

# Eine schnelle und effiziente Methode zum Nachweis von Mikroplastik in Fischen

S. Roch & A. Brinker

**D**ie Belastung der Umwelt mit Mikroplastik bedeutet eine steigende Gefahr für die aquatischen Ökosysteme weltweit. Ozeane, Flüsse und Seen sind in gleichem Maße davon betroffen (siehe AUF AUF 2015/1). In einer Vielzahl von Wasserorganismen, darunter auch Fische, wurden die Plastikpartikel und -fasern kleiner 5 mm im Verdauungstrakt nachgewiesen. Gerade für Fische fehlt jedoch eine schnelle und effiziente Methode, um das Mikroplastik im Magen-Darm-Trakt der Tiere nachzuweisen. Bereits verfügbare Methoden sind meist sehr aufwendig und/oder erfordern eine Vielzahl an Zersetzungsschritten, was wiederum die Gefahr von Kontaminationen und den Verlust von Probenmaterial erhöht. An der Fischereiforschungsstelle Baden-Württemberg wurde daher eine Methode entwickelt, welche die komplette Zersetzung des Magen-Darm-Trakts in weniger als einer Stunde ermöglicht, ohne das Mikroplastik zu schädigen. Ein optionaler Dichteseparationsschritt entfernt zudem mineralische Rückstände und erleichtert die Identifizierung des Mikroplastiks erheblich.

## Hintergrund

Die Belastung der Ozeane mit Mikroplastik ist nun schon seit Längerem bekannt. Aktuelle Studien zeigen zudem, dass auch Flüsse und Seen in ähnlich starkem Maße von der Problematik betroffen sind (Wagner et al. 2014). Aufgrund ihrer geringen Größe können die Plastikpartikel und -fasern kleiner 5 mm für praktisch alle aquatischen Organismen zu einem Problem werden. Die Aufnahme birgt zum einen direkte Risiken z.B. in Form einer Akkumulierung im Magen-Darm-Trakt oder Blockierung des Verdauungstraktes, zum anderen können toxische Substanzen im Plastik oder langlebige organische Schadstoffe (engl: „persistent organic pollutants“) in erhöhten Mengen an die Organismen abgegeben werden. Mikroplastik konnte unter anderem im Verdauungstrakt von Zooplankton, Makrozoobenthos, Muscheln, Vögeln und Fischen nachgewiesen werden (Wright et al. 2013).

Gerade für Fische ist jedoch der Nachweis von Mikroplastik im Magen-Darm-Trakt nicht einfach. Eine visuelle Untersuchung des Mageninhalts führt z.B. oft dazu, dass kleine, unscheinbare Partikel und Fasern übersehen werden.

Um die Identifizierung des Plastiks zu erleichtern, wird aus diesem Grund das organische Material mit Hilfe von Chemikalien zersetzt. Verfügbare Methoden sind jedoch häufig sehr zeitaufwendig und/oder benötigen eine Reihe von Zersetzungsschritten. Dadurch steigt aber auch die Gefahr, dass ein Teil der Probe verloren geht oder es zu einer Kontamination der Probe kommt. Gerade die Kontamination mit künstlichen Fasern aus der Luft ist derzeit ein großes Problem, da es keinerlei praktikable Methoden zu ihrer Vermeidung gibt (Woodall et al. 2015). Auch weitere nicht organische Materialien im Magen-Darm-Trakt der Fische, wie z.B. Sand, können die Identifizierung von Mikroplastik erschweren.

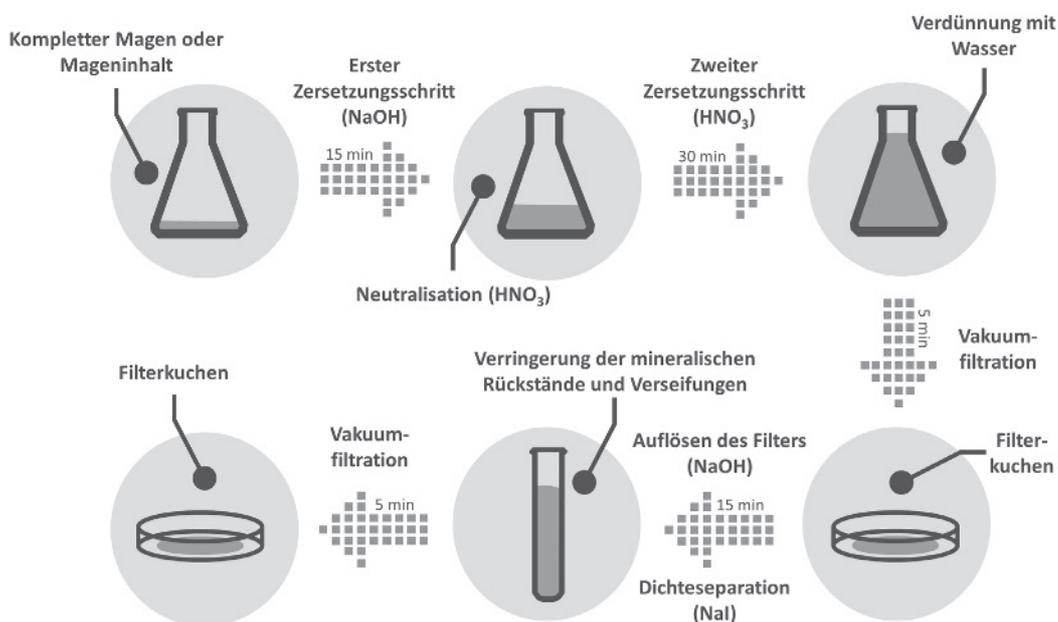
Aus diesem Grund wurde an der Fischereiforschungsstelle Baden-Württemberg (FFS) eine Methode entwickelt, die (i) Chemikalien nutzt, welche den kompletten Magen-Darm-Trakt effizient zersetzen, ohne die wichtigen Plastikarten zu zerstören, (ii) die Anzahl an Arbeitsschritten minimiert und dadurch die Kontamination sowie den Probenverlust gering hält, und (iii) effizient anorganische Mineralien abtrennt. Die Methode wurde in einem nächsten Schritt in Hinblick

auf die Effizienz und den Einfluss auf die häufigsten Plastikarten untersucht und am Ende unter realen Bedingungen mit Fischen aus dem Altrhein bei Istein getestet.

## Methodenüberblick

Ein Überblick des Zersetzungsprotokolls ist in Abbildung 1 dargestellt. Es umfasst zwei Zersetzungsschritte und einen optionalen Dichteseparationsschritt. Um die Gefahr von Kontaminationen gering zu halten, sollten alle Arbeiten unter dem Abzug durchgeführt werden. Während der gesamten Untersuchung sollten zudem nicht synthetische Kleidung und Handschuhe getragen werden. Sämtliche Labormaterialien müssen vor ihrer Verwendung möglichst mehrmals mit hochreinem gefiltertem Wasser gespült werden.

Um das organische Material zu zersetzen, wird die Probe in ein 250 ml Becherglas überführt und je nach Probenmenge Natronlauge (NaOH, 1 mol/L) hinzugegeben (Tab. 1). Die Lösung wird für 15 Minuten auf 50°C erhitzt und mit Hilfe eines Rührfisches stetig durchmischt. Anschließend wird die Probe mit Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>, 65 %) neutralisiert und anschlie-



**Abbildung 1:** Methodenüberblick zum Nachweis von Mikroplastik in Fischen mit den jeweils verwendeten Chemikalien und der Dauer der einzelnen Schritte. Die ersten beiden Schritte stellen eine komplette Zersetzung des organischen Materials sicher. Der optionale Dichteseparationsschritt reduziert die Menge an mineralischem Material und/oder verbleibende Verseifungen auf dem Filter (NaI = Natriumiodid).

ßend eine entsprechende Menge an  $\text{HNO}_3$  hinzugefügt, bis die Endkonzentration 10 mol/L entspricht (Tab. 1). Die Lösung wird für weitere 15 Minuten bei  $50^\circ\text{C}$  erhitzt, bevor die Temperatur für 15 Minuten auf  $80^\circ\text{C}$  erhöht wird, um verbleibende Schwebstoffe zu entfernen. Für die Filtration wird die Probe mit  $80^\circ\text{C}$  heißem filtriertem Wasser verdünnt (1:2, v:v) und auf einen Cellulosenitratfilter (CN Filter) vakuumfiltriert. Der Vorteil von CN Filtern besteht

darin, dass sie recht einfach mit Hilfe von NaOH wieder zersetzt werden können. Die Behältnisse und das Filtrationsgerät werden mit ausreichend gefiltertem Wasser gespült, um einen Probenverlust zu verhindern.

Befinden sich lediglich geringe Verseifungsrückstände auf dem Filter, so wird dieser in ein Becherglas überführt und mit einer geringen Menge an NaOH (1 mol/L) bei  $80^\circ\text{C}$  aufgelöst. Nach einer Verdünnung

mit gefiltertem Wasser wird die Lösung auf einen Quarzfilter vakuumfiltriert. Quarzfilter haben ein deutlich unterscheidbares Spektrum zu Plastik, was bei der Auswertung des Mikroplastiks mit Hilfe von spektroskopischen Methoden (FTIR, Raman) eine wichtige Rolle spielen kann.

Falls sich mineralische Rückstände auf dem Filter befinden, so wird der Probenfilter in einen Scheidetrichter überführt und 25 mL

**Tabelle 1:** Volumina an Chemikalien für verschiedene Probenmengen, welche in dem beschriebenen Zersetzungsprotokoll verwendet werden können.

Gewicht der Probe [g]	Volumen NaOH <sup>a</sup> [mL]	Volumen $\text{HNO}_3$ <sup>b</sup> [mL]	Volumen Wasser [mL]	Finales Volumen <sup>c</sup> [mL]
< 1 g	5	17,5	2,5	25
1 - 3 g	10	36	4	50
3 - 5 g	25	72	3	100
5 - 10 g	50	144	6	200
10 - 15 g	75	221	4	300

<sup>a</sup> Natronlauge: 1 mol/L, <sup>b</sup> Salpetersäure: 65 %, <sup>c</sup> Endkonzentration  $\text{HNO}_3$ : 10 mol/L.

80°C heißes NaOH (1 mol/L) hinzugegeben. Der Trichter wird solange geschüttelt, bis sich der Filter vollständig aufgelöst hat. Anschließend wird 20 g Natriumiodid (NaI) zu der Probe gegeben. Diese Menge an NaI erhöht die Dichte der Lösung auf ca. 1,6 g/cm<sup>3</sup>, wodurch sämtliche Plastikpartikel und -fasern auf der Oberfläche schwimmen. Schwerere Mineralien hingegen sinken auf den Boden ab. Nach 5 Minuten werden 15 ml der Lösung abgelassen und die restliche Lösung mit 80°C heißem gefiltertem Wasser (1:2, v:v) verdünnt. Die Lösung wird dann auf einen Quarzfilter vakuumfiltriert und die Laborgeräte mit ausreichend gefiltertem Wasser ausgespült.

### Untersuchungen zur Effizienz und zum Einfluss auf wichtige Plastikarten

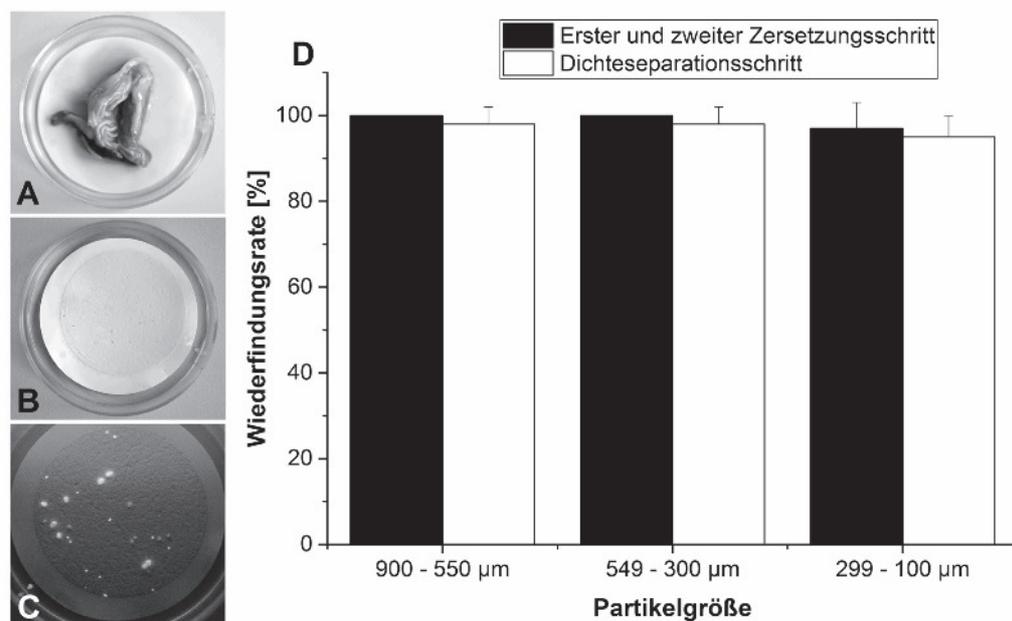
Um zu überprüfen, wie effizient die Methode arbeitet, wurde der Magen-Darm-Trakt von 6 Felchen (*Coregonus lavaretus*, Abb. 2A) mit bekannten Mengen an Mikroplastik versetzt. Das Mikroplastik bestand

aus Polystyrol (PS) und umfasste drei Größenklassen: 900-550 µm, 549-300 µm und 299-100 µm. Zur einfacheren Unterscheidung besaßen die verschiedenen Größenklassen eine unterschiedliche Farbe und fluoreszierten unter Schwarzlicht (Abb. 2C). Das Zersetzungsprotokoll wurde wie oben beschrieben angewendet und die verbleibenden Plastikpartikel anschließend gezählt. Nach der Durchführung des Dichteseparationsschrittes wurde die Zählung wiederholt. Es zeigte sich, dass der Magen-Darm-Trakt ohne nennenswerte Rückstände zersetzt wurde (Abb. 2B). Die Wiederfindungsrate der zugesetzten Partikel lag zwischen 95 und 100 % (Abb. 2D). Damit ist die Methode mit anderen Ansätzen vergleichbar und erlaubt eine sehr gute quantitative Abschätzung der Mikroplastikbelastung in Fischen.

Ein weiteres Experiment sollte klären, welchen Einfluss die Zersetzungsmethode auf wichtige Plastikarten hat. Aufgrund der eingesetzten Chemikalien besteht die Gefahr, dass bestimmte Polymere zersetzt oder zumindest in ihrer

Form oder Farbe verändert werden. Aus diesem Grund wurden Plastikfragmente von gängigen Haushalts- und Laborutensilien (1 - 2 mm Größe, 2) der oben beschriebenen Methode ausgesetzt. Anschließend wurden die Partikel unter dem Mikroskop auf Veränderungen hin untersucht. Folgende Kategorien wurden unter anderem in die Bewertung mit aufgenommen: Farbveränderungen, Gewichtsveränderungen und Oberflächenveränderungen. Zudem wurde überprüft, ob es zu Veränderungen in den spektroskopischen Eigenschaften kommt. Über spektroskopische Messungen wird häufig die Plastikart von unbekannt Partikeln und Fasern bestimmt. Dadurch können eventuell Rückschlüsse über die Herkunft des Mikroplastiks gewonnen werden. In diesem Fall wurde das jeweilige Spektrum der unterschiedlichen Partikel mit Hilfe eines FTIR Spektrometers (Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer) aufgenommen und mit Spektren der gleichen Plastikart vor der Durchführung des Zersetzungsprotokolls verglichen.

Bis auf Polyamid (PA) wurden



**Abbildung 2:** Effizienz und Wiederfindungsrate von Mikroplastik bei der vorgestellten Zersetzungsmethode. (A) Magen-Darm-Trakt eines Felchens vor der Zersetzung. (B) Filter nach Durchführung der Zersetzungsschritte. (C) Wiedergefundene Polystyrol Partikel, welche unter Schwarzlicht leuchten. (D) Wiederfindungsrate nach dem ersten und zweiten Zersetzungsschritt (schwarze Balken) und nach dem Dichteseparationsschritt (weiße Balken), jeweils für verschiedene Größenklassen.



alle der verwendeten Plastikpartikel ohne Probleme identifiziert. Lediglich bei wenigen Plastikarten wurden leichte Veränderungen in der Farbe festgestellt (Tab. 2). Die gemessenen Gewichtsveränderungen lagen meist bei wenigen Prozent und unterschieden sich im Vergleich vor und nach der Durchführung der Methode statistisch nicht (Tab. 3). Nur bei Polyethylenterephthalat (PET) wurde ein signifikanter Gewichtsverlust von rund 16 % festgestellt. Betrachtet man die Oberflächenveränderungen bei den verschiedenen Plastikarten, so wurde ein deutlicher Verlust bei expandiertem Polystyrol (EPS) festgestellt (Tab. 2). Durch die schwammähnlichen Eigenschaften von EPS kam es durch den Einsatz der zersetzenden Chemikalien zu einem Schrumpfen der Partikel. Bei „low density“ Polyethylen (LDPE), sowie Polyvinylchlorid mit und ohne Weichmacher (PVC-P, PVC-U) kam es hingegen zu einer Vergrößerung der Oberfläche (Tab. 2). Diese Veränderung deutet auf leichte Schmelz-effekte hin, welche während des Zersetzungsprozesses entstehen. Des Weiteren zeigte die

Auswertung der FTIR Spektren vor und nach Durchführung der oben beschriebenen Methode keinerlei Auswirkungen auf die charakteristischen Peaks der einzelnen Plastikarten (Abb. 3). Damit ist eine weitere Untersuchung der gefundenen Partikel und Fasern ohne Probleme möglich.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass die vorgestellte Zersetzungsmethode nur geringe Auswirkungen auf gängige Plastikarten hat und dadurch ohne Bedenken für die Aufarbeitung von Proben genutzt werden kann. Berücksichtigt werden muss, dass PA als einzige der untersuchten Plastikarten komplett zersetzt wurde. Dies ist ein allgemein bekanntes Problem, da es sehr leicht durch die verwendete Salpetersäure abgebaut wird. Obwohl PA nur einen sehr geringen Teil an der globalen Plastikproduktion und -nutzung ausmacht, kann es in bestimmten Gewässern zu einer relevanten Belastung führen. Aus diesem Grund muss vor Nutzung des Zersetzungsprotokolls sichergestellt werden, dass PA keine wichtige Rolle im untersuchten Gewässer spielt.

## Abschätzung der Kontaminationen während der Zersetzung

Die Kontaminierung von Proben mit Mikroplastik oder plastikähnlichen Partikeln und Fasern während der Aufarbeitung ist ein Problem, das häufig übersehen wird. Vor allem Fasern, welche von der getragenen Kleidung stammen und überall in der Umgebungsluft zu finden sind, können das Ergebnis einer Mikroplastikzählung erheblich verfälschen. Aus diesem Grund ist es wichtig, bestimmte Vorkehrungen zu treffen und so das Risiko einer Kontamination zu minimieren. Das Tragen von kunststofffreier Kleidung, die Reinigung sämtlicher Gerätschaften mit gefiltertem Wasser und das Arbeiten unter einem Abzug können die Gefahr einer Kontamination reduzieren. Auch ist es unerlässlich, Kontrollen während der Durchführung der Zersetzung mitlaufen zu lassen.

Auch für die vorliegende Methode wurden 10 Kontrollen ohne das Vorhandensein von organischem Material untersucht. Dazu wurden

**Tabelle 2:** Einfluss des Zersetzungsprotokolls auf gängige Plastikarten. Pfeile geben einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich vor und nach der Durchführung der Methode in der jeweiligen Kategorie an.

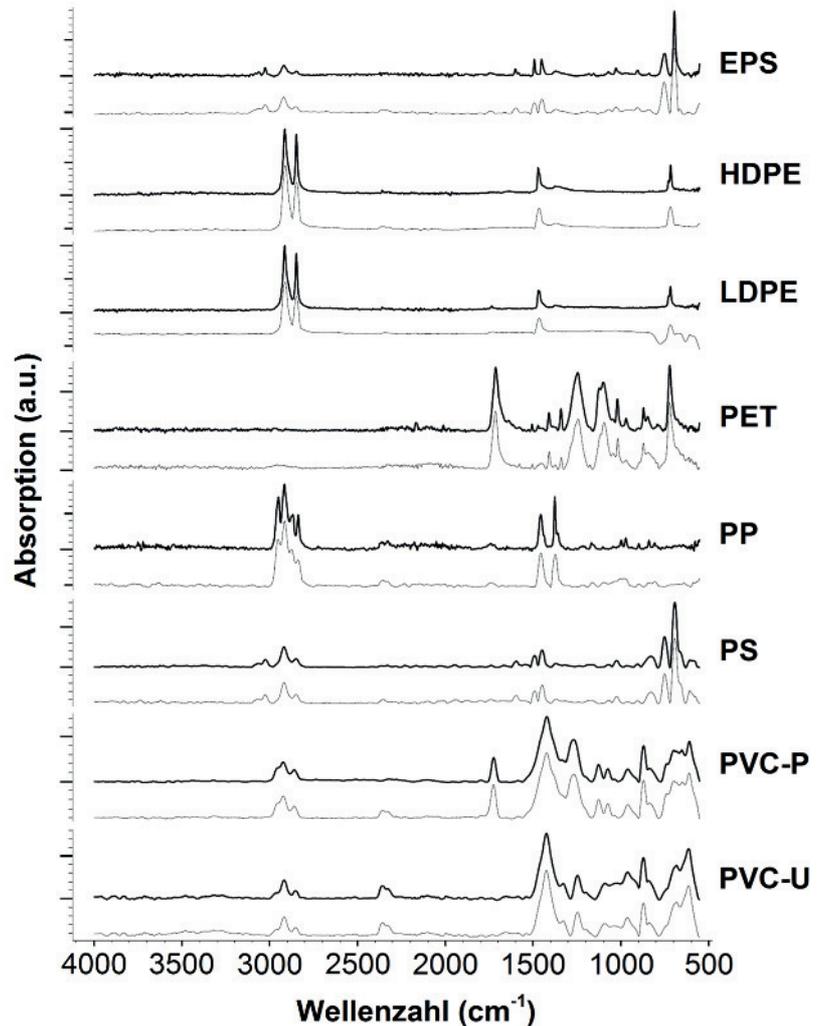
Plastiktyp <sup>a</sup>	Ursprung	Farbveränderungen (vor/nach)	Gewichtsveränderungen	Oberflächenveränderungen	Andere Veränderungen
EPS	Verpackungsmaterial	nein	nein	ja ↓	
HDPE	Zentrifugenröhrchen	nein	nein	nein	
LDPE	Plastikschale	nein	nein	ja ↑	Verklumpung der Partikel
PA	Monofiles Seil	-	-	-	komplett zersetzt
PET	Trinkflasche	ja (grün/weiß)	ja ↓	nein	
PP	Shampoo Flasche	nein	nein	nein	
PS	CD Hülle	nein	nein	nein	Zersetzung an Rändern
PVC-P	Kabelummantelung	ja (blau/weiß)	nein	ja ↑	
PVC-U	Wasserrohr	ja (braun/weiß)	nein	ja ↑	

<sup>a</sup> EPS = Expandiertes Polystyrol, HDPE = „high density“ Polyethylen, LDPE = „low density“ Polyethylen, PA = Polyamid, PET = Polyethylenterephthalat, PP = Polypropylen, PS = Polystyrol, PVC-P = Polyvinylchlorid mit Weichmacher, PVC-U = Polyvinylchlorid ohne Weichmacher.

dieselben Schritte wie bei einer normalen Probenzersetzung durchgeführt. Die gefundenen Partikel und Fasern wurden anschließend vermessen und die Farbe bestimmt. Die Auswertung ergab, dass im Schnitt  $12,8 \pm 6,3$  Fasern pro Filter als Kontamination berücksichtigt werden müssen. Die Fasern waren zwischen 101 und 4774  $\mu\text{m}$  lang und es wurden sechs verschiedene Farben identifiziert. Am häufigsten wurden weiße Fasern gefunden (43 %). Andere Farben kamen wesentlich seltener vor (blau: 17 %, schwarz: 17 %, grau: 11 %, gelb: 8 %, rot: 4 %). Die Länge und die Beschaffenheit der Fasern legen nahe, dass es sich bei den Fasern um Kleidungsfasern handelt. Kontaminationen in Form von Partikeln wurden nicht gefunden. Die in den Kontrollen gefundenen Kontaminationen wurden bei der folgenden Untersuchung von realen Proben aus dem Freiland berücksichtigt und nicht mit in die Auswertung genommen.

### Test der Methode an realen Fischen

Um die vorgestellte Zersetzungsmethode unter realen Bedingungen zu testen, wurde der Magen-Darmtrakt von zwei benthischen Fischarten verwendet. Fünfzehn Schwarzmund-Grundeln (*Neogobius melanostomus*,  $26,5 \pm 10,0$  g Nassgewicht) und 10 Barben (*Barbus barbus*,  $27,9 \pm 13,9$  g Nassgewicht) wurden während einer Befischung im Juni 2015 im Altrhein in der Nähe von Istein gefangen und der Magen-Darm-Trakt präpariert. Anschließend wurde das organische Material mit der oben beschriebenen Methode zersetzt. Die gewonnenen Filter wurden unter dem Mikroskop untersucht und verdächtige Partikel und Fasern mit Hilfe einer heißen Nadel verifiziert (die heiße Nadel hinterlässt einen Abdruck auf Plastik, während mineralische und organische Materialien unverändert bleiben). Die Menge an Mikroplastik pro Fisch wurde berechnet und die Partikel und Fasern wurden vermessen.



**Abbildung 3:** FTIR (Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer) Spektren von gängigen Plastikarten vor (graue Linien) und nach (schwarze Linien) Durchführung der vorgestellten Zersetzungsmethode.

Alle Proben wurden mit der Methode komplett zersetzt. Es wurden keinerlei Rückstände an organischem Material gefunden und die Menge an mineralischen Rückständen wurde durch die Dichteseparation wesentlich reduziert. Bei den Schwarzmund-Grundeln hatten 27 % der Fische Mikroplastik im Magen-Darm-Trakt, bei den Barben waren es 20 %. Die mittlere Anzahl an Mikroplastik betrug  $1,0 \pm 0,0$  für Barben und  $1,25 \pm 0,5$  für Schwarzmund-Grundeln. Die Partikel waren zwischen 264 und 2907  $\mu\text{m}$  lang und unterschieden sich zudem in ihrer Farbe (Abb. 4). Da es sich bei dieser Untersuchung nur um eine Evaluation der Methode

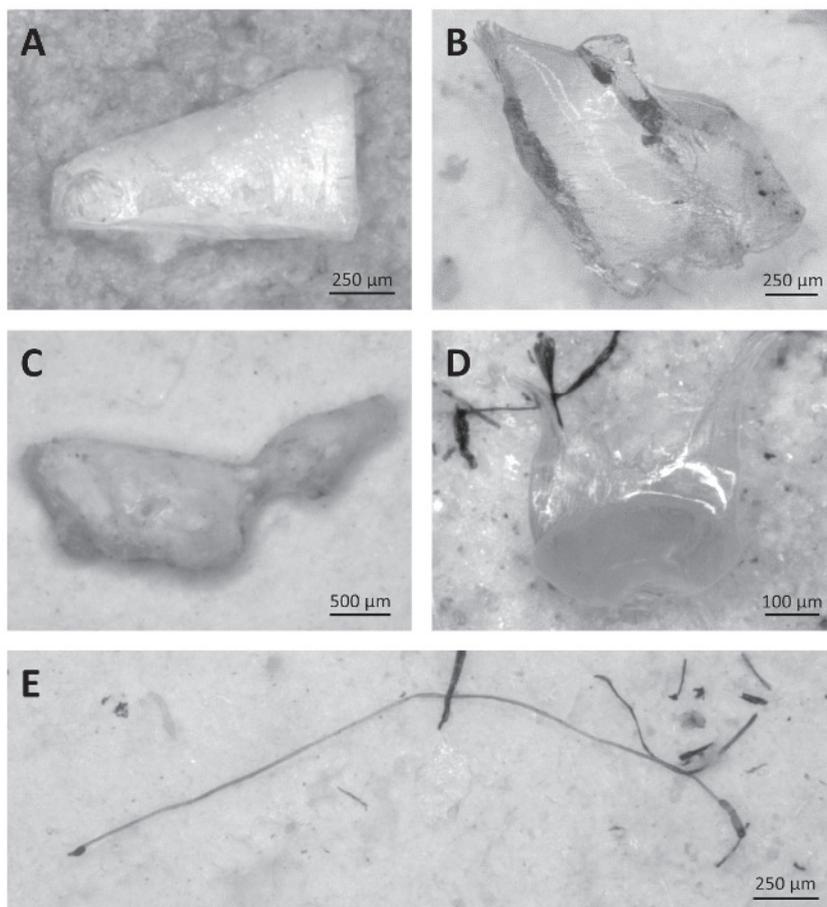
unter realen Bedingungen handelte, wurden keine weiteren ökologischen Faktoren in die Auswertung aufgenommen. Es handelt sich jedoch bei dem gefundenen Mikroplastik um Fragmente von größerem Plastikmüll. Der Anteil an Fischen mit Mikroplastik im Magen-Darm-Trakt ist durchaus mit anderen Studien vergleichbar, dieser kann sich jedoch von Gewässer zu Gewässer stark unterscheiden. Während zum Beispiel lediglich 12 % der Gründlinge in französischen Gewässern mit Mikroplastik belastet waren (Sanchez et al. 2014), wurden in 75 % der untersuchten Flundern aus der Themse in England Plastikfasern und -partikel gefunden

(McGoran et al. 2017).

## Fazit und Ausblick

Die Entwicklung der vorgestellten Methode hatte zum Ziel, den Nachweis von Mikroplastik in Fischen zu erleichtern und die Effizienz einer chemischen Zersetzung von organischem Material zu erhöhen. Es ist nun möglich, in relativ kurzer Zeit eine hohe Anzahl an Proben zu untersuchen. Zudem werden die Gefahr von Kontaminationen und die Zeit, in denen das Mikroplastik den korrosiven Chemikalien ausgesetzt ist, reduziert. In einem nächsten Schritt werden nun mit Hilfe der Zersetzungsmethode repräsentative Fischarten aus Flüssen und Seen in ganz Baden-Württemberg auf Mikroplastik hin untersucht werden. Ziel ist es, einen Überblick über die Belastung der baden-württembergischen Fischfauna zu erlangen und mögliche Belastungsschwerpunkte zu identifizieren. Zusammen mit Expositionsversuchen im Labor kann so das Verständnis der aktuellen Mikroplastikbelastung in unseren heimischen Gewässern verbessert werden, aber auch Hinweise auf die zukünftige Situation geben. Durch die langlebigen Eigenschaften von Plastik ist davon auszugehen, dass die Belastungen in den nächsten Jahrzehnten weiter ansteigen werden. Auch wenn sich herausstellen sollte, dass die derzeitigen Mengen an Mikroplastik nur moderate Auswirkungen auf die Fischfauna haben, so ist es dennoch wichtig, dass die Problematik frühzeitig erkannt, untersucht und verstanden wird.

Weitere Informationen zu der vorgestellten Methode und Details zu den Untersuchungen finden sie hier: Roch S. & Brinker A. (2017). Rapid and Efficient Method for the Detection of Microplastic in the Gastrointestinal Tract of Fishes. *Environmental Science & Technology* 51: 4522–4530.



**Abbildung 4:** Auswahl an Mikroplastik, welches in Schwarzmund-Grundeln und Barben aus dem Altrhein bei Istein im Juni 2015 mit Hilfe der vorgestellten Zersetzungsmethode nachgewiesen werden konnten. Das Mikroplastik kann in Fragmente (A-C), Kügelchen (D) und Fasern (E) kategorisiert werden.

## Literatur

- McGoran A.R. et al. (2017). Presence of microplastic in the digestive tracts of European flounder, *Platichthys flesus*, and European smelt, *Osmerus eperlanus*, from the River Thames. *Environmental Pollution* 220: 744 - 751.
- Sanchez W. et al. (2014). Wild gudgeons (*Gobio gobio*) from French rivers are contaminated by microplastics: Preliminary study and first evidence. *Environmental Research* 128: 98 - 100.
- Wagner M. et al. (2014). Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe* 26: 1 - 9.
- Woodall L.C. et al. (2015). Using a

forensic science approach to minimize environmental contamination and to identify microfibrils in marine sediments. *Marine Pollution Bulletin* 95: 40 - 46.

- Wright S.L. et al. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution* 178: 483 - 492.