

## Entwicklung validierter Messverfahren als Voraussetzung zur Bewertung des Mikroplastikstatus in Fischereierzeugnissen

Julia Süssmann<sup>1</sup>, Elke Walz<sup>2</sup>, Torsten Krause<sup>1</sup>, Dierk Martin<sup>1</sup>, Ralf Greiner<sup>2</sup>, Elke Fischer<sup>3</sup>, Thomas Hackl<sup>4</sup>, Sascha Rohn<sup>5</sup>, Jan Fritsche<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität von Milch und Fisch, Kiel, <sup>2</sup>Max Rubner-Institut, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Karlsruhe, <sup>3</sup>Universität Hamburg, Centrum für Erdsystemforschung und Nachhaltigkeit, Hamburg <sup>4</sup>Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, Hamburg <sup>5</sup>Technische Universität Berlin, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Berlin

### Abstract

Kleine Kunststoffpartikel werden ubiquitär in der Umwelt und entlang der gesamten Nahrungskette nachgewiesen. Das sogenannte Mikro- und/oder Nanoplastik findet somit seinen Weg in die menschliche Ernährung. Als Haupteintragsquelle gelten unter anderem Fischereierzeugnisse. Die Einschätzung menschlicher Exposition und möglicher Risiken für die Lebensmittelsicherheit ist derzeit mangels validierter Analytik nicht möglich.

Mikroplastik wird üblicherweise nach Probenaufschluss und Isolierung der Partikel mit optischen, spektroskopischen oder massenspektrometrischen Verfahren untersucht. Möglicher Abbau einzelner Kunststoffarten durch Aufschlussreagenzien, filterabhängige Größen- und Formunterschiede der isolierten Partikel oder unzureichende Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen führen neben der unterschiedlichen Aussagekraft verschiedener Nachweismethoden zu einer geringen Vergleichbarkeit von Studien.

Dies zeigt den Forschungsbedarf zur Standardisierung der Mikroplastikanalytik, insbesondere im essbaren Anteil von Fisch und Meeresfrüchten; einen Beitrag liefern die Arbeiten zum Vergleich und zur Optimierung von Nachweismethoden für Mikroplastik in Fischereierzeugnissen. Dazu wurden zunächst chemische und enzymatische Aufschlussverfahren hinsichtlich ihrer Eignung für den essbaren Anteil dieser Erzeugnisse geprüft. Kriterien waren hohe Effizienz, geringe Kunststoffdegradation und der Aufwand für die Routineanalytik. In den folgenden Arbeiten werden verschiedene Analysemethoden verglichen, um daraus Empfehlungen für die geeignete Methodenwahl je nach Analysenziel (Screening, toxikologische Untersuchungen o.a.) ableiten zu können.

### Problematik partikulärer Kunststoffe im Lebensmittel „Fisch“

Unabhängig ob gezielt erzeugt oder durch Zerfall entstanden werden feste, in Wasser unlösliche Kunststoffpartikel beliebiger Form im Größenbereich von ca. 1 µm bis 5 mm als Mikroplastik, kleinere als Nanoplastik bezeichnet (1). Die Partikel sind ubiquitär zu finden; Funde von Mikroplastik in menschlichem Speichel (2), Darmgewebe (3) und Fäzes (4) zeigen, dass eine alimentäre Aufnahme der Partikel wahrscheinlich ist. Neben Trinkwasser gelten dabei Fischereierzeugnisse als Haupteintragsquelle (5,6).

Im Gastrointestinaltrakt mariner und limnischer Organismen wurde Mikroplastik nachgewiesen, auch in vielen kommerziell genutzten Arten (7). Die Partikel werden von den Tieren im Zuge ihrer Ernährung direkt (8) oder über die Nahrungskette (9) aufgenommen. Obwohl die Transportmechanismen derzeit noch unklar sind, wurde die Translokation von Partikeln vom Darm in andere Geweberegionen (z.B. Muskel (10)) beobachtet. Ein Übergang der Kunststoffpartikel in den

essbaren Anteil von Fischereierzeugnissen kann somit nicht ausgeschlossen werden. Auch durch Verarbeitung und Verpackung können Kunststoffpartikel in Lebensmittel eingetragen werden (11).

Mikro- und Nanoplastik fungieren auch als potentielle Vektoren für Mikroorganismen und niedermolekulare Verbindungen. Hydrophobe organische Verbindungen (z.B. Pestizide) adsorbieren mit hoher Affinität an Kunststoffpartikeln und können nach Aufnahme wieder im Organismus freigesetzt werden (12). Erste Studien deuten darauf hin, dass eine Anreicherung von potentiell gesundheitsschädigenden Substanzen in Zusammenhang mit partikulären Kunststoffen nicht auszuschließen ist (13,14).

Ferner wurden bereits pathogene Bakterien (15) und Pilze (16) in Biofilmen auf der Oberfläche von Mikroplastik-Partikeln nachgewiesen und es gibt erste Hinweise auf eine positive Korrelation des Aufkommens von Mikroplastik und Parasiten (z.B. Nematoden) in Fischen (17).

Die aufgeführten Beispiele unterstreichen den hohen Bewertungsbedarf des Mikroplastikstatus im essbaren Anteil von Fischen, Krebs- und Weichtieren.

**Tabelle 1:** Auswahl von Analysemethoden zur Detektion und Identifikation von Mikro- und Nanoplastik.

Technik	LOD*	Partikelzahl	Massenanteil	Identifizierung	Limitierungen
(Fluoreszenz-) Mikroskopie	20 – 100 µm	X			keine Identifikation = hohe Fehlerquote (falsch-positiv)
µ-FTIR (20)	10 – 20 µm	X		X	Spektrum-Qualität abhängig von Partikelmorphologie; gestört durch Wasser
µ-Raman (20)	1 – 10 µm	X		X	sehr zeitaufwändig; gestört durch (Auto-)Fluoreszenz
<sup>1</sup> H-NMR (21)	> 10 µg		X	X	Löslichkeit der Kunststoffe (Erfassung aller Kunststoffe aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten nicht möglich)
DSC (22)	> 500 µg		(X)	X	keine etablierte Methode zur Identifizierung von Mischungen unterschiedlichster Polymere
Py-GC/MS (20)	0,5 – 1 µg		X	X	Störung durch organische Matrix = hohe Anforderungen an Probenvorbereitung

\*Bezieht sich bei optischen Methoden auf die Auflösung.

µ-FTIR – Infrarot-Mikrospektroskopie, µ-Raman – Raman-Mikrospektroskopie, NMR – Kernresonanzspektroskopie, DSC – Dynamische Differenzkalorimetrie,

Py-GC/MS –Pyrolyse-Gaschromatographie Massenspektrometrie

### Schwierigkeiten bei der Bewertung von Expositionsdaten

Nach aktuellem Stand der Forschung kann es allein durch den Verzehr von Meeresfrüchten zu einer jährlichen Aufnahme von 9.000 – 27.000 Mikroplastik-Partikeln pro Person kommen (5,6). Nicht vernachlässigt werden darf hierbei die Aufnahme von bis zu 68.000 Partikeln pro Person jährlich über den Hausstaub allein bei der Zubereitung und dem Verzehr von Mahlzeiten (18). Ein zentrales Problem der Expositionsbewertung ist der Mangel an standardisierten und validierten Nachweismethoden (5,6,19).

Für die Mikroplastikanalyse werden meist mikroskopische, spektroskopische oder thermoanalytische Verfahren angewendet. Diese unterscheiden sich in ihrer Selektivität, Auflösung

oder Nachweisgrenze, was die Vergleichbarkeit von Studien einschränkt. Messparameter und Limitierungen üblicher Techniken (Auswahl) sind in Tabelle 1 dargestellt.

Zudem wurden Fortschritte bei der Erfassung kleinerer Partikelgrößen erzielt. Kleine Partikel ( $\emptyset < 10 \mu\text{m}$ ) sind toxikologisch besonders relevant, da sie die Darmzellmembran passieren können (23). Diese wurden in älteren Studien häufig nicht erfasst (6). Je kleiner die zu untersuchenden Partikel sind, desto anspruchsvoller wird jedoch auch die Analytik (24); insbesondere Nanoplastik ist häufig aufgrund physikalischer und optischer Limitierungen noch nicht nachweisbar (25).

Ferner bedarf es strikter Auflagen bezüglich der Analysenqualität (26). Partikuläre Kunststoffe sind ubiquitär zu finden und können bei der Probenbearbeitung, z.B. über die Luft, Kleidung des Laborpersonals, durch unzureichende Reinigung der Laborgeräte oder eingesetzte Reagenzien eingetragen werden (27) und zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Mit Hilfe von Blindproben (Proben ohne Mikroplastik) kann die prozedurale Kontamination überprüft werden, jedoch trägt der variable Umgang mit Blindproben (z. B. bei der Messwertkorrektur (6)) zu einer schlechten Vergleichbarkeit der Studien bei.

### **Herausforderungen der komplexen Matrix „Fisch“**

In Fischen und Meeresfrüchten liegen die Kunststoffpartikel umgeben von organischer Matrix vor. Bevor die Partikel durch Filtration isoliert werden können, muss die Matrix zunächst entfernt werden. Um das gesamte Größenspektrum der als „Mikroplastik“ definierten Partikel erfassen zu können (1), muss die Filtrierbarkeit mit einer Filter-Porengröße von  $1 \mu\text{m}$  erreicht werden. Aufgrund der zu erwartenden niedrigen Partikelzahlen sind hohe Probeneinwaagen für statistisch belastbare Ergebnisse erforderlich (28), so dass effiziente, zur Routineanalytik geeignete Aufschlussmethoden benötigt werden (29).

Zum Aufschluss aquatischer Biota werden üblicherweise Säuren, Basen, Oxidationsmittel oder Enzyme eingesetzt. Chemische Verfahren sind dabei meist kosteneffizient und vielseitig anwendbar, können aber auch einige Kunststoffarten, insbesondere bei hohen Temperaturen, schädigen. Enzymatische Verfahren haben dagegen einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Integrität synthetischer Polymere, sie sind jedoch häufig teuer und nur für geringe Probenmengen sowie spezifische Substrate geeignet, so dass ihr Anwendungsbereich eingeschränkt ist (29-31).

Für den Aufschluss von Fisch-, Krebs- und Weichtierarten eignet sich eine Kombination aus enzymatischer Proteolyse (Pepsin) und alkalischer Hydrolyse (KOH) (32). Diese Methode weist eine vergleichsweise hohe Effizienz auf, bei gleichzeitig geringem Einfluss auf die Polymerintegrität sowie geringem Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand.

Die Isolierung der Partikel erfolgt durch Filtration mit großen Filtern (Porengröße ca.  $1 \mu\text{m}$ ) aus Glasfaser, Polycarbonat oder Silber. Verbleibende Matrixrückstände können durch Nachbehandlung des Filters mit Oxidationsmitteln und Alkoholen (Entfetten) ohne signifikante Kunststoffschädigung reduziert werden.

Zur Quantifizierung mittels Pyrolyse-GC/MS oder für Imaging-Techniken werden die Partikel auf großen Filtern mit glatter Oberfläche (z.B. Polycarbonat, Silber) isoliert. Anschließend werden die Partikel auf einen kleinen Filter gespült (Glasfaser für Py-GC/MS oder Aluminiumoxid für gute optische Detektierbarkeit).

In dotiertem Fischfilet (*Pollachius virens*) wurden mikroskopisch im Rahmen einer vorläufigen In-House-Validierung Wiederfindungsraten  $\geq 88 \%$  bei einer Partikelgröße von  $\emptyset 10 - 50 \mu\text{m}$  und einer Partikelzahl  $n > 10$  bestimmt.

## Literatur

1. International Organization for Standardization. ISO TR 21960:2020 – Plastics — Environmental aspects — State of knowledge and methodologies. 2020 [Letzter Zugriff: 05.08.2021]. Verfügbar auf: <https://www.iso.org/standard/72300.html>.
2. Abbasi S, Turner A. Human exposure to microplastics: A study in Iran. *J. Hazard. Mat.* 2021; 403:123799.
3. Ibrahim YS, Anuar ST, Azmi AA, Khalik WMAWM, Lehata S, Hamzah S, et al. Detection of microplastics in human colectomy species. *JHG Open.* 2021;5(1):116-121.
4. Schwabl P, Köppel S, Königshofer P, Bucsecs T, Trauner M, Reiberger T, et al. Detection of various microplastics in human stool: A prospective case series. *Ann. Intern. Med.* 2019;171(7):453-457.
5. Danopoulos E, Jenner LC, Twiddy M, Rotchell JM. Microplastic contamination of seafood intended for human consumption: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 2020;128(12):126002.
6. Senathirajah K, Attwood S, Bhagwat G, Carbery M, Wilson S, Palanisami T. Estimation of the mass of microplastics ingested – A pivotal first step towards human health risk assessment. *J. Hazard. Mat.* 2021; 404:124004.
7. Jin M, Wang X, Ren T, Wang J, Shan J. Microplastics contamination in food and beverages: Direct exposure to humans. *J. Food Sci.* 2021;86(7):2816-2837.
8. Kühn S, Bravo Revollo EL, van Franeker JA. Deleterious effects of litter on marine life. In: Bergmann M, Gutow L, Klages M, Herausgeber. *Marine anthropogenic litter.* 1. Aufl. London: Springer Open;2015. S. 75 – 116.
9. da Costa Araújo AP, Malafaia G. Microplastic ingestion induces behavioral disorders in mice: A preliminary study on the trophic transfer effects via tadpoles and fish. *J. Hazard. Mat.* 2021;401:123263.
10. Zeytin S, Wagner G, Mackay-Roberts N, Gerdtz G, Schuirmann E, Klockmann S, et al. Quantifying microplastic translocation from feed to the fillet in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Mar. Pollut. Bull.* 2020;156:111210.
11. Zhang Q, Xu EG, Li J, Chen Q, Ma L, Zeng EY, et al. A review of microplastics in table salt, drinking water, and air: direct human exposure. *Environ. Sci. Technol.* 2020; 54(7):3740-3751.
12. Teuten EL, Saquing JM, Knappe DR, Barlaz MA, Jonsson S, Björn A, et al. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 2009;364(1526):2027-2045.
13. Barboza LGA, Cunha SC, Monteiro C, Fernandes JO, Guilhermino L. Bisphenol A and its analogs in muscle and liver of fish from the North East Atlantic Ocean in relation to microplastic contamination. Exposure and risk to human consumers. *J. Hazard. Mat.* 2020;393:122419.
14. Tien CJ, Wang ZX, Chen CS. Microplastics in water, sediment and fish from the Fengshan River system: Relationship to aquatic factors and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fish. *Environ. Pollut.* 2020;265:114962.
15. Kirstein IV, Kirmizi S, Wichels A, Garin-Fernandez A, Erler R, Löder M, et al. Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Mar. Environ. Res.* 2016;120:1-8.
16. Gkoutselis G, Rohrbach S, Harjes J, Obst M, Brachmann A, Horn MA, et al. Microplastics accumulate fungal pathogens in terrestrial ecosystems. *Sci. Rep.* 2021;11(1):1-13.
17. Pennino MG, Bachiller E, Lloret-Lloret E, Albo-Puigserver M, Esteban A, Jadaud A, et al. Ingestion of microplastics and occurrence of parasite association in Mediterranean anchovy and sardine. *Mar. Pollut. Bull.* 2020;158:111399.
18. Catarino AI, Macchia V, Sanderson WG, Thompson RC, Henry TB. Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is minimal compared to exposure via household fibres fallout during a meal. *Environ. Pollut.* 2018; 237:675-684.
19. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal* 2016; 14(6): e04501.
20. Braun U, Stein U, Schritt H, Altmann K, Bannick CG, Becker R, et al. Mikroplastik-Analytik: Probenahme, Probenaufbereitung und Detektionsverfahren. Statuspapier im Rahmen des Forschungsschwerpunktes "Plastik in der Umwelt – Quellen, Senken, Lösungsansätze". 2018. Verfügbar auf: <https://bmbf-plastik.de/de/publikation/diskussionspapier-mikroplastik-analytik> [letzter Zugriff: 09.08.2021]

21. Peez N, Janiska MC, Imhof W. The first application of quantitative  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy as a simple and fast method of identification and quantification of microplastic particles (PE, PET, and PS). *Anal. Bioanal. Chem.* 2019;411(4):823-833.
22. Chialanza MR, Sierra I, Parada AP, Fornaro L. Identification and quantitation of semi-crystalline microplastics using image analysis and differential scanning calorimetry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018;25(17):16767-16775.
23. Stock V, Böhmert L, Lisicki E, Block R, Cara-Carmona J, Pack LK, et al. Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo. *Arch. Toxicol.* 2019;93(7):1817-1833.
24. Renner G, Schmidt TC, Schram J. Analytical methodologies for monitoring micro (nano) plastics: which are fit for purpose? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 2018;1:55-61.
25. Jakubowicz I, Enebro J, Yarahmadi N. Challenges in the search for nanoplastics in the environment—A critical review from the polymer science perspective. *Polym. Test.* 2020;93:106953
26. Hermsen E, Mintenig SM, Besseling E, Koelmans AA. Quality criteria for the analysis of microplastic in biota samples: a critical review. *Environ. Sci. Technol.* 2018;52(18):10230-10240.
27. Dehaut A, Dehaut A, Hermabessiere L, Duflos. Current frontiers and recommendations for the study of microplastics in seafood. *Trends Analyt. Chem.* 2019; 116:346-359.
28. Collard F, Gasperi J, Gilbert B, Eppe G, Azimi S, Rocher V, et al. Anthropogenic particles in the stomach contents and liver of the freshwater fish *Squalius cephalus*. *Sci. Total Environ.* 2018;643:1257-1264.
29. Dehaut A, Cassone AL, Frère L, Hermabessiere L, Himber C, Rinnert E, et al. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environ. Pollut.* 2016;215:223-233.
30. Löder MG, Imhof HK, Ladehoff M, Löscher LA, Lorenz C, Mintenig S, et al. Enzymatic purification of microplastics in environmental samples. *Environ. Sci. Technol.* 2017;51(24):14283-14292.
31. Bessa F, Frias J, Kögel T, Lusher A, Andrade JM, Antunes J, et al. Harmonized protocol for monitoring microplastics in biota. JPI-Oceans BASEMAN Project 2019; Deliverable 4.
32. Süßmann J, Krause T, Martin D, Walz E, Greiner R, Rohn S, et al. Evaluation and optimisation of sample preparation protocols suitable for the analysis of plastic particles present in seafood. *Food Control* 2021; 125:107969.

## Kontakt

Prof. Dr. Jan Fritsche; Max-Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, Kiel  
Jan.Fritsche@mri.bund.de