können, muss der Heuhaufen entfernt werden. Leider ist die Nadel nicht aus Metall, sondern chemisch mit dem Heu verwandt.

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: RAMAN-Referenzspektrum von PE aus Spectral ID 3.03 (Thermo Electron Corporation, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., USA).....	23
Abbildung 2: RAMAN-Referenzspektren verschiedener Polymere aus Spectral ID 3.03 (Thermo Electron Corporation, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., USA).....	25
Abbildung 3: RAMAN-Referenzspektren verschiedener Pigmente und Farbstoffe aus Spectral ID 3.03 (Thermo Electron Corporation, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., USA).....	26
Abbildung 4: Schema der Streuung an einem 1 µm großen sphärischen Partikel auf einer Oberfläche (zweidimensionale Beschreibung) nach LILIENFELD [152].....	36
Abbildung 5: Histogramm der Pixel-Intensitäten. Der rote Pfeil markiert die durch OTSU's Algorithmus vorgenommene Unterteilung in Partikel und Hintergrund. Entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry.....	41
Abbildung 6: links – Originalbild; rechts – Höhenlinienkarte nach Bearbeitung mit der Wasserscheiden-Transformation. Entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Seitenlänge Bild: 4096 µm) .....	42
Abbildung 7: Zeichnung des Filterhalters: Konstruiert und gefertigt von ROLAND HOPPE, Werkstatt des IWC-TUM. ....	46
Abbildung 8: Schnitt durch den Filterhalter: Konstruiert und gefertigt von ROLAND HOPPE, Werkstatt des IWC-TUM. ....	46
Abbildung 9: Übersicht der verschiedenen Filterhaltermodelle: a) 50 mm, massiv; b) 25 mm, massiv; c) 50 mm, mit Aussparung; d) 25 mm, mit Aussparung. ....	47
Abbildung 10: Übersicht über die verschiedenen Beleuchtungsmodi anhand eines PET-Partikels. Im Uhrzeigersinn: Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung 592/24 (exc.: 592/24, em.: 675/100) und Fluoreszenzanregung 470/40 (exc.: 470/40, em.: 525/50).....	49
Abbildung 11: Verteilung der Messbereiche für Partikel < 500 µm. ....	58
Abbildung 12: Höhenprofil eines sauberen PC-Filters mit Goldbeschichtung und 50 mm Durchmesser, der auf einen Glasträger geklebt wurde. ....	60
Abbildung 13: Ausgewählte RAMAN-Spektren aus der Elb-Schwimmstaffel. Referenzspektren aus Spectral ID 3.03 (Thermo Electron Corporation, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., USA).....	69
Abbildung 14: Frisch aus der Vorratspackung entnommener Glasträger unter UV-Licht.....	71
Abbildung 15: Frisch aus der Vorratspackung entnommener Glasträger unter Weißlicht im Streiflicht. Abbildung 14 zeigt denselben Glasträger.....	71
Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahme eines Glasträgers mit getrockneter PS-Suspension. ....	73
Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahme des Glasträgers aus Abbildung 16 nach Anwendung des 3M-4828 –Klebandes.....	74
Abbildung 18: Mikroskopische Dunkelfeld-Aufnahme des 3M-4828 –Klebandes, das auf den Glasträger in Abbildung 16 angewendet und auf einen zweiten Glasträger geklebt wurde.....	75
Abbildung 19: Mikroskopische Hellfeld-Aufnahme des 3M-4828 –Klebandes, das auf den Glasträger in Abbildung 16 angewendet und auf einen zweiten Glasträger geklebt wurde. Eingekreist sind die 2 (von 5) wiedergefundenen und mit RM als PS verifizierten Partikel. ....	76
Abbildung 20: Agglomerate, die nicht richtig getrennt wurden (roter Kreis). Abgewandelt aus Anger und Precht et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Seitenlänge Bild: 4096 µm).....	80
Abbildung 21: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 38e. Entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Abmessungen Bild: 266 µm × 212 µm).....	81
Abbildung 22: Bild aus Abbildung 38 unter zusätzlicher Anwendung der Wasserscheiden-Transformation. Entnommen aus Anger und Precht et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Seitenlänge Bild: 4096 µm) .....	82
Abbildung 23: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4f; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163 µm) .....	83

Abbildung 24: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4g; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163 $\mu\text{m}$ ) .....	84
Abbildung 25: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4h; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163 $\mu\text{m}$ ) .....	84
Abbildung 26: Bild aus KÄPPLER et al. 2018 [173], Figure 1c; Box "white particles" aktiv.....	85
Abbildung 27: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3j; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: ca. 150 $\mu\text{m}$ ) .....	85
Abbildung 28: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3d; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: ca. 170 $\mu\text{m}$ ) .....	86
Abbildung 29: Bild aus KÄPPLER et al. 2016 [134] Figure 1a; Box "white particles" aktiv. ....	86
Abbildung 30: Beispielhaftes Bild einer PS-faser auf einem PC-Filter unter Hellfeldbeleuchtung; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: ca. 1000 $\mu\text{m}$ ) .....	87
Abbildung 31: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4g; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Bild: 163 $\mu\text{m}$ ) .....	88
Abbildung 32: Berechnung der Fläche, die durch sphärische, einander berührende Partikel belegt wird. Der Raum zwischen den Kugeln wird durch Berechnung der Fläche eines Quadrats mit Seitenlänge $d$ , die dem doppelten Radius $r$ der Kugel entspricht, ermittelt.....	90
Abbildung 33: Zusammenhang zwischen $n$ und $e$ für einen Filter mit $N = 10^6$ Partikeln und $P = 2\%$ . Der tolerierte Fehler $e = 10\%$ ist durch die zwei grauen vertikalen Linien dargestellt. Die rote Linie stellt $n$ einer früheren Studie dar [1]. Der gewünschte Fehler $e$ wird bei $n = 13000$ erreicht. Entnommen aus ANGER und VON DER ESCH et al. [8].....	91
Abbildung 34: PTFE-Partikel im Dunkelfeld auf PC mit Goldbeschichtung aufgenommen mit einem 20 $\times$ Objektiv. Klassifizierung 0. (Abmessungen Bild: 450 $\mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ ).....	125
Abbildung 35: schwarze PVC-Partikel im Dunkelfeld auf PC mit Goldbeschichtung aufgenommen mit einem 50 $\times$ Objektiv mit großem Arbeitsabstand. Klassifizierung 1. (Abmessungen Bild: 180 $\mu\text{m} \times 110 \mu\text{m}$ ) .....	125
Abbildung 36: Höhenprofil eines sauberen Silicium-Filter mit ca. 50 mm Durchmesser, median filter size = 0. ....	131
Abbildung 37: Höhenprofil eines sauberen Silicium-Filter mit ca. 50 mm Durchmesser, median filter size = 1. ....	131
Abbildung 38: Schema der Partikelerkennung: a) Originalbild, b) Umwandlung in Graustufenbild, c) Umwandlung in S/W-Bild und Einteilung in Partikel und Hintergrund durch OTSU's Algorithmus, d) Größenbestimmung der Partikel, e) Überlagerung des Originalbildes mit der Partikelerkennung. Entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Seitenlänge Bild: 4096 $\mu\text{m}$ ) .....	134
Abbildung 39: Vergrößerung von Abbildung 38d. (Seitenlänge Bild: 4096 $\mu\text{m}$ ) .....	135
Abbildung 40: Graphische Benutzeroberfläche (GUI) des Programms. Entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Seitenlänge Bild: 4096 $\mu\text{m}$ ) .....	136
Abbildung 41: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4f; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163 $\mu\text{m}$ ) .....	138
Abbildung 42: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4g; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163 $\mu\text{m}$ ) .....	139
Abbildung 43: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4h; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163 $\mu\text{m}$ ) .....	140
Abbildung 44: Bild aus KÄPPLER et al. 2018 [173], Figure 1c; Box "white particles" aktiv.....	140
Abbildung 45: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3j; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: ca. 150 $\mu\text{m}$ ) .....	141
Abbildung 46: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3d; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: 170 $\mu\text{m}$ ) .....	142
Abbildung 47: Bild aus KÄPPLER et al. 2016 [134] Figure 1a; Box "white particles" aktiv. ....	142
Abbildung 48: Bild aus KÄPPLER et al. 2016 [134] Figure 1b; Box "white particles" aktiv.....	144
Abbildung 49: Bild aus KÄPPLER et al. 2018 [173], Figure 1a; Box "white particles" aktiv. (Länge Partikel: ca. 500 $\mu\text{m}$ ) .....	144

Abbildung 50: Bild aus KÄPPLER et al. 2018 [173], Figure 1b; Box "white particles" aktiv. (Länge Partikel: ca. 1000 $\mu\text{m}$ ) .....	144
Abbildung 51: Bild aus KÄPPLER et al. 2018 [173], Figure 1d; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: ca. 2440 $\mu\text{m}$ ) .....	145
Abbildung 52: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3a; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 170 $\mu\text{m}$ ) .....	145
Abbildung 53: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3g; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 140 $\mu\text{m}$ ) .....	145
Abbildung 54: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 9a; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 85 $\mu\text{m}$ ) .....	146
Abbildung 55: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 9d with; Box "white particles" aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 160 $\mu\text{m}$ ) .....	147
Abbildung 56: Beispielhaftes Bild von PS-Partikeln auf einem PC-Filter mit Goldbeschichtung unter Dunkelfeldbeleuchtung; Box „white particles“ aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 4800 $\mu\text{m}$ ) .....	148
Abbildung 57: Bild aus KÄPPLER et al. 2016 [134] Figure 1d; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: 170 $\mu\text{m}$ ) .....	149
Abbildung 58: Beispielhaftes Bild einer PS-faser auf einem PC-Filter unter Hellfeldbeleuchtung; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: ca. 1000 $\mu\text{m}$ ) .....	149
Abbildung 59: Bild aus KÄPPLER et al. 2016 [134] Figure 1c; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: 1000 $\mu\text{m}$ ) .....	149
Abbildung 60: Bild aus FRÈRE et al. [144] Figure 3; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: 27,5 mm) .....	150
Abbildung 61: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 1b; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: 170 $\mu\text{m}$ ) .....	151
Abbildung 62: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 2b; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: 170 $\mu\text{m}$ ) .....	152
Abbildung 63: Bild aus DOMOGALLA-URBANSKY und ANGER et al. [172] Figure 2c; Box "white particles" inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: 200 $\mu\text{m}$ ) .....	153

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sieben Kriterien zur Definition von MP aus HARTMANN et al. [49] übersetzt. ....	7
Tabelle 2: Vergleich der vier zur Identifikation von MP am häufigsten eingesetzten analytischen Methoden RM, ( $\mu$ -)FT-IR, TED-GC-MS und Pyr-GC-MS. Alle Angaben basieren, wenn nicht anders angegeben, auf Übersichtsartikeln [26, 32, 35, 78, 93, 98-100]. ....	19
Tabelle 3: Beschreibung der wichtigsten auftretenden Schwingungen von PE und der zugehörigen Wellenzahl, bei der diese Schwingung im Spektrum auftritt.....	24
Tabelle 4: Laterales Auflösungsvermögen $d_{\text{RALYVEIGH}}$ für verschiedene Laserwellenlängen und Objektive mit unterschiedlichen numerischen Aperturen berechnet nach Formel 3. LWD = long working distance. ....	28
Tabelle 5: Feldtiefe L für verschiedene Laserwellenlängen und Objektive mit unterschiedlichen numerischen Aperturen. Für den Brechungsindex n wurde der Wert von 1,53 für Polyethylen hoher Dichte eingesetzt [143]. ....	29
Tabelle 6: Auflistung der eingesetzten Materialien und Geräte. ....	50
Tabelle 7: Auflistung der zehn untersuchten Klebebänder.....	53
Tabelle 8: Vergleich der Peak-Peak-Abstände für saubere PC-Filter mit Goldbeschichtung und 50 mm Durchmesser; Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus drei True-Surface-Messungen an einem Filter bestimmt.....	59
Tabelle 9: Vergleich der Peak-Peak-Abstände für PC-Filter mit Goldbeschichtung und 50 mm Durchmesser; Filter kamen wie unter 4.1.1 beschrieben mit artifizierter Matrix in Kontakt; Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus drei True-Surface-Messungen an einem Filter bestimmt.....	61
Tabelle 10: Vergleich der Peak-Peak-Abstände für saubere PC-Filter mit Goldbeschichtung und 25 mm Durchmesser; Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus drei TrueSurface-Messungen an einem Filter bestimmt.....	61
Tabelle 11: Übereinstimmung der Partikelerkennung mit der tatsächlichen Partikelzahl anhand des Punktesystems aus Kapitel 4.1.2, für die vier verschiedenen Beleuchtungsmodi. ....	64
Tabelle 12: Vergleich der Peak-Peak-Abstände für saubere Filter mit 47 mm – 50 mm Durchmesser; Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus drei True-Surface-Messungen an einem Filter bestimmt.....	65
Tabelle 13: Vergleich der Peak-Peak-Abstände für saubere Filter mit 25 mm Durchmesser; Mittelwerte und Standardabweichung wurden aus drei True-Surface-Messungen an einem Filter bestimmt.....	66
Tabelle 14: Übersicht der verschiedenen Klebebänder und die Bewertungen nach den vier Kriterien Partikelsichtbarkeit, Partikelaufnahme und -wiederfindung, Klebedauerhaftigkeit und spektraler Hintergrund des Klebebandes. ....	77
Tabelle 15: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 23.....	83
Tabelle 16: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 24.....	84
Tabelle 17: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 26.....	85
Tabelle 18: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 31.....	88
Tabelle 19: Zahl zu messender Partikel n für einen Filter mit $N = 10^6$ , $\sigma = 1,65$ (90 %) und einem toleriertem Fehler $e = 10$ %.....	90
Tabelle 20: Zahl zu messender Partikel n für einen Filter mit $N = 10^6$ , $\sigma = 1,65$ (90 %) und einem toleriertem Fehler $e = 10$ %.....	91
Tabelle 21: Ergebnisse der MiWa-Vergleichsproben – Probe A.....	93
Tabelle 22: Berechnete Fehler e für einen hypothetischen Filter mit $N = 10^6$ bzw. $10^5$ bzw. $10^4$ Partikeln, $n = 7000$ Partikeln und $\sigma = 1,65$ . ....	95
Tabelle 23: Vergleich der MP-Analytik in 2016 [1] mit dem Stand der Technik 2019 (anwendbare Arbeitsvorschrift). ....	96
Tabelle 24: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den PC-Filter mit Goldbeschichtung. ....	124

Tabelle 25: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den PC-Filter.....	126
Tabelle 26: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den Nitrocellulose-Filter.....	127
Tabelle 27: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den Silicium-Filter. ....	128
Tabelle 28: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den PES-Filter. ....	129
Tabelle 29: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den PTFE-Filter.....	130
Tabelle 30: Zahl der PS-Partikel auf einem Glaträger vor (Partikel vorher) Anwendung des entsprechenden Klebebandes und wiedergefundene Zahl an PS-Partikel auf dem Klebeband (Partikel nachher) für das Kriterium Partikelaufnahme und -wieder-findung.....	132
Tabelle 31: Einzelwerte der PS-Partikel auf einem Glaträger vor (Partikel vorher) Anwendung des entsprechenden Klebebandes und wiedergefundene Zahl an PS-Partikel auf dem Klebeband (Partikel nachher) für das Kriterium Klebedauerhaftigkeit .....	133
Tabelle 32: Voreinstellungen der Partikelerkennungs-Software.....	137
Tabelle 33: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 41 .....	138
Tabelle 34: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 41 .....	138
Tabelle 35: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 42 .....	139
Tabelle 36: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 42 .....	139
Tabelle 37: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 44. ....	140
Tabelle 38: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 44.....	141
Tabelle 39: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 47. ....	142
Tabelle 40: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 47.....	143
Tabelle 41: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 54. ....	146
Tabelle 42: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 54.....	146
Tabelle 43: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 55. ....	147
Tabelle 44: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 55.....	147
Tabelle 45: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 56. ....	148
Tabelle 46: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 56.....	148
Tabelle 47: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 60. ....	150
Tabelle 48: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 60.....	150
Tabelle 49: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 61. ....	151
Tabelle 50: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 61.....	151
Tabelle 51: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 62. ....	152
Tabelle 52: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 62.....	152

## Geräte und Chemikalien

<b>Geräte</b>
5× Objektiv EC Epiplan, NA = 0,13, HD M27, Carl Zeiss AG, DE
20× Objektiv, EC Epiplan NA = 0.4 HD M27, Carl Zeiss AG, DE
50× LWD Objektiv, LD EC Epiplan-Neofluar NA = 0.55 HD DIC M27, Carl Zeiss AG, DE
Glas-Vakuumfiltrationsgerät, 25 mm, 30 mL, mit Glasfritte, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, DE
<i>Laminar flow box</i> , Reinraumklasse ISO 5 nach ISO 14644-1
RAMAN-Mikroskop, <i>alpha300R</i> , WITec GmbH, DE
<i>TrueSurface</i> , WITec GmbH, DE
UV/Weißlicht-Taschenlampe <i>Nitecore CU6</i> , SYSMAX Innovations Co.Ltd., CN
<b>Software</b>
ImageJ Version 1.5
Project4, WITec GmbH, DE
RStudio Version 1.1.456 - © 2009-2018 RStudio Inc. (graphische Darstellung der Spektren)
Spectral ID 3.03, Thermo Electron Corporation, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., USA
<b>Chemikalien</b>
Bentonit, Montmorillonit, Carl Roth GmbH + Co. KG, DE
Huminsäuren, nativ, Carl Roth GmbH + Co. KG, DE
Novachem SF 100, Postnova Analytics GmbH, DE
PA12 – Polyamid 12, TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PC – Polycarbonat, TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PE – Polyethylen, TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PET – Polyethylenterephthalat, TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
PMMA – Polymethylethacrylat, TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL
POM – Polyoxymethylen, TU München, WACKER-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie

---

PP – Polypropylen, TU München, WACKER-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie

---

PS – Polystyrol, TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL

---

PTFE – Polytetrafluorethylen, TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL

---

PVAc – Polyvinylacetat, TU München, WACKER-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie

---

PVC – Polyvinylchlorid, TU München, WACKER-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie

---

PVC schwarz – Polyvinylchlorid, TU Berlin, Prof. M. JEKEL & Dr. A. S. RUHL

---

Reinstwasser, Milli-Q® Reference, Merck KGaA, DE

---

### **Verbrauchsmaterialien**

---

3M-4828 Klebeband, 3M Corp., USA

---

Deckglas, 15 mm × 15 mm, Stärke 0,13 mm – 0,16 mm, *Carl Roth GmbH + Co. KG*, DE

---

Fusselfreie Tücher, Thorlabs Inc., DE

---

Glasträger, Thorlabs GmbH, DE

---

KS 283-T-19 Klebeband, Eigenmarke klebeshop24.de

---

KS-29-T-12 Klebeband, Eigenmarke klebeshop24.de

---

LUX Flachkrepp, Emil Lux GmbH & Co. KG

---

Nitrocellulose-Filter, Filterdurchmesser 47 mm, Porenweite 0,45 µm, Osmonics Inc., USA

---

Papiervliesklebeband KM 975, Eigenmarke klebeshop24.de

---

PC-Filter mit Goldbeschichtung, Filterdurchmesser 25 mm bzw. 50 mm, Porenweite 0,8 µm, Analytische Produktions-, Steuerungs- und Controllgeräte GmbH, DE

---

PC-Filter, Filterdurchmesser 25 mm, Porenweite 0,4 µm, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, DE

---

PES-Filter, Filterdurchmesser 25 mm, Porenweite 0,45 µm, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, DE

---

PTFE-Filter, Filterdurchmesser 25 mm, Porenweite 1-2 µm, Pieper Filter GmbH, DE

---

Shurtape J-LAR® Klebeband, Shurtape Technologies, LLC Inc., USA

---

Silicium-Filter, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Dr. U. BRAUN

---

tesa extra Power® Universal, Tesa SE, DE

---

tesa® Doppelband TRANSPARENT, Tesa SE, DE

---

tesa® Malerband PERFECT, Tesa SE, DE

---

tesafilm® TRANSPARENT, Tesa SE, DE

---

## Abkürzungsverzeichnis

( $\mu$ -)-Pyr-GC-MS	(mikro-)Pyrolyse-Gaschromatographie-Massenspektrometrie
$\mu$ -FT-IR	(mikro-)Fourier-Transformations-Infrarot-Mikroskopie
$d_{(ABBE/Airy/RAYLEIGH)}$	Durchmesser nach ABBE, Airy oder RAYLEIGH
e	Vor der Messung angenommener oder nach der Messung errechneter Fehler des MP-Anteils
EDA	energiedispersive Röntgenanalyse
EDS, EDX	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
EVA	Ethylen-Vinylacetat-Copolymer
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
IWC	Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
L	Feldtiefe des konfokalen Volumens
MP	Mikroplastik
MPSS	Münchner-Plastik-Sediment-Separator (engl. <i>munich microplastic sediment separator</i> )
MSFD	Marine Strategy Framework Directive
n	Brechungsindex
N	Gesamtzahl aller Partikel auf dem Filter
NA	Numerische Apertur
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
$n_p$	Zahl der zu messenden Partikel
P	Schätzung des MP-Anteils
PA	Polyamid
PC	Polycarbonat
PEG	Polyethylenglykol
PE-HD/MD	Polyethylen mit hoher und mittlerer Dichte
PE-LD/LLD	Polyethylen mit geringer und sehr geringer Dichte
PET	Polyethylenterephthalat
PMMA	Polymethylmethacrylat

POM	Polyoxymethylen
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PS-E	Geschäumtes Polystyrol (engl. <i>expanded</i> )
PUR	Polyurethan
PVA	Polyvinylacetat
PVC	Polyvinylchlorid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RM	RAMAN-Mikrospektroskopie
SAN/ABS	Styrol-Acrylnitrilcopolymere/Acrylnitril-Polybutadien-Styrolpfropfpolymerie
SBR	Styrol-Butadien-Gummi (engl. <i>Styrene-Butadiene-Rubber</i> )
SEM	Scanning Electron Microscopy
TD-Pyr-GC-MS	Thermische-Desorption-Pyrolyse-Gaschromatographie-Massenspektrometrie
TED-GC-MS	Thermoextraktions-Desorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie
T <sub>g</sub>	Glasübergangstemperatur
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TUM	Technische Universität München
λ	Wellenlänge
σ	Sigma-Wert des Vorhersage-Intervalls

## Literaturverzeichnis

1. Imhof, H. K.; Laforsch, C.; Wiesheu, A. C.; Schmid, J.; Anger, P. M.; Niessner, R.; Ivleva, N. P., Pigments and Plastic in Limnetic Ecosystems: A Qualitative and Quantitative Study on Microparticles of Different Size Classes. *Water Research* **2016**, *98*, 64-74.
2. Angerer, J.; Enzinger, S., Erstmals Mikroplastik im Menschen nachgewiesen - Pressemitteilung. In Medizinische Universität Wien und Umweltbundesamt Österreich: 2018.
3. Schwabl, P.; Liebmann, B.; Köppel, S.; Königshofer, P.; Bucsecs, T.; Trauner, M.; Reiberger, T., Assessment of Microplastic Concentration in Human Stool - Conference Paper. In *UEG Week*, Wien, 2018.
4. Bergmann, M.; Mützel, S.; Primpke, S.; Tekman, M. B.; Trachsel, J.; Gerdt, G., White and Wonderful? Microplastics Preval in Snow from the Alps to the Arctic. *Science Advances* **2019**, *5*, 1-10.
5. Burton, G. A., Jr., Stressor Exposures Determine Risk: So, Why Do Fellow Scientists Continue to Focus on Superficial Microplastics Risk? *Environmental Science & Technology* **2017**, *51*, 13515-13516.
6. Hale, R. C., Are the Risks from Microplastics Truly Trivial? *Environmental Science & Technology* **2018**, *52*, 931.
7. Kramm, J.; Volker, C.; Wagner, M., Superficial or Substantial: Why Care about Microplastics in the Anthropocene? *Environmental Science & Technology* **2018**, *52*, 3336-3337.
8. Anger, P. M.; von der Esch, E.; Baumann, T.; Elsner, M.; Niessner, R.; Ivleva, N. P., Raman Microspectroscopy as a Tool for Microplastic Particle Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *109*, 214-226.
9. Enders, K.; Lenz, R.; Stedmon, C. A.; Nielsen, T. G., 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*, 70-81.
10. Collard, F.; Gilbert, B.; Eppe, G.; Parmentier, E.; Das, K., Detection of Anthropogenic Particles in Fish Stomachs: An Isolation Method Adapted to Identification by Raman Spectroscopy. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **2015**, *69*, 331-339.
11. Schymanski, D.; Goldbeck, C.; Humpf, H. U.; Fürst, P., Analysis of Microplastics in Water by Micro-Raman Spectroscopy: Release of Plastic Particles from Different Packaging into Mineral Water. *Water Research* **2018**, *129*, 154-162.
12. Robertson, J.; Roux, C., From Crime Scene to Laboratory. In *Forensic Examination of Fibres*. Robertson, J.; Roux, C.; Wiggins, K. G., Eds. CRC Press: 2017.
13. Woodall, L. C.; Gwinnett, C.; Packer, M.; Thompson, R. C.; Robinson, L. F.; Paterson, G. L., Using a Forensic Science Approach to Minimize Environmental Contamination and to Identify Microfibres in Marine Sediments. *Marine Pollution Bulletin* **2015**, *95*, 40-46.
14. Kenyon, K. W.; Kridler, E., Laysan Albatrosses Swallow Indigestible Matter. *The Auk* **1969**, *86*, 339-343.
15. Buchanan, J. B., Pollution by Synthetic Fibers. *Marine Pollution Bulletin* **1971**, *2*, 23.
16. Carpenter, E. J.; Smith, K. L. J., Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science* **1972**, *175*, 1240-1241.
17. Colton, J. B.; Knapp, F. D. J.; Burns, B. R., Plastic Particles in Surface Waters of the Northwestern Atlantic. *Science* **1974**, *185*, 491-497.
18. Gregory, M., Accumulation and Distribution of Virgin Plastic Granules on New Zealand Beaches. *N.Z. Journal of Marine and Freshwater Research* **1978**, *12*, 399-414.
19. Derraik, J. G. B., The Pollution of the Marine Environment by Plastic Debris: A Review. *Marine Pollution Bulletin* **2002**, *44*, 842-852.

20. Thompson, R. C.; Olsen, Y.; Mitchell, R. P.; Davis, A.; Rowland, S. J.; John, A. W. G.; McGonigle, D.; Russell, A. E., Lost at Sea: Where is All the Plastic? *Science* **2004**, 304, 838-838.
21. Moore, C. J., Synthetic Polymers in the Marine Environment: A Rapidly Increasing, Long-Term Threat. *Environmental Research* **2008**, 108, 131-139.
22. Barnes, D. K.; Galgani, F.; Thompson, R. C.; Barlaz, M., Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **2009**, 364, 1985-1998.
23. Andrady, A. L., Microplastics in the Marine Environment. *Marine Pollution Bulletin* **2011**, 62, 1596-1605.
24. Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T. S., Microplastics as Contaminants in the Marine Environment: A Review. *Marine Pollution Bulletin* **2011**, 62, 2588-2597.
25. Zarfl, C.; Fleet, D.; Fries, E.; Galgani, F.; Gerdt, G.; Hanke, G.; Matthies, M., Microplastics in Oceans. *Marine Pollution Bulletin* **2011**, 62, 1589-1591.
26. Hidalgo-Ruz, V.; Gutow, L.; Thompson, R. C.; Thiel, M., Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology* **2012**, 46, 3060-3075.
27. Wright, S. L.; Thompson, R. C.; Galloway, T. S., The Physical Impacts of Microplastics on Marine Organisms: A Review. *Environmental Pollution* **2013**, 178, 483-492.
28. Ivar do Sul, J. A.; Costa, M. F., The Present and Future of Microplastic Pollution in the Marine Environment. *Environmental Pollution* **2014**, 185, 352-364.
29. Wagner, M.; Scherer, C.; Alvarez-Munoz, D.; Brennholt, N.; Bourrain, X.; Buchinger, S.; Fries, E.; Grosbois, C.; Klasmeier, J.; Marti, T.; Rodriguez-Mozaz, S.; Urbatzka, R.; Vethaak, A.; Winther-Nielsen, M.; Reifferscheid, G., Microplastics in Freshwater Ecosystems: What We Know and What We Need to Know. *Environmental Sciences Europe* **2014**, 26, 1-9.
30. Andrady, A. L., The Plastic in Microplastics: A Review. *Marine Pollution Bulletin* **2017**, 119, 12-22.
31. Araujo, C. F.; Nolasco, M. M.; Ribeiro, A. M. P.; Ribeiro-Claro, P. J. A., Identification of Microplastics Using Raman Spectroscopy: Latest Developments and Future Prospects. *Water Research* **2018**, 142, 426-440.
32. Ivleva, N. P.; Wiesheu, A. C.; Niessner, R., Microplastic in Aquatic Ecosystems. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, 56, 1720-1739.
33. Ivleva, N. P.; Wiesheu, A. C.; Niessner, R., Mikroplastik in aquatischen Ökosystemen. *Angewandte Chemie* **2017**, 129, 1744-1764.
34. Ogonowski, M.; Gerdes, Z.; Gorokhova, E., What We Know and What We Think We Know About Microplastic Effects – A Critical Perspective. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **2018**, 1, 41-46.
35. Renner, G.; Schmidt, T. C.; Schram, J., Analytical Methodologies for Monitoring Micro(Nano)plastics: Which are Fit for Purpose? *Current Opinion in Environmental Science & Health* **2018**, 1, 55-61.
36. Schwaferts, C.; Niessner, R.; Elsner, M.; Ivleva, N. P., Methods for the Analysis of Submicrometer- and Nanoplastic Particles in the Environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, 112, 52-65.
37. Triebkorn, R.; Braunbeck, T.; Grummt, T.; Hanslik, L.; Huppertsberg, S.; Jekel, M.; Knepper, T. P.; Kraus, S.; Müller, Y. K.; Pittroff, M.; Ruhl, A. S.; Schmieg, H.; Schür, C.; Strobel, C.; Wagner, M.; Zumbülte, N.; Köhler, H.-R., Relevance of Nano- and Microplastics for Freshwater Ecosystems: A Critical Review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, 110, 375-392.
38. PlasticsEurope, Plastics - the Facts 2015-An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. **2015**.
39. PlasticsEurope, Plastics - the Facts 2018-An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. **2018**.

40. Gregory, M.; Andrady, A., Plastics in the Marine Environment. In *Plastics and the Environment*. 2003; pp 379-401.
41. Arthur, C. D.; Baker, J.; Bamford, H. In *Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris*, 2009; NOAA Marine Debris Program, National Oceanic and Atmospheric Administration: 2009.
42. Costa, M. F.; Ivar do Sul, J. A.; Silva-Cavalcanti, J. S.; Araújo, M. C. B.; Spengler, Â.; Tourinho, P. S., On the Importance of Size of Plastic Fragments and Pellets on the Strandline: A Snapshot of a Brazilian Beach. *Environmental Monitoring and Assessment* **2009**, 168, 299-304.
43. Ivleva, N. P.; Nießner, R., Kunststoffpartikel im Süßwasser. *Nachrichten aus der Chemie* **2015**, 63, 46-50.
44. Bergmann, M.; Gutow, L.; Klages, M., *Marine Anthropogenic Litter*. Springer: Cham Heidelberg New York Dordrecht London, 2015.
45. Galgani, F.; Hanke, G.; Werner, S.; Oosterbaan, L.; Nilsson, P.; Fleet, D.; Kinsey, S.; Thompson, R. C.; van Franeker, J.; Vlachogianni, T.; Scoullou, M.; Veiga, J. M.; Palatinus, A.; Matiddi, M.; Maes, T.; Korpinen, S.; Budziak, A.; Leslie, H.; Gago, J.; Liebezeit, G., Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas. In *Litter, M. T. S. o. M.*, Ed. Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2013.
46. Peeken, I.; Primpke, S.; Beyer, B.; Gutermann, J.; Katlein, C.; Krumpfen, T.; Bergmann, M.; Hehemann, L.; Gerdts, G., Arctic Sea Ice is an Important Temporal Sink and Means of Transport for Microplastic. *Nat Commun* **2018**, 9, 1505-1517.
47. Schmid, T.; Opilik, L.; Blum, C.; Zenobi, R., Nanoscale Chemical Imaging Using Tip-Enhanced Raman Spectroscopy: A Critical Review. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, 52, 5940-5954.
48. Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.-H.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F., Terminology for Biorelated Polymers and Applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* **2012**, 84, 377-410.
49. Hartmann, N.; Huffer, T.; Thompson, R. C.; Hasselov, M.; Verschoor, A.; Daugaard, A. E.; Rist, S.; Karlsson, T. M.; Brennholt, N.; Cole, M.; Herrling, M. P.; Hess, M.; Ivleva, N. P.; Lusher, A. L.; Wagner, M., Are we Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environmental Science & Technology* **2019**, 53, 1039-1047.
50. Walton, W. H., Feret's Statistical Diameter as a Measure of Particle Size. *Nature* **1948**, 162, 329-330.
51. Boyes, W., Particle Sizing. In *Instrumentation Reference Book*. Butterworth-Heinemann: 2010.
52. Anger, P. M.; Prechtel, L.; Elsner, M.; Niessner, R.; Ivleva, N., Implementation of an Open Source Algorithm for Particle Recognition and Morphological Characterisation for Microplastic Analysis by Means of Raman Microspectroscopy. *Analytical Methods* **2019**, 11, 3483-3489.
53. Ng, K. L.; Obbard, J. P., Prevalence of Microplastics in Singapore's Coastal Marine Environment. *Marine Pollution Bulletin* **2006**, 52, 761-767.
54. Imhof, H. K.; Sigl, R.; Brauer, E.; Feyl, S.; Giesemann, P.; Klink, S.; Leupolz, K.; Loder, M. G.; Loschel, L. A.; Missun, J.; Muszynski, S.; Ramsperger, A. F.; Schrank, I.; Speck, S.; Steibl, S.; Trotter, B.; Winter, I.; Laforsch, C., Spatial and Temporal Variation of Macro-, Meso- and Microplastic Abundance on a Remote Coral Island of the Maldives, Indian Ocean. *Marine Pollution Bulletin* **2017**, 116, 340-347.
55. Lots, F. A. E.; Behrens, P.; Vijver, M. G.; Horton, A. A.; Bosker, T., A Large-scale Investigation of Microplastic Contamination: Abundance and Characteristics of Microplastics in European Beach Sediment. *Marine Pollution Bulletin* **2017**, 123, 219-226.
56. Van Cauwenberghe, L.; Vanreusel, A.; Mees, J.; Janssen, C. R., Microplastic Pollution in Deep-Sea Sediments. *Environmental Pollution* **2013**, 182, 495-499.

57. Eriksen, M.; Lebreton, L. C. M.; Carson, H. S.; Thiel, M.; Moore, C. J.; Borerro, J. C.; Galgani, F.; Ryan, P. G.; Reisser, J., 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*, 1-15.
58. Zarfl, C.; Matthies, M., Are Marine Plastic Particles Transport Vectors for Organic Pollutants to the Arctic? *Marine Pollution Bulletin* **2010**, *60*, 1810-1814.
59. Obbard, R. W., Microplastics in Polar Regions: The Role of Long Range Transport. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **2018**, *1*, 24-29.
60. Imhof, H. K.; Ivleva, N. P.; Schmid, J.; Niessner, R.; Laforsch, C., Contamination of Beach Sediments of a Subalpine Lake with Microplastic Particles. *Current Biology* **2013**, *23*, R867-868.
61. Zbyszewski, M.; Corcoran, P. L., Distribution and Degradation of Fresh Water Plastic Particles Along the Beaches of Lake Huron, Canada. *Water, Air, & Soil Pollution* **2011**, *220*, 365-372.
62. Gasperi, J.; Dris, R.; Bonin, T.; Rocher, V.; Tassin, B., Assessment of Floating Plastic Debris in Surface Water Along the Seine River. *Environmental Pollution* **2014**, *195*, 163-166.
63. Sadri, S. S.; Thompson, R. C., On the Quantity and Composition of Floating Plastic Debris Entering and Leaving the Tamar Estuary, Southwest England. *Marine Pollution Bulletin* **2014**, *81*, 55-60.
64. Mani, T.; Hauk, A.; Walter, U.; Burkhardt-Holm, P., Microplastics Profile Along the Rhine River. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 17988-17995.
65. Klein, S.; Worch, E.; Knepper, T. P., Occurrence and Spatial Distribution of Microplastics in River Shore Sediments of the Rhine-Main Area in Germany. *Environmental Science & Technology* **2015**, *49*, 6070-6076.
66. Biginagwa, F. J.; Mayoma, B. S.; Shashoua, Y.; Syberg, K.; Khan, F. R., First Evidence of Microplastics in the African Great Lakes: Recovery from Lake Victoria Nile Perch and Nile Tilapia. *Journal of Great Lakes Research* **2016**, *42*, 146-149.
67. Pivokonsky, M.; Cermakova, L.; Novotna, K.; Peer, P.; Cajthaml, T.; Janda, V., Occurrence of Microplastics in Raw and Treated Drinking Water. *Science of the Total Environment* **2018**, *643*, 1644-1651.
68. Simon, M.; van Alst, N.; Vollertsen, J., Quantification of Microplastic Mass and Removal Rates at Wastewater Treatment Plants Applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) Imaging. *Water Research* **2018**, *142*, 1-9.
69. Ziajahromi, S.; Neale, P. A.; Rintoul, L.; Leusch, F. D., Wastewater Treatment Plants as a Pathway for Microplastics: Development of a New Approach to Sample Wastewater-based Microplastics. *Water Research* **2017**, *112*, 93-99.
70. Murphy, F.; Ewins, C.; Carbonnier, F.; Quinn, B., Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environmental Science & Technology* **2016**, *50*, 5800-5808.
71. Mason, S. A.; Garneau, D.; Sutton, R.; Chu, Y.; Ehmann, K.; Barnes, J.; Fink, P.; Papazissimos, D.; Rogers, D. L., Microplastic Pollution is Widely Detected in US Municipal Wastewater Treatment Plant Effluent. *Environmental Pollution* **2016**, *218*, 1045-1054.
72. Carr, S. A.; Liu, J.; Tesoro, A. G., Transport and Fate of Microplastic Particles in Wastewater Treatment Plants. *Water Research* **2016**, *91*, 174-182.
73. Tagg, A. S.; Sapp, M.; Harrison, J. P.; Ojeda, J. J., Identification and Quantification of Microplastics in Wastewater Using Focal Plane Array-Based Reflectance Micro-FT-IR Imaging. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 6032-6040.
74. Rezaia, S.; Park, J.; Md Din, M. F.; Mat Taib, S.; Talaiekhazani, A.; Kumar Yadav, K.; Kamyab, H., Microplastics Pollution in Different Aquatic Environments and Biota: A Review of Recent Studies. *Marine Pollution Bulletin* **2018**, *133*, 191-208.
75. Pico, Y.; Alfarhan, A.; Barcelo, D., Nano and Microplastic Analysis: Focus on Remediation Technologies and Occurrence in Freshwater Ecosystems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *113*, 409-425.

76. Duis, K.; Coors, A., Microplastics in the Aquatic and Terrestrial Environment: Sources (with a Specific Focus on Personal Care Products), Fate and Effects. *Environmental Sciences Europe* **2016**, *28*, 1-25.
77. Storck, F. R.; Kools, S. A. E.; Rick-Pfeiffer, S., Microplastics in Fresh Water Resources. In *GWRC Science Brief September 2015*, Coalition, G. W. R., Ed. Global Water Research Coalition: Stirling, Australia, 2015.
78. Rocha-Santos, T.; Duarte, A. C., A Critical Overview of the Analytical Approaches to the Occurrence, the Fate and the Behavior of Microplastics in the Environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *65*, 47-53.
79. Eerkes-Medrano, D.; Thompson, R. C.; Aldridge, D. C., Microplastics in Freshwater Systems: A Review of the Emerging Threats, Identification of Knowledge Gaps and Prioritisation of Research Needs. *Water Research* **2015**, *75*, 63-82.
80. Dris, R.; Imhof, H.; Sanchez, W.; Gasperi, J.; Galgani, F.; Tassin, B.; Laforsch, C., Beyond the Ocean: Contamination of Freshwater Ecosystems with (Micro-)Plastic Particles. *Environmental Chemistry* **2015**, *12*, 539-550.
81. Wagner, M.; Lambert, S., *Freshwater Microplastics: Emerging Environmental Contaminants?*; Springer Nature: Cham, Switzerland, 2018.
82. Lohmann, R., Microplastics are not Important for the Cycling and Bioaccumulation of Organic Pollutants in the Oceans-but Should Microplastics be Considered POPs themselves? *Integrated Environmental Assessment and Management* **2017**, *13*, 460-465.
83. Lithner, D.; Larsson, A.; Dave, G., Environmental and Health Hazard Ranking and Assessment of Plastic Polymers Based on Chemical Composition. *Science of the Total Environment* **2011**, *409*, 3309-3324.
84. P. H. H. Araujo; C. Sayer; J. G. R. Poco; Giudici, R., Techniques for Reducing Residual Monomer Content in Polymers: A Review. *Polymer Engineering and Science* **2002**, *42*, 1442-1468.
85. Oberbeckmann, S.; Kreikemeyer, B.; Labrenz, M., Environmental Factors Support the Formation of Specific Bacterial Assemblages on Microplastics. *frontiers in Microbiology* **2018**, *8*, 1-12.
86. Oberbeckmann, S.; Labrenz, M., Marine Microbial Assemblages on Microplastics: Diversity, Adaptation and Role in Degradation. *Annual Review of Marine Science* **2020**, *12*, 2.1-2.24.
87. Wright, S. L.; Kelly, F. J., Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environmental Science & Technology* **2017**, *51*, 6634-6647.
88. Revel, M.; Châtel, A.; Mouneyrac, C., Micro(Nano)plastics: A Threat to Human Health? *Current Opinion in Environmental Science & Health* **2018**, *1*, 17-23.
89. Waring, R. H.; Harris, R. M.; Mitchell, S. C., Plastic Contamination of the Food Chain: A Threat to Human Health? *Maturitas* **2018**, *115*, 64-68.
90. Rist, S.; Carney Almroth, B.; Hartmann, N. B.; Karlsson, T. M., A Critical Perspective on Early Communications Concerning Human Health Aspects of Microplastics. *Science of the Total Environment* **2018**, *626*, 720-726.
91. Imhof, H. K.; Wiesheu, A. C.; Anger, P. M.; Niessner, R.; Ivleva, N. P.; Laforsch, C., Variation in Plastic Abundance at Different Lake Beach Zones - A Case Study. *Science of the Total Environment* **2018**, *613-614*, 530-537.
92. Kershaw, P. J.; Rochman, C. M., Sources, Fate and Effects of Microplastics in the Marine Environment: Part 2 of a Global Assessment. *Rep. Stud. GESAMP* **2016**, *93*.
93. Lusher, A. L.; Welden, N. A.; Sobral, P.; Cole, M., Sampling, Isolating and Identifying Microplastics Ingested by Fish and Invertebrates. *Analytical Chemistry* **2017**, *9*, 1346-1360.
94. Imhof, H. K.; Schmid, J.; Niessner, R.; Ivleva, N. P.; Laforsch, C., A Novel, Highly Efficient Method for the Separation and Quantification of Plastic Particles in Sediments of Aquatic Environments. *Limnology and Oceanography: Methods* **2012**, *10*, 524-537.

95. Coppock, R. L.; Cole, M.; Lindeque, P. K.; Queiros, A. M.; Galloway, T. S., A Small-scale, Portable Method for Extracting Microplastics from Marine Sediments. *Environmental Pollution* **2017**, 230, 829-837.
96. Dehaut, A.; Cassone, A. L.; Frere, L.; Hermabessiere, L.; Himber, C.; Rinnert, E.; Riviere, G.; Lambert, C.; Soudant, P.; Huvet, A.; Duflos, G.; Paul-Pont, I., Microplastics in Seafood: Benchmark Protocol for Their Extraction and Characterization. *Environmental Pollution* **2016**, 215, 223-233.
97. Tagg, A. S.; Harrison, J. P.; Ju-Nam, Y.; Sapp, M.; Bradley, E. L.; Sinclair, C. J.; Ojeda, J. J., Fenton's Reagent for the Rapid and Efficient Isolation of Microplastics from Wastewater. *Chemical Communications* **2016**, 53, 372-375.
98. Huppertsberg, S.; Knepper, T. P., Instrumental Analysis of Microplastics-Benefits and Challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2018**, 410, 6343-6352.
99. Braun, U.; Jekel, M.; Gerdts, G.; Ivleva, N. P.; Reiber, J., Diskussionspapier Mikroplastik-Analytik - Plastik in der Umwelt. **2018**.
100. Shim, W. J.; Hong, S. H.; Eo, S., Identification Methods in Microplastic Analysis: A Review. *Analytical Chemistry* **2016**, 9, 1384-1391.
101. Eriksen, M.; Mason, S.; Wilson, S.; Box, C.; Zellers, A.; Edwards, W.; Farley, H.; Amato, S., Microplastic Pollution in the Surface Waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin* **2013**, 77, 177-182.
102. Majewsky, M.; Bitter, H.; Eiche, E.; Horn, H., Determination of Microplastic Polyethylene (PE) and Polypropylene (PP) in Environmental Samples Using Thermal Analysis (TGA-DSC). *Science of the Total Environment* **2016**, 568, 507-511.
103. Maes, T.; Jessop, R.; Wellner, N.; Haupt, K.; Mayes, A. G., A Rapid-screening Approach to Detect and Quantify Microplastics Based on Fluorescent Tagging with Nile Red. *Scientific Reports* **2017**, 7, 44501-44511.
104. Song, Y. K.; Hong, S. H.; Jang, M.; Han, G. M.; Rani, M.; Lee, J.; Shim, W. J., A Comparison of Microscopic and Spectroscopic Identification Methods for Analysis of Microplastics in Environmental Samples. *Marine Pollution Bulletin* **2015**, 93, 202-209.
105. Dekiff, J. H.; Remy, D.; Klasmeier, J.; Fries, E., Occurrence and Spatial Distribution of Microplastics in Sediments from Norderney. *Environmental Pollution* **2014**, 186, 248-256.
106. Wesch, C.; Barthel, A.-K.; Braun, U.; Klein, R.; Paulus, M., No Microplastics in Benthic Eelpout (*Zoarces Viviparus*): An Urgent Need for Spectroscopic Analyses in Microplastic Detection. *Environmental Research* **2016**, 148, 36-38.
107. Liebezeit, G.; Liebezeit, E., Synthetic Particles as Contaminants in German Beers. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2014**, 31, 1574-1578.
108. Wiesheu, A. C.; Anger, P. M.; Baumann, T.; Niessner, R.; Ivleva, N. P., Raman Microspectroscopic Analysis of Fibers in Beverages. *Analytical Methods* **2016**, 8, 5722-5725.
109. Fries, E.; Dekiff, J. H.; Willmeyer, J.; Nuelle, M.-T.; Ebert, M.; Remy, D., Identification of Polymer Types and Additives in Marine Microplastic Particles Using Pyrolysis-GC/MS and Scanning Electron Microscopy. *Environmental Science: Processes & Impacts* **2013**, 15, 1949-1956.
110. Fischer, M.; Scholz-Böttcher, B. M., Simultaneous Trace Identification and Quantification of Common Types of Microplastics in Environmental Samples by Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology* **2017**, 51, 5052-5060.
111. Nuelle, M.-T.; Dekiff, J. H.; Remy, D.; Fries, E., A New Analytical Approach for Monitoring Microplastics in Marine Sediments. *Environmental Pollution* **2014**, 184, 161-169.
112. Mintenig, S. M.; Bäumlein, P. S.; Koelmans, A. A.; Dekker, S. C.; van Wezel, A. P., Closing the Gap Between Small and Smaller: Towards a Framework to Analyse Nano- and Microplastics in Aqueous Environmental Samples. *Environmental Science: Nano* **2018**, 5, 1640-1649.

113. Dümichen, E.; Braun, U.; Senz, R.; Fabian, G.; Sturm, H., Assessment of a New Method for the Analysis of Decomposition Gases of Polymers by a Combining Thermogravimetric Solid-Phase Extraction and Thermal Desorption Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2014**, 1354, 117-128.
114. Dümichen, E.; Barthel, A. K.; Braun, U.; Bannick, C. G.; Brand, K.; Jekel, M.; Senz, R., Analysis of Polyethylene Microplastics in Environmental Samples, Using a Thermal Decomposition Method. *Water Research* **2015**, 85, 451-457.
115. Dümichen, E.; Eisentraut, P.; Bannick, C. G.; Barthel, A. K.; Senz, R.; Braun, U., Fast Identification of Microplastics in Complex Environmental Samples by a Thermal Degradation Method. *Chemosphere* **2017**, 174, 572-584.
116. Eisentraut, P.; Dümichen, E.; Ruhl, A. S.; Jekel, M.; Albrecht, M.; Gehde, M.; Braun, U., Two Birds with One Stone—Fast and Simultaneous Analysis of Microplastics: Microparticles Derived from Thermoplastics and Tire Wear. *Environmental Science & Technology Letters* **2018**, 5, 608-613.
117. Dümichen, E.; Eisentraut, P.; Celina, M.; Braun, U., Automated Thermal Extraction-Desorption Gas Chromatography Mass Spectrometry: A Multifunctional Tool for Comprehensive Characterization of Polymers and their Degradation Products. *Journal of Chromatography A* **2019**, 1592, 133-142.
118. Griffiths, P. R.; Haseth, J. A. d., *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, New Jersey, 2007.
119. Salzer, R.; Siesler, H. W., *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. WILEY-VCH Verlag GmbH Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2014.
120. Chalmers, J. M.; Edwards, H. G. M.; Hargreaves, M. F., *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*. John Wiley & Sons Inc.: Chichester, West Sussex, 2012.
121. Schrader, B., *Infrared and Raman Spectroscopy - Methods and Applications*. VCH Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim, Germany, 1995.
122. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., *Instrumentelle Analytik*. Springer Spektrum: Berlin Heidelberg, 2013.
123. Löder, M. G. J.; Kuczera, M.; Mintenig, S.; Lorenz, C.; Gerdts, G., Focal Plane Array Detector-Based Micro-Fourier-Transform Infrared Imaging for the Analysis of Microplastics in Environmental Samples. *Environmental Chemistry* **2015**, 12, 563-581.
124. Primpke, S.; Wirth, M.; Lorenz, C.; Gerdts, G., Reference Database Design for the Automated Analysis of Microplastic Samples Based on Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2018**, 410, 5131-5141.
125. Renner, G.; Schmidt, T. C.; Schram, J., A New Chemometric Approach for Automatic Identification of Microplastics from Environmental Compartments Based on FT-IR Spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2017**, 89, 12045-12053.
126. Renner, G.; Nellessen, A.; Schwiers, A.; Wenzel, M.; Schmidt, T. C.; Schram, J., Data Preprocessing & Evaluation Used in the Microplastics Identification Process: A Critical Review & Practical Guide. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, 111, 229-238.
127. Ferraro, J. R.; Nakamoto, K.; Brown, C. W., Chapter 1 - Basic Theory. In *Introductory Raman Spectroscopy (Second Edition)*. Academic Press: San Diego, 2003; pp 1-94.
128. Smith, E.; Dent, G., *Modern Raman Spectroscopy: a Practical Approach*. John Wiley & Sons: Chichester, United Kingdom, 2013.
129. Vandenabeele, P., *Practical Raman Spectroscopy - An Introduction*. John Wiley & Sons, Ltd: The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom, 2013.
130. McCreery, R. L., *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. Wiley-Interscience: 2002; Vol. 157.
131. Zoubir, A., *Raman Imaging*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin Heidelberg, 2012; Vol. 1.

132. Turrell, G.; Corset, J., *Raman Microscopy: Developments and Applications*. Elsevier Academic Press: London, 1996.
133. Ribeiro-Claro, P. J. A.; Nolasco, M. M.; Araujo, C. F., Characterization of Microplastics by Raman Spectroscopy. In *Characterization and Analysis of Microplastics*. 2017; Vol. 75.
134. Käppler, A.; Fischer, D.; Oberbeckmann, S.; Schernewski, G.; Labrenz, M.; Eichhorn, K. J.; Voit, B., Analysis of Environmental Microplastics by Vibrational Microspectroscopy: FTIR, Raman or Both? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, 408, 8377-8391.
135. Smekal, A., Zur Quantentheorie der Dispersion. *Naturwissenschaften* **1923**, 11, 873-875.
136. Raman, C. V., A New Radiation. *Indian Journal of physics* **1928**, 2, 387-398.
137. Raman, C. V.; Krishnan, K. S., The Production of New Radiations by Light Scattering. Part I. *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **1929**, 122, 23-35.
138. Landsberg, G.; Mandelstam, L., Eine neue Erscheinung bei der Lichtzerstreuung in Krystallen. *Naturwissenschaften* **1928**, 16, 557-558.
139. Bower, D. I.; Maddams, W. F., The Characterization of Polymers. In *The vibrational spectroscopy of polymers*. Davis, E. A.; Ward, I. M., Eds. Cambridge University Press: Cambridge, United Kingdom, 1989; pp 162-226.
140. Opilik, L.; Schmid, T.; Zenobi, R., Modern Raman Imaging: Vibrational Spectroscopy on the Micrometer and Nanometer Scales. *Annual Review on Analytical Chemistry* **2013**, 6, 379-398.
141. Stewart, S.; Priore, R. J.; Nelson, M. P.; Treado, P. J., Raman Imaging. *Annual Review on Analytical Chemistry* **2012**, 5, 337-360.
142. Overall, N. J., Confocal Raman Microscopy: Common Errors and Artefacts. *Analyst* **2010**, 135, 2512-2522.
143. Elsner, P., *Kunststoffe - Eigenschaften und Anwendungen*. Springer-Verlag: Heidelberg, 2012.
144. Frère, L.; Paul-Pont, I.; Moreau, J.; Soudant, P.; Lambert, C.; Huvet, A.; Rinnert, E., A Semi-automated Raman Micro-spectroscopy Method for Morphological and Chemical Characterizations of Microplastic Litter. *Marine Pollution Bulletin* **2016**, 113, 461-468.
145. Ossmann, B. E.; Sarau, G.; Holtmannspotter, H.; Pischetsrieder, M.; Christiansen, S. H.; Dicke, W., Small-sized Microplastics and Pigmented Particles in Bottled Mineral Water. *Water Research* **2018**, 141, 307-316.
146. Sujathan, S.; Kniggendorf, A. K.; Kumar, A.; Roth, B.; Rosenwinkel, K. H.; Nogueira, R., Heat and Bleach: A Cost-Efficient Method for Extracting Microplastics from Return Activated Sludge. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **2017**, 73, 641-648.
147. Otting, W., *Der Raman-Effekt und seine analytische Anwendung*. Springer-Verlag: Berlin Göttingen Heidelberg, 1952; Vol. 5.
148. Vandenabeele, P., Raman Instrumentation. In *Practical Raman Spectroscopy - An Introduction*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, United Kingdom, 2013.
149. Gail, L.; Gommel, U.; Hortig, H.-P., *Reinraumtechnik*. Springer: Heidelberg Dordrecht London New York, 2012; Vol. 3.
150. Raumfahrtproduktsicherung - Überwachung der Teilchenkontamination von Raumfahrzeugsystemen und Reinräumen; Englische Fassung EN 16602-70-50:2015. In *DIN EN 16602-70-50*, Norm, D., Ed. 2015.
151. Giancoli, D. C., *Physik*. Pearson Education Deutschland GmbH: München, 2016.
152. Lilienfeld, P., Optical Detection of Particle Contamination on Surfaces A Review. *Aerosol Science and Technology* **1986**, 5, 145-165.
153. Bergua, A., *Das menschliche Auge in Zahlen*. Springer-Verlag GmbH Deutschland: Berlin, 2017.
154. Eichler, J., *Laser und Strahlenschutz*. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH: Braunschweig Wiesbaden, 1992.

155. Schäfer, O., Detektion von Partikeln auf planen Oberflächen (Si-Wafer). In Dortmund, U., Ed. Dortmund, 1989.
156. Wirth, M.; Frascini, M.; Masek, M.; Bruynooghe, M., Performance Evaluation in Image Processing. *EURASIP Journal on Advances in Signal Processing* **2006**, 2006, 1-3.
157. Udupa, J. K.; Leblanc, V. R.; Zhuge, Y.; Imielinska, C.; Schmidt, H.; Currie, L. M.; Hirsch, B. E.; Woodburn, J., A Framework for Evaluating Image Segmentation Algorithms. *Computerized Medical Imaging and Graphics* **2006**, 30, 75-87.
158. Chen, Y.; Ming, D.; Zhao, L.; Lv, B.; Zhou, K.; Qing, Y., Review on High Spatial Resolution Remote Sensing Image Segmentation Evaluation. *Photogrammetric Engineering & Remote Sensing* **2018**, 84, 629-646.
159. Zhang, Y. J., A Survey on Evaluation Methods for Image Segmentation. *Pattern Recognition* **1996**, 29, 1335-1346.
160. Zhang, H.; Fritts, J. E.; Goldman, S. A., Image Segmentation Evaluation: A Survey of Unsupervised Methods. *Computer Vision and Image Understanding* **2008**, 110, 260-280.
161. Bittrich, L.; Brandt, J., *Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.* **2018**, <https://gitlab.ipfdd.de/GEPARD/gepard>.
162. Erni-Cassola, G.; Gibson, M. I.; Thompson, R. C.; Christie-Oleza, J. A., Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20  $\mu$ m) in Environmental Samples. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, 51, 13641-13648.
163. Primpke, S.; Lorenz, C.; Rascher-Friesenhausen, R.; Gerdts, G., An automated approach for microplastics analysis using focal plane array (FPA) FTIR microscopy and image analysis. *Anal. Methods* **2017**, 9, 1499-1511.
164. Prata, J. C.; Reis, V.; T.V.Matos, J.; Costa, J. P. d.; Duarte, A. C.; Rocha-Santos, T., A New Approach for Routine Quantification of Microplastics Using Nile Red and Automated Software (MP-VAT). *Science of the Total Environment* **2019**, 690, 1277-1283.
165. Otsu, N., A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* **1979**, 9, 62-66.
166. Kauermann, G.; Küchenhoff, H., Stichproben - Methoden und praktische Umsetzung mit R. In Springer: Berlin, Heidelberg, 2011.
167. Valliant, R.; Dever, J. A.; Kreuter, F., Sample Design and Sample Size for Single-Stage Surveys. In *Practical Tools for Designing and Weighting Survey Samples*. Springer: New York Heidelberg Dordrecht London, 2013; pp 37-39.
168. Myers, J. C., Normal Distribution Function. In *Geostatistical Error Management*. 1997; pp 134-151.
169. WITecGmbH, Topographic Confocal Raman Microscopy of Archaeology Samples - Application Note.
170. WITecGmbH, Food Analysis with Confocal Raman Microscopy - Application Note.
171. Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W., NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nature methods* **2012**, 9, 671-675.
172. Domogalla-Urbansky, J.; Anger, P. M.; Ferling, H.; Rager, F.; Wiesheu, A. C.; Niessner, R.; Ivleva, N. P.; Schwaiger, J., 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**, 2007-2012.
173. Käßler, A.; Fischer, M.; Scholz-Böttcher, B. M.; Oberbeckmann, S.; Labrenz, M.; Fischer, D.; Eichhorn, K. J.; Voit, B., Comparison of  $\mu$ -ATR-FTIR Spectroscopy and py-GC-MS as Identification Tools for Microplastic Particles and Fibers Isolated from River Sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2018**, 5313-5327.
174. Ossmann, B. E.; Sarau, G.; Schmitt, S. W.; Holtmannspotter, H.; Christiansen, S. H.; Dicke, W., Development of an Optimal Filter Substrate for the Identification of Small Microplastic Particles in Food by Micro-Raman Spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2017**, 4099-4109.

## Anhang – A – Optimierung verschiedener RAMAN-Parameter

Tabelle 24: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den PC-Filter mit Goldbeschichtung.

		PC mit Goldbeschichtung			
		Hellfeld	Dunkelfeld	Fs 470/40	Fs 592/24
PC	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PS	20x	1	1	1	-1
	50xLD	0	1	0	-1
PET	20x	1	1	1	1
	50xLD	-1	1	1	-1
PMMA	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	0	0	-1	-1
PA	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PTFE	20x	1	0	-1	-1
	50xLD	0	0	-1	-1
PVC(schwarz)	20x	1	1	0	-1
	50xLD	1	1	1	-1
PE	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PVC(weiß)	20x	1	1	1	-1
	50xLD	1	1	0	-1
PP	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PVAC	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
POM	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	-1	1	-1	-1

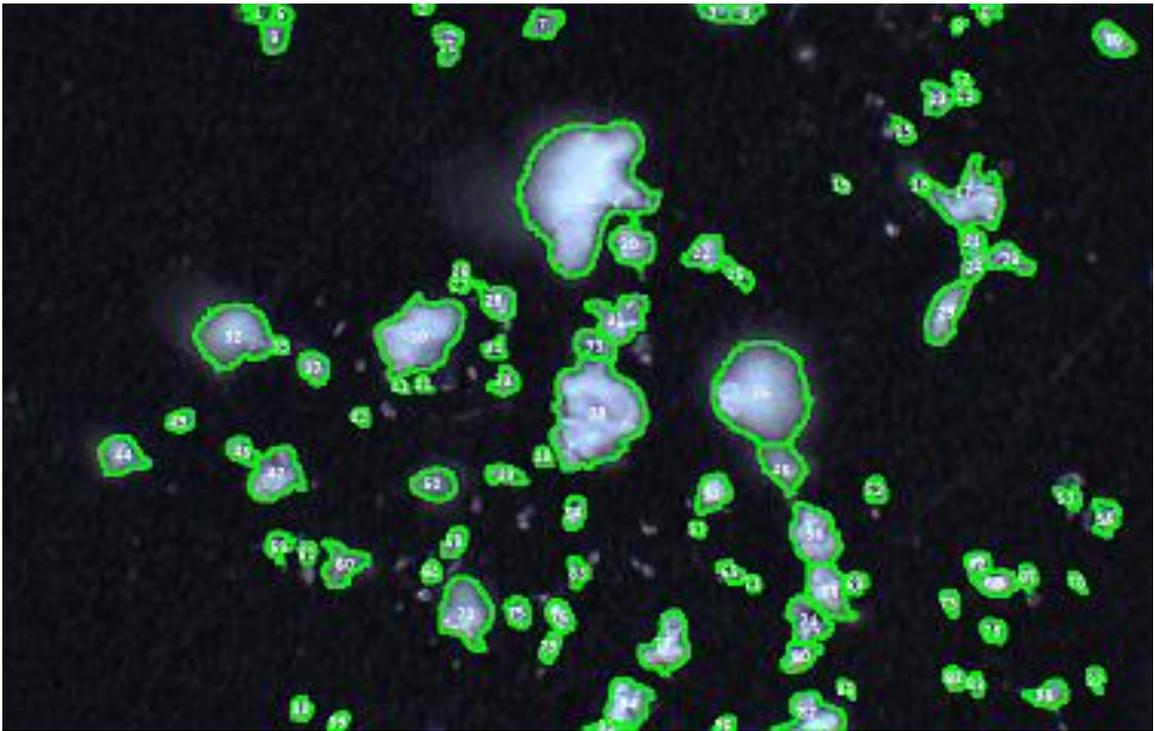


Abbildung 34: PTFE-Partikel im Dunkelfeld auf PC mit Goldbeschichtung aufgenommen mit einem 20× Objektiv. Klassifizierung 0. (Abmessungen Bild: 450  $\mu\text{m}$   $\times$  300  $\mu\text{m}$ )

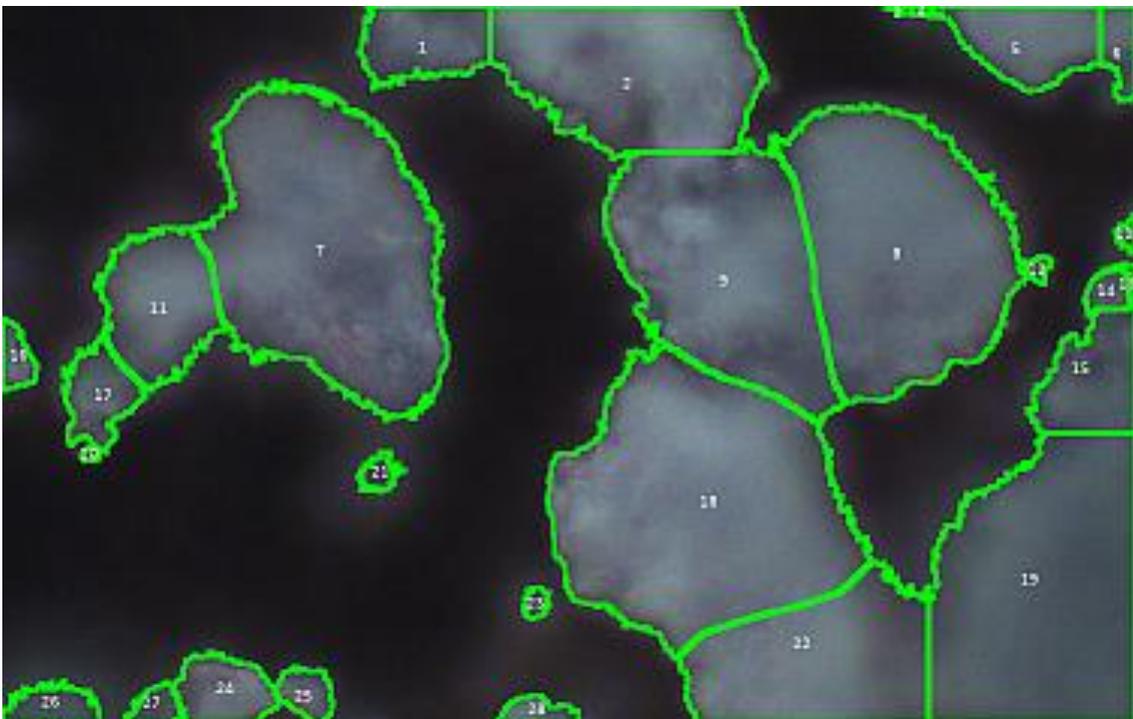


Abbildung 35: schwarze PVC-Partikel im Dunkelfeld auf PC mit Goldbeschichtung aufgenommen mit einem 50× Objektiv mit großem Arbeitsabstand. Klassifizierung 1. (Abmessungen Bild: 180  $\mu\text{m}$   $\times$  110  $\mu\text{m}$ )

Tabelle 25: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den PC-Filter.

		PC			
		Hellfeld	Dunkelfeld	Fs 470/40	Fs 592/24
PC	20x	-1	1	-1	-1
	50xLD	-1	1	-1	-1
PS	20x	-1	1	0	0
	50xLD	-1	0	-1	-1
PET	20x	-1	1	1	1
	50xLD	-1	1	1	1
PMMA	20x	-1	0	-1	-1
	50xLD	-1	0	-1	-1
PA	20x	-1	1	0	-1
	50xLD	-1	1	-1	-1
PTFE	20x	-1	1	-1	-1
	50xLD	-1	0	-1	-1
PVC(schwarz)	20x	0	1	1	-1
	50xLD	-1	-1	1	-1
PE	20x	0	1	-1	-1
	50xLD	-1	1	-1	-1
PVC(weiß)	20x	-1	1	1	-1
	50xLD	-1	1	1	-1
PP	20x	-1	1	1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PVAC	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
POM	20x	-1	1	1	-1
	50xLD	-1	1	1	-1

Tabelle 26: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den Nitrocellulose-Filter.

		Nitrocellulose			
		Hellfeld	Dunkelfeld	Fs 470/40	Fs 592/24
PC	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	0	0	-1	-1
PS	20x	0	0	-1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
PET	20x	0	0	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PMMA	20x	0	-1	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PA	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
PTFE	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PVC(schwarz)	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	0	-1	-1	-1
PE	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PVC(weiß)	20x	1	0	-1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
PP	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PVAC	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	0	-1	-1	-1
POM	20x	-	-	-	-
	50xLD	-	-	-	-

Tabelle 27: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den Silicium-Filter.

		Silicium			
		Hellfeld	Dunkelfeld	Fs 470/40	Fs 592/24
PC	20x	1	1	0	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PS	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PET	20x	1	1	1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PMMA	20x	0	0	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PA	20x	1	1	1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PTFE	20x	0	0	-1	-1
	50xLD	0	1	-1	-1
PVC(schwarz)	20x	1	1	1	-1
	50xLD	0	1	0	-1
PE	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PVC(weiß)	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PP	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
PVAC	20x	1	1	-1	-1
	50xLD	1	1	-1	-1
POM	20x	1	1	1	-1
	50xLD	1	1	1	-1

Tabelle 28: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den PES-Filter.

		PES			
		Hellfeld	Dunkelfeld	Fs 470/40	Fs 592/24
PC	20x	1	-1	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PS	20x	1	-1	-1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
PET	20x	1	-1	1	1
	50xLD	1	-1	1	1
PMMA	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PA	20x	1	-1	-1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
PTFE	20x	0	-1	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PVC(schwarz)	20x	1	-1	-1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
PE	20x	1	-1	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PVC(weiß)	20x	1	-1	-1	-1
	50xLD	1	-1	1	-1
PP	20x	1	-1	-1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
PVAC	20x	1	-1	-1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
POM	20x	1	-1	1	-1
	50xLD	-1	1	-1	-1

Tabelle 29: Einzelwerte der Übereinstimmung zwischen Partikelerkennung und tatsächlicher Partikelzahl für die Beleuchtungsmodi Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzanregung bei 470/40 (Fs 470/40) und Fluoreszenzanregung bei 592/24 (Fs 592/24) für den PTFE-Filter.

		PTFE			
		Hellfeld	Dunkelfeld	Fs 470/40	Fs 592/24
PC	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PS	20x	1	1	1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
PET	20x	1	-1	1	1
	50xLD	1	-1	1	1
PMMA	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	-1	-1	-1	-1
PA	20x	1	1	0	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
PTFE	20x	0	1	0	-1
	50xLD	-1	1	-1	-1
PVC(schwarz)	20x	1	-1	1	-1
	50xLD	0	-1	1	-1
PE	20x	-1	0	-1	-1
	50xLD	-1	0	-1	-1
PVC(weiß)	20x	1	1	1	-1
	50xLD	-1	1	0	-1
PP	20x	-1	-1	-1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
PVAC	20x	0	-1	-1	-1
	50xLD	1	-1	-1	-1
POM	20x	1	1	1	-1
	50xLD	-1	1	1	-1

Die Rohdaten zu diesem Kapitel sind über ein Repository auf gitlab einsehbar. Der Zugang hierzu wird auf Anfrage über [p.anger@tum.de](mailto:p.anger@tum.de) freigeschalten.

In Abbildung 36 und Abbildung 37 ist der Vergleich des Höhenprofils für einen sauberen Silicium-Filter gezeigt. Abbildung 36 zeigt das Höhenprofil, das mit *median filter size = 0* erhalten wird, bei Abbildung 37 ist diese Software-Einstellung auf den Wert 1 gesetzt. Dies war nötig, da die in Abbildung 36 zu sehenden Spitzen Artefakte der *TrueSurface*-Option darstellen und nicht das reale Oberflächenprofil widerspiegeln.

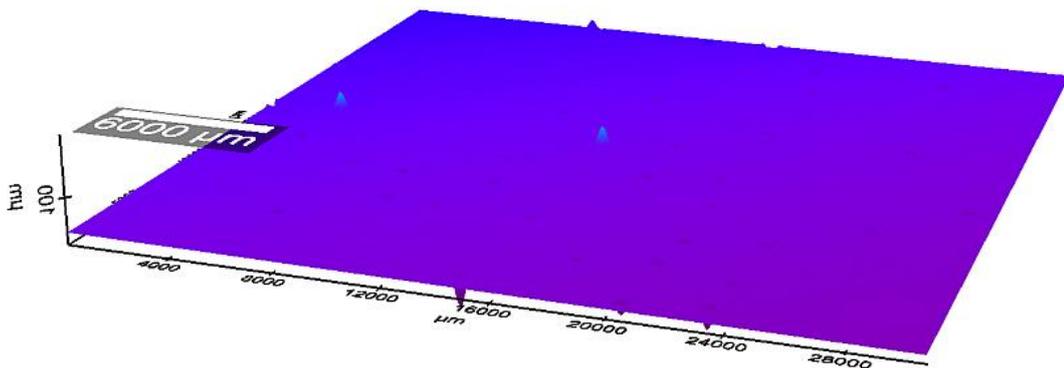


Abbildung 36: Höhenprofil eines sauberen Silicium-Filter mit ca. 50 mm Durchmesser, *median filter size = 0*.

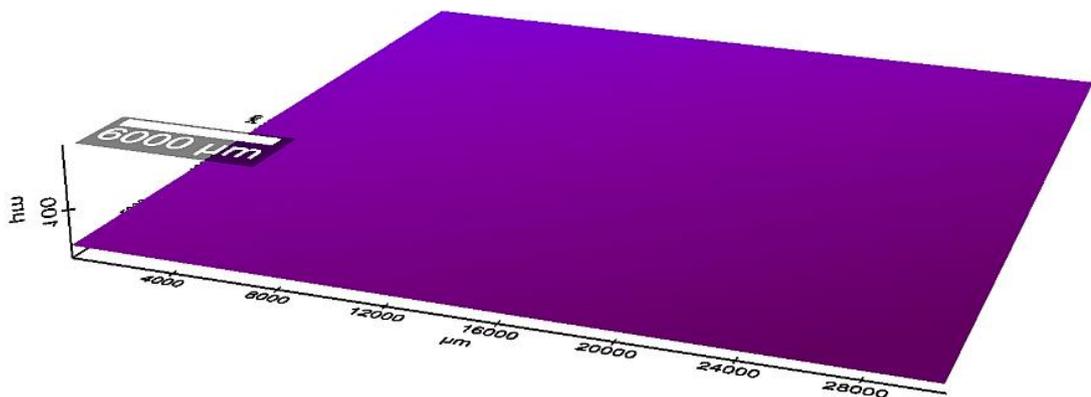


Abbildung 37: Höhenprofil eines sauberen Silicium-Filter mit ca. 50 mm Durchmesser, *median filter size = 1*.

## Anhang – B – Kontaminationskontrolle

In Tabelle 30 sind die Ergebnisse für die Validierung des *TLS* für das Kriterium Partikelaufnahme und -wiederfindung gezeigt. In Tabelle 31 sind die Ergebnisse für die Validierung des *TLS* für das Kriterium Klebedauerhaftigkeit gezeigt.

Tabelle 30: Zahl der PS-Partikel auf einem Glasträger vor (Partikel vorher) Anwendung des entsprechenden Klebebandes und wiedergefundene Zahl an PS-Partikel auf dem Klebeband (Partikel nachher) für das Kriterium Partikelaufnahme und -wiederfindung.

Partikelaufnahme und -wiederfindung			
Klebeband	Wiederholung	Partikel vorher	Partikel nachher
3M-4828	1	7	1
	2	5	2
	3	4	1
KS-29-T-12	1	4	0
	2	4	2
	3	3	3
tesafilm® TRANSPARENT	1	9	6
	2	2	2
	3	8	5
Shurtape J-LAR®	1	2	1
	2	12	10
	3	3	3

Tabelle 31: Einzelwerte der PS-Partikel auf einem Glasträger vor (Partikel vorher) Anwendung des entsprechenden Klebebandes und wiedergefundene Zahl an PS-Partikel auf dem Klebeband (Partikel nachher) für das Kriterium Klebedauerhaftigkeit.

Klebedauerhaftigkeit			
Klebeband	Wiederholung	Partikel vorher	Partikel nachher
3M-4828	1	4	2
	2	4	1
	3	5	3
KS-29-T-12	1	2	0
	2	3	2
	3	11	9
tesafilm® TRANSPARENT	1	4	3
	2	5	2
	3	2	2
	4	9	7
Shurtape J-LAR®	1	9	8
	2	1	1
	3	2	2

Die Rohdaten zu diesem Kapitel sind über ein Repositoryum auf gitlab einsehbar. Der Zugang hierzu wird auf Anfrage über [p.anger@tum.de](mailto:p.anger@tum.de) freigeschalten.

## Anhang – C – Partikelerkennung

### *Funktionalität der Partikelerkennungssoftware*

Der Ablauf der Partikelerkennung ist in Abbildung 38 gezeigt. Zunächst wird das Originalbild in ein Graustufenbild umgewandelt. Auf dieses kann OTSU's Algorithmus angewendet werden. Dieser teilt das Bild in zwei Klassen, die im nächsten Schritt schwarz (Partikel) und weiß (Hintergrund) dargestellt werden (S/W-Bild). Im S/W-Bild werden im darauffolgenden Schritt zusammenhängende Partikel-Pixel gezählt und aus der Auflösung die Größen der Partikel bestimmt. In Abbildung 38d ist dies durch die blaue Umrandung dargestellt. Außerdem werden die Koordinaten der Partikelzentren  $x_c$  und  $y_c$  nach Formel 9 berechnet ( $y_c$  wird analog zu  $x_c$  berechnet).

$$x_c = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N x_i \quad \text{Formel 9}$$

$N$  stellt in Formel 9 die Zahl der Pixel dar, die zu einem Partikel gehören. Das Ergebnis der Partikelerkennung wird im letzten Schritt mit dem Originalbild überlagert.

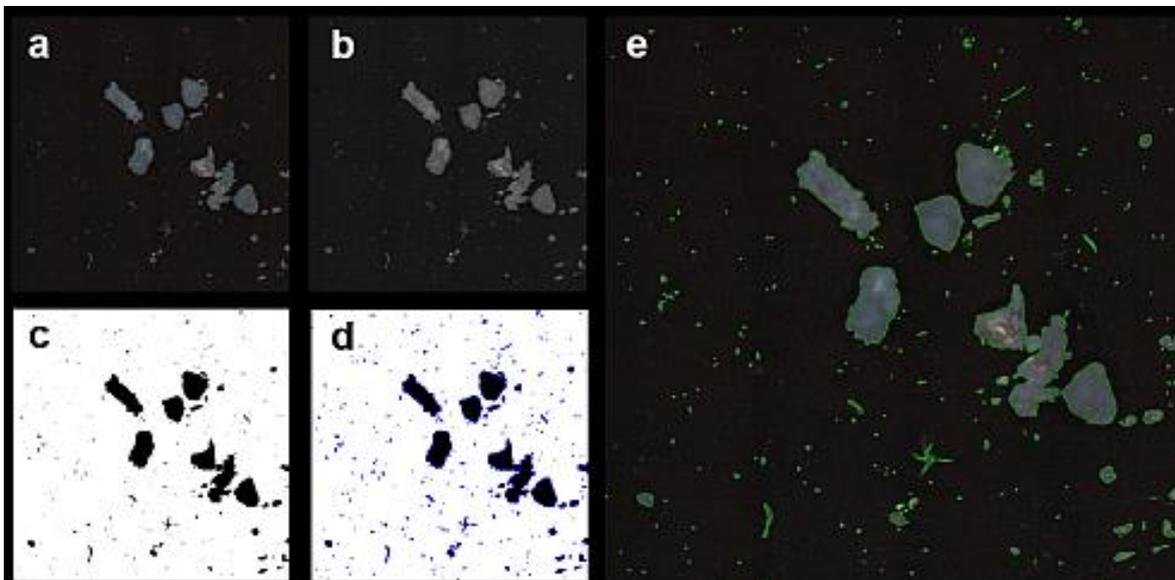


Abbildung 38: Schema der Partikelerkennung: a) Originalbild, b) Umwandlung in Graustufenbild, c) Umwandlung in S/W-Bild und Einteilung in Partikel und Hintergrund durch OTSU's Algorithmus, d) Größenbestimmung der Partikel, e) Überlagerung des Originalbildes mit der Partikelerkennung. Entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Seitenlänge Bild: 4096  $\mu\text{m}$ )

Zur besseren Erkennbarkeit der blauen Umrandung ist Abbildung 38d in Abbildung 39 vergrößert dargestellt.

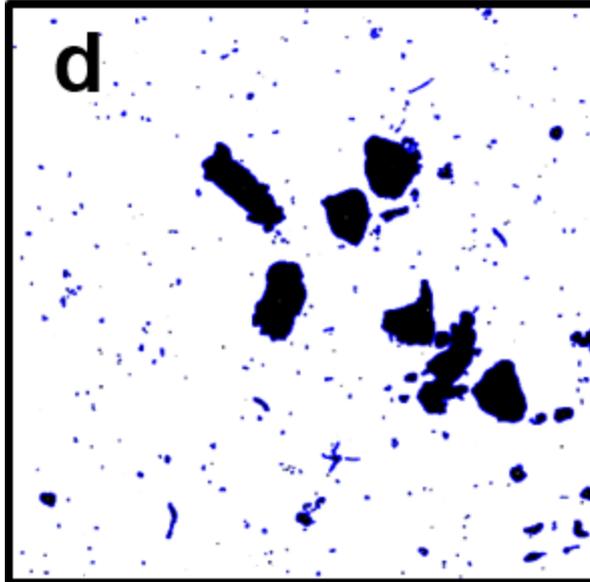


Abbildung 39: Vergrößerung von Abbildung 38d. (Seitenlänge Bild: 4096  $\mu\text{m}$ )

Das Programm kann über eine *graphical user interface* (GUI) gesteuert werden (Abbildung 40). Im linken Teil wird das Originalbild angezeigt, das über *Open Image* geöffnet werden kann. Das Programm akzeptiert Bilder im *windows bitmap* (.bmp)- oder *portable network graphic* (.png)-Format. Im mittleren Teil ist das mit dem Ergebnis der Partikelerkennung überlagerte Originalbild zu sehen. Dieser Schritt wird durch die Schaltfläche *Analyze* gestartet. Auf der rechten Seite befinden sich verschiedene Funktionalitäten zur Bildbearbeitung.

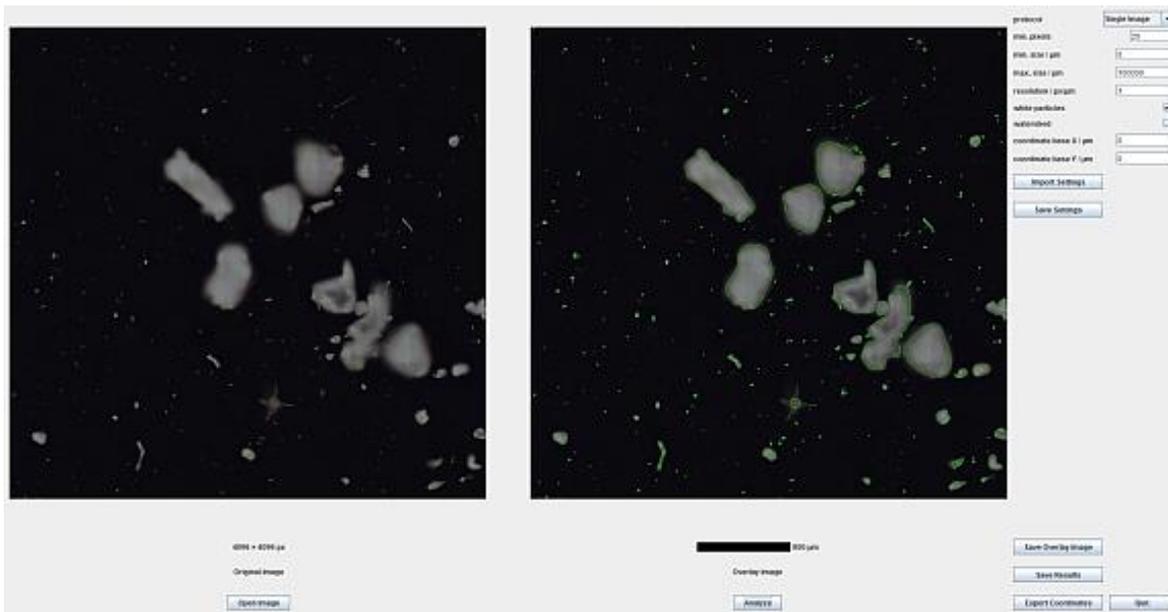


Abbildung 40: Graphische Benutzeroberfläche (GUI) des Programms. Entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry. (Seitenlänge Bild: 4096  $\mu\text{m}$ )

Um die Partikelerkennung durchzuführen, gibt es zwei Möglichkeiten Bilder in das Programm zu laden. Über die Schaltfläche *protocol* oben rechts in der GUI kann ausgewählt werden, ob es sich um ein einzelnes Bild handelt (*Single Image*) oder um eine Serie von Bildern, die zusammengeführt werden sollen (*Stitching Image*). Über die Eingabemöglichkeit *min. pixels* wird die Mindestzahl an Pixeln bestimmt, ab der zusammenhängende Pixel als Partikel gezählt werden. Über die Möglichkeit *min. size /  $\mu\text{m}$*  wird ebenfalls eine Mindestgröße des Partikels bestimmt. In diesem Fall wird der Mindest-FERET-Durchmesser angegeben. Mit der Eingabefläche *max. size /  $\mu\text{m}$*  hingegen kann der maximale FERET-Durchmesser angegeben werden, der für die gefundenen Partikel akzeptiert werden soll. Im Eingabefeld *resolution /  $\text{px } \mu\text{m}^{-1}$*  wird die Auflösung des Bildes angegeben. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Auflösung des Bildes in x- und y- Richtung gleich sein sollte, da es nur die Möglichkeit der Eingabe eines Auflösungswertes gibt. Wird die Box *white particles* aktiviert, werden im Originalbild helle Strukturen als Partikel erkannt und dunkle als Hintergrund. Dies ist beispielsweise bei Dunkelfeldbildern der Fall. Wird die Box *white particles* nicht aktiviert, werden umgekehrt helle Strukturen als Hintergrund erkannt und dunkle als Partikel. Dies wäre beispielsweise für Hellfeldbilder die richtige Analysenmethode. Mit der Box *watershed* kann die Wasserscheiden-Transformation zugeschaltet werden.

Dies ist bei Bildern mit vielen Agglomeraten sinnvoll. Schließlich werden über die Felder *coordinate base X /  $\mu\text{m}$*  und *coordinate base Y /  $\mu\text{m}$*  die Koordinaten des Bildmittelpunktes angegeben. Von diesem aus werden die Koordinaten der Partikelzentren berechnet. Zusätzlich gibt es noch die Möglichkeit Einstellungen über *Save Settings* zu speichern und über *Import Settings* zu laden.

Das Ergebnis der Partikelerkennung kann als überlagertes Bild mittels *Save Overlay Image* gespeichert werden. Die Ergebnisse können außerdem als *comma-separated value* (.csv)-Datei ausgegeben werden. Hierbei gibt es die Möglichkeit über *Save Results* die Koordinaten, den maximalen und den minimalen FERET-Durchmesser, sowie die Fläche der Partikel zu speichern. Über *Export Coordinates* werden die Partikel durchnummeriert und nur mit den Koordinaten gespeichert. Das Programm kann schließlich über die Schaltfläche *Quit* beendet werden.

Die Voreinstellungen, die für die Auswertung der Bilder in Kapitel 5.4 und im Anhang verwendet wurden, zeigt Tabelle 32:

Tabelle 32: Voreinstellungen der Partikelerkennungs-Software.

<i>min. pixels</i>	20	<i>max. size / <math>\mu\text{m}</math></i>	100000
<i>min. size / <math>\mu\text{m}</math></i>	0	<i>resolution / <math>\text{px } \mu\text{m}^{-1}</math></i>	1

Die Rohdaten zu diesem Kapitel sind über ein Repository auf gitlab einsehbar. Der Zugang hierzu wird auf Anfrage über [p.anger@tum.de](mailto:p.anger@tum.de) freigeschalten.

Die gezeigten Bilder und deren Validierung sind entnommen aus ANGER und PRECHTL et al. [52] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry.

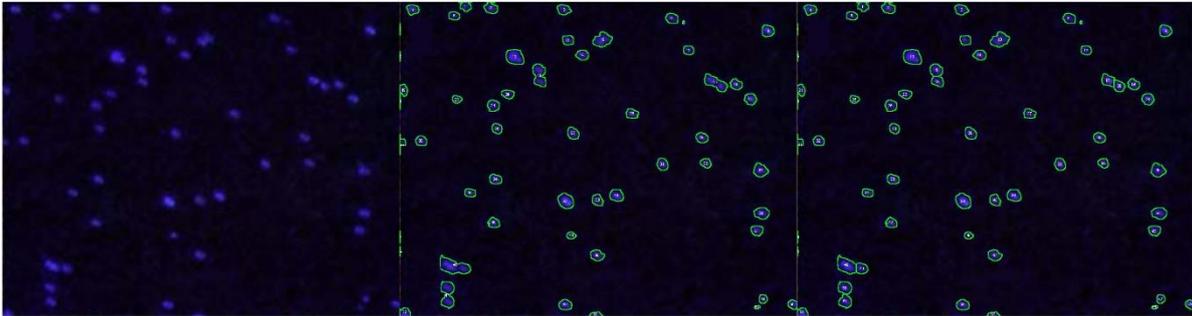


Abbildung 41: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4f; Box “white particles” aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163  $\mu\text{m}$ )

Tabelle 33: Genauigkeit der Bildererkennung in Abbildung 41

	# Partikel	Übereinstimmung / %	falsch negative	falsch positive
Experte	50			
OTSU	53	92.0	4	7
OTSU + Wasserscheide	57	100	0	7

Tabelle 34: Verlässlichkeit der Bildererkennung in Abbildung 41

	# Partikel	Übereinstimmung / %	falsch negative	falsch positive
OTSU	53			
OTSU Rotation 90°	53	100	0	0
OTSU vertikale Spiegelung	53	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	falsch negative	falsch positive
OTSU + Wasserscheide	57			
OTSU + Wasserscheide Rotation 90°	57	100	0	0
OTSU + Wasserscheide vertikale Spiegelung	57	100	0	0

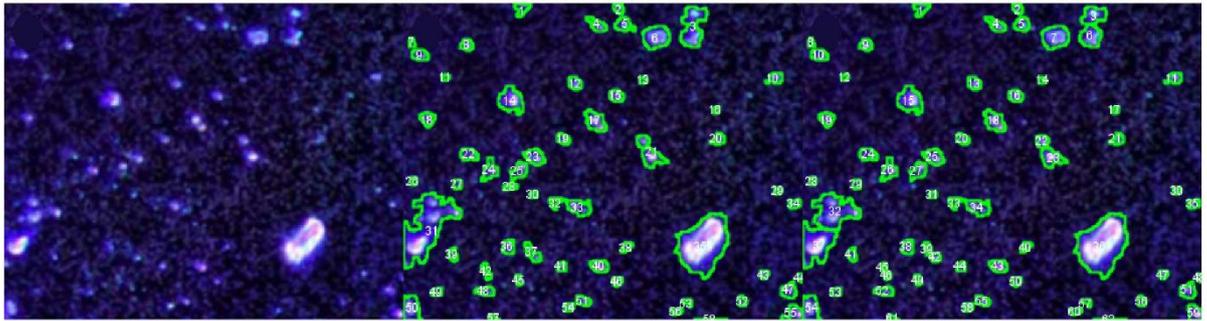


Abbildung 42: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4g; Box “white particles” aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163  $\mu\text{m}$ )

Tabelle 35: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 42

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	53			
OTSU	58	79.2	11	16
OTSU + Wasserscheide	62	83.0	9	18

Tabelle 36: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 42

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU	58			
OTSU Rotation 90°	58	100	0	0
OTSU vertikale Spiegelung	58	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU + Wasserscheide	62			
OTSU + Wasserscheide Rotation 90°	63	100	0	1
OTSU + Wasserscheide vertikale Spiegelung	63	100	0	1

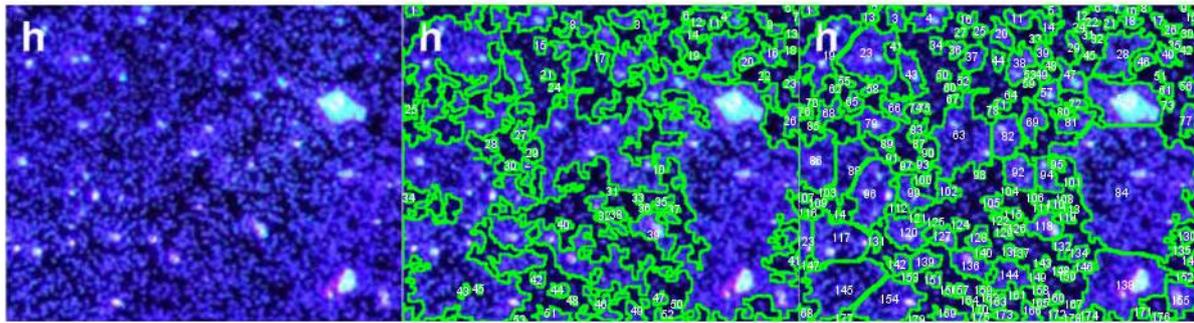


Abbildung 43: Bild aus OSSMANN et al. [174] Figure 4h; Box “white particles” aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 163 µm)

In Abbildung 43 wurden durch Überbelichtung des Bildes sehr viele falsch positive Partikel erkannt. Die Poren des Filters “leuchten” und werden dadurch als Partikel missinterpretiert. Dieses Bild wurde daher nicht weiter validiert.

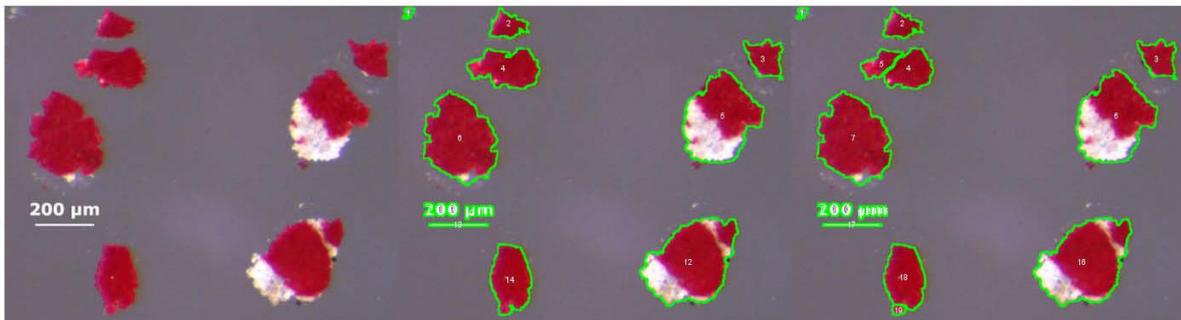


Abbildung 44: Bild aus KÄPPLER et al. 2018 [173], Figure 1c; Box “white particles” aktiv.

Tabelle 37: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 44.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	8			
OTSU	8	100	0	0
OTSU + Wasserscheide	10	100	0	2

Tabelle 38: Verlässlichkeit der Bildererkennung in Abbildung 44.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU	8			
OTSU vertikale Spiegelung	8	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU + Wasserscheide	10			
OTSU + Wasserscheide vertikale Spiegelung	10	100	0	0

Die Werte für die Rotation um 90° fehlen für Abbildung 44. Dies ist durch eine Beschränkung im möglichen Länge/Breite-Verhältnis des Programmes bedingt. In allen untersuchten Bildern deckten sich die Ergebnisse der Rotation um 90° mit denen des Originalbildes. Es ist daher empfehlenswert Bilder mit einem unpassenden Länge/Breite-Verhältnis vor der Analyse um 90° zu drehen.

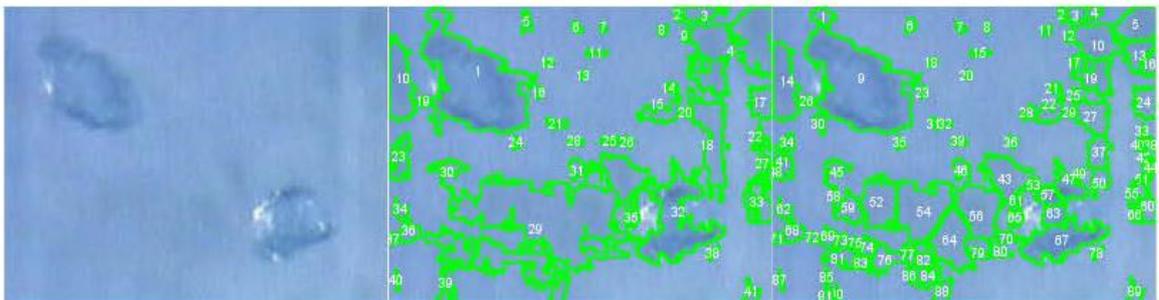


Abbildung 45: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3j; Box “white particles” inaktiv. (Lange Seite Einzelbild: ca. 150 µm)

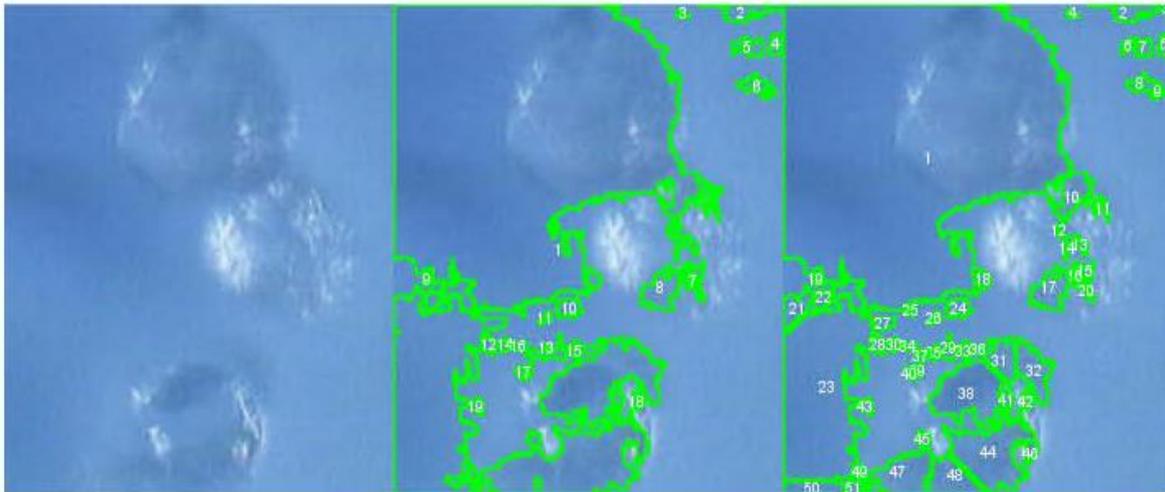


Abbildung 46: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3d; Box “white particles” inaktiv.  
(Lange Seite Einzelbild: 170 µm)

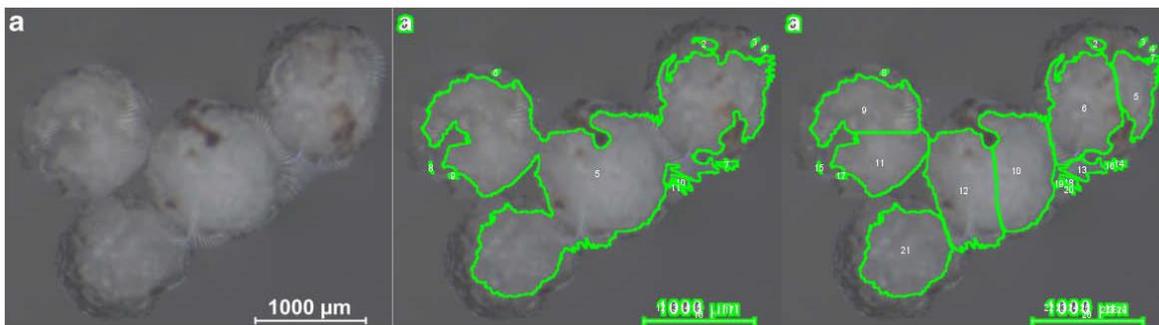


Abbildung 47: Bild aus KÄPPLER et al. 2016 [134] Figure 1a; Box “white particles” aktiv.

Tabelle 39: Genauigkeit der Bildererkennung in Abbildung 47.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	4			
OTSU	11	75.0	1	8
OTSU + Wasserscheide	20	100	0	16

Tabelle 40: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 47.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU	11			
OTSU vertikale Spiegelung	11	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU + Wasserscheide	20			
OTSU + Wasserscheide vertikale Spiegelung	20	100	0	0

Die Werte für die Rotation um 90° fehlen für Abbildung 47. Dies ist durch eine Beschränkung im möglichen Länge/Breite-Verhältnis des Programmes bedingt. In allen untersuchten Bildern deckten sich die Ergebnisse der Rotation um 90° mit denen des Originalbildes. Es ist daher empfehlenswert Bilder mit einem unpassenden Länge/Breite-Verhältnis vor der Analyse um 90° zu drehen.

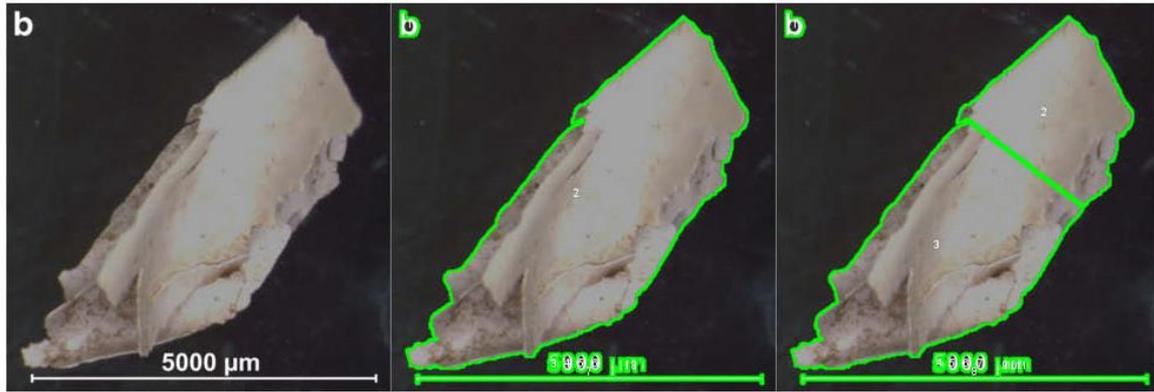


Abbildung 48: Bild aus KÄPPLER et al. 2016 [134] Figure 1b; Box “white particles” aktiv.

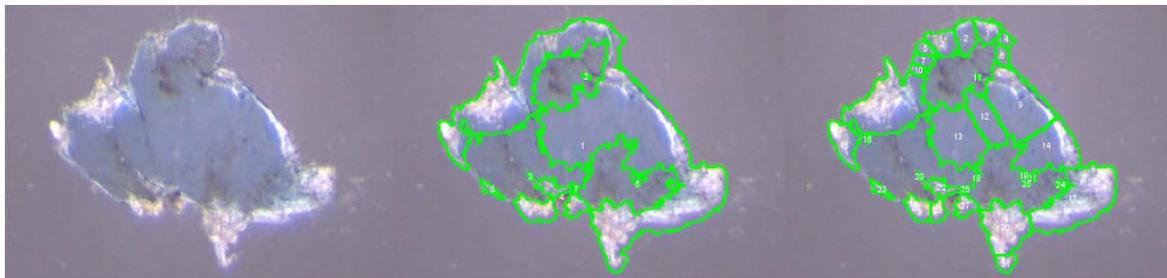


Abbildung 49: Bild aus KÄPPLER et al. 2018 [173], Figure 1a; Box “white particles” aktiv.  
(Länge Partikel: ca. 500  $\mu\text{m}$ )



Abbildung 50: Bild aus KÄPPLER et al. 2018 [173], Figure 1b; Box “white particles” aktiv.  
(Länge Partikel: ca. 1000  $\mu\text{m}$ )

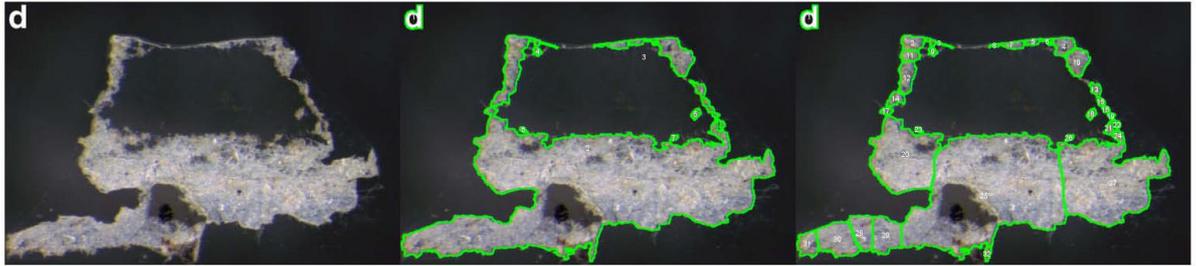


Abbildung 51: Bild aus KÄPPLER et al. 2018 [173], Figure 1d; Box “white particles” aktiv.  
 (Lange Seite Einzelbild: ca. 2440  $\mu\text{m}$ )

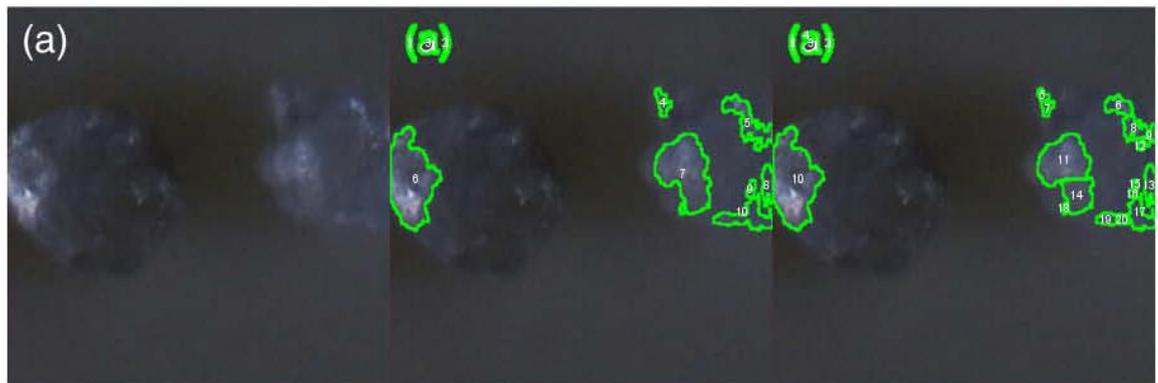


Abbildung 52: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3a; Box “white particles” aktiv.  
 (Lange Seite Einzelbild: 170  $\mu\text{m}$ )



Abbildung 53: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 3g; Box “white particles” aktiv.  
 (Lange Seite Einzelbild: 140  $\mu\text{m}$ )

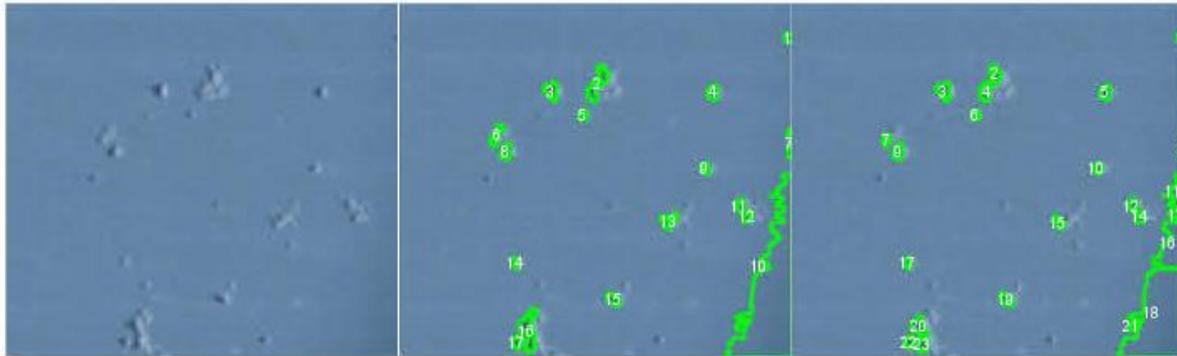


Abbildung 54: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 9a; Box “white particles” aktiv.  
(Lange Seite Einzelbild: 85 µm)

Tabelle 41: Genauigkeit der Bildererkennung in Abbildung 54.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	20			
OTSU	17	65.0%	7	4
OTSU + Wasserscheide	23	65.0%	7	10

Tabelle 42: Verlässlichkeit der Bildererkennung in Abbildung 54.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU	17			
OTSU Rotation 90°	17	100	0	0
OTSU vertikale Spiegelung	17	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU + Wasserscheide	23			
OTSU + Wasserscheide Rotation 90°	23	100	0	0
OTSU + Wasserscheide vertikale Spiegelung	23	100	0	0

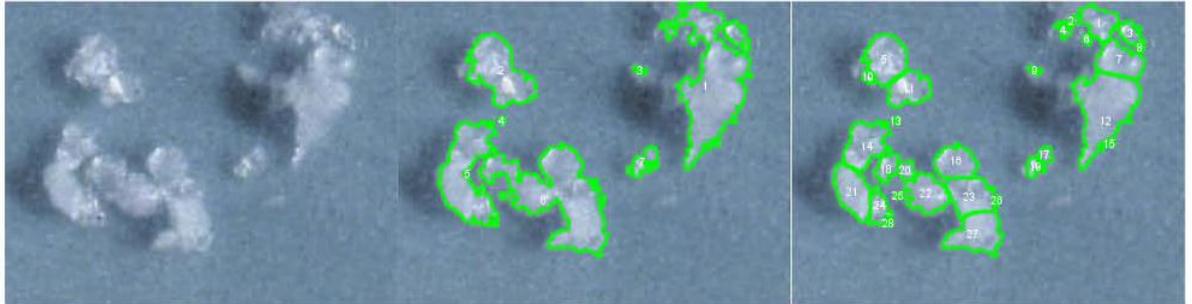


Abbildung 55: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 9d with; Box “white particles” aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 160  $\mu\text{m}$ )

Tabelle 43: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 55.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	10			
OTSU	7	60	4	1
OTSU + Wasserscheide	28	100	0	18

Tabelle 44: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 55.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU	7			
OTSU Rotation 90°	7	100	0	0
OTSU vertikale Spiegelung	7	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU + Wasserscheide	28			
OTSU + Wasserscheide Rotation 90°	28	100	0	0
OTSU + Wasserscheide vertikale Spiegelung	28	100	0	0

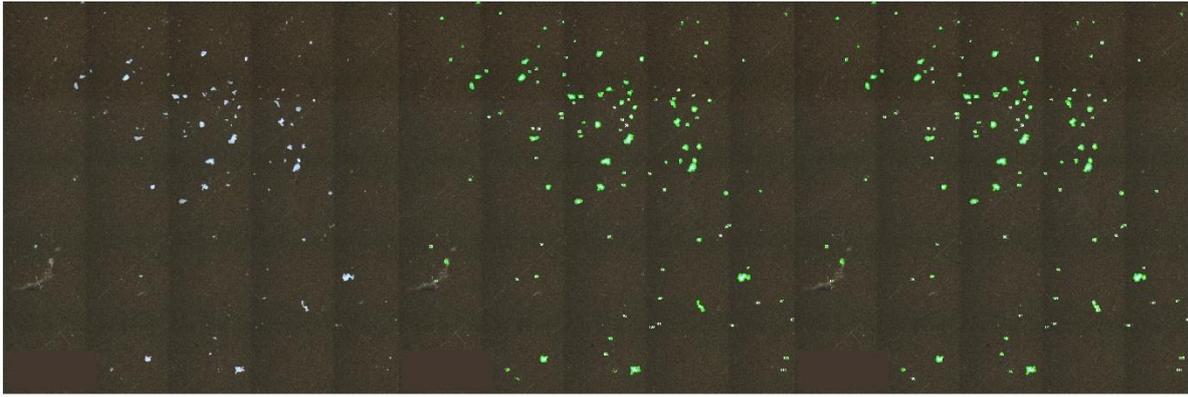


Abbildung 56: Beispielhaftes Bild von PS-Partikeln auf einem PC-Filter mit Goldbeschichtung unter Dunkelfeldbeleuchtung; Box „white particles“ aktiv. (Lange Seite Einzelbild: 4800 µm)

Abbildung 56 ist das einzige Bild mit in Relation zur Bildgröße sehr kleinen Partikeln. Zur Analyse dieses Bildes wurde daher “min. pixels” gleich 5 gesetzt.

Tabelle 45: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 56.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	127			
OTSU	115	90.6	12	0
OTSU + Wasserscheide	120	92.9	9	2

Tabelle 46: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 56.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU	115			
OTSU Rotation 90°	115	100	0	0
OTSU vertikale Spiegelung	115	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU + Wasserscheide	120			
OTSU + Wasserscheide Rotation 90°	120	100	0	0
OTSU + Wasserscheide vertikale Spiegelung	120	100	0	0

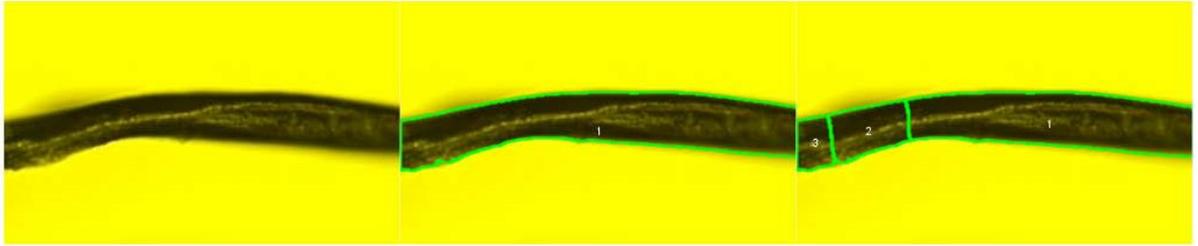


Abbildung 57: Bild aus KÄPPLER et al. 2016 [134] Figure 1d; Box “white particles” **inaktiv**. (Lange Seite Einzelbild: 170  $\mu\text{m}$ )



Abbildung 58: Beispielhaftes Bild einer PS-faser auf einem PC-Filter unter Hellfeldbeleuchtung; Box “white particles” **inaktiv**. (Lange Seite Einzelbild: ca. 1000  $\mu\text{m}$ )

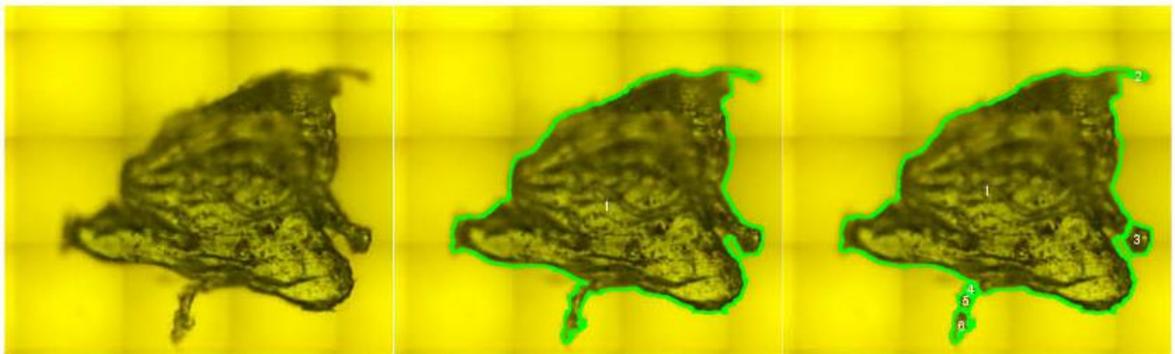


Abbildung 59; Bild aus KÄPPLER et al. 2016 [134] Figure 1c; Box “white particles” **inaktiv**. (Lange Seite Einzelbild: 1000  $\mu\text{m}$ )

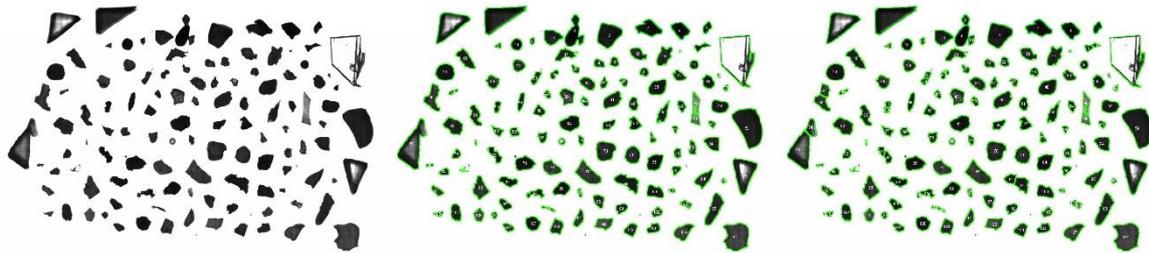


Abbildung 60: Bild aus FRÈRE et al. [144] Figure 3; Box “white particles” inaktiv.  
(Lange Seite Einzelbild: 27,5 mm)

Tabelle 47: Genauigkeit der Bildererkennung in Abbildung 60.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	119			
OTSU	114	95.0%	6	1
OTSU + Wasserscheide	127	96.6%	4	12

Tabelle 48: Verlässlichkeit der Bildererkennung in Abbildung 60.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Otsu	114			
Otsu vertikale Spiegelung	114	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Otsu + Wasserscheide	127			
Otsu + Wasserscheide vertikale Spiegelung	127	100	0	0

Die Werte für die Rotation um 90° fehlen für Abbildung 60. Dies ist durch eine Beschränkung im möglichen Länge/Breite-Verhältnis des Programmes bedingt. In allen untersuchten Bildern deckten sich die Ergebnisse der Rotation um 90° mit denen des Originalbildes. Es ist daher empfehlenswert Bilder mit einem unpassenden Länge/Breite-Verhältnis vor der Analyse um 90° zu drehen.



Abbildung 61: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 1b; Box “white particles” inaktiv.  
(Lange Seite Einzelbild: 170 µm)

Tabelle 49: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 61.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	30			
OTSU	42	60.0%	12	24
OTSU + Wasserscheide	68	93.3%	2	40

Tabelle 50: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 61.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU	42			
OTSU Rotation 90°	42	100	0	0
OTSU vertikale Spiegelung	42	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU + Wasserscheide	68			
OTSU + Wasserscheide Rotation 90°	68	100	0	0
OTSU + Wasserscheide vertikale Spiegelung	68	100	0	0

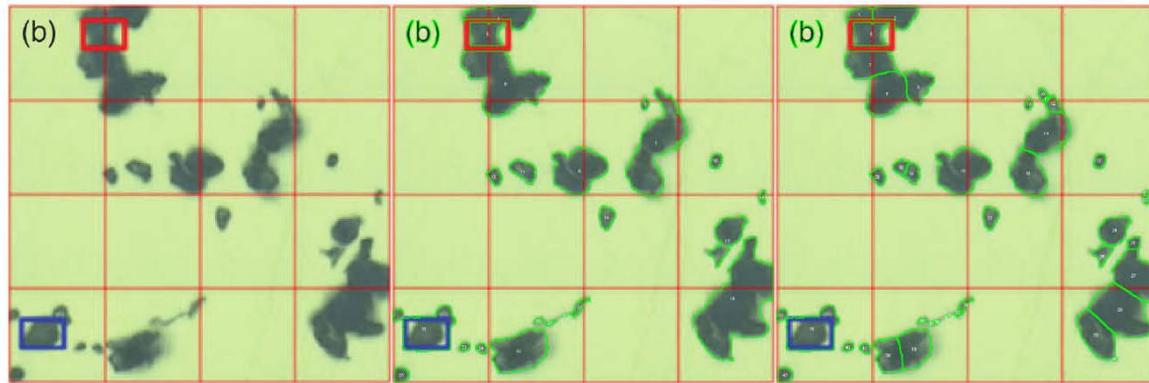


Abbildung 62: Bild aus LÖDER et al. [123] Figure 2b; Box “white particles” **inaktiv**.  
(Lange Seite Einzelbild: 170  $\mu\text{m}$ )

Tabelle 51: Genauigkeit der Bilderkennung in Abbildung 62.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
Experte	27			
OTSU	22	70.4%	8	3
OTSU + Wasserscheide	40	92.6%	2	15

Tabelle 52: Verlässlichkeit der Bilderkennung in Abbildung 62.

	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU	22			
OTSU Rotation 90°	22	100	0	0
OTSU vertikale Spiegelung	22	100	0	0
	# Partikel	Übereinstimmung / %	Falsch negative	Falsch positive
OTSU + Wasserscheide	40			
OTSU + Wasserscheide Rotation 90°	40	100	0	0
OTSU + Wasserscheide vertikale Spiegelung	40	100	0	0

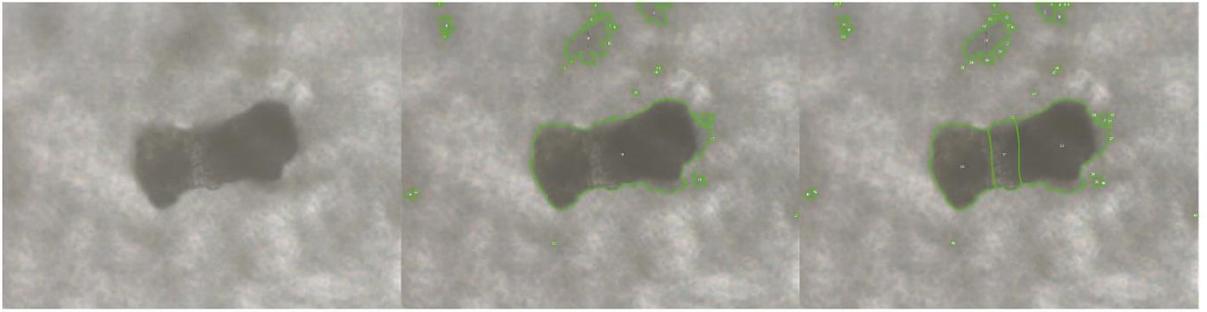


Abbildung 63: Bild aus DOMOGALLA-URBANSKY und ANGER et al. [172] Figure 2c; Box "white particles" **inaktiv**. (Lange Seite Einzelbild: 200  $\mu\text{m}$ )

## Anhang – D – Publikationen

1. Philipp M. Anger<sup>1</sup> und Elisabeth von der Esch<sup>1</sup>, Thomas Baumann, Martin Elsner, Reinhard Niessner, Natalia P. Ivleva, *RAMAN microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis*, Trends in Analytical Chemistry, (109) **2018**, 214-226, DOI: 10.1016/j.trac.2018.10.010
2. Philipp M. Anger<sup>1</sup> und Leonhard Precht<sup>1</sup>, Martin Elsner, Reinhard Niessner, Natalia P. Ivleva, *Implementation of an open source algorithm for particle recognition and morphological characterisation for microplastic analysis by means of Raman microspectroscopy*, Analytical Methods, **2019**, DOI: 10.1039/c9ay01245a



## Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis

Philipp M. Anger<sup>1</sup>, Elisabeth von der Esch<sup>1</sup>, Thomas Baumann, Martin Elsner, Reinhard Niessner, Natalia P. Ivleva\*

Institute of Hydrochemistry, Chair of Analytical Chemistry and Water Chemistry, Technical University of Munich, Marchioninstr. 17, 81377, Munich, Germany



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Available online 19 October 2018

#### Keywords:

Raman microspectroscopy (RM)  
Microplastic  
Analysis  
Statistical certainty  
Contamination  
Image processing  
Simple random sampling

### ABSTRACT

This review discusses the identification and quantification of microplastic (MP) using Raman microspectroscopy (RM). It addresses scientists investigating MP in environmental and food samples. We show the benefits and limitations of RM from a technical point of view (sensitivity, smallest particle sizes, speed optimizations, analysis artefacts and background effects) and provide an assessment of the relevance of lab analyses and their interpretation (sample sizes for the analysis, uncertainty of the analysis). All parts are complimented by extensive literature data and a theoretical derivation of the concepts. We conclude with suggestions for a feasible and meaningful RM analysis of MP samples.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

### 1.1. Small and very small microplastic particles – the niche for Raman microspectroscopy

Plastic particles in the size range of 1  $\mu\text{m}$ –5 mm are called microplastic (MP) [1]. Primary MP is mainly produced for personal care products (cosmetics, toiletries) or as scrubbing agents [2]. Primary particles can enter the environment mostly through waste waters, but they are not commonly found in the environment [3]. The origin of secondary MP is any plastic material, from improperly disposed plastic to car tires [4], as all anthropogenic polymers fragment due to UV radiation, weathering, abrasion, as well as chemical and (micro)biological degradation [5]. At the moment, sampling, sample preparation as well as identification and quantification techniques are mostly still under development and in testing phases [6]. Consequently, the extent of MP contamination in the environment is still difficult to quantify and reported concentrations and particle sizes vary by several orders of magnitude [1]. Different analytical techniques are being applied to environmental samples to detect, identify and quantify MP particles, most prominently focal plane array Fourier-transform infrared spectroscopy (FPA-FT-IR)

[1,7–9], Raman microspectroscopy alias Raman microscopy (RM) [1,9–11], thermoextraction desorption gas chromatography mass spectrometry (TED-GC-MS) [12–15] and pyrolysis gas chromatography (Pyr-GC-MS) [16,17] are utilized. According to Renner et al. [18] the spectroscopic methods (FT-IR and RM) are the most popular techniques for unambiguous chemical identification as they were applied in 90% of studies. FT-IR and RM identify MP particles via vibrational *fingerprint*, which is unique for every polymer type, whereas the other methods rely on MS information of monomers/oligomers or additives and provide information on polymer mass. FT-IR and RM are in principle non-destructive, whereas the MS-based methods rely on thermal extraction/decomposition, coupled to chromatographic separation and subsequent MS detection of volatile products [1,12,15,16]. The MS-based methods need to be developed for each polymer and adapted for different matrices individually [15]. However, the methods are complementary in analyzing single particles (FT-IR, RM) or masses (TED-GC-MS, Pyr-GC-MS) and the target sizes of single particles or minimal masses they can reach. The limit for the spectroscopic techniques for spatially resolved detection is the Abbe limit. In principle (non-linear) spectroscopic techniques can detect structures below the Abbe limit. However, spatially resolved detection, which includes chemical and morphological characterization of particles, is able to reach the lower limit of MP (1  $\mu\text{m}$ ) as it is currently defined [1]. We therefore focused on linear Raman techniques. For the MS methods the limit is set by the mass available for analysis, the mass portion of MP in the sample and the individual detection limit for each polymer [12,15,18]. Fig. 1 gives a graphical representation of the smallest

\* Corresponding author.

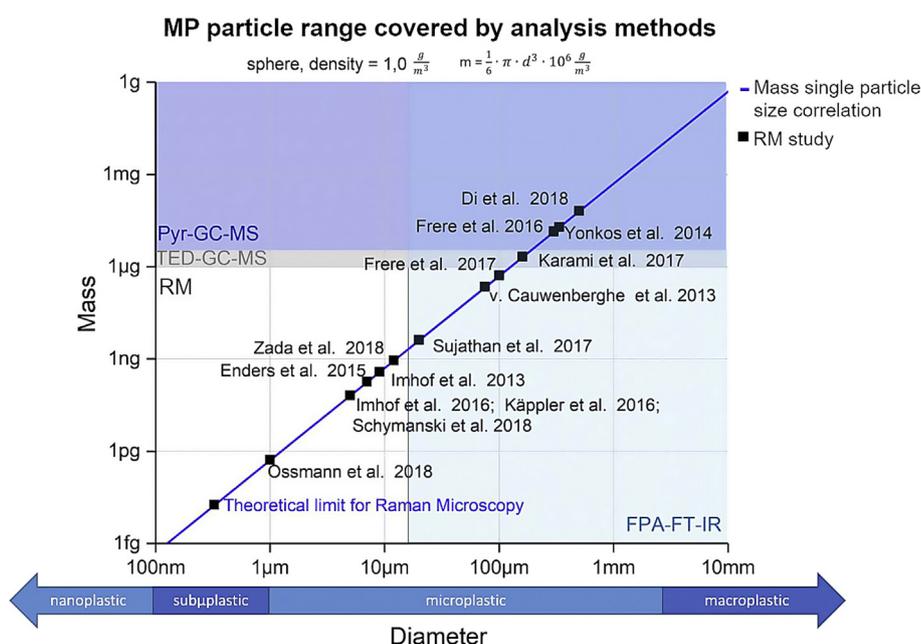
E-mail addresses: [p.anger@tum.de](mailto:p.anger@tum.de) (P.M. Anger), [elisabeth.esch@tum.de](mailto:elisabeth.esch@tum.de) (E. von der Esch), [tbaumann@tum.de](mailto:tbaumann@tum.de) (T. Baumann), [m.elsner@tum.de](mailto:m.elsner@tum.de) (M. Elsner), [reinhard.niessner@ch.tum.de](mailto:reinhard.niessner@ch.tum.de) (R. Niessner), [natalia.ivleva@ch.tum.de](mailto:natalia.ivleva@ch.tum.de) (N.P. Ivleva).

<sup>1</sup> Shared first authorship.

### Nomenclature

<<MP	Smallest MP particle
FPA-FT-IR	Focal plane array Fourier-transform infrared spectroscopy
l/mm	Lines/mm
LOD	Limit of detection
LWD	Long working distance
MP	Microplastic
NA	Numerical aperture
PA	Polyamide
PC	Polycarbonate
PCL	Polycaprolactone

PE	Polyethylene
PET	Polyethylene terephthalate
PLA	Poly(lactic acid)
PMMA	Poly(methyl methacrylate)
PP	Polypropylene
PS	Polystyrene
PTFE	Polytetrafluoroethylene
PVC	Polyvinylchloride
Pyr-GC-MS	Pyrolysis gas chromatography
RM	Raman microspectroscopy
SNR	Signal to noise ratio
TED-GC-MS	Thermo extraction desorption gas chromatography mass spectrometry



**Fig. 1.** Mass to diameter correlation of spherical MP particles with a density of  $1 \text{ g/cm}^3$  (dark blue line). Analytical range of TED-GC-MS (gray) [15] and Pyr-GC-MS (dark blue) [16,17] for PE, as the most commonly found MP. As well, the limit for FPA-FT-IR (light blue) [7] leaving the niche for Raman microspectroscopy (white). Points indicate smallest reported MP particle in environmental [9,22–34] and food [35–38] samples for each RM study, respectively.

detectable single particle for each method and the smallest particles found by means of RM. Detailed information about microplastic analysis with TED-GC-MS [12–15], Pyr-GC-MS [16,19] and FPA-FT-IR [7,8,20,21] can be found elsewhere.

The mass to diameter ratio was calculated for a spherical polymer particle with a density of  $1 \text{ g/cm}^3$ , as the most common polymers have densities ranging from  $0.90 \text{ g/cm}^3$  (PP) to  $1.6 \text{ g/cm}^3$  (PVC) and the polymers with the highest production rate have the lower densities [1,39]. This visualization was chosen to compare mass and spectrometric analysis techniques, as they deliver different yet correlated information on the sample. For TED-GC-MS, the limit of detection (LOD) is  $1.6 \mu\text{g}$  for PE [15]. Pyr-GC-MS has a limit of  $4 \mu\text{g}$  for PE [16,17]. Using automated MP detection FPA-FT-IR is limited to particles larger than  $20 \mu\text{m}$  [7]. The theoretical limit of about  $300 \text{ nm}$  for RM is defined by the Abbe limit and calculated and explained in section 2.1. Furthermore, recent RM studies of environmental [9,22–34] and food [35–38] samples are marked by the smallest detected MP particle reported. This visualization

shows a niche for RM in the small MP range with decreasing practical particle size limitations. As illustrated in Fig. 1, the theoretical limit has not yet been reached for environmental samples, leaving room for improvement.

The unique feature of the single particle approach with RM is its possibility to chemically and morphologically characterize MP particles even if they constitute only a small percentage of the total number of particles in a sample. This is very important, as MP analysis is a four-dimensional challenge composed of: (i) chemical composition, (ii) size and (iii) shape of the individual particle, as well as (iv) abundance of each polymer particle type within a sample [40]. RM is especially suited for small MP particles, which are plentiful in numbers, but not in mass and potentially exhibit the largest environmental threat [1,41].

Furthermore, such an analysis allows the investigation of all Raman active particles in a sample, thus making it widely applicable throughout particle research, and enabling the investigation of a ratio of anthropogenic to natural substances in environmental samples.

For the analysis of MP particles in the environment, a method for the quick detection of the entire size range is desired. With the necessary automation and effective measures for minimizing the fluorescence background, RM provides all the prerequisites for the development of such a method. RM bears the potential to representatively measure the required number of particles from 1  $\mu\text{m}$  up to 5 mm, deliver a size correlated compound distribution and morphological as well as chemical characterization on the single particle level. Current applications, however, are still exceedingly time-consuming, require skilled operators and currently do not yet follow harmonized protocols. This review therefore, aims to summarize current ongoing efforts to achieve such a transition towards routine RM analysis of MP. In the following sections, we will give a critical overview of the RM technique applied for MP analysis and will discuss trends for the future RM based MP analysis.

## 2. Discussion

### 2.1. How small can RM analyze?

In chapter 1, the niche for RM was established to be the spatially resolved detection of the smallest MP particles and for analyzing samples with a low mass of MP. The question is: What is the smallest particle analyzable by RM? or How small can RM analyze? The second question refers to spatially resolved detection, which enables chemical and morphological characterization. We first give an answer from a theoretical point of view and in the second part compare them to findings from the literature. It should be mentioned that RM is capable of analyzing larger particles as well. In fact, as long as the particle fits under the microscope a spectrum can be acquired.

#### 2.1.1. Theoretical considerations

RM, is the combination of a Raman spectrometer and an optical microscope. This setup enables excitation of a defined volume with laser light, which is embraced by the lateral and the depth resolution. The theoretical basis has already been discussed in various books [42,43]. In this chapter we will give a short summary on the most important aspects relevant for the analysis of MP.

In microscopy, the lateral resolution ( $d$ ) is confined by the Abbe or diffraction limit, which is dependent on the numerical aperture (NA) and the observed wavelength ( $\lambda$ ):  $d_{(\text{Abbe})} = \lambda/2 \text{ NA}$ . The Abbe resolution is only accessible with coherent light. Light guided through a circular aperture diffracts and forms a so-called Airy pattern. The resolution is calculated using the diameter of the Airy disk, limited by the first minimum of the Airy pattern, via the following equation:  $d_{(\text{Airy})} = 1.22 \lambda/\text{NA}$ . The Rayleigh criterion can be applied to describe the distance between two objects that can be resolved, which is, in this case defined by the distance between the two maxima of the Airy pattern of two objects, while the maximum of the Airy pattern of object one is located on the first minimum of object two:  $d_{(\text{Rayleigh})} = 0.61 \lambda/\text{NA}$  [44].

The achievable resolution for the Raman part of the Raman microscope is in a first approximation described by the laser spot size, which is calculated using the Airy pattern, also used for calculating the lateral resolution of the microscope. In a second approximation the aforementioned Rayleigh criterion is utilized to calculate the difference between two objects that can be resolved. For laser sources with 532 nm, 633 nm and 785 nm wavelength, applying an objective with NA of 0.5 (e.g., a technical specification of 50 $\times$  long working distance objectives) spatial resolutions of 649 nm, 772 nm and 958 nm are obtained, respectively. An even better resolution is achievable with objectives with NA = 1.0 (325 nm resolution with a 532 nm laser) [45].

These considerations show that the lower limit of 1  $\mu\text{m}$  currently discussed for MP is easily accessible by the optical microscope as well as the Raman part. It also shows that the resolution needed for submicroplastic (<1  $\mu\text{m}$ ) particles is achievable [Schwaferts et al. submitted]. Even smaller structures are analyzable by non-linear Raman techniques, which are able to overcome the Abbe limit. For further information, the reader is referred to Araujo et al. [10,11] dealing especially with MP and non-linear techniques and to the works of Opilik et al. [46] and Stewart et al. [47] for a more general overview.

Axial or depth resolution is highly dependent on the sample itself. However, for the analysis of MP it is sufficient to approximate an excited volume of a few microns in depth [48]. Therefore, a sample containing particle sizes differing from a few millimeters to a few micrometers needs an approach that ensures focusing of the laser on every particle. This can be realized in two different ways: through auto-focusing software, which is often available by the manufacturer or by group-wise analysis of particles with defined depths for every group. The latter requires a method to determine the height of the particles.

#### 2.1.2. Findings from literature

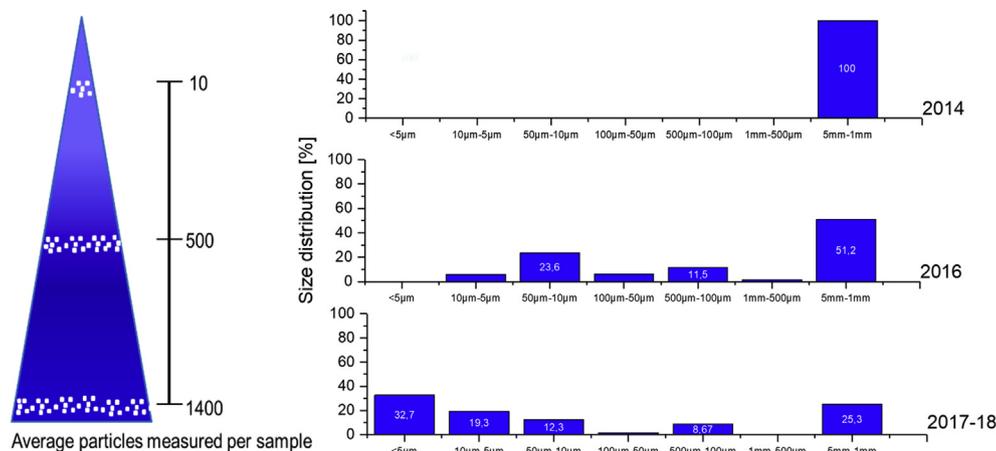
RM enables the characterization of single particles. Together with an automated procedure for the recognition of particles and automated measurements, the number of analyzed particles has increased, as well as the size range (Fig. 2). A clear trend towards the detection of smaller and smaller particles, which is the niche of RM, can be seen.

The smallest reported MP particle found in a real sample (bottled mineral water) and confirmed by RM so far is a 1  $\mu\text{m}$  polyamide (PA) particle published by Ossmann et al. [35]. They used a 532 nm laser and an objective with 50 $\times$  magnification (NA = 0.75).

In addition, five other groups have reported on MP particles below 10  $\mu\text{m}$  by now (entries 1–4 and 9 in Table 1). To shed light on the measurement conditions that are critical for measurements in this low size range, in the following we review the setup details employed in these studies. In particular, we address the choice of wavelengths and numerical aperture as critical parameters and discuss aspects of sample treatment that are crucial for measurements of very small particles.

In a study published in 2013 [31] we found a PA particle of 9  $\mu\text{m}$  in size in sediment samples using a 633 nm laser and an objective with 50 $\times$  magnification (NA = 0.75). The smallest particle Enders et al. [23] found in ocean water had a size of 7  $\mu\text{m}$ . They applied a 455 nm laser and an objective with 50 $\times$  magnification (NA = 0.75). In another study [30] we confirmed PA particles with a size of 5  $\mu\text{m}$  in sediment samples. A 633 nm laser and an objective with 50 $\times$  magnification and long working distance (NA = 0.5) was used. K appler et al. [9] did not state the size of the smallest particle, but found 9 particles in the size range of 5–10  $\mu\text{m}$  in sediment samples. They used a 532 nm laser and an objective with 20 $\times$  magnification (NA = 0.5). In contrast to the other papers, K appler et al. [9] used mapping to find smaller MP particles present in the sample. They applied a point distance of 10  $\mu\text{m}$  for mapping. Schymanski et al. [36] did not report a smallest MP particle but found e.g. that 39% of MP particles in mineral water from beverage cartons were in the size range of 5–10  $\mu\text{m}$ . They also analyzed mineral waters in other container materials and found similar MP particles portions for the lower size class. They used a 532 nm laser and an objective with 20 $\times$  magnification.

The studies used either a 455 nm, a 532 nm or 633 nm laser, but no 785 nm laser was applied for analysis of particles smaller than 10  $\mu\text{m}$ . This may be due to the better spatial resolution achieved with these lasers, but is also owed to the fact that measuring spectra with a 785 nm laser takes a lot more time. The intensity of



**Fig. 2.** Development of reported size distributions in liquid samples as a function of time. For the period between 2014 [49], 2016 [9,25,30] and 2017–18 [27,35,36] as automation advances, the measurement of increasingly more and smaller particles is enabled.

**Table 1**

Comparison of measurement parameters for MP found in environmental and food samples with RM. l/mm = lines/mm, LWD = long working distance, <<MP = smallest MP particle.

Study	Laser excitation	Power	Objective	Measurement time	Grating	Spectral range	<<MP
Imhof et al., 2013 [31]	633 nm	0.4–4 mW	50× (NA = 0.75)	5–500 s	600 l/mm	50–4000 cm <sup>-1</sup>	9 µm
Enders et al., 2015 [23]	455 nm	–	50× (NA = 0.75)	20 s	–	100–3500 cm <sup>-1</sup>	7 µm
Imhof et al., 2016 [30]	633 nm	0.4–4 mW	50× LWD (NA = 0.5)	5–500 s	600 l/mm	50–4000 cm <sup>-1</sup>	5 µm
Käppler et al., 2016 [9]	532 nm	5 mW	20× (NA = 0.5)	20 × 500 ms	600 l/mm	160–3600 cm <sup>-1</sup>	5–10 µm
Frère et al., 2016 [25]	785 nm	–	10× (NA = 0.25)	2 × 10 s	300 l/mm	200–1700 cm <sup>-1</sup>	279 µm
Sujathan et al., 2017 [32]	532 nm	10.8 mW	50× (NA = 0.55)	0.5–2 s/4 h	600 l/mm	–120 – 3500 cm <sup>-1</sup>	20 µm
Erni-Cassola et al., 2017 [24]	442 nm	–	–	20 × 10 s + 5 min bleaching	–	100–3500 cm <sup>-1</sup>	20 µm
Ossmann et al., 2018 [35]	532 nm	3.2 mW	50× (NA = 0.75)	2 × 1 s	600 l/mm	150–3500 cm <sup>-1</sup>	1.3 µm
Schymanski et al., 2018 [36]	532 nm	12%	20×	5 s	1040 l/mm	200–3200 cm <sup>-1</sup>	5–10 µm
Ghosal et al., 2018 [50]	785 nm	1–100 mW	20× – 100×	10–60 s	–	200–3200 cm <sup>-1</sup>	1 mm

the Raman signal declines with the fourth power of the laser wavelength. Furthermore, the efficiency of conventional CCD cameras applied for the entire visible region is relatively low [51]. Therefore, a 785 nm laser requires more time to acquire a spectrum with the same signal to noise ratio (SNR) a 633 nm laser would take.

The used objective of course has a great influence on spatial resolution. The studies that reported on very small MP particles, all applied objectives with at least a NA of 0.5. Ossmann et al. [35], who found the smallest particle, used the objective with the biggest NA (50×, NA = 0.75). The easiest solution would be to use objectives with 100× magnification which have a NA of ca. 0.9. However, a high NA results in a very small working distance of the objective. Objectives with 100× magnification normally have working distances around 300 µm. They can only be used for very smooth filter samples, bigger particles need to be excluded prior to analyses by sample preparation. For practical applications objectives with a NA of at least 0.5 and a long working distance are most recommendable.

From a theoretical point of view, the lower size limit of MP of 1 µm is easily reachable. However, only in one study the smallest particle reported has a size of 1 µm [35] and the second smallest particle found was 5 µm in diameter [30]. The reason why other groups did not find such small particles are various. Imhof et al. [30] utilized a quartz filter that consists of interwoven fibers. Particles smaller than 5 µm may have gotten into the woven fabric, which may have hindered optical detection. They also analyzed sediment samples, which means a highly complex matrix that hampers analyses of smaller particles. Käppler et al. [9] used mapping with a point distance of 10 µm for analysis of particles deposited on a Si filter with 10 µm pore size. Applying this pore size and distance for

mapping means that particles smaller than 10 µm may be filtered out by sample preparation or be overlooked in subsequent RM analysis. However, this is of course a compromise to enable reasonable sample preparation and measurement times. Schymanski et al. [36] used gold coated polycarbonate filters with a pore size of 3 µm, which may have also hindered the analyses of particles smaller than 3 µm. In conclusion, although theoretically 1 µm MP particles should not be a problem for RM, their identification still is highly dependent on various other parameters such as complexity of sample, applied filter type and measurement parameters.

## 2.2. How fast can RM be?

An essential question for the overall performance of RM measurements is the needed time to get enough spectral information for a reliable evaluation. This splits into two aspects. On the one hand, the time for an evaluable single measurement and on the other hand the time needed for the overall process of measuring a sufficient number of particles. The latter is also discussed in chapter 2.5. (Trade-off between measurement time and representativeness), which is a deduction of this chapter and chapter 2.4. (Challenge of representativeness).

### 2.2.1. Time effort for single measurement

For a reliable evaluation of RM spectra of MP it is recommendable to detect all spectral features of the most common polymer types. According to PlasticsEurope [39] the 12 polymers with the highest annual production are polypropylene (PP), polyethylene low/very low density (PE-LD/LLD), polyethylene high/medium density (PE-HD/MD), polyvinylchloride (PVC), polyurethane (PUR),

polyethylene terephthalate (PET), polystyrene (PS), expanded PS (PS-E), styrene-acrylonitrile resin/acrylonitrile butadiene styrene (SAN/ABS), polyamide (PA), polycarbonate (PC) and poly (methyl methacrylate) (PMMA). The spectral range of these polymers needed to cover all spectral features from  $200\text{ cm}^{-1}$  –  $3200\text{ cm}^{-1}$  (compare Table 2), which gives a spectral range of  $3000\text{ cm}^{-1}$ . This spectral range covers the *fingerprint* area ( $200\text{ cm}^{-1}$  –  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) and the C–H stretching modes of alkyls, alkenes and aromatic protons ( $2800\text{ cm}^{-1}$  –  $3200\text{ cm}^{-1}$ ) [52].

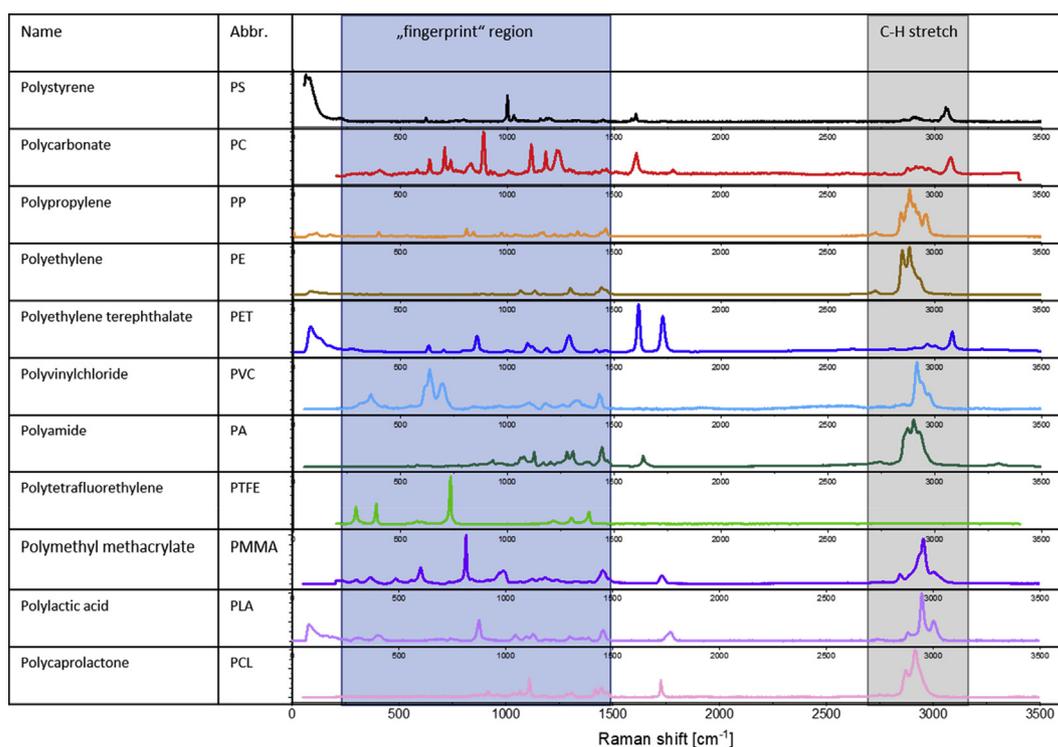
The time to cover the spectral range of  $3000\text{ cm}^{-1}$  is determined by the excitation wavelength, the length of the beam path in the spectrometer, the number of lines in the grating and the width of the CCD camera. An optimal setting should cover the whole spectral range within one measurement using only one position for the grating. A shorter wavelength and a low number of lines in the grating results in a broad spectral range, which can be covered with one grating position. The trade-off is the decreasing spectral resolution for an increasing covered spectral range. However, this normally is not a problem as the analysis of MP spectra is accomplished by comparing several positions of spectral bands. Although a lower spectral resolution makes a spectrum less rich in information, for the comparison of spectral positions this is not a relevant factor. Therefore, normally the grating with lowest number of lines is applicable. Frère et al. [25] are the only group we found applying a grating with 300 l/mm, which is also the lowest number of lines used in RM for analysis of MP to our knowledge. Most of the studies applied gratings with 600 l/mm (Table 1). Hence, it is possible to increase the time efficiency of the overall process. Commercially available Raman microscopes have a fixed beam path length in the spectrometer and normally one, sometimes two CCD cameras. The latter differ in response for different wavelength, which is important if lasers in broad wavelength range are used within one system [53].

Evaluation of Raman spectra is done either manually or via algorithms. For both approaches, the lowest possible measurement time should result in spectra where the SNR equals at least three for the weakest band that is needed for evaluation. To improve the SNR, the laser power can be increased to the point well below sample destruction at the given measurement time. Estimating an exact power is dependent on many different factors such as sample, matrix and instrument characteristics and often not worthwhile. The applied laser powers vary from 0.4 mW (633 nm) [30] to 10.8 mW (532 nm) [32]. It is recommendable to test the applicable laser power for every sample type. From ours and others experience (Table 1) a practical approach is to begin with a low laser power (e.g. 0.4 mW), then carefully increasing the laser power for small particles, since they can be easily destroyed. If the laser power should be the same for all particles, using less laser power and a longer measurement time are recommendable.

The estimation of the measurement time, which consists of the acquisition time and the number of accumulations, is also a critical task. The acquisition time is limited by the saturation of the CCD camera. The camera collects photons during the whole acquisition time but has a limited capacity. If saturation is reached, spectral features can be partially or completely lost [53]. Therefore, acquisition times are chosen where a single measurement does not reach saturation. To still achieve a good SNR, multiple measurements can be accumulated and averaged. The measurement time for pristine polymers is usually shorter than for weathered MP. In the following only studies where environmental samples were analyzed are taken into account. The shortest measurement time was reported by Sujathan et al. [32] with 0.5 s, which is also the group that reported the highest applied laser power. In contrast, in Imhof et al. [30] we used a very low laser power and with 500 s one of the longest measurement times for a single particle. Both groups analyzed the particles in more than one step and did additional

**Table 2**

Raman spectra of relevant polymers. “Fingerprint” region and region for C–H stretching modes of alkyls, alkenes and aromatic protons are highlighted.



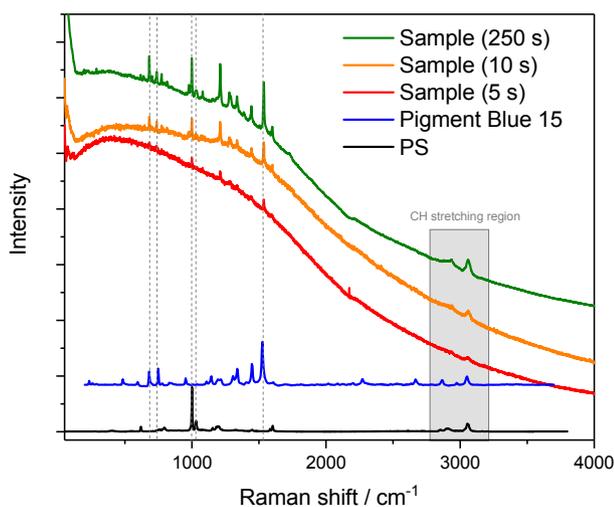
measurements with higher laser power and/or longer measurement times. Measurement times of other groups are found in between these two extrema. It is advisable to apply lowest possible measurement times tuned to the applicable laser power.

Furthermore, it is worth noting that both polymer and pigment of a MP particle can be analyzed simultaneously with RM, if appropriate measurement conditions are used. An unmonitored reduction of measurement time will lead to an incomplete analysis, where only the pigment is visible, as shown in Fig. 3 [30]. If an unambiguous spectrum of the polymer is not achievable through Raman, despite appropriate measurement conditions, it is advisable to apply complementary spectroscopic methods, such as IR spectroscopy (MP >20  $\mu\text{m}$ ) [9] or possibly non-linear Raman spectroscopy (MP <20  $\mu\text{m}$ ) [10,11].

### 2.2.2. Time effort for overall process

The time for the total measurement consists of the threesome: (i) optical particle recognition, and selection of measurement locations (ii) actual Raman measurements at the selected locations (iii) evaluation of acquired spectra. In their article Araujo et al. [10] recently comprehensively reviewed the different approaches currently in use or under development. They also gave a comprehensive overview on total time consumption of studies applying RM for MP analysis. The fastest referenced RM method was applied by Frère et al. [25] with 20 s/mm<sup>2</sup>, but they only analyzed particles down to 279  $\mu\text{m}$ . The method by Erni-Cassola et al. [24] requires around 2 min/mm<sup>2</sup>, analyzing particles down to 20  $\mu\text{m}$ . Their approach starts with staining the particles with a fluorescent dye, which then enables particle identification by an ImageJ software tool. The next step is RM measurement of each stained particle. If, and only if, the staining covers all plastic particles, the method is a smart way to reduce the number of particles which need to be characterized spectroscopically.

Although the selection of an optimized method is always depending on the objective of the study, we suggest a two step approach: (i) use image analysis software to determine particle coordinates (e.g. Schymanski et al. [36], Frère et al. [25]) and (ii) apply single point measurements of a statistically significant subset. In chapter 2.4., we will discuss what a significant subset of particles may be. Another possibility would be to expand the method of Erni-Cassola et al. [24] to particles smaller than 20  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3.** Time dependence of spectral identification, modified from [30] (Supporting information). Settings for the measurement: 633 nm laser, 4 mW and objective with 50 $\times$  magnification and long working distance (NA = 0.5).

## 2.3. Potential of RM

### 2.3.1. Identification of MP polymer types

The identification of the polymer type of the MP particles found in a sample is important, as different polymers can have varying impacts on the biosphere [54]. The detected MP by RM depends highly on the sample type, as shown in Fig. 4. Additionally, the abundance of each polymer type was compared to the reported polymer market share (%) [39]. PE and PP have the highest market shares with 29% and 19%, respectively. They are also the most abundant polymers in environmental samples, with strikingly similar contents in the averaged sediment samples (PE 32.6%, PP 17.4%). The PP and PE percentage in the averaged water samples is much higher (74.3% and 40.4%) than the respective market shares. On the other hand, dense polymer types, such as PET (15%) and PS (26.2%) are enriched in sediments. This could be caused by a natural density separation in liquid matrices, where dense polymer types and heavily overgrown particles sink down leaving only the light plastic at the surface and burying the heavier polymers in the sediments. This hypothesis seems to fail for PS, which is also enriched in water samples. In the case of PS it is important to note that the density of PS can be tailored to specific applications by vaporizing the blowing agent pentane to introduce air bubbles rather than changing the chemical structure [55]. Based on the Raman spectrum of expanded PS these particles will be assigned to PS as well. Contrary to PS, expanded PS would be expected to accumulate in water. Furthermore, PS in all its variations is a popular packaging material [56] which can easily be introduced into the environment through littering, which could help to further explain its enrichment in water and sediment samples. Overall a greater polymer variety can be seen in sediment and salt samples, which also fits with the density separation hypothesis. PVC was only found in solid samples as it is the densest of the mentioned polymers. However, it is much less abundant than suggested by its market share. This is reasonable, as PVC is used less for packaging purposes than the other polymers limiting its exposure to the environment [56]. As expected, exceptionally high PET abundances were found in samples from PET bottles.

So far, there are no accounts of biodegradable MP, such as polylactic acid (PLA) or polycaprolactone (PCL) in the environment, although aging studies suggest that also biodegradable plastic form secondary MP through weathering [57]. The absence of these polymers in environmental samples may result from the relatively low production rates and also from the novelty of these materials as they have only recently entered the plastic market [39].

For our analysis we evaluated papers where MP was analyzed by RM and matched the findings to the respective polymer market share. In another study by Fraunhofer the sources of MP were investigated through a top down approach, where polymer consumption was extrapolated to potential MP formation. As the top ten contributors to MP in the environment they propose: abrasion of tires, emissions from waste disposal, abrasion of polymers and bitumen in asphalt, pellet losses, wind drift of materials from sports and play grounds, emissions from construction sites, packaging materials, road markings and fibers from textiles. Many of these sources have yet to be investigated. Due to the high carbon black content (22–40%) of tires it is very difficult to apply single particle based spectroscopic methods [58]. For these tire wear particles a single particle analysis by means of EDX has been proposed, as sulfur and zinc are characteristic components of tires and can give an indication if the particle stems from a tire [4]. If the total tire wear particle mass exceeds 0.23  $\mu\text{g}$  in a sample of 10–50 mg for styrene butadiene rubbers TED-GC-MS is the method of choice [15].

### 2.3.2. Influence of particle shape on the detection

One of the challenges in single particle analysis is the variety of different shapes that are encountered and require specific detection

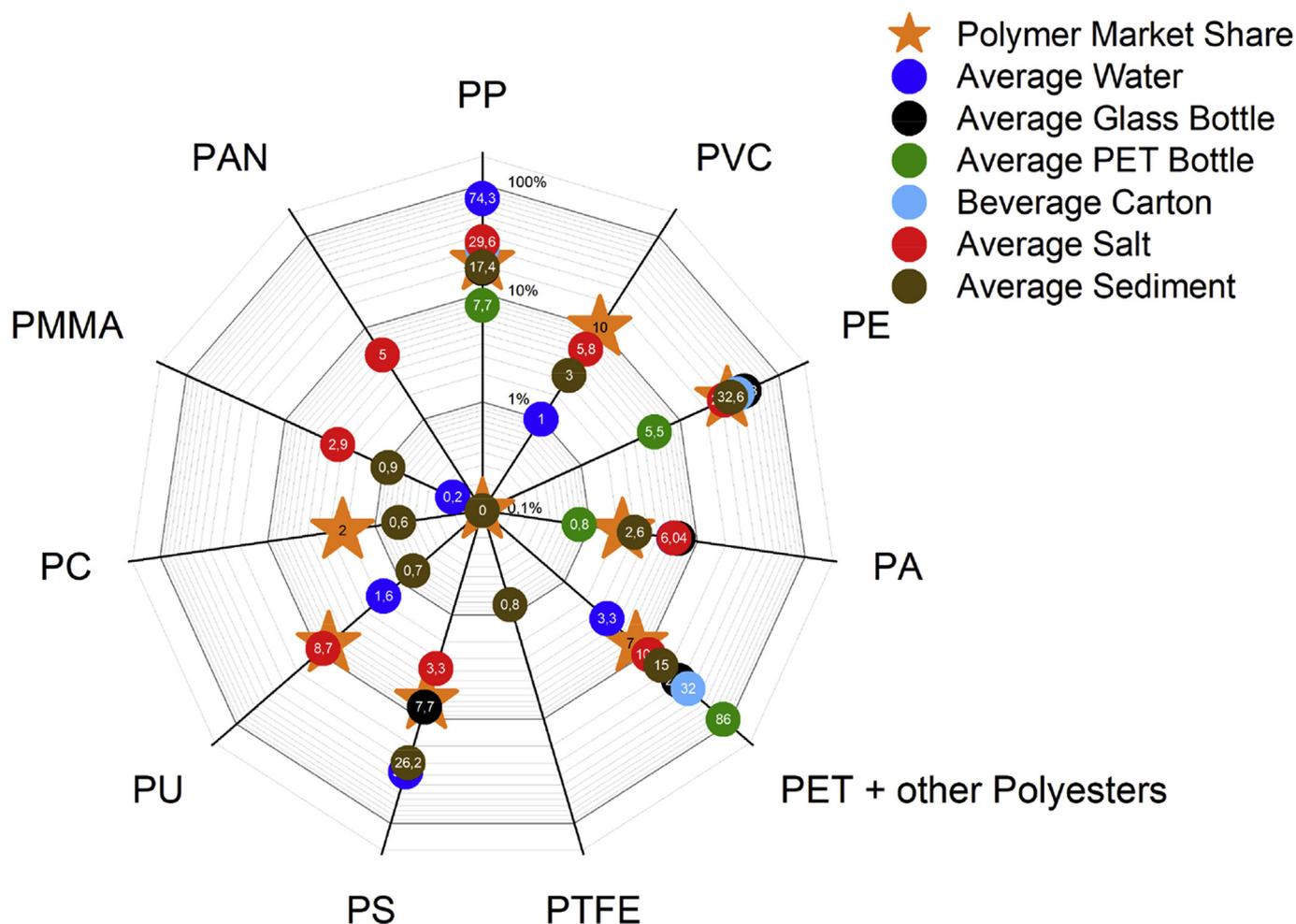


Fig. 4. Distribution of polymers for different MP sample types analyzed by means of RM and correlated to the polymer market share to PlasticsEurope [39] (star). The polymer abundance was averaged for each sample type: Water (ocean [23,24], river [27] and estuary [25], dark blue), glass bottle [35,36] (black), PET bottle [35,36] (green), beverage carton [36] (light blue), salt [37,38] (red), sediment [9,22,25–31,33] (brown).

settings (Fig. 5). Hence, finding a suitable detection algorithm for all particles on a filter is a rather difficult task. The fidelity of the source image that is used for particle detection is of key importance for the success of any particle detection algorithm. Acquiring high-resolution images with low depth-of-field is an essential

prerequisite. In the case of the simultaneous detection of very small and very large particles, image acquisition with subsequent focus stacking is required in order to minimize depth-of-field.

Modern particle recognition software packages, such as ParticleFinder (Horiba) [25], Single Particle Explorer (RapID) [36], Gepard Enabled Particle Detection GEPARD [IPF repository tba.] and Munich Microparticle Recognizer Raman Analyzer, MipRAN [Anger et al. in prep.] lead to very good results for the recognition of spherical particles, but lack reliability when it comes to other shapes. Fragments and films are likely to be detected correctly by these software packages, as they are similar to spherical particles in shape, but partly or completely translucent particles may introduce errors. Inconsistencies in color are a challenge for any particle recognition algorithm that exploits high contrast differences in brightness or color between background and particle, which is why dark field images were preferred over bright field in recent studies [35,36]. Dark field is a microscopic visualization mode that collects stray light, which highlights edges and corners and thereby facilitates optical recognition via contrast. Blurred particle edges may lead to over- or underestimation of the particle size, or incorrect boundaries.

Fibers display the highest level of difficulty for recognition, if they should be detected in their entirety. At higher magnification the fiber might not fit into one single field-of-view, therefore, the image processing has to work on the entire montage of the

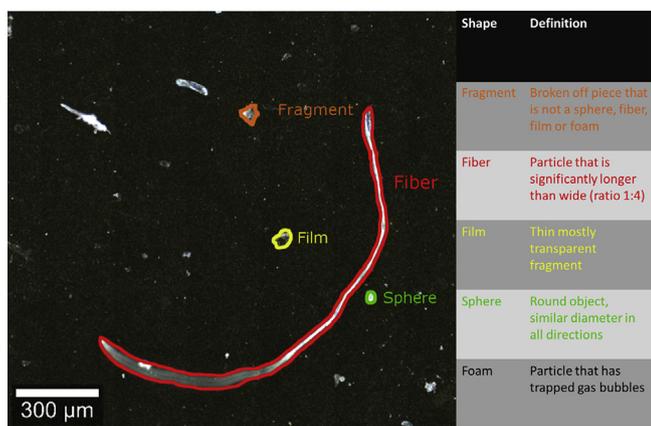


Fig. 5. Secondary MP reference particles designed for particle detection testing [E. von der Esch et al. in preparation]. Shape classifications arise from Image processing requirements and are in accordance with [59,60].

individual images with all border and segmentation effects. Due to their high aspect ratio in combination with irregular contours, algorithms designed to separate overlapping agglomerated particles are likely to lead to unwanted fragmentation along the fiber. Different translucency of the particles has to be accounted for with an adaptive segmentation algorithm. The detection of fibers is especially important, as studies [61,62] found that most fibers in a sample originate from laboratory contamination and must therefore be excluded from final results.

To improve the detection of particles, programs must be tailored to all MP shapes. Therefore, it is very important to work with MP reference materials, which contain MP particles similar to MP found in environmental samples for development and testing [E. von der Esch et al. in preparation]

Since traditionally MP particles are categorized by size we propose to keep the widely accepted categories (1  $\mu\text{m}$ –5  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ –10  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ –50  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ –100  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ –500  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ –1 mm, 1 mm–5 mm) [63] and additionally report the shape. Therefore, it is important to find a common shape and size classification for fibers. As longest and shortest dimension must be determined for each particle for automatic shape characterization, we propose to only classify a fiber as MP-fiber if both diameters are below 5 mm and the aspect ratio is at least 1:4. Further, fibers should be listed separately reporting both length and width together with the chemical identity.

### 2.3.3. Exploration of MP to non-MP ratio

Through (semi-) automated RM, a (high) number of particles can be analyzed regardless of their origin so that a ratio between anthropogenic substances such as MP particles and native particles can be investigated. This ratio will strongly depend on the sample as well as the preparation procedure. Valuable information from the MP distribution in water samples could be gained as less preparation is necessary for those samples [64]. Finding out this ratio could also help improve toxicological studies as environmental MP concentrations have yet to be determined [65]. Unfortunately, only very few studies provide information on this highly interesting matter. This could be because measurement automation is still in the development stages for single particle RM analysis. Hence, only very recent studies could have acquired enough data for such a comparison [35,36]. Another factor is the interference of fluorescence which disrupts the classification of some particles [66,67]. These are not always mentioned even though they make up a significant portion of the particles found in the sample.

It is recommendable to report all analyzed particles by chemical identity, as well as the unidentified particles. This should show which procedures significantly reduce or induce fluorescence. Thus, a correlation between measurement parameters such as acquisition time, number of accumulations and laser wavelength can be achieved. The same applies to sample preparation, where any information about steps that effectuate fluorescence quenching will be extremely helpful for operators.

## 2.4. Challenge of representativeness

Applying RM for the analysis of MP usually means analyzing single particles on a filter sequentially. The obvious question is: How many particles need to be analyzed to get a statistically meaningful result? The answer to this question strongly depends on sample matrix and success of sample preparation. Only for special cases if the total number of particles in the sample is low, as in, e.g., bottled water, it seems feasible to analyze all particles [35,36]. In this chapter we want to give a suggestion for analysis of filters with a number of particles which cannot be measured in a reasonable time. For this assessment we assume a filter covered with  $10^6$  particles which is

the magnitude we found in previous studies from samples of surface water. This is also the magnitude of particles calculated from a filter with 11 mm diameter covered with a single layer of 5  $\mu\text{m}$  particles (area of filter divided by area of one particle). We emphasize that the following calculations apply to the final filter sample. Sampling and sample processing are excluded at this point.

We will calculate the minimal required number of particles based on the following assumptions: (i) all particles on the filter can be divided into the two groups: MP and non-MP; (ii) all particles on the filter are separated from each other; (iii) all particles are randomly distributed on the filter, meaning the MP to non-MP ratio is constant over all parts of the filter (no clustering of particles according to their properties); (iv) heterogeneous spatial distribution of the particles is allowed; (v) all particles are identified by image processing; (vi) independent of their size, all particles are treated equally as single measurement points; (vii) identification of particles by means of RM is flawless. We strongly emphasize that these assumptions reflect an idealized system.

Determining the sample size  $n$  (number of particles which need to be analyzed) is possible by applying a random sampling approach [68] called simple random sample of units selected without replacement (*srswor*) [69]. The sample size  $n$  is calculated using Equation (1) based on the normal distribution [70]. The precision is given by the symmetrical margin of error.

$$n \geq \frac{P(1-P)}{\frac{e^2}{\sigma^2} + \frac{P(1-P)}{N}} \quad (1)$$

with:

Sigma value for prediction interval	$\sigma = 1.65$ for 90% prediction interval [68]
Total number of particles found on the filter through image processing	$N$
Estimate of the MP fraction	$P$ /decimals
Margin of error	$e$ /decimals
Sample size/number of particles required	$n$

In Table 3 the number of particles that need to be analyzed for a filter with  $10^6$  particles,  $\sigma = 1.65$  (90%) and a tolerated margin of error  $e = 10\%$  for the MP fraction is calculated. We varied the estimate of the MP fraction to show the correlation between the sample size  $n$  and the analyte fraction  $P$ .

**Table 3**

Number of particles that need to be analyzed for a filter with  $N = 10^6$  particles,  $\sigma = 1.65$  (90%) and a tolerated margin of error  $e = 10\%$ ,  $P$  varied from 0.05% to 5% MP fraction.

Variables	$P = 5\%$ MP	$P = 0.5\%$ MP	$P = 0.05\%$ MP
$e^a =$	0.005	0.0005	0.00005
$n \geq$	5,147	51,394	352,428

<sup>a</sup>  $e$  is always 10% of the estimated MP fraction  $P$ , i.e. the decimal number decreases with decreasing estimate of the MP fraction  $P$ .

We increased the tolerated margin of error  $e$  to 20% for the MP fraction  $P = 5\%$  and to  $e = 30\%$  for the MP fractions  $P = 0.5\%$  and  $P = 0.05\%$  in Table 4 leading to a non-linear decrease of the required particle number.

Tables 3 and 4 show that the number of particles that need to be analyzed strongly increases with decreasing fraction of MP among the total number of particles. In chapter 2.5, we will discuss to what extent these absolute minimal sample sizes  $n$  can be achieved under idealized conditions with state-of-the-art measurement techniques.

**Table 4**

Number of particles that need to be analyzed for a filter with  $N = 10^6$  particles,  $\sigma = 1.65$  (90%) and varied tolerated margins of error  $e = 20\%$  ( $P = 5\%$ ) and  $e = 30\%$  ( $P = 0.5\%$  and  $P = 0.05\%$ ).

Variables	$P = 5\%$ MP	$P = 0.5\%$ MP	$P = 0.05\%$ MP
$e =$	0.01	0.0015	0.00015
$n \geq$	1,292	5,984	57,022

After estimating  $n$ , the subsequent RM measurement reveals the MP fraction  $p$  in the sample  $n$ . To extrapolate  $n$  to the total number of particles  $N$  the confidence interval has to be recalculated, as it is very unlikely, that the measured MP fraction  $p$  will match the estimated MP fraction  $P$ . The fraction of MP  $p$  is then reported by stating the recalculated margin of error. The lower limit is calculated by  $MP_{(fraction\ lower\ limit)} = p - \sigma [p(1-p)/n]$  and the upper limit is calculated by  $MP_{(fraction\ upper\ limit)} = p + \sigma [p(1-p)/n]$ . Alternatively, the required number of particles can be adjusted during the measurement according to  $p$ .

Assuming 5% MP particles and having found  $10^6$  particles on the filter, according to Equation (1) we would have analyzed 5147 particles ( $e = 0.005$ ). After analysis a possible outcome would be 103 MP particles (~2% of 5147). Thus, the confidence interval now varies from 1.6% to 2.4% MP particles in the sample, meaning that the MP fraction is  $2 \pm 0.4\%$  (new  $e = 0.004$ , equaling a tolerated margin of error of 20%, which is twice as much as set prior to the analysis). In Fig. 6, the development of the margin of error  $e$  for 2% MP fraction is displayed with increasing sample size. For the illustrated case 13 000 particles would have had to be analyzed to fulfill the original precision criterion  $e = 10\%$ .

### 2.5. Trade-off between measurement time and representativeness

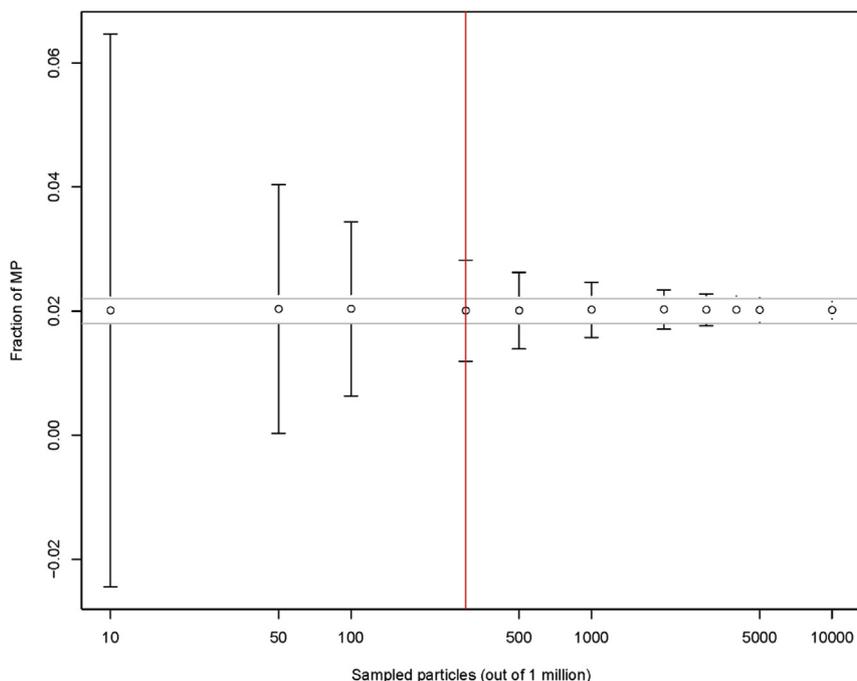
In chapter 2.2. the settings for the shortest possible measurement time were considered. We also stated that the fastest method at the moment is not the most preferable as it dismisses the big advantage of RM to analyze particles smaller than 20  $\mu\text{m}$ .

In Table 5, we calculated the possible number of particles from the absolute measurement time for RM approaches that found particles between 1  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  in environmental samples and also for the fastest RM approach. These numbers should work as points of reference. For practical measurements, the numbers of analyzable particles within these time spans will decrease due to several issues (e.g. movement of motorized table), nevertheless they can serve as a first approximation.

In our assessment we chose 5 h, as it is the net measurement time available on a typical working day, leaving time for particle recognition and data evaluation. For unattended overnight runs, we assumed 15 h (5 p.m.–8 a.m.). Additionally, we calculated the number of analyzable particles for 1 and 2 days of uninterrupted measurement.

Comparing the numbers from Table 3 with the calculated numbers of  $10^6$  particles on a typical filter from surface water even the very short measurement time of Sujathan et al. [32] would not allow measuring all particles within less than a few days. It is therefore obvious that some trade-off must be made. For a sample with 5% MP particles,  $\sigma = 1.65$  (90%) and a tolerated margin of error  $e = 10\%$  for the MP fraction 5147 particles need to be analyzed which is possible in less than 5 h by using the approach of Ossmann et al. [35] or in 15 h with the approach of Schymanski et al. [36] or Imhof et al. [30]. For a sample with 0.5% MP,  $\sigma = 1.65$  (90%) and a margin of error  $e = 20\%$ , 5984 particles need to be analyzed. In this case the margin of error  $e$  is increased from 10% to 20%, making the same approaches feasible in the same time span. For MP fractions lower than 0.05% the number of particles that need to be analyzed is only reasonable if the tolerated margin of error  $e$  is expanded to 30%. In this case the method of Ossmann et al. [35] would need almost two days of total measurement time.

We emphasize again that the numbers calculated in chapter 2.4 only account for an idealized measurement, which is of course not possible to fulfill and only mark the absolute minimum of required particles for a statistically meaningful result. However, Fig. 6 shows that the required number of particles approaches a certain point above which additional measurements do not substantially



**Fig. 6.** Correlation of sample size  $n$  and margin of error  $e$  for an assumed fraction of MP particles of 2%. The precision criterion margin of error  $e = 10\%$  is displayed as gray horizontal lines. The red line marks a typical sample size of 300 particles.

**Table 5**

Comparison of analyzable number of particles for given time spans for different RM approaches.

Study	s/particle	5 h total Meas. time	15 h total Meas. time	24 h total Meas. time	48 h total Meas. time
Imhof et al., 2016 [30] <sup>a</sup>	500 s	36 particles	108 particles	173 particles	346 particles
Käppler et al., 2017 [9]	10 s	1,800 particles	5,400 particles	8,640 particles	17,280 particles
Schymanski et al., 2018 [36], Imhof et al., 2016 [30] <sup>a</sup>	5 s	3,600 particles	10,800 particles	17,280 particles	34,560 particles
Ossmann et al., 2018 [36]	2 s	9,000 particles	27,000 particles	43,200 particles	86,400 particles
Sujathan et al., 2017 [32]	0.5 s	36,000 particles	108,000 particles	172,800 particles	345,600 particles

s/particle = Single measurement time per particle, Meas. time = Measurement time.

<sup>a</sup> Imhof et al., 2016 [30] reported times varying from 5 s to 500 s, the analyzable number of particles was calculated for both time spans.

improve the margin of error. This means that although the calculated required number of particles in chapter 2.4. will increase for cases with more realistic assumptions, the final value is limited nonetheless and will always be smaller than the total number of particles  $N$ . A more accurate estimation will require a more elaborate statistical model to account for systematic errors.

## 2.6. Number of particles or filter area?

In the literature, the analyzed part is often expressed in percentage of the filter area [1,71], which has two major drawbacks when comparing performance of RM analyses. The first drawback comes with the application of filters with different diameters, which makes the given numbers for filter area incomparable. The latter is of course only true if number densities on the two filters are the same. For differing number densities giving a percentage becomes even more confusing. It is therefore recommendable not to use percentages of filter areas or at least not use them in abstracts or prominently in conclusions.

The second major drawback is the indication of filter area itself. RM usually is used as a single particle analysis tool. Therefore, no real area is actually analyzed in the first place, but it is instead the particles – their number and nature – which matters. The same area may contain particles varying in orders of magnitude. To compare performance one needs the number of analyzed particles because this is the true analytical outcome of RM single particle analyses.

These two drawbacks led us to the conclusion not to use the indication of (the percentage of) analyzed filter area any further. The better approach is to estimate the overall number of particles on the filter  $N$  by image processing of the whole filter and therefore

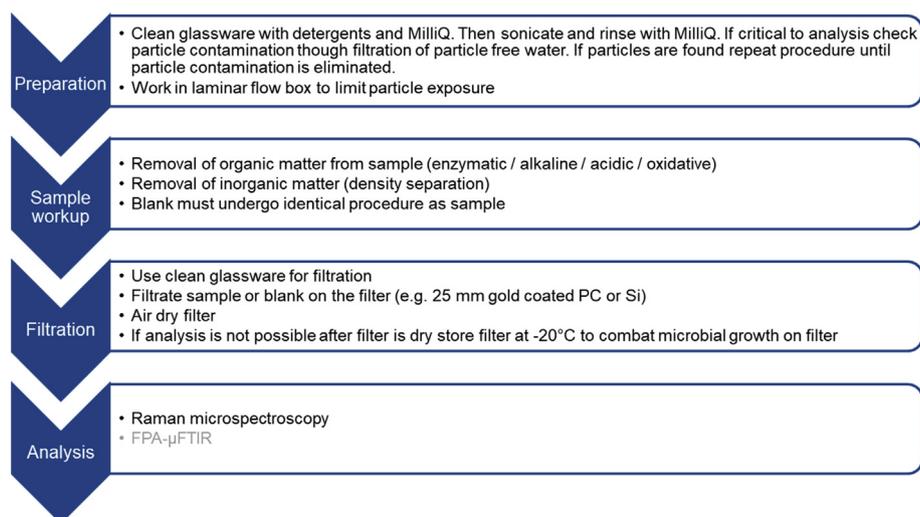
estimate the number of required particles  $n$  for a statistically meaningful measurement. This in combination with an error margin  $e$  would give more insight into the quality of the measurement.

## 2.7. How to circumvent contaminations and fluorescence interference

Contamination is a critical issue in MP research. We have compiled best practice approaches from various sources [9,35,36,63] and our own experience to create general guidelines for contamination reduction (Fig. 7). A special focus lies on the measurement of process blanks to quantify contamination from sample handling.

Last but not least, the fluorescence background in Raman spectra of environmental samples needs to be addressed before the measurement, as the background signal interferes with the detectability of the particles. Inorganic materials (e.g., clay minerals) which are often found in sediment samples can exhibit strong fluorescence and therefore interfere with the detection of MP [66,67]. These substances should be removed by density separation [72], centrifugation [30], or electrostatic charge [73] before the measurement, if the MP to non-MP ratio is irrelevant to the desired analysis.

Another possible source for Raman background can be Mie scattering of stray light from the source or the Raman lines. The CCD camera collects this light and generates an additional Raman background [74]. Improving the effective morphology by e.g. compressing the sample to a pellet was shown to reduce this effect and hence the background. From our point of view this strategy is not applicable for the single particle RM analysis of (microplastic) particles on filter samples.

**Fig. 7.** Scheme for contamination prevention and control.

A significant fluorescence signal is derived from organic compounds that were adsorbed to the particle surface, therefore their removal is very important for the quality of the measurement. Currently there are enzymatic [75], alkaline [76], acidic and oxidative [76,77] treatments that can be combined to free a particle from organic matter [1,18].

A fluorescence background may also arise from pigments or additives, which should not be removed through pretreatment, as they give more insight into the composition and possible origin of MP particles. To overcome this issue, the fluorescence background still has to be reduced during the measurement. This can be achieved through laser- or photobleaching [78]. Laser induced bleaching of fluorophores may also be of interest in an automated analysis protocol as Ribeiro-Claro et al. pointed out [11]. An additional exposure time could be included prior to spectra recording thus improving the possibility to identify MP particles.

The most frequently mentioned possibility to circumvent fluorescence is detuning from fluorophores, which can be done by changing the laser source to longer wavelengths [11]. In chapter 2.1.2 we discussed the use of different laser sources. From findings in the literature the most common laser with the longest wavelength applied for RM analysis of MP has 785 nm. However, this laser has several drawbacks discussed in the same chapter, which is why it is not recommendable to detune the laser source to the technical extent, but rather use a maximum of e.g. 633 nm.

### 3. Conclusion

Even though RM has greatly advanced in recent years to become a useful tool for the detection of MP in the environment, there is still potential for significant further improvement and development of this technique. Especially the MP particles <20 µm and small total MP masses (<1.6 µg) provide a niche for RM. The most urgent challenges are to reach the theoretical size limit, to establish representative measurements, and to automate the procedure. Currently, the smallest MP particle found in a real sample (bottled mineral water) has a size of 1 µm. To find MP particles of this size, it is recommendable to use lasers with 532 nm or 633 nm and objectives with high NA and sufficiently high working distance, such as objectives with 50× (or 100×) magnification. At this stage, RM methods can be accelerated by acquiring a spectral range of 200 cm<sup>-1</sup> – 3200 cm<sup>-1</sup>, using the least frames possible, e.g. a grating with 300 l/mm or 600 l/mm. Additionally, the highest non-destructive laser power with respect to acquisition time and accumulation should be applied. Possible settings can be found in section 2.2.1. As shown in section 2.3.1 the use of RM allows the distinction of polymer types and provides plausible MP abundances in the analyzed sample. To harness the full potential of RM, it is advisable to pay attention to, and to state the ratio of MP to non-MP particles, the overall number of particles, the size distribution and the shapes of the detected particles. Furthermore, the number of fluorescent and therefore not identifiable particles should also be given to catalyze an understanding of methodological challenges across laboratories. We also suggest the random sample of units selected without replacement (*srswor*) approach to calculate the minimum number of particles that need to be analyzed. In section 2.4 and 2.5 we showed that the absolute minimum number of particles required can be reached with state of the art measurement techniques. However, the statistical model describes an idealized measurement system, and will need to be expanded to include procedural uncertainties to give a more realistic estimation of particles needed for a statistically meaningful analysis. Statistical certainty is especially relevant for MP as it is a topic of high public concern. Furthermore, the automated particle detection will need to be advanced so that it is suited to all shapes of MP without

miscalculations of particle sizes and size distributions. Automation and statistical sample size reduction results in an overall faster procedure and higher sample throughput, simultaneously providing high analytical accuracy. It has to be mentioned, that all these efforts are in vain if a contamination-free laboratory environment cannot be provided and controlled by procedural blanks. Therefore, to keep up with the increasing popularity of RM within MP research, major advances can be expected from bringing forward harmonized protocols of data acquisition and reporting, as well as intensified scientific exchange to avoid contaminations and interferences from fluorescence.

### Acknowledgments

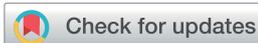
We like to thank Christoph Haisch, Christian Schwaferts, Dieter Fischer, Josef Brandt, Lisa Göpfert, Carolin Hartmann, Jonas Letica, Andreas Lichtenstern and Martin Jekel for helpful discussions. Furthermore, we would like to thank Allvac, Infiana and Huhtamaki for providing polymer samples. Funding by the German Federal Ministry of Education and Research (MiWa – Microplastic in the water cycle, 02WRS1378C) as well as funding by the Bayerische Forschungsförderung (MiPac – Microparticles in the aquatic environment and in foodstuffs – are biodegradable polymers a conceivable solution to the “microplastic problem”, AZ-1258-16) is gratefully acknowledged.

### References

- [1] N.P. Ivleva, A.C. Wiesheu, R. Niessner, Microplastic in aquatic ecosystems, *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (2017) 1720–1739.
- [2] M.R. Gregory, Plastic ‘scrubbers’ in hand cleansers: a further (and minor) source for marine pollution identified, *Mar. Pollut. Bull.* 32 (1996) 867–871.
- [3] A.F. Wheeler, Intentionally Added Microplastics in Products, Environment Agency Austria, 2017.
- [4] S. Wagner, T. Hüffer, P. Klöckner, M. Wehrhahn, T. Hofmann, T. Reemtsma, Tire wear particles in the aquatic environment - a review on generation, analysis, occurrence, fate and effects, *Water Res.* 139 (2018) 83–100.
- [5] B. Gewert, M.M. Plassmann, M. MacLeod, Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment, *Environ. Sci. Process. Impact* 17 (2015) 1513–1521.
- [6] M.E. Miller, F.J. Kroon, C.A. Motti, Recovering microplastics from marine samples: a review of current practices, *Mar. Pollut. Bull.* 123 (2017) 6–18.
- [7] M.G.J. Löder, M. Kuczera, S. Mintenig, C. Lorenz, G. Gerdtz, Focal plane array detector-based micro-fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples, *Environ. Chem.* 12 (2015) 563–581.
- [8] S. Huppertsberg, T.P. Knepper, Instrumental analysis of microplastics-benefits and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.* (2018). <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1210-8>.
- [9] A. Käßler, D. Fischer, S. Oberbeckmann, G. Schernewski, M. Labrenz, K.J. Eichhorn, B. Voit, Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 8377–8391.
- [10] C.F. Araujo, M.M. Nolasco, A.M.P. Ribeiro, P.J.A. Ribeiro-Claro, Identification of microplastics using Raman spectroscopy: latest developments and future prospects, *Water Res.* 142 (2018) 426–440.
- [11] P.J.A. Ribeiro-Claro, M.M. Nolasco, C.F. Araujo, Characterization of Microplastics by Raman Spectroscopy, Characterization and Analysis of Microplastics, 2017.
- [12] E. Dümichen, P. Eisentraut, C.G. Bannick, A.K. Barthel, R. Senz, U. Braun, Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method, *Chemosphere* 174 (2017) 572–584.
- [13] E. Dümichen, U. Braun, R. Senz, G. Fabian, H. Sturm, Assessment of a new method for the analysis of decomposition gases of polymers by a combining thermogravimetric solid-phase extraction and thermal desorption gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1354 (2014) 117–128.
- [14] E. Dümichen, A.K. Barthel, U. Braun, C.G. Bannick, K. Brand, M. Jekel, R. Senz, Analysis of polyethylene microplastics in environmental samples, using a thermal decomposition method, *Water Res.* 85 (2015) 451–457.
- [15] P. Eisentraut, E. Dümichen, A.S. Ruhl, M. Jekel, M. Albrecht, M. Gehde, U. Braun, Two birds with one stone—fast and simultaneous analysis of microplastics: Microparticles derived from thermoplastics and tire wear, *Environ. Sci. Technol. Lett.* (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00446>.
- [16] M. Fischer, B.M. Scholz-Böttcher, Simultaneous trace identification and quantification of common types of microplastics in environmental samples by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 5052–5060.

- [17] S.M. Mintenig, P.S. B auerlein, A.A. Koelmans, S.C. Dekker, A.P. van Wezel, Closing the gap between small and smaller: towards a framework to analyse nano- and microplastics in aqueous environmental samples, *Environ. Sci. Nano.* 5 (2018) 1640–1649.
- [18] G. Renner, T.C. Schmidt, J. Schram, Analytical methodologies for monitoring micro(nano)plastics: which are fit for purpose? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 1 (2018) 55–61.
- [19] B.G. Kwon, K. Amamiya, H. Sato, S.-Y. Chung, Y. Kodera, S.-K. Kim, E.J. Lee, K. Saido, Monitoring of styrene oligomers as indicators of polystyrene plastic pollution in the North-West Pacific Ocean, *Chemosphere* 180 (2017) 500–505.
- [20] M. Simon, N. van Alst, J. Vollertsen, Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging, *Water Res.* 142 (2018) 1–9.
- [21] S. Klein, E. Worch, T.P. Knepper, Occurrence and spatial distribution of microplastics in river shore sediments of the rhine-main area in Germany, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 6070–6076.
- [22] L. Zada, H.A. Leslie, A.D. Vethaak, G.H. Tinnevelt, J.J. Jansen, J.F. de Boer, F. Ariese, Fast microplastics identification with stimulated Raman scattering microscopy, *J. Raman Spectrosc.* 49 (2018) 1136–1144.
- [23] K. Enders, R. Lenz, C.A. Stedmon, 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, *Mar. Pollut. Bull.* 100 (2015) 70–81.
- [24] G. Erni-Cassola, M.I. Gibson, R.C. Thompson, J.A. Christie-Oleza, Lost, but found with Nile red: a novel method for detecting and quantifying small microplastics (1 mm to 20  $\mu\text{m}$ ) in environmental samples, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 13641–13648.
- [25] L. Fr ere, I. Paul-Pont, J. Moreau, P. Soudant, C. Lambert, A. Huvet, E. Rinnert, A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter, *Mar. Pollut. Bull.* 113 (2016) 461–468.
- [26] A.A. Horton, C. Svendsen, R.J. Williams, D.J. Spurgeon, E. Lahive, Large microplastic particles in sediments of tributaries of the River Thames, UK - abundance, sources and methods for effective quantification, *Mar. Pollut. Bull.* 114 (2017) 218–226.
- [27] M. Di, J. Wang, Microplastics in surface waters and sediments of the three gorges reservoir, China, *Sci. Total Environ.* 616–617 (2018) 1620–1627.
- [28] A. Ballent, P.L. Corcoran, O. Madden, P.A. Helm, F.J. Longstaffe, Sources and sinks of microplastics in Canadian lake ontario nearshore, tributary and beach sediments, *Mar. Pollut. Bull.* 110 (2016) 383–395.
- [29] P.J. Clunies-Ross, G.P.S. Smith, K.C. Gordon, S. Gaw, Synthetic shorelines in New Zealand? Quantification and characterisation of microplastic pollution on Canterbury's coastlines, *New Zeal. J. Mar. Fresh.* 50 (2016) 317–325.
- [30] H.K. Imhof, C. Laforsch, A.C. Wiesheu, J. Schmid, P.M. Anger, R. Niessner, N.P. Ivleva, Pigments and plastic in limnetic ecosystems: a qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes, *Water Res.* 98 (2016) 64–74.
- [31] H.K. Imhof, N.P. Ivleva, J. Schmid, R. Niessner, C. Laforsch, Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles, *Curr. Biol.* 23 (2013) R867–R868.
- [32] S. Sujathan, A.K. Kniggendorf, A. Kumar, B. Roth, K.H. Rosenwinkel, R. Nogueira, Heat and bleach: a cost-efficient method for extracting microplastics from return activated sludge, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73 (2017) 641–648.
- [33] F.A.E. Lots, P. Behrens, M.G. Vijver, A.A. Horton, T. Bosker, A large-scale investigation of microplastic contamination: abundance and characteristics of microplastics in European beach sediment, *Mar. Pollut. Bull.* 123 (2017) 219–226.
- [34] L. Van Cauwenberghe, A. Vanreusel, J. Mees, C.R. Janssen, Microplastic pollution in deep-sea sediments, *Environ. Pollut.* 182 (2013) 495–499.
- [35] B.E. Ossmann, G. Sarau, H. Holtmannspotter, M. Pischetsrieder, S.H. Christiansen, W. Dicke, Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water, *Water Res.* 141 (2018) 307–316.
- [36] D. Schymanski, C. Goldbeck, H.U. Humpf, P. F urst, Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: release of plastic particles from different packaging into mineral water, *Water Res.* 129 (2018) 154–162.
- [37] A. Karami, A. Golieskardi, C. Keong Choo, V. Larat, T.S. Galloway, B. Salamatinia, The presence of microplastics in commercial salts from different countries, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–9.
- [38] S. G undogdu, Contamination of table salts from Turkey with microplastics, *Food Addit. Contam. Part A Chem.* 35 (2018) 1006–1014.
- [39] PlasticsEurope, *Plastics\_the\_facts\_2017\_FINAL\_for\_website\_one\_page.pdf*, 2017.
- [40] R.C. Hale, Analytical challenges associated with the determination of microplastics in the environment, *Anal. Methods* 9 (2017) 1326–1327.
- [41] R.H. Waring, R.M. Harris, S.C. Mitchell, Plastic contamination of the food chain: a threat to human health? *Maturitas* 115 (2018) 64–68.
- [42] G. Turrell, J. Corset, *Raman Microscopy: Developments and Applications*, Elsevier Academic Press, London, 1996.
- [43] B. Schrader, *Infrared and Raman Spectroscopy - Methods and Applications*, 1st ed., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1995.
- [44] R. Salzer, H.W. Siesler, *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, 2nd ed., WILEY-VCH Verlag GmbH co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014.
- [45] E. Lee, *Raman Imaging - Techniques and Applications*, 1st ed., Springer, Berlin, Heidelberg, 2012.
- [46] L. Opilik, T. Schmid, R. Zenobi, Modern Raman imaging: vibrational spectroscopy on the micrometer and nanometer scales, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif)* 6 (2013) 379–398.
- [47] S. Stewart, R.J. Priore, M.P. Nelson, P.J. Treado, Raman imaging, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif)* 5 (2012) 337–360.
- [48] N.J. Everall, Confocal Raman microscopy: common errors and artefacts, *Analyst* 135 (2010) 2512–2522.
- [49] L.T. Yonkos, E.A. Friedel, A.C. Perez-Reyes, S. Ghosal, C.D. Arthur, Microplastics in four Estuarine rivers in the Chesapeake Bay, U. S. A, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 14195–14202.
- [50] S. Ghosal, M. Chen, J. Wagner, Z.-M. Wang, S. Wall, Molecular identification of polymers and anthropogenic particles extracted from oceanic water and fish stomach - A Raman micro-spectroscopy study, *Environ. Pollut.* 233 (2018) 1113–1124.
- [51] E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy: a Practical Approach*, 1st ed., John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, 2013.
- [52] D.I. Bower, W.F. Maddams, The characterization of polymers, in: E.A. Davis, I.M. Ward (Editors), *The Vibrational Spectroscopy of Polymers*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1989, pp. 162–226.
- [53] P. Vandenabeele, *Raman Instrumentation, Practical Raman Spectroscopy - an Introduction*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom, 2013.
- [54] D.S. Green, B. Boots, J. Sigwart, S. Jiang, C. Rocha, Effects of conventional and biodegradable microplastics on a marine ecosystem engineer (arenicola marina) and sediment nutrient cycling, *Environ. Pollut.* 208 (2016) 426–434.
- [55] J.S. Horvarth, Expanded Polystyrene (EPS) geofoam: an introduction to material behavior, *Geotext. Geomembr.* 13 (1994) 263–280.
- [56] A.L. Andray, M.A. Neal, Applications and societal benefits of plastics, *Philos. T. Roy. Soc. B* 364 (2009) 1977–1984.
- [57] S. Lambert, M. Wagner, Formation of microscopic particles during the degradation of different polymers, *Chemosphere* 161 (2016) 510–517.
- [58] P.J. Kole, A.J. Lohr, F. Van Belleghem, A.M.J. Ragas, Wear and tear of tyres: a stealthy source of microplastics in the environment, *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 14 (2017).
- [59] N.B. Hartmann, A. Verschoor, T. H uffer, A.E. Daugaard, R. Thompson, S. Rist, M. Hassell ov, T. Karlsson, N. Brennholt, M. Cole, M.P. Herrling, M. He , N.P. Ivleva, A.L. Lusher, F. Stork, M. Wagner, Towards Definitions and Categorisation of Environmental Plastic Debris, 2018.
- [60] S.H. Hong, W.J. Shim, L. Hong, Methods of analysing chemicals associated with microplastics: a review, *Anal. Methods* 9 (2017) 1361–1368.
- [61] L.C. Woodall, C. Gwinnett, M. Packer, R.C. Thompson, L.F. Robinson, G.L. Paterson, Using a forensic science approach to minimize environmental contamination and to identify microfibrils in marine sediments, *Mar. Pollut. Bull.* 95 (2015) 40–46.
- [62] E.M. Foekema, C. De Groot, M.T. Mergia, J.A. van Franeker, A.J. Murk, A.A. Koelmans, Plastic in north sea fish, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 8818–8824.
- [63] U. Braun, M. Jekel, G. Gerds, N.P. Ivleva, J. Reiber, Mikroplastik-Analytik: Probenahme, Probenaufbereitung und Detektion, in: BMBF, 2018.
- [64] V. Hidalgo-Ruz, L. Gutow, R.C. Thompson, M. Thiel, Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 3060–3075.
- [65] M. Wagner, C. Scherer, D. Alvarez-Munoz, N. Brennholt, X. Bourrain, S. Buchinger, E. Fries, C. Grosbois, J. Klasmeier, T. Marti, S. Rodriguez-Mozaz, R. Urbatzka, A. Vethaak, M. Winther-Nielsen, G. Reifferscheid, Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know, *Environ. Sci. Eur.* 26 (2014) 1–9.
- [66] S. Sobanska, H. Hwang, M. Choel, H.J. Jung, H.J. Eom, H. Kim, J. Barbillat, C.U. Ro, Investigation of the chemical mixing state of individual Asian dust particles by the combined use of electron probe X-ray microanalysis and Raman microspectrometry, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3145–3154.
- [67] A. Iwata, A. Matsuki, Characterization of individual ice residual particles by the single droplet freezing method: a case study in the Asian dust outflow region, *Atmos. Chem. Phys.* 18 (2018) 1785–1804.
- [68] J.C. Myers, *Normal Distribution Function, Geostatistical Error Management*, 1997, pp. 134–151.
- [69] R. Valliant, J.A. Dever, F. Kreuter, *Sample Design and Sample Size for Single-stage Surveys, Practical Tools for Designing and Weighting Survey Samples*, Springer, New York Heidelberg Dordrecht London, 2013, pp. 37–39.
- [70] G. Kauermann, H. K uchenhoff, *Stichproben - Methoden und praktische Umsetzung mit R*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.
- [71] T. Rocha-Santos, A.C. Duarte, A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment, *Trac. Trends Anal. Chem.* 65 (2015) 47–53.
- [72] H.K. Imhof, J. Schmid, R. Niessner, N.P. Ivleva, C. Laforsch, A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments, *Limnol. Oceanogr. Meth.* 10 (2012) 524–537.
- [73] S. Felsing, C. Kochleus, S. Buchinger, N. Brennholt, F. Stock, G. Reifferscheid, A new approach in separating microplastics from environmental samples based on their electrostatic behavior, *Environ. Pollut.* 234 (2017) 20–28.
- [74] F. Bonnier, A. Mehmood, P. Knief, A.D. Meade, W. Hornebeck, H. Lambkin, K. Flynn, V. McDonagh, C. Healy, T.C. Lee, F.M. Lyng, H.J. Byrne, *In vitro* analysis of immersed human tissues by Raman microspectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 42 (2011) 888–896.

- [75] M.G.J. Loder, H.K. Imhof, M. Ladehoff, L.A. Loschel, C. Lorenz, S. Mintenig, S. Piehl, S. Primpke, I. Schrank, C. Laforsch, G. Gerdt, Enzymatic purification of microplastics in environmental samples, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 14283–14292.
- [76] R.R. Hurley, A.L. Lusher, M. Olsen, L. Nizzetto, Validation of a method for extracting microplastics from complex, organic-rich, environmental matrices, *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 7409–7417.
- [77] A.S. Tagg, J.P. Harrison, Y. Ju-Nam, M. Sapp, E.L. Bradley, C.J. Sinclair, J.J. Ojeda, Fenton's reagent for the rapid and efficient isolation of microplastics from wastewater, *Chem. Commun.* 53 (2016) 372–375.
- [78] J. Zięba-Palus, A. Michalska, Photobleaching as a useful technique in reducing of fluorescence in Raman spectra of blue automobile paint samples, *Vib. Spectrosc.* 74 (2014) 6–12.

Cite this: *Anal. Methods*, 2019, 11, 3483

# Implementation of an open source algorithm for particle recognition and morphological characterisation for microplastic analysis by means of Raman microspectroscopy†

Philipp M. Anger,‡ Leonhard Prechtl,‡ Martin Elsner,<sup>id</sup> Reinhard Niessner<sup>id</sup> and Natalia P. Ivleva<sup>id</sup>\*  
<sup>†</sup> Shared first authorship.

Microplastic (MP, *i.e.* synthetic polymer particles of 1  $\mu\text{m}$ –5 mm) is not only a suspected environmental contaminant, but also a challenging target for chemical analysis. To analyse particularly very small MP particles, Raman microspectroscopy (RM) enables morphological characterization and chemical identification at the single particle level. To this end, the RM procedure consists of the three steps: particle detection (recognition of particles and their morphological characterization), RM measurements and spectra evaluation. To enable effective and unbiased particle detection on filter samples even when covered by a multitude of particles, we present the implementation of *Otsu's* algorithm and a watershed-called transformation available as open source code for *ImageJ* on a common Raman microscope. *Otsu's* algorithm is an automatic thresholding algorithm that splits pixels in two groups (bright and dark) by minimizing the between-class variance of the two groups. The additional watershed transformation finds the watersheds of particle agglomerations. We demonstrate the effectiveness of our implementation of these algorithms. A coloured microscopic picture is converted into a black and white (b/w) image. Indents ("neck"-positions) of this image are then used to separate agglomerated particles. This implementation was critically evaluated regarding the criteria *accuracy (validity)*, *reliability (precision)* and *sensitivity*. The algorithm presented here (<https://gitlab.lrz.de/raman-sem-iwc/mipran>) allows for reliable detection of particles in a wide variety of particle characteristics (size, shape, colour and transparency) and illumination types (dark and bright field). It has the additional benefit that it is equally applicable to any method using image-based particle detection so that it can help in harmonizing MP research throughout the community.

Received 13th June 2019  
Accepted 17th June 2019

DOI: 10.1039/c9ay01245a

[rsc.li/methods](https://rsc.li/methods)

## Introduction

The term microplastic (MP) describes plastic fragments, fibres, films, spheres or foams that have a size between 1  $\mu\text{m}$  and 5 mm.<sup>1,2</sup> The potential risk of MP particles in the environment makes them a topic of great current public concern,<sup>2,3</sup> even though their effective risk, which is the combination of hazard and exposure, is still a field of debate.<sup>4,5</sup> Currently, four different analytical techniques are most commonly applied to assess MP loads in various environmental matrices. Two of them are mass spectrometry-based thermoanalytical methods, namely thermoextraction desorption-gas chromatography-

mass spectrometry (TED-GC-MS)<sup>6,7</sup> and pyrolysis-gas-chromatography-MS (Pyr-GC-MS).<sup>8</sup> The two other techniques are spectroscopic methods, Fourier-transform infrared (FT-IR) – (micro)spectroscopy<sup>9–14</sup> and Raman microspectroscopy (RM).<sup>1,2,9,15,16</sup> Both spectroscopic approaches yield results on a single particle level. Each of the methods have different advantages and disadvantages, which have been intensively discussed elsewhere.<sup>1,2,9,17,18</sup>

For RM analysis, all types of sample preparation have in common that they eventually transfer the MP from natural and biological samples onto a filter that is placed under the microscope. Such a filter is covered with numerous particles after a more or less intense procedure for the removal of (in)organic matrix. The theoretical spatial resolution of roughly half a micrometer<sup>1</sup> enables RM for the analysis of single particles, which is a great advantage over the MS-based methods. Furthermore, the higher spatial resolution of RM makes it possible to analyse particles smaller than 20  $\mu\text{m}$ , which is an additional advantage in comparison with FT-IR.<sup>1</sup> However, RM

*Institute of Hydrochemistry, Chair of Analytical Chemistry and Water Chemistry, Technical University of Munich, Marchioninstr. 17, 81377 Munich/DE, Germany.*  
E-mail: [natalia.ivleva@tum.de](mailto:natalia.ivleva@tum.de); [p.anger@tum.de](mailto:p.anger@tum.de); [leonhard.prechtl@tum.de](mailto:leonhard.prechtl@tum.de); [m.elsner@tum.de](mailto:m.elsner@tum.de); [reinhard.niessner@ch.tum.de](mailto:reinhard.niessner@ch.tum.de)

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9ay01245a

‡ Shared first authorship.

analyses on a single particle level is also a time-consuming process since the number of particles increases dramatically with decreasing particle size. The first attempts to analyse MP particles with RM relied on experimenter input for particle selection, particle measurements, and spectra evaluation.<sup>16</sup> Current developments aim at the automation of as many aspects of the analytical process as possible. Herein, we present an open source solution for a crucial step in this workflow: the automated recognition and morphological characterization of particles.

### Otsu's method

In 1979 Nobuyuki *Otsu* presented a method that enables an unsupervised threshold selection from a grey level image.<sup>19</sup> The algorithm is applicable to gray level images that consist of two (or more) classes, *e.g.* the objects that need to be identified and the background. The discrimination is based on the different intensity values of the object pixel and the background pixel. In an obvious case, the pixel intensities, displayed in a histogram, easily reveal the two classes, which are then divided by a “valley”. *Otsu* described a way to determine the “valley” in the histogram for less obvious cases as seen in Fig. 1.

*Otsu* showed that it is sufficient to maximize the between-class-variance. For the detailed derivation we refer to the original publication.<sup>19</sup> Briefly, the discriminant criterion measure  $\eta$  – which is a measure of class separability – is given by the formula  $\eta = \sigma_B^2 / \sigma_T^2$ , where  $\sigma_B^2$  is the between-class-variance and  $\sigma_T^2$  the total-class-variance. Maximizing the criterion measure improves the “goodness” of the separation. The total-class-variance is independent of the threshold, whereas the between-class-variance is dependent. A “better” threshold yields a higher between-class-variance, thus yielding a higher criterion measure.

### Feret's diameter

In this work the Feret's diameter is used to define the size of a particle.<sup>20,21</sup> It is defined as the distance of two parallel

tangents which confine the particle. Rotation of a particle, of other shape than a perfect sphere, yields different diameters for every angle. Strictly speaking Feret's diameter is the mean of all diameters over all angles. For our program we have chosen to give the maximum diameter and the minimum diameter. The maximum Feret's diameter of a particle is a useful measure of particle size, which is already applied by *e.g.* Imhof *et al.*<sup>16</sup>

### Euclidian distance map – watershed

The watershed transform calculates an Euclidian distance map (EDM). The Euclidian distance is the distance between two points calculated in Euclidian space *i.e.* using the Pythagorean theorem. Based on the threshold image the Euclidian distance of every object pixel to the nearest background pixel is calculated. The resulting image can be interpreted as a height map where pixels with the longest distance to the nearest background pixel resemble the summits. The generated image (see Fig. S1 in the ESI†) can be interpreted for the watersheds. The algorithm searches for the maxima of the EDM (the watershed) and then splits the agglomerates into single particles at indents or “neck”-positions starting from a maximum.<sup>22</sup>

### Evaluation of the image segmentation algorithm

Evaluation of an image segmentation algorithm is a complex procedure. Some good overview articles can be found elsewhere.<sup>23–27</sup> In short, criteria need to be defined, for which measurable output can be produced that yields a “good” representation from the viewpoint of the human observer. In the course of this work we give an evaluation based on the criteria *accuracy (validity)*, *reliability (precision)* and *sensitivity*. The first two criteria are evaluated as empirical ones, *i.e.* particle numbers resulting from test images are compared. The third criterion (*sensitivity*) is treated as an analytical criterion as it is evaluated based on the principle of the algorithm.<sup>26</sup> However, these criteria can only partly resemble a segmentation by a human. We, therefore, strongly emphasize, that everyone should (at least shortly) evaluate the algorithm for their own samples. The criteria are defined as follows: *accuracy* or *validity* describes the performance of an algorithm compared to some reference. This could either be another algorithm or a human expert.<sup>23</sup> *Reliability* or *precision* of an algorithm is determined by comparing the results for repeated application on a stable set of images determined.<sup>23</sup> *Sensitivity* is the susceptibility of the algorithm to small changes of the image.<sup>23</sup> The most widely applied method for the evaluation of image segmentation is subjective evaluation.<sup>25,27</sup> This method has the drawback of a possible bias of the human expert which is inherent to any subjective evaluation.<sup>25</sup> Nevertheless, we applied this approach as it seemed to be suitable for our work, which is to show the applicability of *Otsu's* algorithm and the additional watershed transform for MP analysis. The human expert who assigned the particles for this evaluation has five years of experience in MP analysis by means of RM and can, therefore, be taken as reference. We acknowledge that this is not the highest ranked evaluation possible, but it can nevertheless show the applicability of our approach.

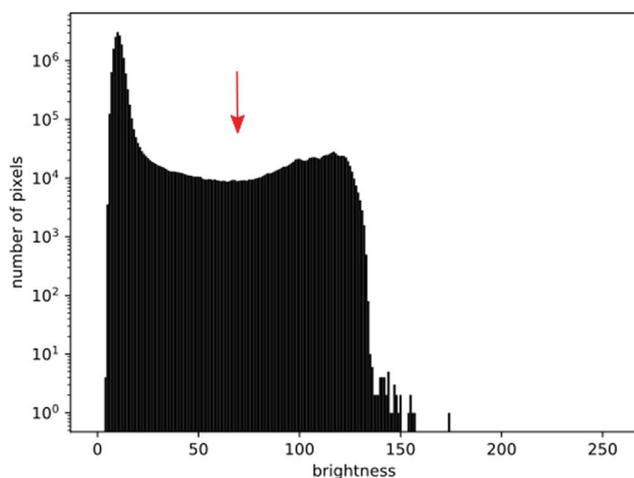


Fig. 1 Histogram of pixel intensities for an image straightforward divided into two classes. The “valley” between the two maxima is easily identifiable (red arrow).

## Experimental

The microscopic images (Fig. 2–4) of the main manuscript were acquired with an *alpha300R* (Witec GmbH) Raman microscope using an objective with 5× magnification (Olympus). For image processing *ImageJ* 1.5 was applied.<sup>28</sup> Using Java, several *ImageJ* plugins were combined to create an Open Source software package that implements *Otsu's* algorithm, a particle finding algorithm, a watershed transform and some possibilities for image handling. The *ImageJ* documentation and plugins can be found online.<sup>22</sup> The command line inputs are interpreted by the Apache Commons CLI library. The software package itself can be found at the LRZ GitLab repository <https://gitlab.lrz.de/raman-sem-iwc/mipran>.

The image processing workflow is displayed in Fig. 2. First, a microscopic image is recorded (Fig. 2a). Subsequently, it is converted into a gray level image using the hue channel of the HSV colour model (Fig. 2b). Applying *Otsu's* algorithm on the gray level image yields a threshold that assigns all pixels into two classes. The image is converted into a black and white (b/w) image (Fig. 2c). The program encircles the identified particles (Fig. 2d). Finally, the original image is superimposed with the outline of the found particles to display the overlay image (Fig. 2e). Within the image processing the coordinates of the found particles are calculated by determining the centroid/geometric centre from all pixels assigned to the corresponding particle. For the determination of the *x*-coordinate of the centroid

( $x_c$ ) and analogue for  $y_c$  the equation  $x_c = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N x_i$ , where  $x_i$  iterates over the  $N$  pixels belonging to the particle, was used.

The program has a limited number of processing parameters to choose from (Fig. 3). For image processing user input is required for the applied *protocol*. The user can choose between *Single Image* and *Stitching Image*. The former processes a single image, the latter stitches together an image out of images it finds in the chosen directory *via* the button *Open Image*. The program accepts Windows bitmap (bmp) and portable network graphic (png) as

format. The field *min. pixels* sets the number of pixels needed to define a particle. Its default value is 20, which means that 20 directly connected pixels are needed to define a particle. The user is also requested to state the minimal size of a particle *via* the field *min. size/μm*. This sets the minimal Feret's diameter, whereas *min. pixels* together with the field *resolution/px μm<sup>-1</sup>* defines the minimum area of a particle. The field *max. size/μm* is used to set the maximum Feret's diameter and thereby can be used to exclude very large particles from the analysis. However, it can also exclude agglomerations if present. Its default value is 100 000. The field *resolution/px μm<sup>-1</sup>* requires the input of the used ratio while acquiring the image. The default value is 1. For the Raman microscope system used in this work, one can set the width and height in μm and the size of the image in pixel. To give an example, an image with a width/height of 4000 μm × 4000 μm and a size of 8000 pixels in *x*- and *y*-direction would yield a resolution of 2. We implemented only the possibility to set one resolution, which implies that the user should use only images with the same resolution value in *x*- and *y*-direction. By ticking the box *white particles* the user can tell the program that particles appear bright and the background is dark, which is the case for *e.g.* dark field images. Leaving the box unticked means particles are dark and background is bright, which in general resembles a bright field image. The box *watershed* activates the use of the watershed transform. The fields *coordinate base X/μm* and *coordinate base Y/μm* set the coordinates of the centre of the image. From this reference point the coordinates of the identified particles are calculated.

Different menu buttons in the program help to navigate through the analysis and to process results (Fig. 3). The button *Open Image* opens a (stitched) image, which is then displayed on the left side of the graphical user interface underlined with *Original Image*. By clicking the button *Analyze* the image processing is started with the chosen settings. The button *Import Settings* can be used to import settings that have been selected and saved before *via* the button *Save Settings*. The program analyses the image and displays its result on the right as an overlay of the original image and the found particles encircled

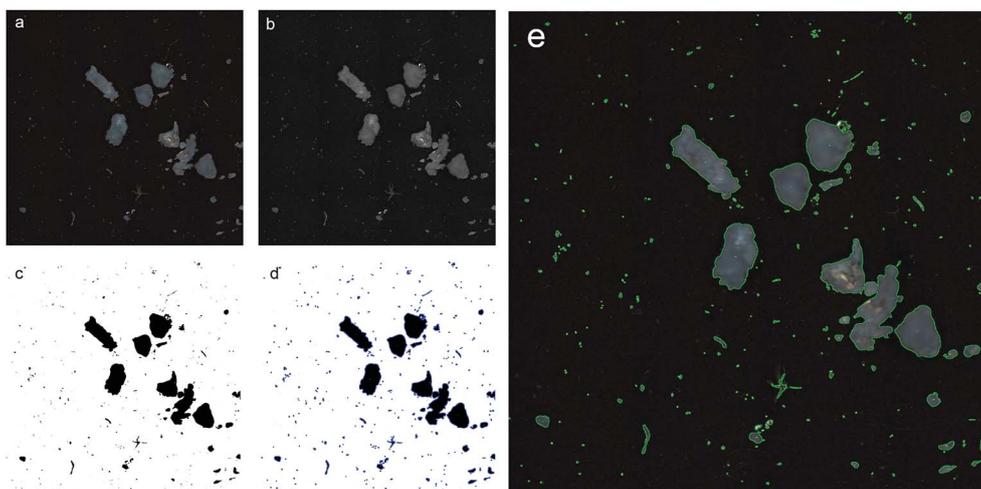


Fig. 2 Image processing scheme; (a) – original image, (b) – b/w image, (c) – threshold image, (d) – detected particles, (e) – overlay image.

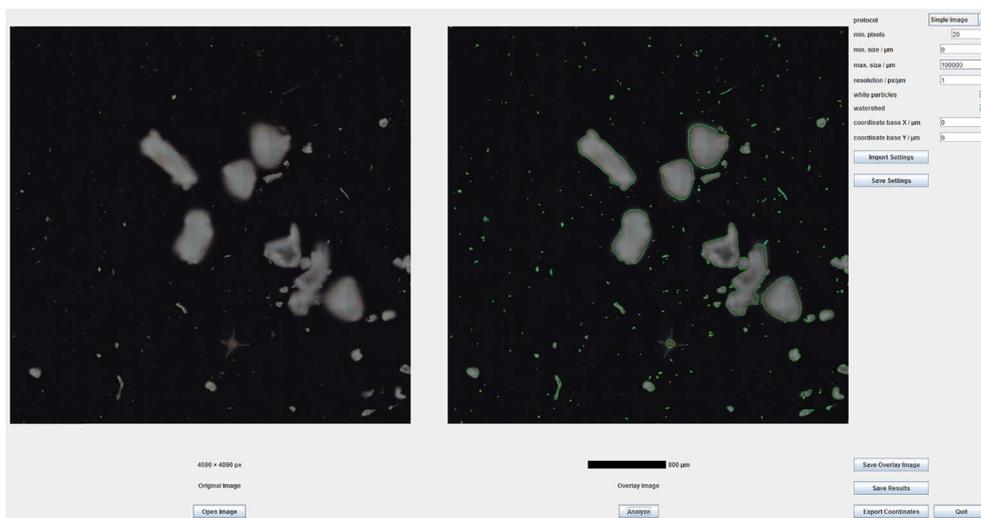


Fig. 3 Screenshot of the graphical user interface: left – original image, right – overlay image, far right – functionalities for image processing.

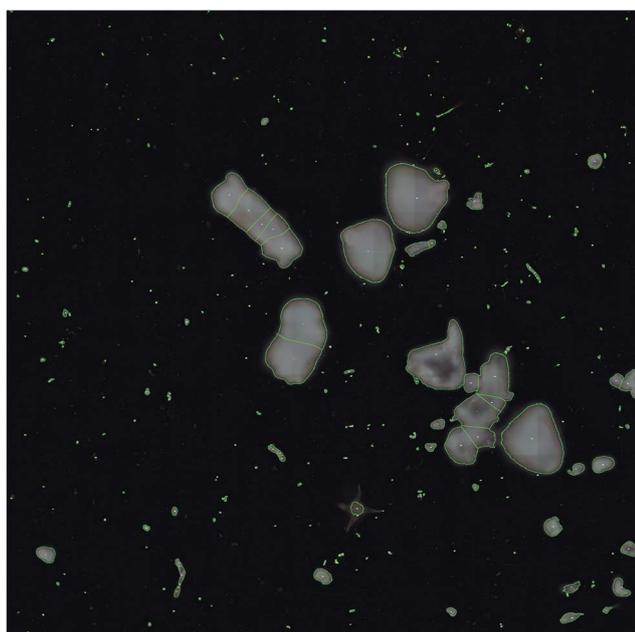


Fig. 4 Image processing of Fig. 2 with additional watershed transform.

with a narrow green line (see Fig. 2e). The *Overlay Image* can be saved by clicking the button *Save Overlay Image*. *Save Results* exports the coordinates, the maximum and the minimum Feret's diameter, and the area of the particles in a comma-separated value (csv) file. All particles are numbered consecutively according to their *y*-value and for equal *y*-values according to their *x*-value. The button *Export Coordinates* creates a csv file that only includes the numbering of the particles and the corresponding coordinates. Finally, the button *Quit* closes the program.

### Evaluation of the image segmentation algorithm

*Accuracy* or *validity* was measured image-wise by the accordance of the algorithm with a human expert. Therefore, we counted

the number of particles in the images displayed in the ESI† and compared these results with the results from the algorithm. We counted the number of false positives (found particles where there are none or wrong segmentation of existing particles) and false negatives (existing particles that were not found). False negatives are worse, because this type of error decreases the number of MP particles that can be found. The accordance value was calculated by the following equation:  $\text{accordance} = (N_{\text{algorithm}} - N_{\text{false-positives}}) / N_{\text{human-expert}}$ , where *N* are the respective counts of particles. For better readability the results were given in percentages. A more detailed explanation can be found in the ESI.† *Reliability* or *precision* is the ability of the algorithm to yield the same results for repetitions on stable data.<sup>23</sup> For this evaluation step we applied rotation by 90° counterclockwise and as second comparison, vertical flipping. Instead of comparing the results to the results of the human expert, we compared them among each other. *Sensitivity* is visualized with some images yielding only a very small contrast.

For evaluation a representative set of images is needed.<sup>24</sup> Therefore, we used images from MP samples found in the literature as a database, namely from the works of Ossmann *et al.* (Fig. S3–S5†), K  ppler *et al.* 2018 (Fig. S6, S12–S14†), L  der *et al.*<sup>10</sup> (Fig. S7–S9, S15–S18, S24 and S25†), K  ppler *et al.* 2016 (ref. 9) (Fig. S10, S11, S20 and S22†), Fr  re *et al.* (Fig. S23†), Domogalla-Urbansky and Anger *et al.*<sup>29</sup> (Fig. S26†) as well as own images made for this study (Fig. S19 and S21†).

The individual results for all images can be found in the ESI,† only some examples will be discussed in the main manuscript.

## Results & discussion

In Fig. 2e a processed image is displayed as example. The watershed transform was deactivated and all other user input was in default values. This image can serve as an example to illustrate the capabilities and shortcomings of the program. One can easily see that all larger particles are correctly

identified. In Fig. S2 in the ESI,† which is a magnified section of Fig. 2e, it becomes apparent that besides some particles which are not bright enough, also small particles are recognized well. A problem, however, occurs with the agglomerate in the right half of the picture (Fig. 2e). The particles contributing to this agglomerate are not individually resolved so that the actual particle number is underestimated. The additional application of the watershed transform is shown in Fig. 4. In contrast to Fig. 2e the agglomerate is divided so that the separate particles are identified this time. However, two of the larger particles are divided, as well. This leads to additional measurement points and overestimates the number of particles. Consequently, any agglomeration of particles creates difficulties meaning that overloading of filters should be avoided.

The figures included in the ESI (Fig. S3–S26†) illustrate the wide applicability of our approach for the detection of particles. We included images of bright particles on dark background (Fig. S3–S6, S9–S18†), of dark particles on bright background (Fig. S7, S8, S19–S25†), of particles with differing colour (e.g. Fig. S6†), of particles with different transparencies (e.g. Fig. S7 and S8†), of different shapes (fibres e.g. Fig. S19 & S20,† fragments e.g. Fig. S3,† spheres e.g. Fig. S9† and films e.g. Fig. S11†) and of different arrangements (isolated particles e.g. Fig. S16,† agglomerates e.g. Fig. S9†). For all images but one (Fig. S18†) we used the default values. For Fig. S18† the min. pixel size was set from 20 to 5, since the particles were very small in comparison to the overall image size. We processed the images with watershed transform turned on and off. The resulting images were opposed to the original one and each other. The only decision we made was that for bright particles the box “white particles” was ticked and for dark particles unticked.

The image series created from figures of Ossmann *et al.*<sup>30</sup> shows that particles do not need to be very bright (Fig. S3 and S4 in the ESI†). These images show accordances ranging from 79.2% to 100%. In fact, it is more of a problem, when pictures are over-illuminated which makes features of the filter, in this case pores, glow like actual particles (Fig. S5 in the ESI†). In an image series created from Käßler *et al.* 2018<sup>31</sup> it is shown that even bicoloured particles are found and identified as coherent ones (Fig. S6 in the ESI†). In this case the accordance was 100%. The limits of the algorithm are reached in the images by Löder *et al.*<sup>10</sup> where the optical contrast between particles and background is not high enough to differentiate between them. However, this does not mean that particles are not found, but rather that additional particles are recognized (Fig. S7 in the ESI†). A problem for the algorithm are images where parts of the background are brighter than the particles and other parts of the background are darker than the particles, which can be seen in the series from images of Löder *et al.*<sup>10</sup> (Fig. S7 and S8 in the ESI†). However, this is a rather unusual case and, in general, a good contrast between background and particles is achievable. Overall, the application of the additional watershed transform yields better or at least the same results of accordance for all processed images. The watershed transform is nevertheless an additional one, because for images rich in fibres it will be counterproductive as it will create quite a lot of additional measurement points. The series created from

Käßler *et al.* 2016<sup>9</sup> (Fig. S10 and S19 in the ESI†) and one of our own images (Fig. S20 in the ESI†) illustrate how the watershed transform impairs the result for fibres and fibre-like particles, as these are dissected into smaller particles. For an imaginary filter sample covered with a great number of fibres and agglomerates this restriction would result in biased results. In the one case, the application of the watershed transform would lead to an excessive number of additional measurement points and an underestimation of the particle size. In the other case, if the watershed transform is deactivated, agglomerates would not be separated adequately, which would lead to an underestimation of the true number of particles and an overestimation of their size. Thus, depending on the sample type the decision for application of the watershed transform has to be made.

The evaluation of *reliability* or *precision* showed an extremely high stability of the algorithm concerning rotated or flipped images. In fact, for all cases the accordance was 100%. Only for one processed image one false positive was found after rotation and after vertical flipping (Fig. S4†).

The evaluation concerning *sensitivity* is based on the properties of *Otsu's* algorithm, which makes use of the contrast between particles and background. Therefore, the algorithm fails if the contrast is not sufficiently high enough. This is evident in the images of Löder *et al.*<sup>10</sup> (Fig. S7 and S8†). In these images the contrast is only minimal due to a partial transparency of the particles. This leads to unsatisfying results, but may be circumvented by the use of dark field illumination.

## Conclusions

Our approach of applying *Otsu's* algorithm and a watershed transform provides a straightforward solution to deliver reasonable particle detection (recognition and morphological characterization) for a wide variety of different particle characteristics (size, shape, colour and transparency) and illumination types (dark and bright field). We critically evaluated *accuracy* (*validity*), *reliability* (*precision*) and *sensitivity*. The accordance values for *accuracy* or *validity* are for most images around 90% or higher. The accordance values for *reliability* or *precision* achieved 100% for all but one tested images. The bottleneck of the implemented algorithm is its *sensitivity* towards small differences in the contrast between particles and background.

The software and the choice of options for image processing are kept simple. In fact, for the majority of cases it is sufficient to use the default values and to decide whether particles are bright or dark, and to check whether the application of the additional watershed transform yields a better representation of the particles. Generally, for the images the default values were applied. These limited options are a great strength of our approach, as it makes the image processing step reproducible and thus yields comparable analyses in different laboratories. In contrast, a software that enables the user to change parameters in an almost unlimited manner implies that for every image a different (optimized) setting may be found. This compromises the idea of an algorithm which replaces a human decision-maker.

Although our program represents an easily applicable solution which can help to harmonize analytical protocols for MP particles, there are some cases where further development is needed. The simultaneous presence of a great number of fibres and agglomerates is still a problem, since the watershed algorithm would either mistake fibres as lengthy agglomerates of particles, or – when switched off – would not be able to identify true agglomerates. A more sophisticated approach is, hence, needed to tackle MP samples of such kind.

## Conflicts of interest

The authors have no competing interests to declare.

## Acknowledgements

We thank Elisabeth von der Esch, Carolin Hartmann and Christian Schwaferts for helpful discussions. We gratefully acknowledge funding by the German Federal Ministry of Education and Research (MiWa – Microplastic in the water cycle, 02WRS1378C).

## References

- 1 P. M. Anger, E. von der Esch, T. Baumann, M. Elsner, R. Niessner and N. P. Ivleva, Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2018, **109**, 214–226, DOI: 10.1016/j.trac.2018.10.010.
- 2 N. P. Ivleva, A. C. Wiesheu and R. Niessner, Microplastic in aquatic ecosystems, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2017, **56**, 1720–1739, DOI: 10.1002/anie.201606957.
- 3 A. L. Andrady, The plastic in microplastics: A review, *Mar. Pollut. Bull.*, 2017, **119**(1), 12–22, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.01.082.
- 4 M. Ogonowski, Z. Gerdes and E. Gorokhova, What we know and what we think we know about microplastic effects – A critical perspective, *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 2018, **1**, 41–46, DOI: 10.1016/j.coesh.2017.09.001.
- 5 R. Triebskorn, T. Braunbeck, T. Grummt, L. Hanslik, S. Huppertsberg, M. Jekel, *et al.*, Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2019, **110**, 375–392, DOI: 10.1016/j.trac.2018.11.023.
- 6 E. Dümichen, P. Eisentraut, C. G. Bannick, A. K. Barthel, R. Senz and U. Braun, Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method, *Chemosphere*, 2017, **174**, 572–584, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.010.
- 7 P. Eisentraut, E. Dümichen, A. S. Ruhl, M. Jekel, M. Albrecht, M. Gehde, *et al.*, Two birds with one stone—fast and simultaneous analysis of microplastics: microparticles derived from thermoplastics and tire wear, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 2018, **5**, 608–613, DOI: 10.1021/acs.estlett.8b00446.
- 8 M. Fischer and B. M. Scholz-Böttcher, Simultaneous trace identification and quantification of common types of microplastics in environmental samples by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**(9), 5052–5060, DOI: 10.1021/acs.est.6b06362.
- 9 A. Käßler, D. Fischer, S. Oberbeckmann, G. Schernewski, M. Labrenz, K. J. Eichhorn, *et al.*, Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both?, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**(29), 8377–8391, DOI: 10.1007/s00216-016-9956-3.
- 10 M. G. J. Löder, M. Kuczera, S. Mintenig, C. Lorenz and G. Gerdtts, Focal plane array detector-based micro-fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental Samples, *Environ. Chem.*, 2015, **12**(5), 563–581, DOI: 10.1071/en14205.
- 11 S. Primpke, M. Wirth, C. Lorenz and G. Gerdtts, Reference database design for the automated analysis of microplastic samples based on Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **21**, 5131–5141, DOI: 10.1007/s00216-018-1156-x.
- 12 S. Primpke, C. Lorenz, R. Rascher-Friesenhausen and G. Gerdtts, An automated approach for microplastics analysis using focal plane array (FPA) FTIR microscopy and image analysis, *Anal. Methods*, 2017, **9**(9), 1499–1511, DOI: 10.1039/c6ay02476a.
- 13 M. Simon, N. van Alst and J. Vollertsen, Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging, *Water Res.*, 2018, **142**, 1–9, DOI: 10.1016/j.watres.2018.05.019.
- 14 G. Renner, T. C. Schmidt and J. Schram, A new chemometric approach for automatic identification of microplastics from environmental compartments based on FT-IR spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2017, **89**(22), 12045–12053, DOI: 10.1021/acs.analchem.7b02472.
- 15 C. F. Araujo, M. M. Nolasco, A. M. P. Ribeiro and P. J. A. Ribeiro-Claro, Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects, *Water Res.*, 2018, **142**, 426–440, DOI: 10.1016/j.watres.2018.05.060.
- 16 H. K. Imhof, C. Laforsch, A. C. Wiesheu, J. Schmid, P. M. Anger, R. Niessner, *et al.*, Pigments and plastic in limnetic ecosystems: a qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes, *Water Res.*, 2016, **98**, 64–74, DOI: 10.1016/j.watres.2016.03.015.
- 17 S. Huppertsberg and T. P. Knepper, Instrumental analysis of microplastics-benefits and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **410**(25), 6343–6352, DOI: 10.1007/s00216-018-1210-8.
- 18 G. Renner, T. C. Schmidt and J. Schram, Analytical methodologies for monitoring micro(nano)plastics: Which are fit for purpose?, *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 2018, **1**, 55–61, DOI: 10.1016/j.coesh.2017.11.001.
- 19 N. Otsu, A threshold selection method from gray-level histograms, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 1979, **9**(1), 62–66, DOI: 10.1109/tsmc.1979.4310076.

- 20 W. H. Walton, Feret's statistical diameter as a measure of particle size, *Nature*, 1948, **162**, 329, DOI: 10.1038/162329b0.
- 21 W. Boyes, *Particle Sizing. Instrumentation Reference Book*, Butterworth-Heinemann, 4th edn, 2010.
- 22 Health NIO, *ImageJ API Documentation*, 04.03.2019, <https://imagej.nih.gov/ij/developer/api/index.html?overview-summary.html>.
- 23 M. Wirth, M. Frascini, M. Masek and M. Bruynooghe, Performance evaluation in image processing, *EURASIP Journal on Advances in Signal Processing*, 2006, **2006**(1), 1–3, DOI: 10.1155/asp/2006/45742.
- 24 J. K. Udupa, V. R. Leblanc, Y. Zhuge, C. Imielinska, H. Schmidt, L. M. Currie, *et al.*, A framework for evaluating image segmentation algorithms, *Comput. Med. Imaging Graph.*, 2006, **30**(2), 75–87, DOI: 10.1016/j.compmedimag.2005.12.001.
- 25 Y. Chen, D. Ming, L. Zhao, B. Lv, K. Zhou and Y. Qing, Review on high spatial resolution remote sensing image segmentation evaluation, *Photogramm. Eng. Remote Sens.*, 2018, **84**(10), 629–646, DOI: 10.14358/pers.84.10.629.
- 26 Y. J. Zhang, A survey on evaluation methods for image segmentation, *Pattern Recogn.*, 1996, **29**(8), 1335–1346.
- 27 H. Zhang, J. E. Fritts and S. A. Goldman, Image segmentation evaluation: A survey of unsupervised methods, *Comput. Vis. Image Understand.*, 2008, **110**(2), 260–280, DOI: 10.1016/j.cviu.2007.08.003.
- 28 C. A. Schneider, W. S. Rasband and K. W. Eliceiri, NIH Image to *ImageJ*: 25 years of Image Analysis, *Nat. Methods*, 2012, **9**(7), 671–675.
- 29 J. Domogalla-Urbansky, P. M. Anger, H. Ferling, F. Rager, A. C. Wiesheu, R. Niessner, *et al.*, 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), 2007–2012, DOI: 10.1007/s11356-018-3609-3.
- 30 B. E. Ossmann, G. Sarau, S. W. Schmitt, H. Holtmannspotter, S. H. Christiansen and W. Dicke, Development of an optimal filter substrate for the identification of small microplastic particles in food by micro-Raman spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 4099–4109, DOI: 10.1007/s00216-017-0358-y.
- 31 A. Käßler, M. Fischer, B. M. Scholz-Böttcher, S. Oberbeckmann, M. Labrenz, D. Fischer, *et al.*, Comparison of  $\mu$ -ATR-FTIR spectroscopy and py-GCMS as identification tools for microplastic particles and fibers isolated from river sediments, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **410**(21), 5313–5327, DOI: 10.1007/s00216-018-1185-5.