Near infrared hyperspectral imaging and multivariate image analysis for microplastics identification and characterisation in aquatic samples

Cristina Malegori1\*, Stefania Piarulli2,3, Ferrante Grasselli2, Laura Airoldi2,4, Silvia Prati5, Rocco Mazzeo5, Giorgia Sciutto5, Paolo Oliveri1

1DIFAR - Department of Pharmacy, University of Genova, Viale Cembrano 4, 16148 – Genova, malegori@difar.unige.it, oliveri@difar.unige.it.

2UO CoNISMa - Department of Biological, Geological and Environmental Sciences and Interdepartmental Research Centre for Environmental Sciences, University of Bologna, Via S. Alberto 163, 48123 – Ravenna, stefania.piarulli2@unibo.it, laura.airoldi@unibo.it.

3SINTEF Ocean - Department of Clima and Environment, Brattørkaia 17 C, 7010 - Trondheim, Norway, stefania.piarulli2@unibo.it

4Department of Biology, Chioggia Hydrobiological Station Umberto D’Ancona, University of Padova, 30015 – Chioggia, laura.airoldi@unibo.it.

5Department of Chemistry “G. Ciamician”, University of Bologna, Via Guaccimanni 42, 48121 – Ravenna, s.prati@unibo.it, rocco.mazzeo@unibo.it, giorgia.sciutto@unibo.it.

\*Corresponding author

Microplastic (MP) contamination is a critical environmental challenge with potential consequences on the ecosystems and for human health. For this reason, there is an urgent need for developing reliable methods enabling to monitor the presence of these particles in different environmental compartments and biota, especially in aquatic samples, because the marine environment is demonstrated to be the final sink for MP contamination.

In light of this consideration, the present work proposes near infrared hyperspectral imaging (NIR-HSI) as an analytical method for the identification and characterisation of small MP, down to 50 μm, in aquatic samples.

For testing the proposed strategy, 54 cellulose filters were analysed: 27 samples were prepared by the filtration of the digested soft tissue of individual mussels, while 27 samples were prepared by filtering sea water samples (1 L each). Before filtration, all the 54 samples were artificially contaminated with different MP (polypropylene, polystyrene and polyamide) at 3 levels of addition – high (≅ 1.5 mg), medium (≅ 1 mg) and low (≅ 0.5 mg).

Moreover, 6 samples of sea water and digested soft tissue of mussels without any artificial contaminations were analysed, independently, for validating the analytical strategy.

NIR-HSI images were acquired by a SWIR-3 camera equipped with a 40x20 cm Lab Scanner (Specim Ltd, Finland), recording a short-wave infrared (SWIR) spectrum, in the region between 1000 nm up to 2500 nm, for each pixel of the image.

On the acquired data-cubes, chemical maps of the filters were obtained by calculating the normalised difference image (NDI), a data processing strategy able to enhance spectral differences between the cellulose background of the filter and the polymer of the MP. The combination of NDI with the evaluation of the spectral signature allows the analyst to differentiate between the 3 MP polymers investigated; the outcomes of the present study demonstrated the reliability of NIR-HSI coupled with the NDI, as an automatable and cost and time- effective method, for the identification of MP down to 50 μm on heterogenous sample matrices.

**Keywords:** Near infrared hyperspectral imaging, microplastics, aquatic samples.

Imaging iperspettrale nel vicino infrarosso e analisi multivariata delle immagini per l'identificazione e la caratterizzazione delle microplastiche in campioni acquatici

Cristina Malegori1\*, Stefania Piarulli2,3, Ferrante Grasselli2, Laura Airoldi2,4, Silvia Prati5, Rocco Mazzeo5, Giorgia Sciutto5, Paolo Oliveri1

1DIFAR – Dipartimento di Farmacia, Università di Genova, Viale Cembrano 4, 16148 – Genova, malegori@difar.unige.it, oliveri@difar.unige.it.

2UO CoNISMa - Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali e Centro di Ricerca Interdipartimentale per le Scienze Ambientali, Università di Bologna, Via S. Alberto 163, 48123 – Ravenna, stefania.piarulli2@unibo.it, laura.airoldi@unibo.it.

3SINTEF Ocean - Dipartimento di Clima e Ambiente, Brattørkaia 17 C, 7010 - Trondheim, Norway, stefania.piarulli2@unibo.it

4Dipartimento di Biologia, Stazione Idrobiologica Umberto D’Ancona, Università di Padova, 30015 – Chioggia, laura.airoldi@unibo.it.

5Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”, Università di Bologna, Via Guaccimanni 42, 48121 – Ravenna, s.prati@unibo.it, rocco.mazzeo@unibo.it, giorgia.sciutto@unibo.it.

\*Corresponding author

La contaminazione da microplastiche (MP) è una sfida ambientale critica con potenziali conseguenze sugli ecosistemi e per la salute umana. Per questo motivo, è fondamentale sviluppare metodi affidabili che consentano di monitorare la presenza di queste particelle nei diversi comparti ambientali e nel biota, in particolare nei campioni acquatici, perché l'ambiente marino si è dimostrato essere il collettore finale per la contaminazione da MP.

Alla luce di questa considerazione, il presente lavoro propone l'imaging iperspettrale nel vicino infrarosso (NIR-HSI) come metodo analitico per l'identificazione e la caratterizzazione di piccole MP, fino a 50 μm, in campioni acquatici.

Per testare la strategia proposta, sono stati analizzati 54 filtri di cellulosa: 27 campioni sono stati preparati filtrando i tessuti molli digeriti di singoli mitili, mentre 27 campioni sono stati preparati filtrando campioni di acqua di mare (1 L ciascuno). Prima della filtrazione, tutti i 54 campioni sono stati contaminati artificialmente con diverse MP (polipropilene, polistirene e polistirolo) a 3 livelli di contaminazione - alto ( 1,5 mg), medio ( 1 mg) e basso ( 0,5 mg).

Inoltre, sono stati analizzati in modo indipendente 6 campioni di acqua di mare e di tessuti molli digeriti di mitili senza contaminazioni artificiali per convalidare la strategia analitica.

Le immagini NIR-HSI sono state acquisite da una telecamera SWIR-3 dotata di un Lab Scanner da 40x20 cm (Specim Ltd, Finlandia), che registra uno spettro infrarosso (SWIR), nella regione compresa tra 1000 nm e 2500 nm, per ogni pixel dell'immagine.

Sui cubi di dati acquisiti, le mappe chimiche dei filtri sono state ottenute calcolando la *normalised difference image (NDI),* una strategia di elaborazione dati in grado di migliorare le differenze spettrali tra lo sfondo del filtro e il polimero. La combinazione di NDI con la valutazione della firma spettrale permette all'analista di differenziare tra i 3 polimeri studiati; i risultati del presente studio hanno dimostrato l'affidabilità di NIR-HSI accoppiato con NDI, come un metodo automatizzabile e conveniente in termini di costi e tempo, per l'identificazione di MP fino a 50 μm in matrici eterogenee.

**Keywords:** Imaging iperspettrale nel vicino infrarosso, microplastiche, campioni acquatici.