

# Andromeda

## Analysis techniques for quantifying nano- and microplastic particles and their degradation in the marine environment

### Contexte

Ce rapport résume les résultats obtenus par ILVO et VLIZ dans le cadre du projet Andromeda de JPI Oceans. Un large éventail de méthodes est disponible pour analyser les microplastiques (MPs) dans les matrices de l'environnement marin, allant de la simple microscopie optique et de la spectroscopie particule par particule à la spectroscopie d'imagerie et à divers algorithmes statistiques et ensembles d'outils d'analyse d'images. Dans cette myriade d'options, le projet Andromeda a identifié un besoin évident d'optimisation, de validation et d'harmonisation du courant, afin d'ajuster les méthodes disponibles aux besoins de surveillance et de recherche.

Les travaux effectués par l'ILVO et le VLIZ se focalisent sur l'amélioration de méthodes d'analyse des microplastiques qui soient à la fois rentables et efficaces. Un aspect important de ces recherches concerne l'utilisation de techniques de coloration du Rouge du Nil (NR) comme alternatives fiables aux méthodes spectroscopiques coûteuses et chronophages telles que la spectroscopie  $\mu$ FTIR ou  $\mu$ Raman. Le développement et l'optimisation de telles méthodes rentables sont complexes, car elles doivent combiner des gains de temps et d'argent par rapport aux méthodes d'analyse de pointe, tout en garantissant un niveau d'exactitude et de précision acceptable, une détection fiable d'une grande variété de polymères, ainsi qu'une faible probabilité de contamination. La coloration fluorescente des MP à l'aide du colorant hydrophobe NR, fréquemment utilisé en histologie, permet de détecter rapidement la présence de MP dans les échantillons environnementaux grâce à la microscopie à fluorescence. La coloration au NR s'est avérée efficace pour distinguer les MP des matériaux non plastiques tels que les carapaces d'amphipodes, les algues, le bois, les plumes, les coquilles de mollusques, la craie et les particules de sable. . En outre, l'interaction du NR avec différents polymères varie en fonction des caractéristiques chimiques du plastique, ce qui a permis d'utiliser avec succès la coloration au NR des particules pour l'identification des polymères basée sur la fluorescence.

L'automatisation de méthodologies peu coûteuses de coloration par fluorescence comme alternative aux méthodologies souvent utilisées, basées sur la spectroscopie, est apparue comme une alternative prometteuse pour le développement de méthodes de criblage rentables pour l'analyse des particules. Cependant, la plupart de ces approches se concentrent uniquement sur la détection des particules et utilisent des modèles de boîte noire plutôt que des modèles de boîte blanche, dont la structure interne est transparente et qui représentent l'information de manière visuelle et claire. En outre, au début du projet, l'interaction entre le NR et différents polymères sur la base de leurs caractéristiques chimiques n'a pas encore été étudiée de manière approfondie et présente un potentiel pour le développement de méthodes d'analyse plus avancées, à haut débit et rentables, permettant à la fois la détection des MP et l'identification des polymères.

### Objectifs

Les principaux objectifs de l'ILVO et du VLIZ dans le cadre du projet Andromeda étaient les suivants :

#### 1. Analyse des microplastiques par fluorochromes

- Développer une méthodologie ex-situ simple et semi-automatique pour détecter et identifier les MP, basée sur la coloration au NR, qui permet également d'identifier les polymères plastiques les plus abondamment produits.

- Optimiser les protocoles de traitement des échantillons pour l'extraction des MP avec des méthodes basées sur le NR à partir de l'eau de mer, des sédiments et du biote, et valider le flux de travail de l'analyse des MP.
- Tester l'applicabilité des protocoles de traitement et d'analyse des échantillons développés pour des échantillons environnementaux réels et, entre-temps, fournir une mise à jour de la pollution par les MP dans la partie Belge de la mer du Nord (BPNS), en mettant l'accent sur le site d'élimination des dragues Zeebrugge Oost, qui constitue un hotspot pour les macroplastiques.
- Réaliser une étude exploratoire pour vérifier le potentiel de la combinaison de la cytométrie de flux et de la coloration fluorescente des MP, afin de développer une méthode d'analyse in situ, semi-automatique et rapide pour observer les MP de petite taille dans l'eau de mer à bord d'un navire de recherche, sans qu'il soit nécessaire de procéder à une étape de traitement approfondie de l'échantillon.

## 2. Analyse coût-efficacité

- Réaliser une analyse de la rentabilité (ACE) des méthodes couramment utilisées pour l'analyse des MP dans l'eau de mer, sur la base des données d'enquête recueillies auprès d'experts dans ce domaine, et fournir des recommandations concrètes et utiles sur les techniques d'analyse des MP en termes de rentabilité. Cette analyse vise à aider les chercheurs, les décideurs politiques et les autres parties prenantes à choisir entre différentes méthodes d'analyse des polluants organiques persistants.

## **Conclusions**

Le principal résultat de la collaboration ILVO-VLIZ dans ce projet est l'optimisation et la validation d'une méthode d'analyse basée sur le NR pour les MPs dans différentes matrices de l'environnement marin. Une méthode de classification semi-automatique en deux étapes a été créée, combinant la quantification des couleurs (RVB) basée sur l'analyse automatisée des filtres de particules colorés au NR et photographiés avec un microscope à fluorescence (FM) avec un modèle d'arbre de classification ('*decision tree*'). Ce modèle est supervisé par apprentissage automatique (ML) et développé dans un environnement open-source, en utilisant les logiciels ImageJ et Rstudio. Deux modèles ont été développés : le premier, le modèle de détection des plastiques ('*Plastic Detection Model*' - PDM), peut prédire avec une grande précision si les particules sont d'origine plastique ou non, sur la base de leur coloration fluorescente (95,8 % de particules correctement identifiées). Le second, le modèle d'identification des polymères ('*Polymer Identification Model*' - PIM), peut identifier les types de polymères plastiques (88,1 % de particules correctement identifiées).

Des tests supplémentaires avec des plastiques altérés artificiellement ont cependant montré une baisse de la précision prédictive des modèles ML développés. Après avoir élargi les ensembles de données existants de 2 x 60 à 2 x 500 particules (PDM) et de 7 x 30 à 7 x 200 particules (PIM), les modèles les plus performants pour les MP altérés artificiellement étaient basés sur des algorithmes de forêt 'arbres décisionnels' ('*random forest*'), plutôt que sur des arbres de décision (> 90 % et > 80 % de précision pour PDM et PIM, respectivement). Il a donc été décidé d'utiliser les modèles améliorés pour toutes les analyses ultérieures des MP. La détermination de la taille limite des modèles basés sur

Les algorithmes de forêt aléatoire a montré que les polymères MP vierges de moins de 10  $\mu\text{m}$  pouvaient encore être identifiés avec précision à l'aide de la méthode mise au point. Un deuxième ensemble de modèles de forêt aléatoire a été construit en utilisant des images acquises avec un stéréomicroscope à fluorescence (FSM) plutôt qu'avec un FM, qui permet l'acquisition d'images de filtres entiers. Les tests interlaboratoires des modèles ont cependant montré des précisions inférieures pour les MP photographiés avec un microscope différent de celui utilisé pour développer les modèles. Ces résultats démontrent que des ensembles de données d'entraînement spécifiques au laboratoire sont nécessaires pour une analyse fiable des MP. Ensuite, un protocole d'analyse détaillé a été rédigé pour la détection des MP et l'identification de leurs types de polymères respectifs à l'aide des deux modèles de forêt aléatoire ML développés.

Les protocoles de traitement des échantillons ont été optimisés pour l'extraction des MP à partir de différentes matrices marine. Ces protocoles garantissent une utilisation efficace du protocole d'analyse susmentionné. Les protocoles ont été validés et une attention particulière a été accordée à l'AQ/CQ analytique associé à la validation de ces protocoles. Les protocoles de traitement des échantillons mis au point ont été utilisés avec succès pour extraire les MP de diverses matrices sur le site d'immersion de dragues Zeebrugge Oost et à proximité, ainsi que dans des zones de référence. L'analyse de la pollution par les MP dans ces zones est actuellement en cours.

Des expériences combinant la cytométrie de flux et le colorant fluorescent NR ont montré un potentiel pour le développement futur d'une méthode d'analyse in situ des MP où les MP jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  peuvent être détectées, et où aucun traitement d'échantillon n'est nécessaire. Des résultats exploratoires ont montré que les signaux fluorescents obtenus permettent de différencier les particules de la matière organique à l'aide de l'algorithme *K-Nearest Neighbors* (K-NN), qui est un algorithme d'apprentissage automatique simple et supervisé.

Enfin, un outil prédictif a été développé à partir des données d'enquête obtenues sur la rentabilité des méthodes d'analyse des MP. À l'avenir, cet outil pourrait aider les acteurs scientifiques, politiques et industriels à mieux comprendre quels flux de travail offrent le meilleur rapport qualité-prix pour des échantillons d'eau de mer spécifiques et pourrait servir de données de référence. En outre, il pourrait permettre une prise de décision plus éclairée en matière de politique et de gestion.

#### **Keywords**

Microplastiques, microscopie à fluorescence, rouge du Nil, apprentissage automatique, intelligence artificielle, plastiques altérés, validation, analyse coût-efficacité.