

Mikroplastik in Lebensmitteln:

Gibt es ein Risiko?

Aktuelle Aspekte der Risikoabschätzung

Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen

Bundesinstitut für Risikobewertung,
Abteilung Lebensmittelsicherheit

Mikroplastik – Vorkommen in Lebensmitteln

Water Research 129 (2018) 154–162



Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water

Darena Schymanski^{a, b}, Christophe Goldbeck^a, Hans-Ulrich Humpf^b, Peter Fürst^{a, *}

^a Chemical and Veterinary Analytical Institute Münsterland-Emscher-Lippe (CVUA-MEL), Joseph-König-Strasse 40, 48147 Münster, Germany

^b Institute of Food Chemistry, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Corrensstr. 45, 48149 Münster, Germany



Food Additives & Contaminants: Part A



ISSN: 1944-0049 (Print) 1944-0057 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/tfac20>

Synthetic particles as contaminants in German beers



ELSEVIER

Environmental Pollution

Volume 193, October 2014, Pages 65–70



Microplastics in bivalves cultured for human consumption

Lisbeth Van Cauwenberghe^a, Colin R. Janssen

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The presence of microplastics in commercial salts from different countries

Received: 25 November 2016
Accepted: 09 March 2017

Ali Karami¹, Abolfazl Golieskardi¹, Cheng Keong Choo², Vincent Larat³, Tamara S. Galloway⁴ & Babak Salamatnia²

Fleur de Sel
Forscher entdecken Mikroplastik in Speisesalz
In den Meeren sammelt sich Plastikmüll. Einige Teilchen landen Untersuchungen zufolge in Nahrungsmitteln.



Mikroplastik – Vorkommen in Lebensmitteln

Water Research 129 (2018) 154–162

Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

ELSEVIER

Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water

Darena Schymanski^{a, b}, Christophe Goldbeck^a, Hans-Ulrich Humpf^b, Peter Fürst^{a, *}

^a Chemical and Veterinary Analytical Institute Münsterland-Emscher-Lippe (CVUA-MEL), Joseph-König-Straße 40, 48147 Münster, Germany
^b Institute of Food Chemistry, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Correnstr. 45, 48149 Münster, Germany

Food Additives & Contaminants: Part A

ISSN: 1944-0049 (Print) 1944-0057 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/tfac20>

Taylor & Francis

Synthetic particles as contaminants in German beers

Environmental Pollution

Volume 193, October 2014, Pages 65-70

ELSEVIER

Microplastics in bivalves cultured for human consumption

Lisbeth Van Cauwenberghe^a, Colin R. Janssen

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The presence of microplastics in commercial salts from different countries

Received: 25 November 2016
Accepted: 09 March 2017

Ali Karami¹, Abolfazl Golieskardi¹, Cheng Keong Choo², Vincent Larat³, Tamara S. Galloway⁴ & Babak Salamatina²

Fleur de Sel
Forscher entdecken Mikroplastik in Speisesalz
In den Meeren sammelt sich Plastikmüll. Einige Teilchen landen Untersuchungen zufolge in Nahrungsmitteln.



Fleur de Sel bei der Ernte auf Bal

Vorkommen in Lebensmitteln:

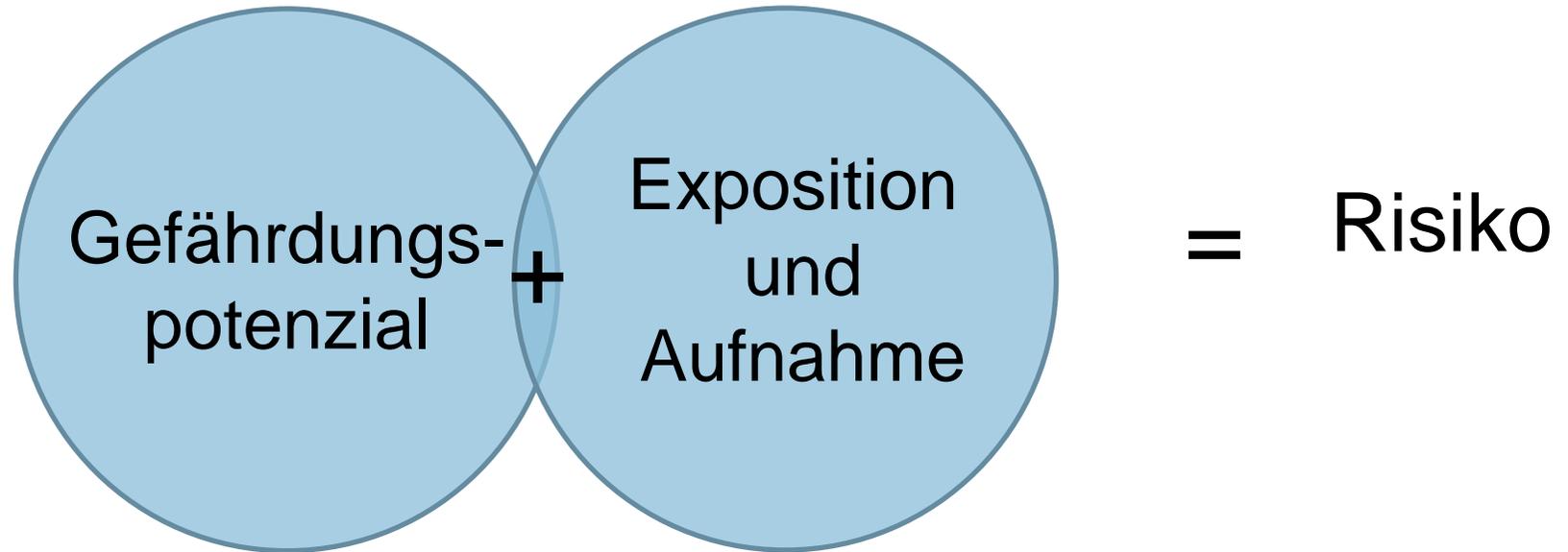
- Studien zu Mineralwasser, Honig, Bier, Seafood und Tafelsalz
- Zudem aus Plastikrohren, Verpackungen und Verarbeitungsprozessen

Problem: Quantifizierung

Es ist möglich und wurde gezeigt, dass Mikroplastik in die menschliche Ernährung gelangt.

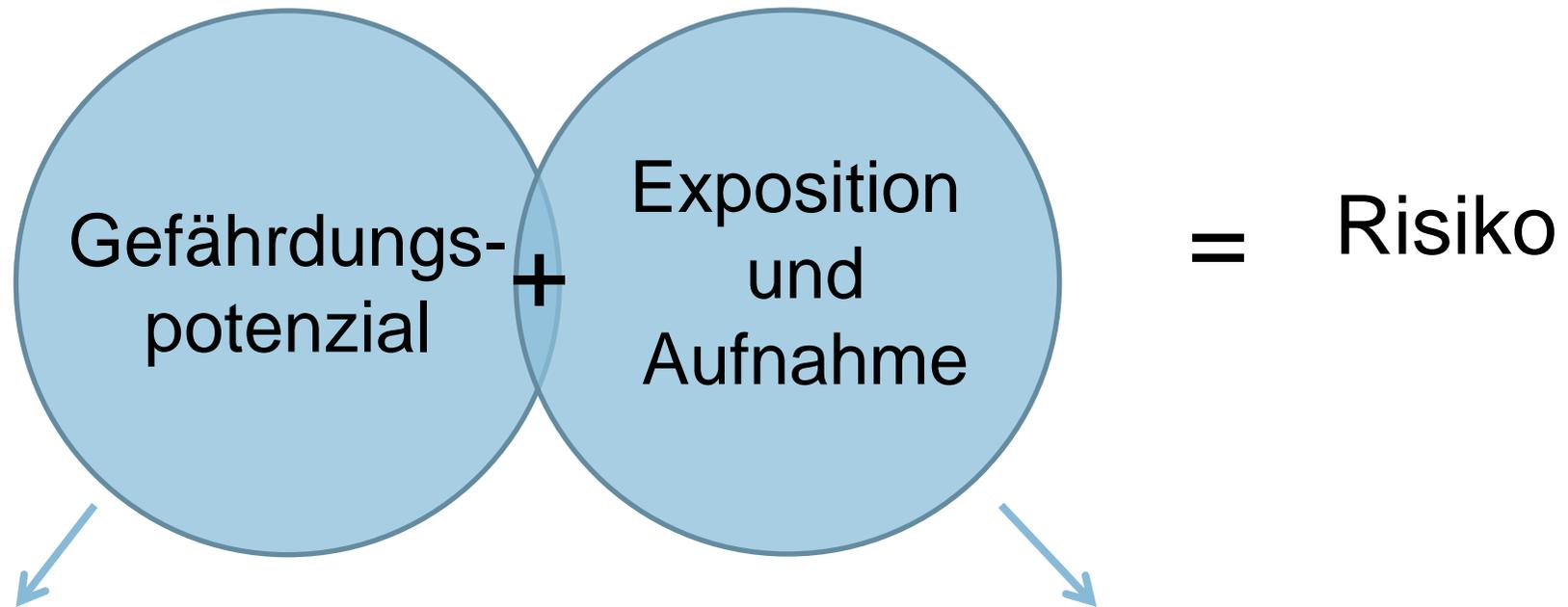
Mikroplastik – Toxikologische Relevanz

Besteht für den Menschen durch die orale Aufnahme von Mikroplastik ein Risiko?



Mikroplastik – Toxikologische Relevanz

Besteht für den Menschen durch die orale Aufnahme von Mikroplastik ein Risiko?



- Handelsübliche Plastikmaterialien werden als weitgehend inert angesehen
- Offen ist das Reaktionspotenzial von z.B. wasserlöslichen Polymeren

- Aktuell liegen nur wenige Daten vor, weil standardisierte Messmethoden fehlen
- Messungen in einigen Lebensmitteln äußerst schwierig (z.B. Fisch, Fleisch)

- EFSA-Modellrechnung mit Muscheln:
 - Median: 4 Partikel / g Muschel
 - Entspricht 900 Partikel pro Mahlzeit bzw. 7 µg Plastik
- Expositionsmengen sehr gering (Kap. 3.6)

<https://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/4501>

STATEMENT

ADOPTED: 11 May 2016

doi: 10.2903/j.efsa.2016.4501

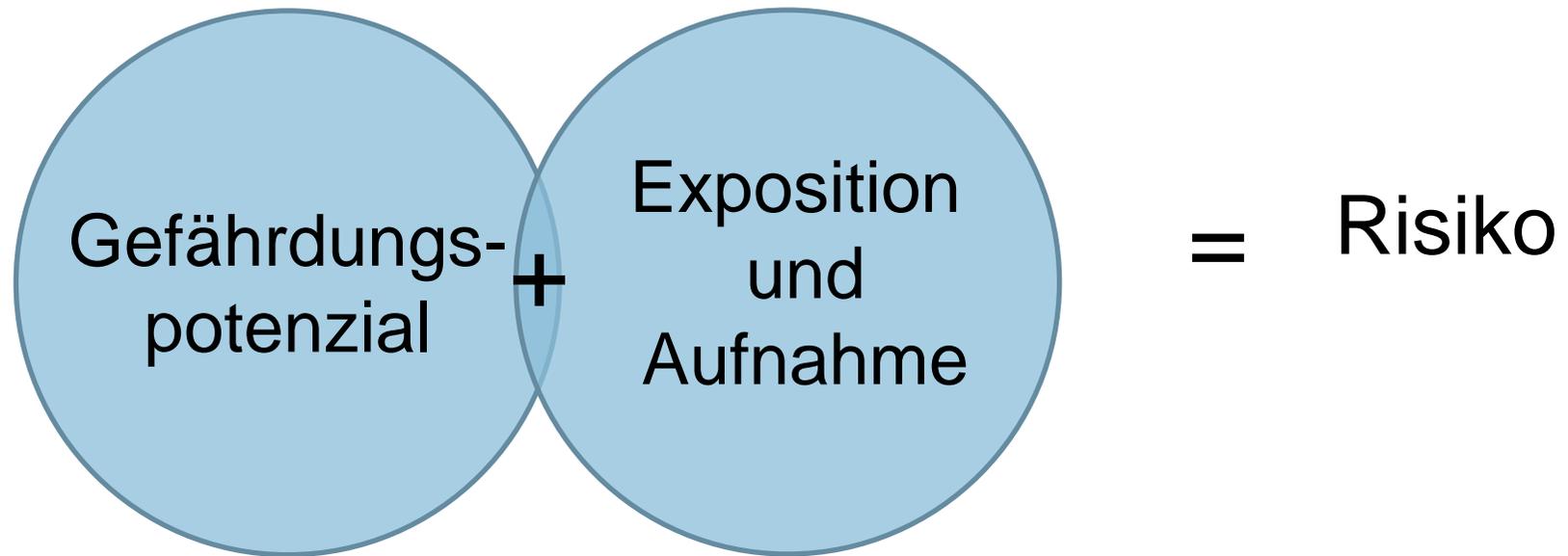
Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)



Toxikologische Relevanz von anhaftenden Kontaminanten

Besteht für den Menschen durch die orale Aufnahme von Mikroplastik ein Risiko?



- Auch indirekte Gefährdung durch anhaftende Kontaminanten möglich
- z.B. Umweltkontaminanten, Algentoxine, Hitzekontaminanten, Biozide



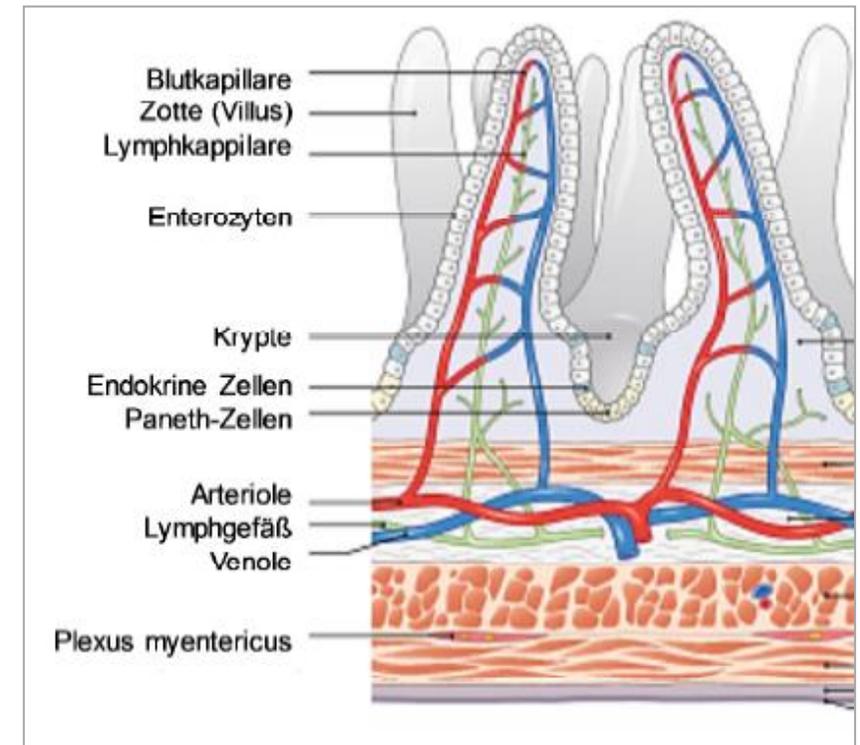
<https://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/4501>

- EFSA-Einschätzung: Beitrag dazu erhöht die übliche Exposition um weniger als 0,01 %

Eine zusammenfassende Risikobewertung ist aufgrund fehlender Daten aktuell noch nicht möglich, aber die generellen Prinzipien der Risikobewertung sind anwendbar.

Nach oraler Aufnahme – Wird Mikroplastik vom Körper aufgenommen?

- Mehrere Barrieren sind zu überwinden, z.B. Darmbarriere
- Vielfältige Barriereprinzipien:
 - Physikalische Barriere:
Maximalgröße für Transport über Darmschicht
 - Chemische Barriere:
Orale Bioverfügbarkeit von Fremdstoffen variiert sehr stark nach Stoffklassen
 - Immunologische Barriere:
Abtransport z.B. durch Immunzellen
 - Biochemische Barriere:
Umsetzung in der Leber



Nach oraler Aufnahme – Wird Mikroplastik vom Körper aufgenommen?

Wenn ja:

In relevanten Mengen? Und was bewirkt es im Körper?

- EFSA:

>150 µm keine Aufnahme über die Darmbarriere möglich

< 1,5 µm Aufnahme und Verteilung in weitere Organe prinzipiell möglich

- Eigene Forschung BfR:

- Aufnahme in die Darmzellen bis zu 4 µm möglich

- *in vitro* experimente mit Barrieremodellen des Dünndarms

- *in vivo* Mausstudie mit oraler Applikation

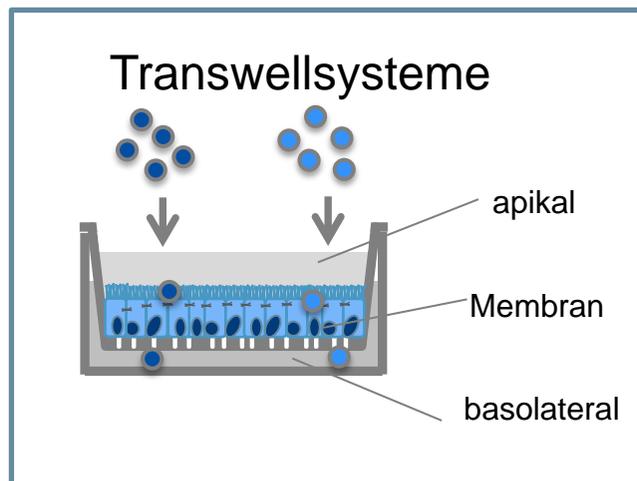
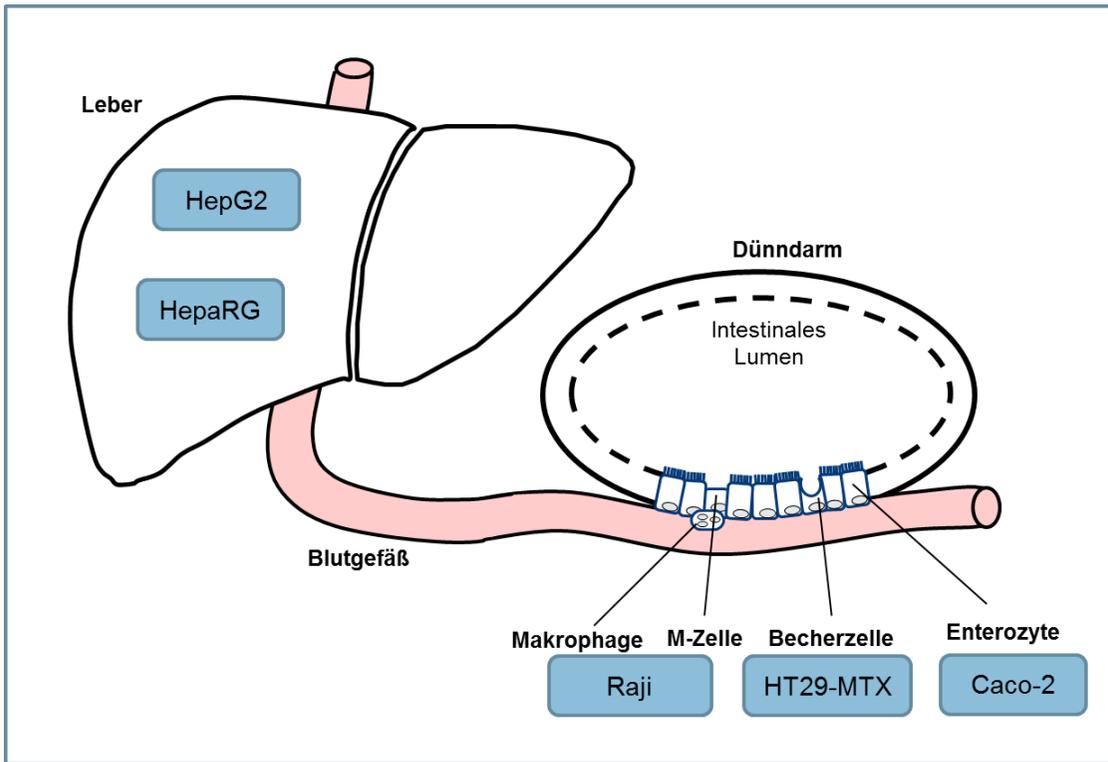
REGULATORY TOXICOLOGY

Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles *in vitro* and *in vivo*

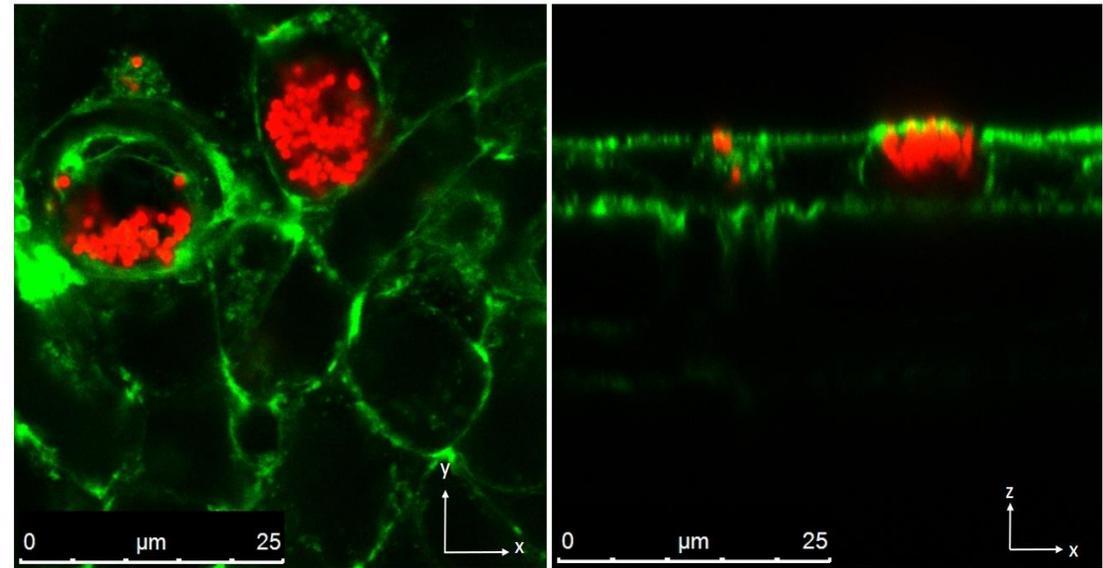
Valerie Stock¹ · Linda Böhmert¹  · Elisa Lisicki¹ · Rafael Block¹ · Julia Cara-Carmona¹ · Laura Kim Pack¹ · Regina Selb¹ · Dajana Lichtenstein¹ · Linn Voss¹ · Colin J. Henderson² · Elke Zabinsky³ · Holger Sieg¹ · Albert Braeuning¹ · Alfonso Lampen¹

Mikroplastik – Zelluläre Aufnahme mit *in vitro*-Modellen

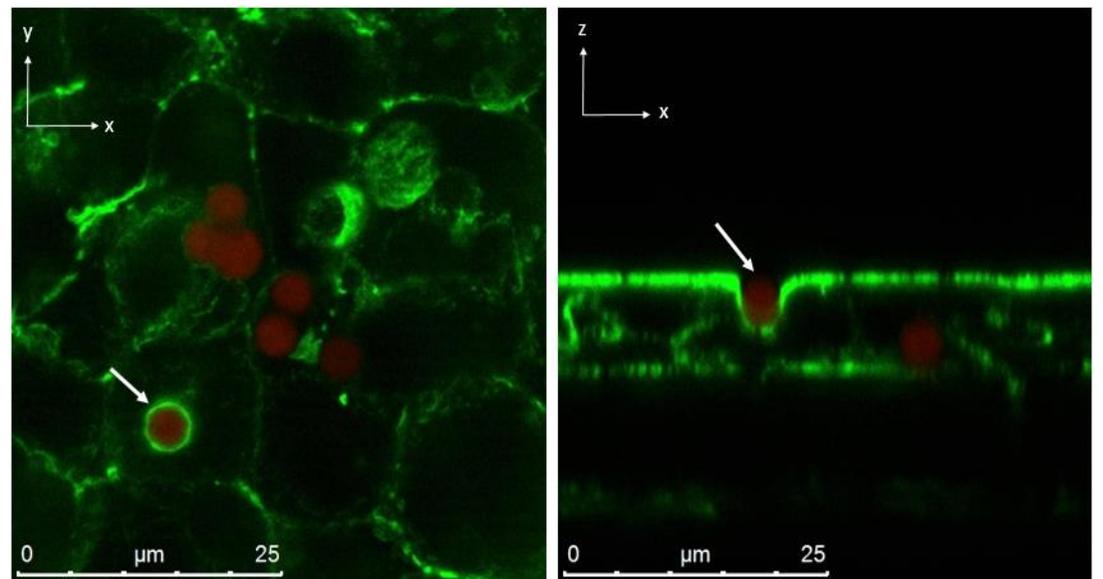
Zellmodelle



Konfokalmikroskopie



1-µm MF-Partikel (Konfokalmikroskopie)



4-µm PS-Partikel (Konfokalmikroskopie)

Mikroplastik – Zelluläre Aufnahme mit *in vitro*-Modellen

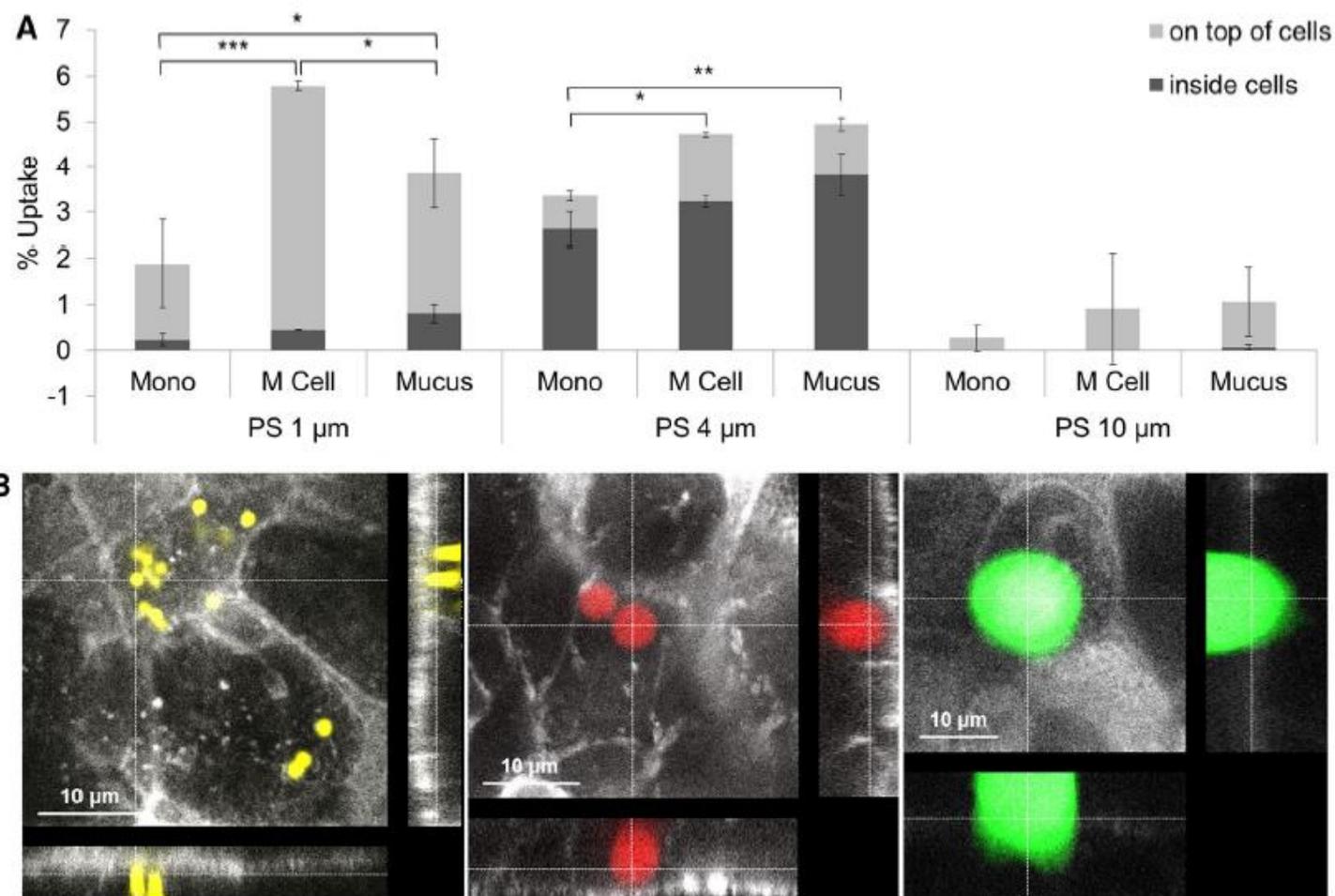


Fig. 4 Uptake of fluorescent 1 µm, 4 µm and 10 µm polystyrene (PS) microplastic particles into intestinal epithelial Caco-2 cells and their co-cultures after 24 h of incubation in a transwell system. **a** Percentage of microplastic particles found to interact with the cells of the Caco-2 monocultures, the M cell model, or the mucus model, as determined by confocal microscopy and plate reader-based fluorescence measurements. After counting of the particles inside and on top of the cells, the ratio of particles counted in/on the cells was calculated. Total fluorescence of the membrane was determined by the use of a plate reader and from that, the fractions of particles in/on the cells were calculated for the whole membrane. Particles which were found in the cytoplasm or on the basolateral side of the cell

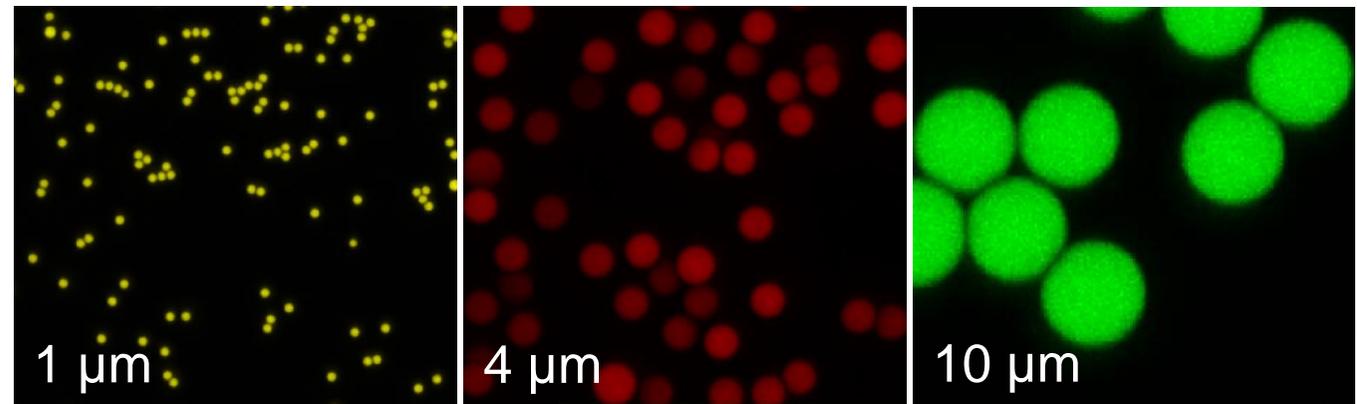
monolayer were counted as the “inside cells” fraction, while particles which were not absorbed by the cells but interacted with the microvilli were counted as the “on the cells” fraction. Mean values \pm SD of $n=3$ independent experiments are given. **b** Representative confocal microscopic images of epithelial cells from the Caco-2 monoculture model incubated with the three different fluorescent microplastic particles (left: 1 µm polystyrene, middle: 4 µm polystyrene, right: 10 µm polystyrene). Cell membranes were stained with actin-green. *Differences in overall particle absorption (sum of particles inside and on the cells) between the three models were calculated by one-way ANOVA; $p < 0.05$ in separate calculations for each particle size

aus Stock et. al. 2019

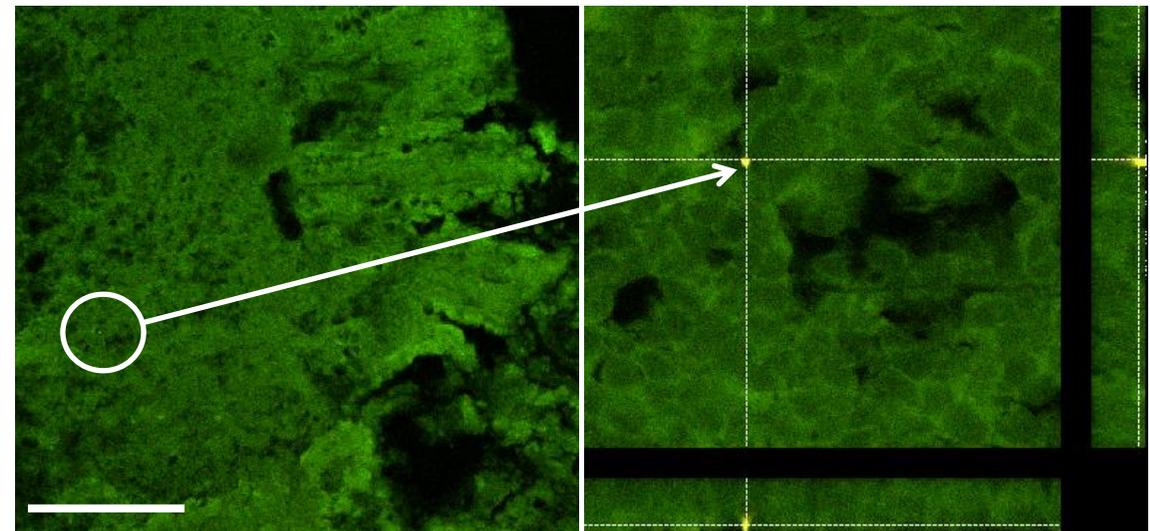
Mikroplastik – Wird Mikroplastik vom Körper aufgenommen?

– *in vivo* Ergebnisse

- 28-Tage-Fütterungsstudie mit verschiedenfarbigen Polystyrolpartikeln

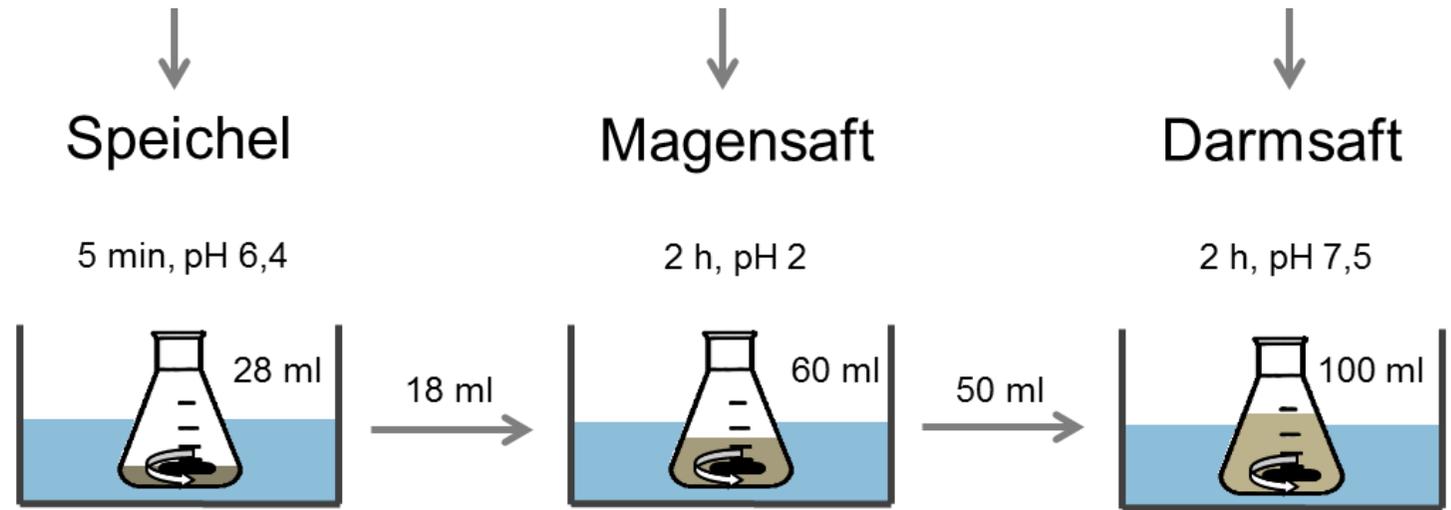
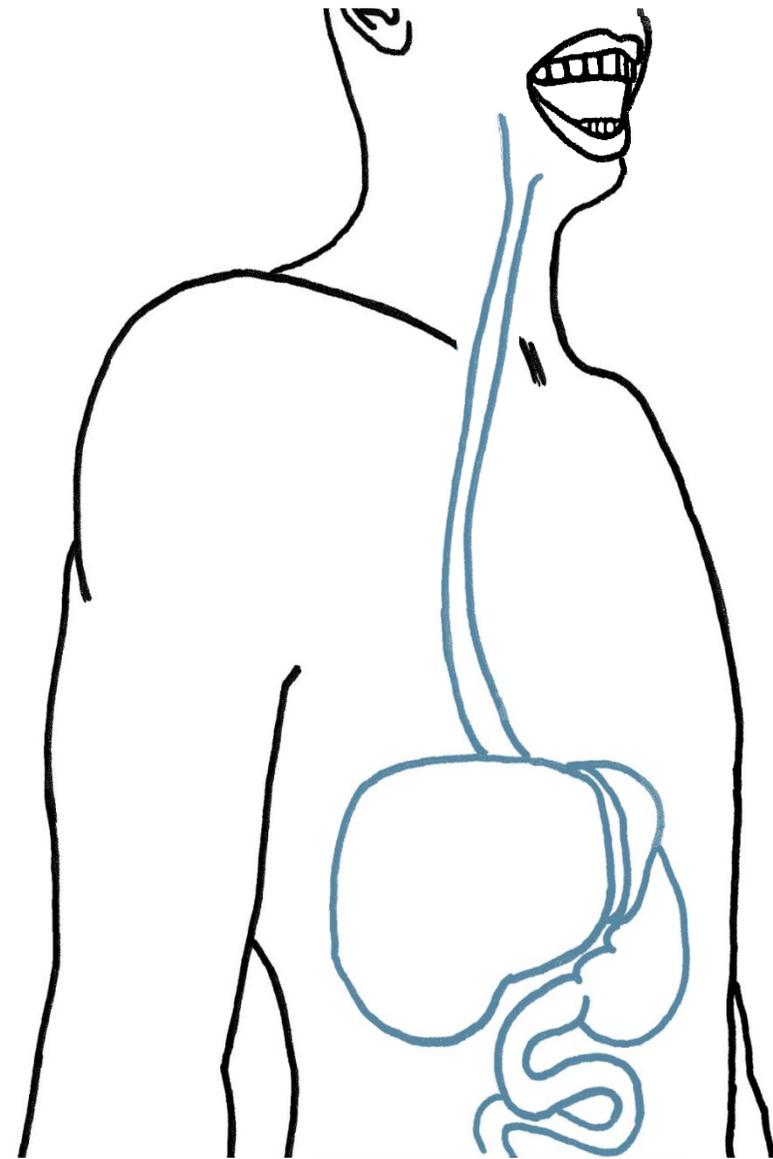


- Sehr geringe orale Bioverfügbarkeit
- Konfokalmikroskopie zur Bestimmung der Organverteilung -> sehr wenige Einzelpartikel im Darmgewebe
- Messung von oxidativem Stress



Mikroplastik – Hat das Verdauungssystem Einfluss auf Mikroplastik?

Artifzielles Verdauungssystem

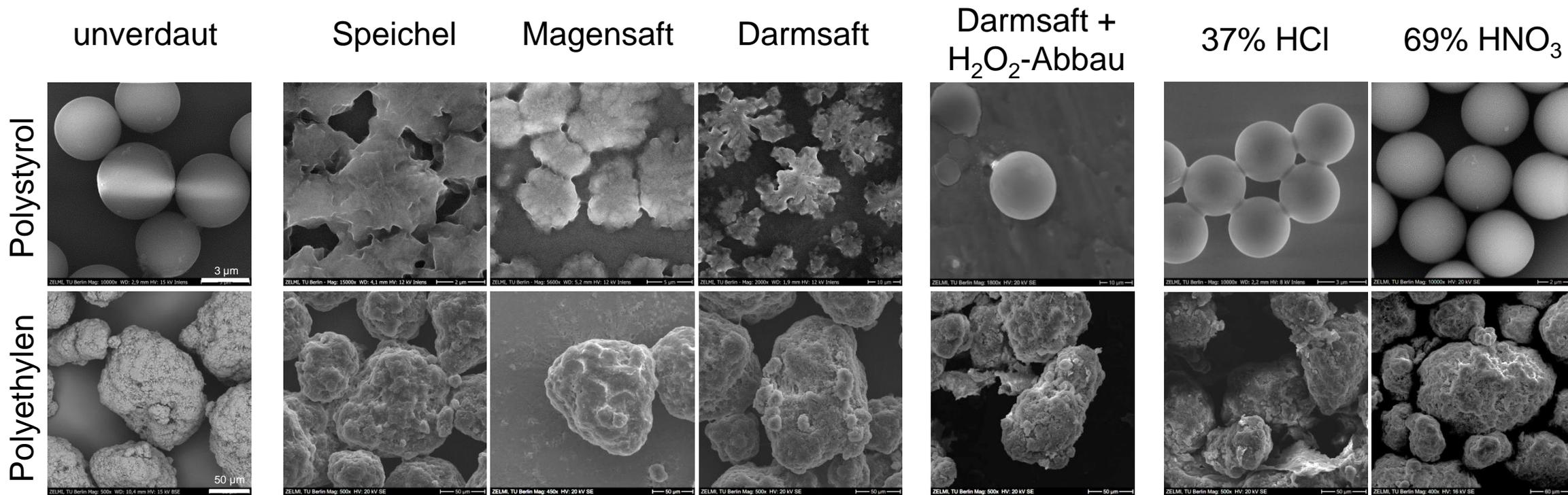


Verdau-Simulanzen mit

- Salzen
- Säuren / Basen (pH-Werte)
- Verdauungsenzymen
- Körpertemperatur (37 °C)
- Verweildauer unter Rühren

Mikroplastik – Verdauungssystem und Simulation

- Mikroplastik artifiziiell verdaut



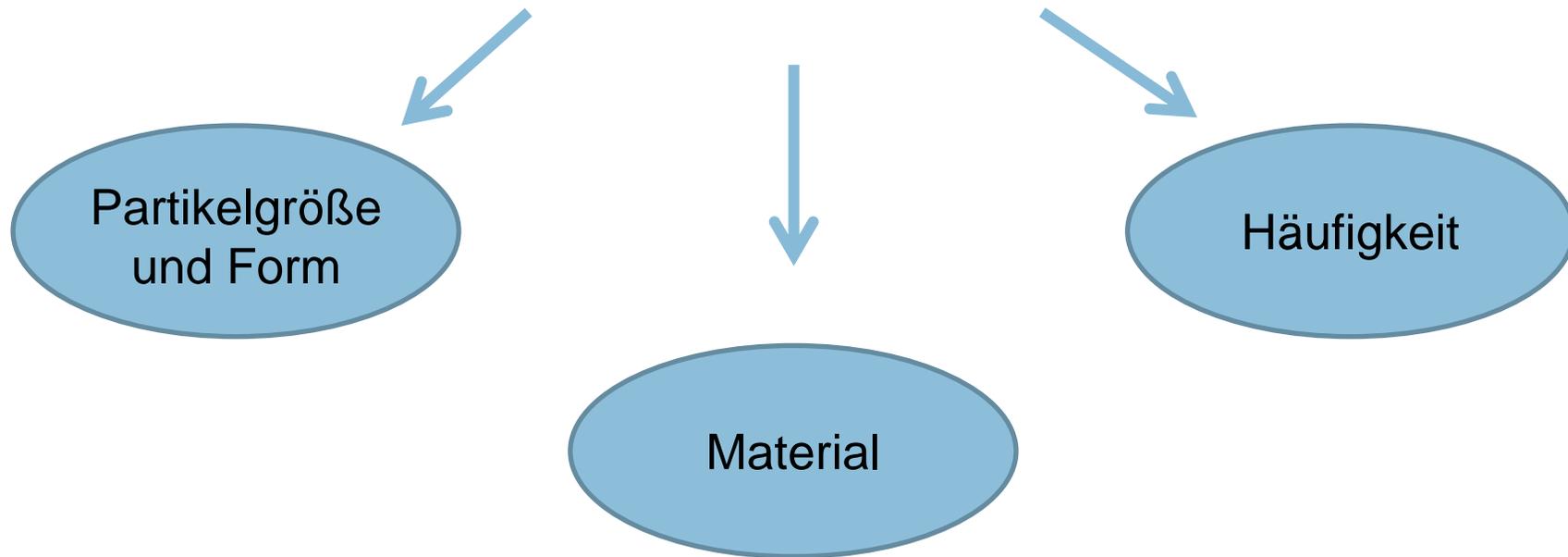
- Strukturveränderungen beruhen auf Anheftung organischer Matrix der Verdaulichkeiten
- Nach Abbau organischer Matrix liegen Partikel unverändert vor

Die Bedingungen des menschlichen Verdauungssystems reichen nicht aus, um Mikroplastikpartikel abzubauen.

Rasterelektronenmikroskopische Messung an der TUB, PhD-Projekt Valerie Stock

Warum ist eine Risikoabschätzung für Mikroplastik eine Herausforderung?

Plastik ist nicht gleich Plastik



Mikroplastik – Welche Partikelgrößen sind im Fokus?

Größenbereiche



Primäres Mikroplastik



- **Absichtlich** hergestellt als Bestandteile von Kosmetik, in der Lebensmittelproduktion und in Bedarfsgegenständen
- Kommerziell erhältlich

Sekundäres Mikroplastik

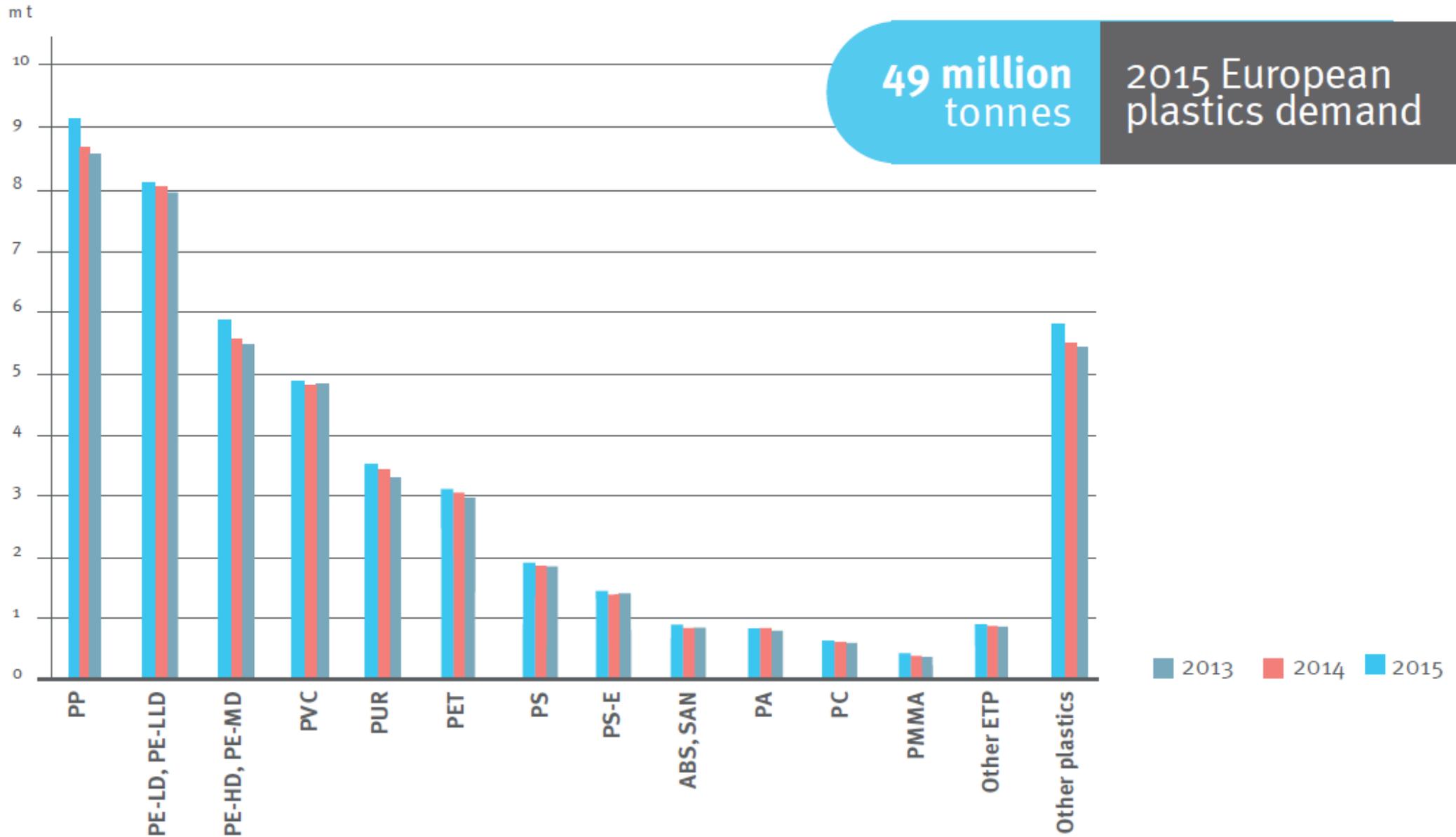


- Entsteht aus größeren Plastikteilen durch **Reibung** und **Zersetzung** von Plastikabfall
- Schwierig zu gewinnen, aufzuarbeiten und anzuwenden

Mikroplastik – Vorkommen und Häufigkeit

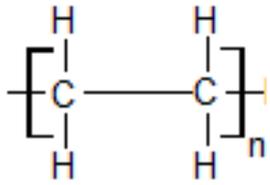
Unterscheidung verschiedener Plastikarten

Source: PlasticsEurope (PEMRG) / Consultic / myCeppi

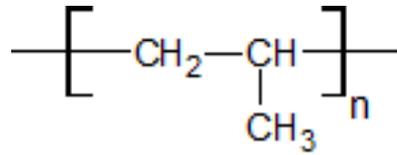


Mikroplastik - Materialunterschiede

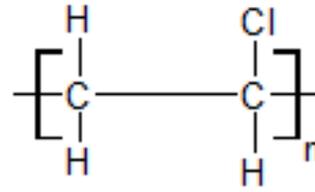
Polyethylen
(PE)



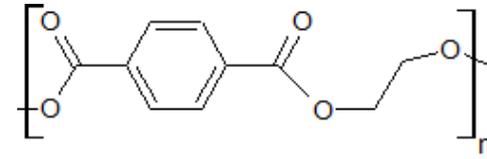
Polypropylen
(PP)



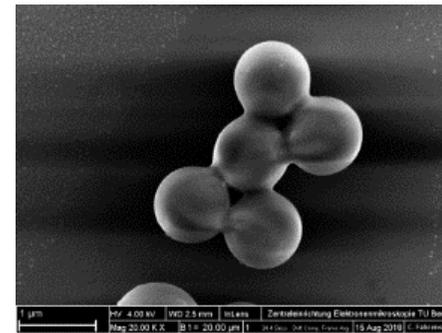
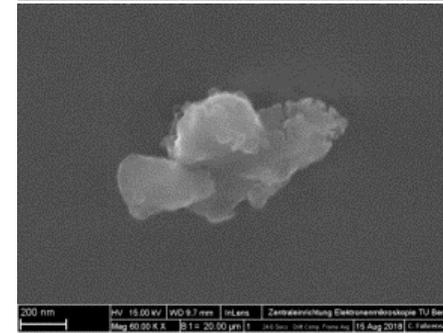
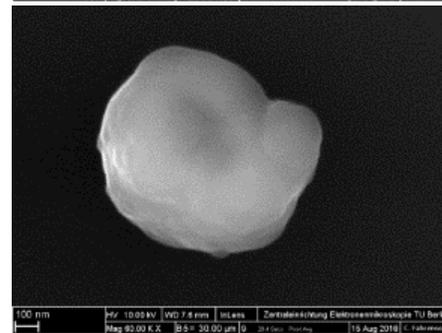
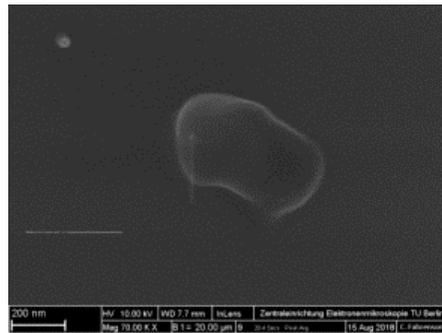
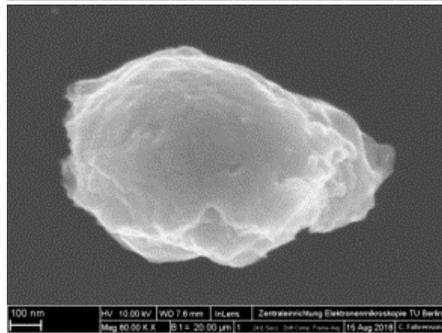
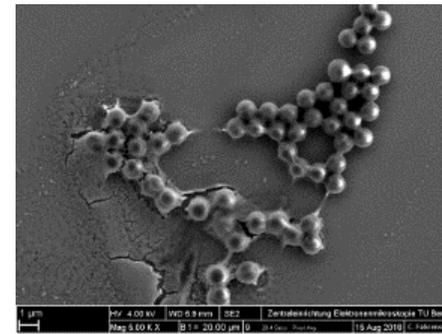
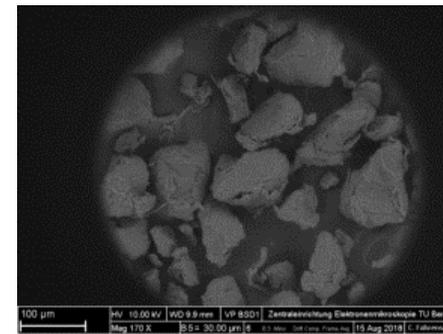
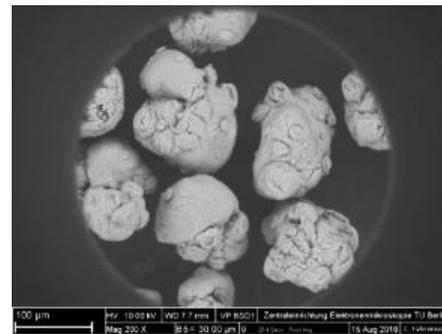
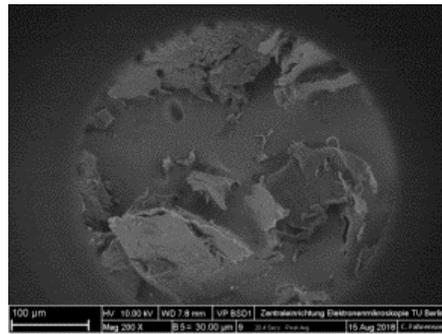
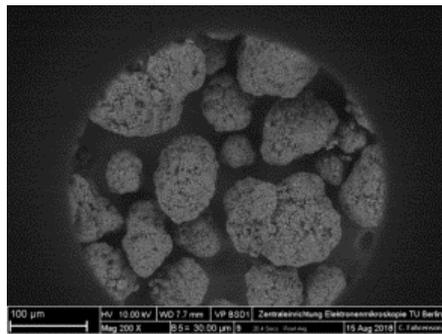
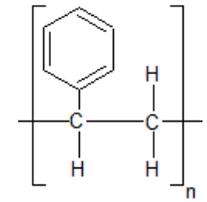
Polyvinylchlorid
(PVC)



Polyethylen-
terephthalat
(PET)



Polystyrol
(PS)



Rasterelektronenmikroskopische Messung an der TUB PhD-Projekt Valerie Stock

Mikroplastik - Materialunterschiede

Polystyrol ist am besten untersucht.

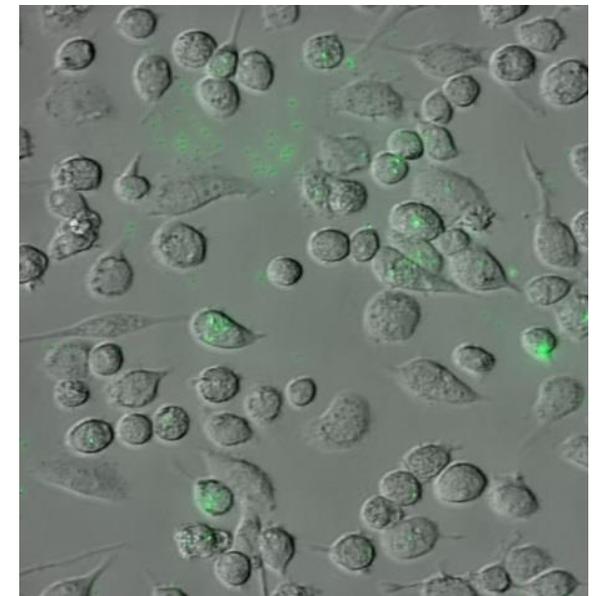
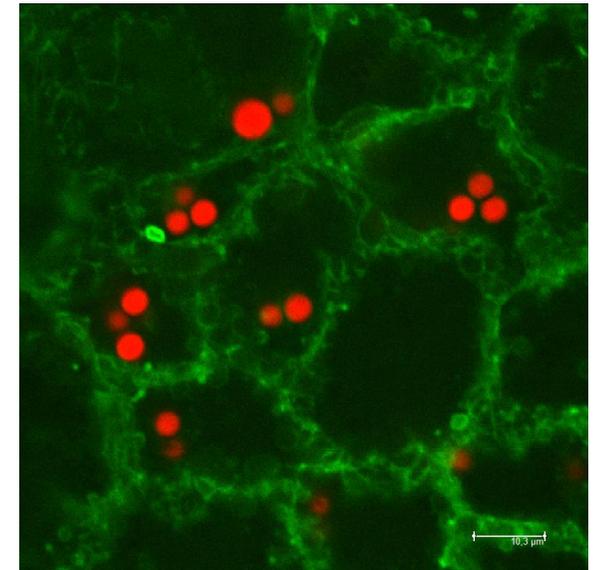
- Chemische Synthese einfach möglich
- Größenverteilung eng und gut bestimmbar
- Markierungen können aufgebracht werden

Andere Plastikmaterialien bereiten Schwierigkeiten.

- Kommen häufiger vor, sind aber schwerer herstellbar

Materialdichte ebenfalls von Bedeutung

- Einsatz im Zellsystem
- Zentrifugierbarkeit
- Messbarkeit bei Lichtstreuungsverfahren



Mikroplastik – Was bewirkt es im Körper?

Wenn Mikroplastik aufgenommen wird:

Was bewirkt es im Körper?

- EFSA:
 - nur wenige Studien verfügbar (Kap. 3.8)
 - verschiedene Tierstudien
 - meist keine messbaren Effekte
 - Effekte auf Wachstum und Immunsystem möglich
 - Humandaten nicht verfügbar

- Eigene Forschung:
 - Messung zellulärer Effekte *in vitro*
 - Messung oxidativen Stresses *in vivo*



<https://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/4501>

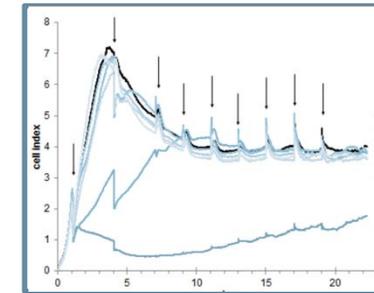
Mikroplastik – Testmethoden zur Ermittlung zellulärer Effekte

Viabilitätstests



Zelltodmechanismen,
reaktive Sauerstoffradikale
(...)

Wachstumstests

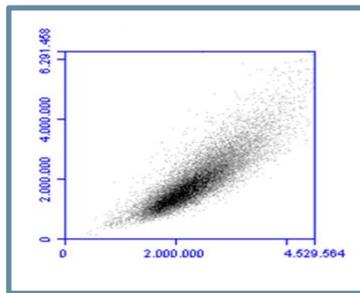


xCelligence-Verfahren



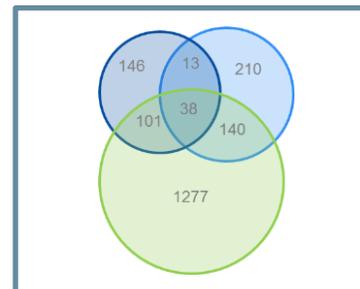
Testverfahren

Durchflusszytometrie



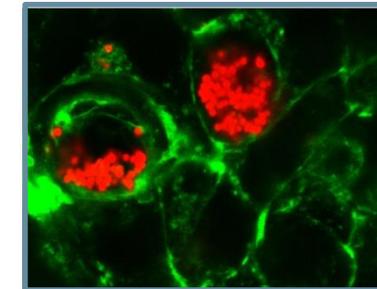
“Zählen von Ereignissen”

Genregulation



Einfluss auf den
Stoffwechsel

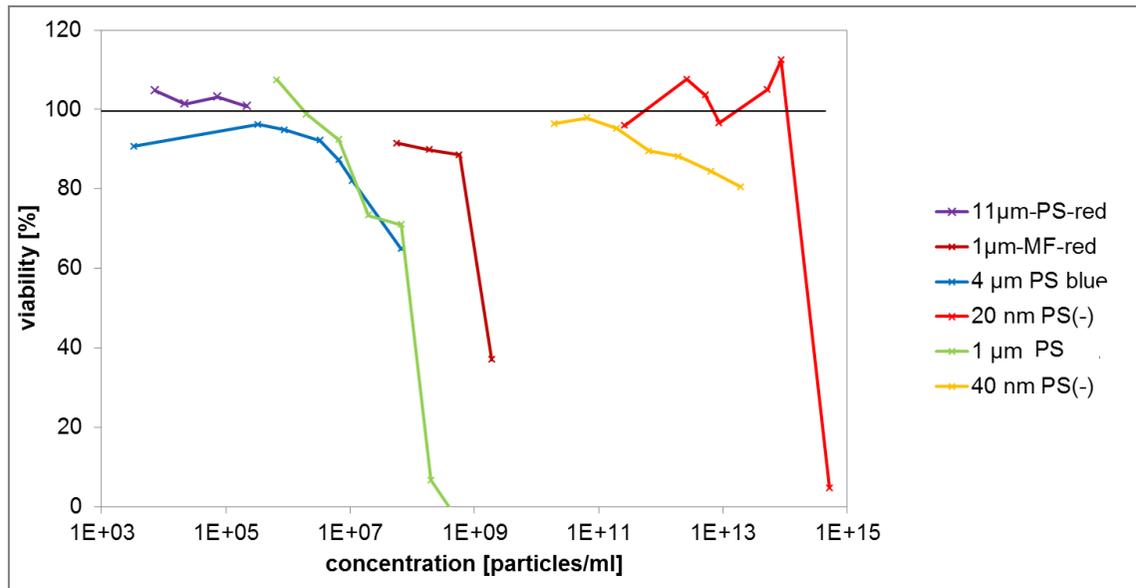
Mikroskopie



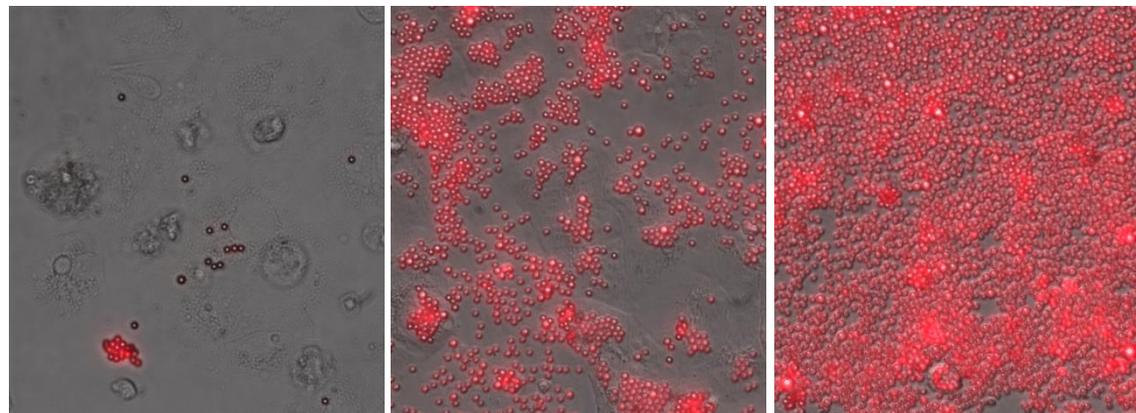
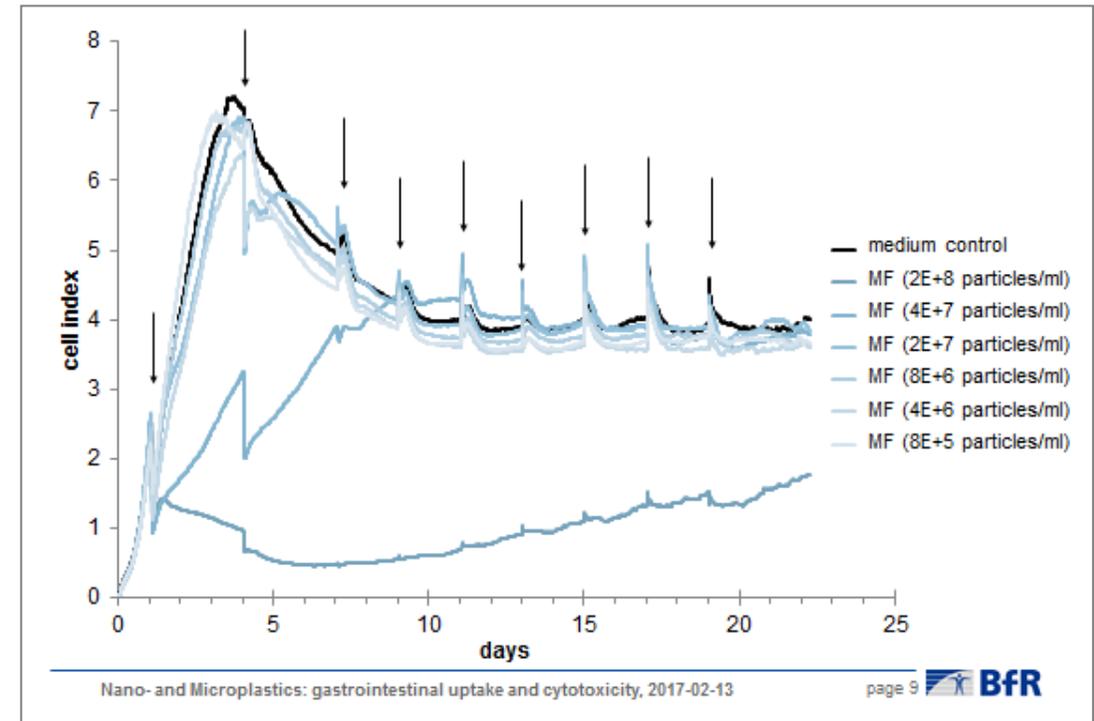
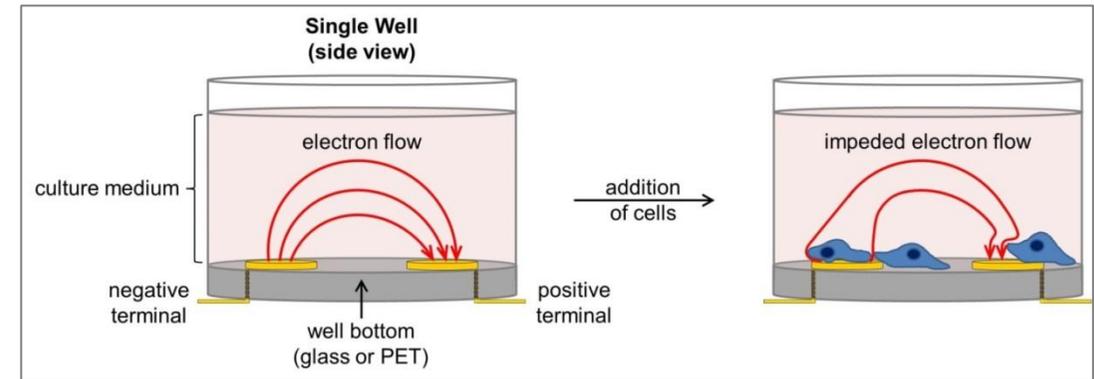
Fluoreszenz- und
Lichtmikroskopie

Mikroplastik – Was bewirkt es im Körper?

Zellviabilitätstests



Wachstumstests

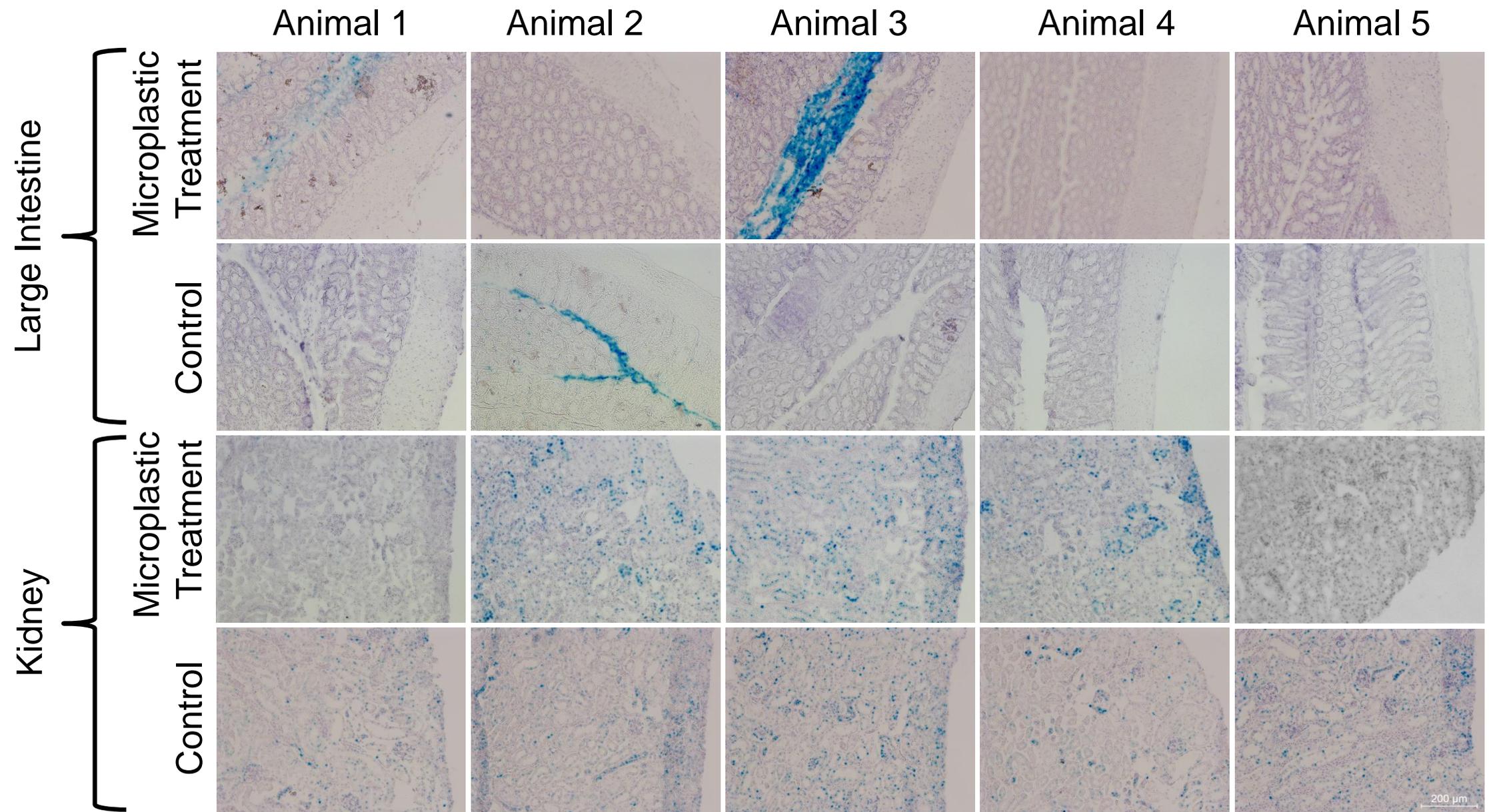


Effekte auf Zellen sind erst bei sehr hohen Konzentrationen messbar (overload)

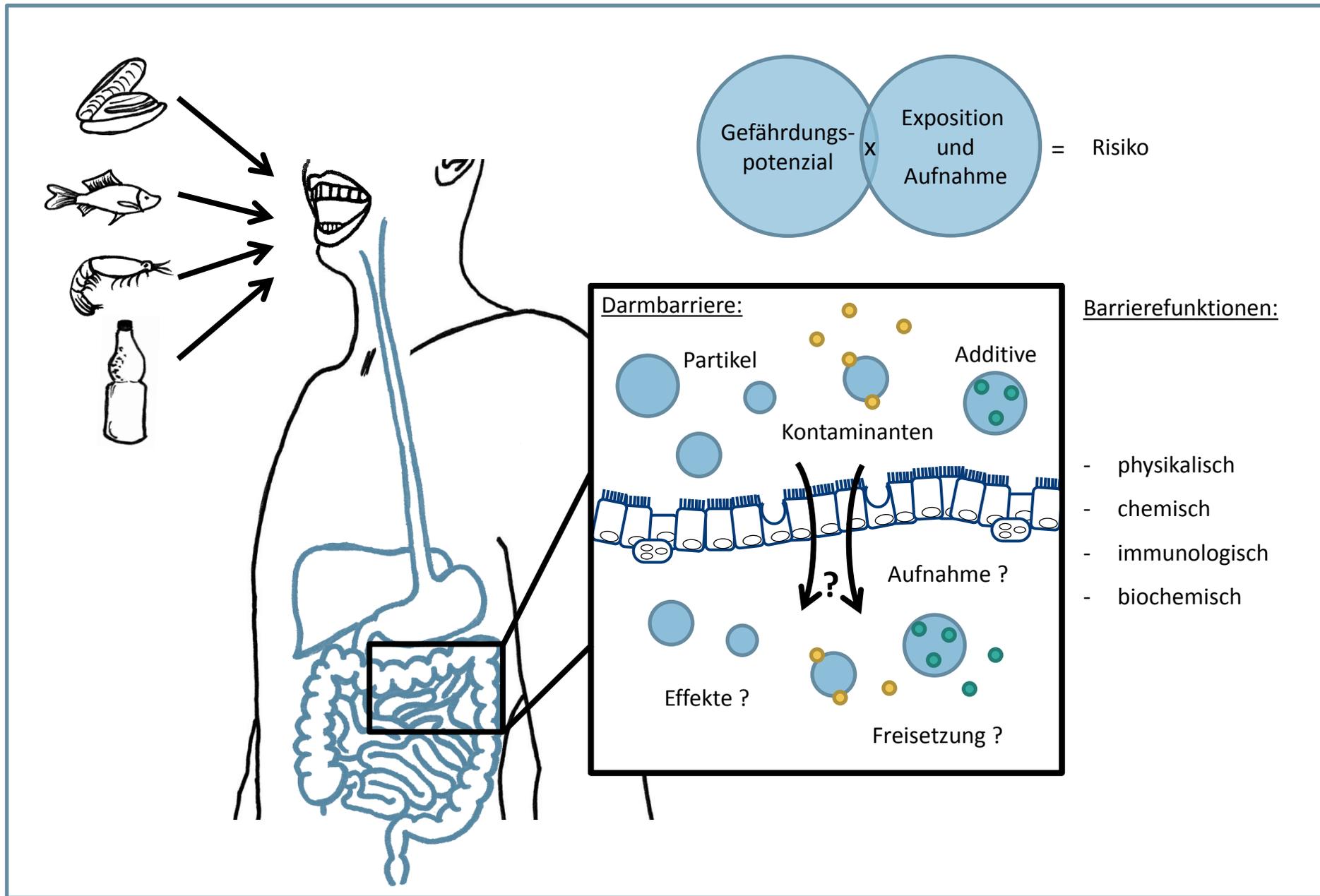
Mikroplastik – Was bewirkt es im Körper?

- *aus in vivo-Studie*: LacZ staining zur Messung oxidativen Stresses
- kein erhöhter oxidativer Stress in HOTT-Mäusen messbar

aus Stock et. al. 2019



Mikroplastik - Zusammenfassung



Eine zusammenfassende Risikobewertung ist aufgrund vieler offener Fragen aktuell noch nicht möglich, aber die generellen Prinzipien der Risikobewertung sind anwendbar.

Mikroplastik - Zusammenfassung

- Mikroplastik kann sich in der Umwelt anreichern und in die Nahrungskette gelangen
- Umwelteinflüsse können Plastikmaterial weiter zersetzen und chemisch verändern
- Aufnahme über die Nahrung, Bioverfügbarkeit und toxikologische Wirkmechanismen bislang unklar
- Weitere Forschungsprojekte hinsichtlich Materialcharakterisierung, Detektion sowie zellulärer Aufnahme und Wirkung

GERMAN FEDERAL INSTITUTE FOR RISK ASSESSMENT



BfR
Bundesinstitut für Risikobewertung

Size depending effects of microscaled and nanoscaled plastic particles on the intestinal barrier

V. Stock¹, L. Böhmert¹, E. Lisicki¹, J. C. Carmona¹, L. K. Pack¹, D. Lichtenstein¹, L. Voss¹, A. Braeuning¹, H. Sieg¹, A. Lampen¹

¹ German Federal Institute for Risk Assessment, Max-Dohm-Str. 5-10, 10589 Berlin, Germany

Introduction

Each year, several millions of tons of plastic debris are released into the environment, particularly into the oceans. Despite of its mostly low biodegradability, factors like UV radiation, salt water and mechanical strain can decompose plastic to micro- and nanoscale particles. Therefore, potential nutritional intake through the food chain, for instance by consumption of seafood, is very likely and represents a potential hazard for human health. In the present study, the uptake and transport of polystyrene plastic particles in three different sizes was investigated using three *in vitro* transwell models and an *in vivo* transgenic mouse model (HOTT mice) which is responsive to oxidative stress.

Material & Methods

in vitro
Human intestinal Caco-2 cells alone or in combination with HT29-MTX cells (human mucosa model) or Raji B-lymphocytes (M-cell model) were grown in a transwell system and used as models for the human intestinal barrier. Potential uptake or passage of the fluorescence-labeled particles was determined by fluorescence measurements by plate reader, flow cytometry and confocal microscopy¹.

in vivo
Five homo-oxigenase-1 triple transgenic (HOTT) reporter mice were orally treated with a mixture of three different sizes of fluorescent polystyrene particles for 28 days. Oxidative stress status was visualized by iNOS stain (reporter) which is under control of the oxidative stress activated heme oxygenase 1 (Hmox1) promoter. Microplastic uptake and oxidative stress status were determined microscopically.

Results

in vitro

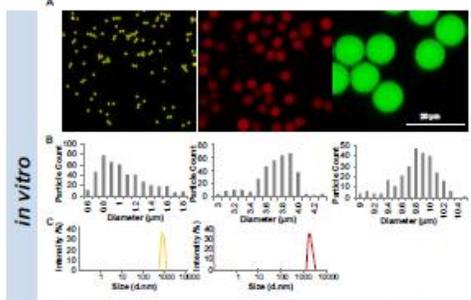


Fig 1: Characterization of fluorescent 1, 4 and 10 µm polystyrene particles. A: Confocal images of the particles. B: Size distribution of at least 100 particles per size determined by manual image analysis of confocal images. C: Size determination of the 1 µm and the 4 µm particle by Dynamic Light Scattering (DLS). The size of the 10 µm particle exceeds the detection limit of the method and could therefore not be determined.

in vitro

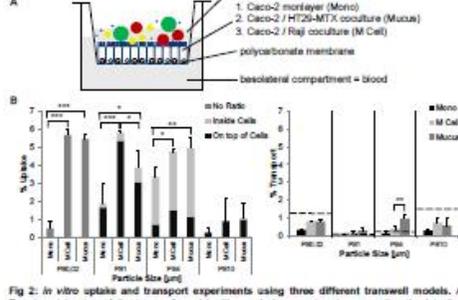


Fig 2: *In vitro* uptake and transport experiments using three different transwell models. A: Experimental setup of the transwell model with an apical compartment representing the intestinal lumen, a membrane on which a monolayer of 1. Caco-2 cells, 2. a coculture of Caco-2 and HT29-MTX or 3. a coculture of Caco-2 and Raji are grown representing the intestinal wall and a basolateral compartment representing the blood stream. B: Percentage of particles found on the surface of cells or in the cell lumen divided by model and particle size. C: Percentage of particles found in the basolateral compartment divided by model and particle size. Dashed line: Determination limit of particle fluorescence in the basolateral compartment.

in vivo

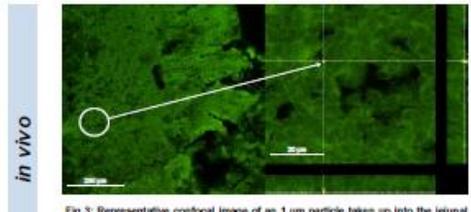


Fig 3: Representative confocal image of a 1 µm particle taken up into the jejunal wall of a HOTT mouse fed with with a mixture of three different fluorescent polystyrene particle sizes three times a week for 28 days.

in vivo



Fig 4: Oxidative stress reporter stain of large intestine, kidney, spleen and liver of control mice, mice treated with a mixture of three different fluorescent polystyrene particle sizes and a liver positive control.

Conclusions

in vitro

- > higher uptake and transport of all particles in the cocultures
- > higher uptake for smaller particles
- > cocultures differ in their particle affinities
- > overall particle transport very low

in vivo

- > very low particle uptake
- > only 1 µm sized particles were taken up in the large intestine
- > no increase of oxidative stress by particle treatment

¹Lichtenstein D, Böhmert L, Meyer T, Sieber A-C, Hübner C, Schmidt L, Jüttig R, Niekamp B, Fabraon C, Seiwitz B, Thoenemann AP, Weiger J, Giese-Lupke L, Braeuning A, Lampen A. 2017. It takes more than a coating to get nanoparticles through the intestinal barrier. *In vitro*. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceuticals* 112:21-28.

German Federal Institute for Risk Assessment • Max-Dohm-Str. 5-10 • DE-10589 Berlin • Phone +49 30 - 184 12 - 0 • Fax +49 30 - 184 12 - 47 41 • bf@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de

For further information: Valerie.Stock@bfr.bund.de

Vielen Dank für die Aufmerksamkeit

Danksagung:

Dr. Holger Sieg
PD.Dr. Albert Braeuning
Dr. Linda Böhmert
Valerie Stock

Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen

Bundesinstitut für Risikobewertung

Abteilung Lebensmittelsicherheit

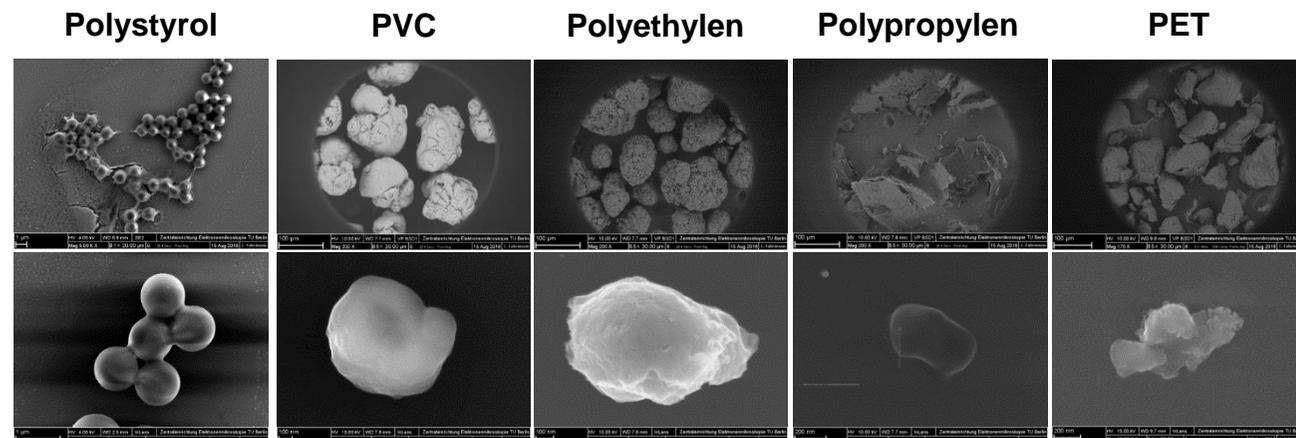
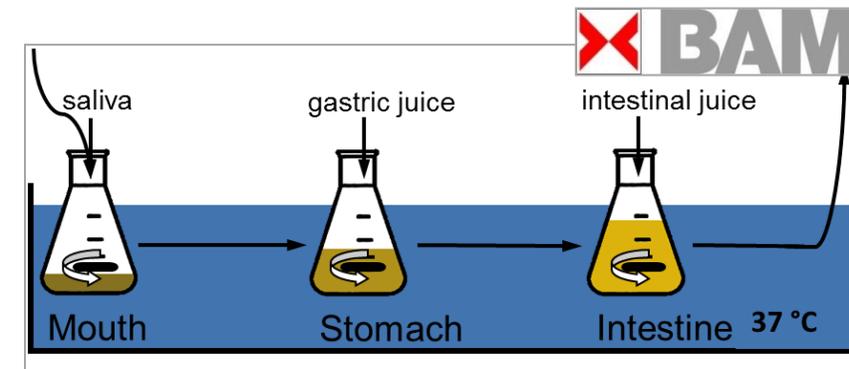
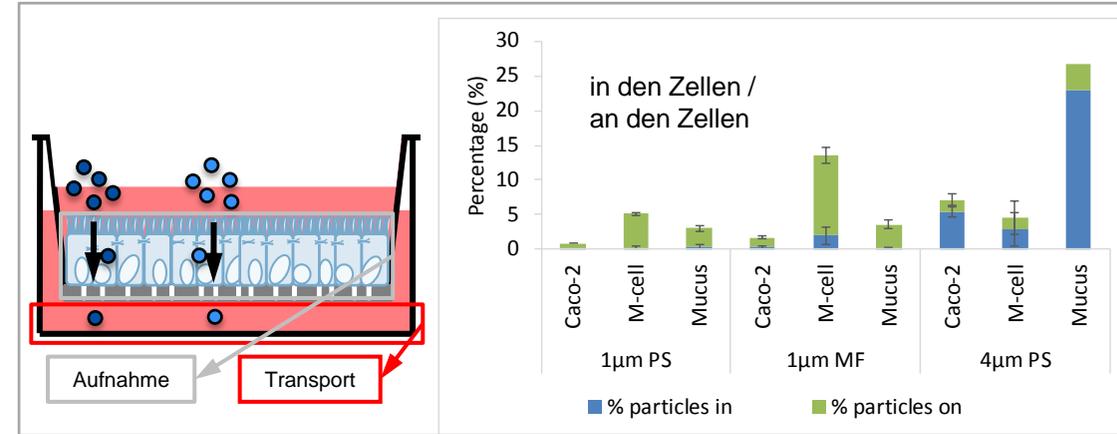
Max-Dohrn-Straße 8-10 • D-10589 Berlin

Tel. 0 30 - 84 12 - 25000 • Fax 0 30 -184 12 - 25099

Alfonso.Lampen@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de

Mikroplastik - Forschungsprojekte

- Zelluläre Aufnahme und Wirkung
- Alterung / Zersetzung
- Materialgewinnung, Aufreinigung
- Einsatz verschiedener Plastikmaterialien
- Detektion ungelabelter Partikel
- Artifizielles Verdauungssystem
- Anheftung und Freisetzung von Umweltkontaminanten
- Orale *in vivo* Mausstudie



Messung an der TUB PhD-Projekt Valerie Stock