Detektion og Kvantificering af Mikroplastik i Marine relaterede Fødevareprodukter ved brug af Fluorescens

Mathies C. Ellehauge Henriksen
Svendborg Gymnasium, 3.Z

Naturvidenskab
30. oktober 2017

FORSKERSPIRER
TA' FORSKUD PÅ FREMTIDEN

Indholdsfortegnelse

1 Indledning **2**

2 Formål og Problemformulering **2**

2.1 Afgrænsning *3*

3 Teori, Metode og Empiri **3**

3.1 Fluorescensmiddelet Nile Red *3*

3.2 Solvatochromt effekt af Nile Red *4*

3.3 Ekstrahering og isolering af mikroplastik i organisk materiale *4*

3.4 Valg af forskellige marine relaterede fødevareprodukter *5*

3.5 Metode *6*

4 Projektets udførsel **6**

4.1 Pilotforsøg *7*

4.2 Forsøg - Tabelværdier *7*

4.3 Primære forsøg *7*

4.4 Budget *8*

4.5 Tidsplan *9*

5 Konklusion og perspektivering **9**

6 Kontakter **10**

6.1 Tak til alle *10*

Bilag **14**

1 – Nile Red kemisk struktur og 3D repræsentation samt generel info *14*

2 – Gruppering af plastik efter farve, solvatochromisme *14*

3 – Nedbrydning af organisk materiale ved brug af KOH og NaClO *15*

4 – Mængder til forsøg *16*

4.1 Pilot forsøg 16

4.2 Primære forsøg 16

4.3 Samlede mængde 16

1 Indledning

Dette projekt omhandler at kunne detektere og kvantificere mikroplastik i marine relaterede fødevareprodukter ved brug af fluorescens. Idéen til projektet blev til, da jeg læste om den massive plastik forurening i havmiljøet, som viste, at der allerede i 2010 var en plastikmængde i havene på omkring 4,8 til 12,7 millioner tons[1]. Plastikken her bliver udsat for forskellige naturkræfter, der tilsammen nedbryder plastikken over længere tid[2], til det man kalder mikroplastik, som har en størrelse af < 5mm. Det er i denne kategoriserede størrelse, at plastik kan blive indtaget af plankton[3, 4] og bevæge sig op gennem fødekæden til andet marine liv[5]. Mennesker kan også blive udsat for mikroplastik fra bl.a. muslinger[6, 7], og det er blot én af måderne, mikroplastik ender i maden på[8]. Det er en potentiel fare for mennesker, og selve faren realiseres af faktummet af, at man har set skadelige effekter hos havdyr[9, 10, 11]. Ydermere er overemnet, mikroplastik som forureningskilde, meget aktuelt med et af de seneste fund af mikroplastik værende i dansk drikkevand[12].

Der er et generelt behov for at etablere en metode til detektering og kvantificering af mikroplastik, da en standardiseret metode ikke er blevet etableret. Dette forhindrer, at man kan sammenligne de forskellige kvantitative metoders resultater[13]. Mere er det vigtigt, at metoden er billig og hurtig, dog samtidig effektiv, givet at der er et forøgende behov for at undersøge mikroplastiks tilstedeværelse flere og flere steder. Derfor er fluorescens farvning en oplagt detekteringsmetode, der er anerkendt som en billig og hurtig metode til mikroskopiske analyser. Valget ved at undersøge fødevareprodukter fra havet grunder i, at det bliver indtaget af mennesker og dermed rejser et interessant spørgsmål omkring helbred ift. mikroplastik.

2 Formål og Problemformulering

Formålet med dette projekt er at sammensætte en billig, hurtig, effektiv metode med henblik på at detektere og kvantificere mikroplastik i fødevareprodukter, som evt. kunne hjælpe til med etableringen af en standardiseret metode i forskningsmiljøet. Derfor vil fluorescens blive brugt som detektionsmiddel som et led i metoden, grundet dets effektivitet og billige omkostninger. Metoden vil blive undersøgt deduktivt ved at teste eksperimentelt tilstedeværelsen og kvantiteten af mikroplastik i danske fødevareprodukter fra havet. Deraf lyder min problemformulering således: ***Er det muligt at detektere og kvantificere mikroplastik i danske marine relaterede fødevareprodukter ved brug af en ny og forbedret metode, hvor fluorescens er brugt som detektionsmiddel?***

2.1 Afgrænsning

Dette projekt beskæftiger sig med metoder omkring detektering og kvantificering af mikroplastik, og mere specifikt at komme frem til en metode der alene har det formål at finde mikroplastik i marine relaterede fødevareprodukter. Derfor vil forsøgene kun måle tilstedeværelsen og kvantiteten af ekstraheret mikroplastik i fødevareprodukter fra havet, da andre og flere prøver fra havet ville gøre projektet uoverskueligt og være for tidskrævende. Derudover vil den fundne metode udelukkende bruge fluorescens som detektionsmiddel. Metoder som f.eks. IR-spektroskopi og Raman scattering, som anvendes meget indenfor området, vil kun blive stillet op mod den fundne metode for at belyse fordele og ulemper.

Sundhedsmæssige problematikker og forårsagelser ift. indtagelse af mikroplastik af mennesker, såvel af andet, vil ikke blive taget op eller diskuteret, da formålet med projektet kun omhandler metodologien indenfor emnet og ikke betydningen af resultaternes evt. konsekvenser.

3 Teori, Metode og Empiri

3.1 Fluorescensmiddelet Nile Red

Fluorescens er et fænomen, hvor et stof modtager energi i form af lys og genudsender det med højere bølgelængde. I dette projekt er kravet, at det fluorescerende farvestof skal kunne bindes til mikroplastik og derved synliggøre det, så det kan tælles. Forskning har fundet det fluorescerende farvestof Nile Red, som værende det hidtil mest lovende fluorescensmiddel til detektering af mikroplastik[14]. Specifikt blev de forskellige farvestoffer testet efter deres evne til at blive adsorberet af plastik, og Nile Red var mest effektiv ift. dette (adsorbtionsvarighed: 5min – 66timer) samt dens styrke af fluorescens. Derfor vil Nile Red blive udgangspunktet for dette projekt som detektionsmiddel.

Nile Red (**Bilag 1**) er et lipofilt farvestof, som ikke vil fluorescere i de fleste polære omgivelser. Det vil fluorescere i et lipid rigt miljø som f.eks. intracellulære lipid dråber[15]. Da plastik primært er lipofilt, vil plastik og Nile Red binde sig og Nile Red fluorescere. Deraf vil man kunne tydeliggøre mikroplastik markant under et fluorescensmikroskop og være i stand til at kvantificere det. At bruge et fluorescerende lipofilt stof til detektering af mikroplastik er blevet foreslået tidligere af en forsker indenfor emnet, Andrady (2010)[16], og der er hidtil kun blevet udført få forsøg og målinger[14, 17, 18].

Maes *et al.* (2017)[14] farver, mest optimalt, mikroplastikken ved at tilføre koncentreret Nile Red med acetone i en opløsning af 10µg mL^{-1} i suspensionen med en inkubationstid på 30min.

3.2 Solvatochromt effekt af Nile Red

En nævneværdig funktion ved Nile Red er, at det er solvatochromt. Dvs., at det kan ændre farve efter omgivelsens polaritet, hvilket betyder, at det vil være muligt at definere og gruppere plastik efter fluorescens (**Bilag 2**). Maes *et al.* (2017)[14] har undersøgt dette og ud fra forsøg[i] lavet et plot med fluorescens indeks og kontakt vinkel (en måling af overflade polaritet) af fem forskellige plastik polymerer grupperet i polært og upolært (*Fig. 1*). Her vil det være muligt, i et vist omfang, at se forskel i farve ved de forskellige plastik polymerer. Det er dog vigtigt at notere sig, at noget plastik viser næsten samme fluorescens, og det kan derfor blive svært at skelne mellem disse.

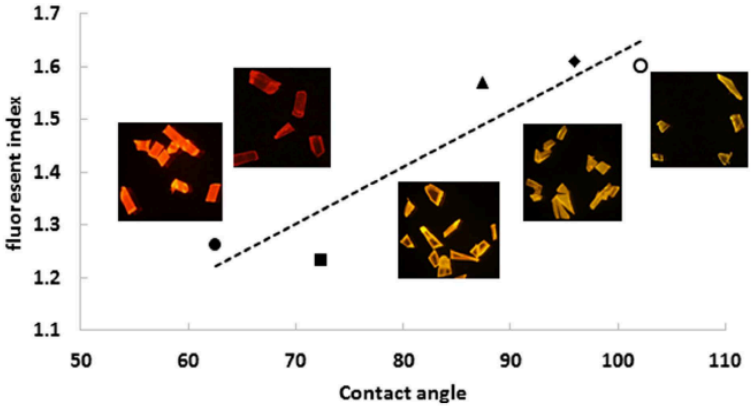


Fig. 1 Den polære gruppe bestod af Nylon og PET, og den upolære gruppe bestod af PE, PP og PS. X-aksen viser kontakt vinklen, som er en anden måde at vise polaritet på. Y-aksen viser fluorescens indekset, som udregnes ved $\frac{R+G}{R}$.

3.3 Ekstrahering og isolering af mikroplastik i organisk materiale

Fordi Nile Red er et lipofilt stof, er det vigtigt at isolere plastikken fra det biologiske materiale, da Nile Red vil binde sig til dette og forårsage fejl i optællingen af plastik. Derfor skal man opløse det organiske materiale uden at skade plastikken. En officiel metode af ICES (International Council for the Exploration of the Sea) lyder på, at man bruger en syreblanding af HNO_3 og $HClO_4$[19]. En gruppe forskere har dog fundet, at metoden beskadiger plastik og har derefter udviklet en betydelig mere effektiv metode[20]. Flere forskellige syre og syreopløsninger blev testet for deres effektivitet til at

[i] Forsøget blev udført ved brug af et specielt designet mikroskop, som var forbundet med et Canon EOS 600D kamera. Her kunne der måles på de individuelle plastik stykker og udregnes en værdi (fluorescens indeks) ud fra forholdet mellem intensiteten i de røde og grønne pixels ($\frac{R+G}{R}$) med hjælp fra billedanalyse programmet image J. Kontakt vinkel værdierne var fundne litteratur værdier.

nedbryde det organiske materiale uden at skade plastikken. Det mest effektive middel var en 30% fortyndet blanding af 1:1 KOH:NaClO (**Bilag 3**). Årsagen til effektiviteten af denne kombination, formuleret af seniorforskeren Jakob Strand, er, at en blanding af en stærk base (KOH) og et oxidationsmiddel (NaClO) vil forholdsvist nemt nedbryde mange former naturligt forekommende organisk materiale – hvorimod de fleste plastik polymerer i dette miljø er persistente (med enkelte undtagelser).

Efter selve nedbrydelsen er det vigtigt at få ekstraheret mikroplastikken på en ordentlig måde. Derfor er det anbefalet at bruge cellulose-nitrat filtre for at få filtreret alt organisk materiale væk, hvorefter mikroplastikken kan detekteres og kvantificeres under et mikroskop.

3.4 Valg af forskellige marine relaterede fødevareprodukter

For at få et repræsentativt resultat af havet er det foretrukket at analysere marine liv fra den pelagiske zone, den bentiske zone og fra kyster og æstuarier[19]. Det kræves dog, at produktet indeholder mave-tarm-kanalen, som indeholder mikroplastikken, hvilket de fleste marinerelaterede fødevareprodukter har fået fjernet. I dette studie vil kun blåmuslinger repræsentere den delvise kilde af mikroplastik fra havet, hvorimod kilden for de andre fødevareprodukter vil være luften[21], hanevandet[22] og måske maskineri, fabriksudstyr og andet. Af den grund vil dette studie ikke få et repræsentativt resultat af havet, men derimod et delvist et af kyster og æstuarier samt et af de specifikke fødevareprodukter der bliver undersøgt. Ydermere skal det siges, at analysen af prøverne foregår ved at opløse alt indholdet i produkterne i forhold til normalt kun at opløse mave-tarm-kanalen.

Uprocesserede fødevarer	Processerede fødevarer
Makrel (***Scomber Scombrus***)	**Dåse makrel**
Torsk (filet) ***(Gadus Morhua)***	**Tun på dåse**
Blåmuslinger ***(Mytilus edulis)***	**Pillede rejer**

Fig. 2 Valg af forskellige fødevareprodukter der vil blive analyseret for indeholdelse af mikroplastik.

Der skelnes mellem fødevareprodukter, der er processeret (produkt har været igennem fabriks produktion) og uprocesseret (produkt har ikke være igennem fabriksproduktion), da mængden af mikroplast og kilden til mikroplast forurening kan variere meget, grundet omstændighederne som behandlingen af fødevareprodukterne foregår i. Grundlaget for undersøgelsen af processeret mad understøttes af EFSA (European Food Safety Authority), som har udtrykt, at der er mangel på forskning af mikroplastiks tilstedeværelse i processeret mad[8].

Fig. 2 (side 5) viser de tilfældig valgte fødevareprodukter, der vil blive undersøgt for indhold af mikroplastik, hvor de uprocesserede fødevareprodukter vil blive købt ved en dansk fiskehandler og de processerede fødevareprodukter købt ved en dansk dagligvarebutik.

3.5 Metode

Den nye og forbedrede metode til at udføre forsøget tager meget brug af Maes' artikel[14], hvori der står, at deres protokol skal kunne justeres til at være anvendelig i andre prøver som bl.a. biota prøver[ii]. Derfor vil den nye metode bestå mest af Maes' protokol[14] med modifikationer fra bl.a. Enders' artikel[20]. Udover udførslen af denne metode, vil det være godt at undersøge Nile Reds solvatochromiske effekt, og om muligt at forudsige det emitterede lys for at identificere hvilken plastik polymer, der er at gøre med. Matematisk har man prøvet at gøre dette, men desværre var resultaterne ikke pålidelige[23]. Der vil derfor blive lavet tabelværdier af de forskellige plastik polymers emitterede fotoners bølgelængder, ved at måle det emitterede lys med et spektrometer forbundet med et mikroskop.

Det er vigtigt at tage forbehold for fejlkilder, når forsøget udføres. Muligheden for mikroplast forurening i prøverne er stor, da der både er fundet mikroplastik i luften[21] og i hanevandet[22], derfor skal forsøgene udføres meget varsomt og i så rene omgivelser som muligt.

4 Projektets udførsel

I det primære forsøg er formålet at finde mikroplastik i marine fødevareprodukter ved brug af fluorescens, samt at detektere hvilke plastik polymerer der er i produkterne. Et ekstra forsøg, hvor formålet er at lave tabelværdier af emitterede fotoners bølgelængder af Nile Red ved binding med forskellige plastik polymerer, nævnt i metode kapitlet 3.5, vil blive lavet med henblik på at anvende tabelværdierne til at detektere hvilke plastik polymerer der analyseres under det primære forsøg. Ydermere er det nødvendigt at have et pilot forsøg, hvorved det bekræftes, at en 30% KOH:NaClO opløsning vil kunne opløse de udvalgt fødevareprodukter effektivt nok, da der kan sås tvivl om, hvorvidt produkterne og deres størrelser vil blive effektivt opløst, da dette specifikke opløsningsmiddel primært er blevet testet på mave-tarm-kanaler fra torsk[20].

[ii] *"With appropriate alterations to the protocol, filtration steps to reduce volumes for water samples or digestion/solvent extraction methods generally applied for biota, the method should also be applicable to other matrices in which microplastic analysis is desirable, lowering cost and speeding up quantification processes."* Maes *et al.* (2017)[14]

4.1 Pilotforsøg

I pilotforsøget, som vil blive udført på Svendborg Gymnasium, vil de seks forskellige fødevarer blive købt ind samt KOH (KOH pellets opløst i vand, 1120 g/L) og NaClO (flydende koncentrat med 14% aktivt klor). Den 30% KOH:NaClO opløsning vil være i mængderne 5mL pr. gram materiale, der skal opløses. De forskellige fødevarer vil få tilsat de passende mængder opløsningsmiddel, hvorefter en inkubationstid på omtrent 5 timer kræves, for at materialet burde være opløst[20]. Opløsningseffektiviteten vil blive vurderet ved visuel inspektion, hvorefter opløsningen vil blive filtreret for at detektere ikke-opløste rester af fødevareprodukterne gennem et mikroskop. Hvis der ikke bliver fundet nogen ikke-opløste rester, kan det primære og tabelværdi forsøget påbegyndes.

4.2 Forsøg - Tabelværdier

I dette forsøg, som udføres på Københavns Universitet med vejleder Bo Wegge Laursen, vil de forskellige stykker plastik, der skal analyseres, være *'The Big Six'* [iii]. Mindre stykker, 0,1mm – 0,5mm, af det købte plastik, vil blive skåret ud, hvorefter farve metoden af Maes *et al.* (2017)[14] vil blive brugt. Universitetet har et mikroskop forbundet med et spektrometer, således at det er muligt at detektere de specifikke bølgelængder fra Nile Red. Når bølgelængderne er målt, noteres de forskellige bølgelængder, hvorefter de bruges til det endelige og primære forsøg.

4.3 Primære forsøg

Der vil blive indkøbt de tilpasse mængder af KOH og NaClO, fødevareprodukterne samt filtre og acetone. Forsøget har mulighed for at blive udført på forskellige universiteter/institutter[iv].

Først laves de rigtige mængder af den 30% KOH:NaClO, som vil være 19.800mL, da der skal 5mL pr. gram. Den færdige opløsning skal filtreres igennem inden forsøg (Cellulose nitrat filtre, 0,45µm). Yderligere forberedes Nile Red opløsningen, hvilket er 10µg mL^{-1} acetone og filtreret med et 0,45µm PTFE kanyle filter. Derefter forberedes de forskellige fødevareprodukter i et stinkskab i beholdere, hvorefter den rigtige mængde opløsning tilsættes hvert fødevareprodukt. Efter 5 timer, antaget at det er tiden, der kræves, for at fødevareprodukterne er opløst, filtreres det opløste materiale igennem et filtrationsanlæg. Filtrene tages fra filtrationsanlægget og herpå tilføres

[iii] Generelt refereres der ofte til dét plastik, der er fundet mest af, i miljøer der er forurenet, som *'The Big Six'*. Af dem indgår polyethylen (både lav-densitet og høj-densitet), polypropylen, polystyren, polyvinylchlorid og polyethylentereftalat.

[iv] Københavns Universitet, Institut for Bioscience i Roskilde, Leibniz-instituttet for Østersøforskning

Nile Red opløsningen, som skal have en inkubationstid på 30 min. Det skulle nu være muligt, at detektere plastikken gennem et mikroskop, hvor et lys af 450-510nm anvendes. Her kan et orange filter, hvis nødvendigt, anvendes for at fjerne overskydende blåt lys. Formålet er nu at kvantificere og detektere (ved brug af tabelværdierne) mikroplastikken i prøverne, hvorefter resultaterne noteres.

Hvis muligt vil prøverne blive analyseret med et FT-IR mikroskop eller ved Raman scattering, hvor resultaterne kan sammenlignes og evt. fejl findes.

4.4 Budget

Indkøbssted	Produkt	Pris
Sigma-Aldrich	KOH Pellets (5kg)	$885\ kr.$
Sigma-Aldrich	NaClO (6-14% aktivt klor, 5L)	$403{,}20kr \cdot 2 = 806{,}40\ kr.$
Sigma-Aldrich	Acetone (beregnet til spektroskopi, 500mL)	$214{,}56kr.$
Tilfældig lokal fiskehandler	Makrel x 3	(Dette vil være en ca. pris, da den specifikke pris er ukendt). $Ca.\ 350\ kr.$
	Torsk filet x 3	
	Pakke blåmuslinger x 3	
Coop.dk	Makrelguf (Glyngøre) x 3	$51{,}75\ kr.$
Coop.dk	Tun i olie (Xtra) x 3	$34{,}5\ kr.$
Coop.dk	Grønlandske rejer (Irmas) x 3	$132\ kr.$
Sigma-Aldrich	Nile Red (Beregnet til mikroskopi, 1g)	$3.780\ kr.$
Sigma-Aldrich	Acrodisc® PTFE kanyle filtre (0,45µm)	$1.463\ kr.$
GE Healthcare Life Sciences	Whatman cellulose nitrat membran filtre 47mm (0,45µm)	$1.378{,}25\ kr.$
Sigma-Aldrich	Polycarbonat filter membraner 25mm (0,4µm)	$1.310{,}40\ kr.$
		Pris i alt: $10.405{,}86\ kr.$

Fig. 3, tabel af udgifter

Grundet de 'lave' omkostninger af forsøgene, i forhold til præmiesummens størrelse, vil det være muligt at udføre et ekstra forsøg, hvori der kan tages forbehold til eventuelle uventede fejl. Yderligere er mange redskaber allerede til rådighed på de forskellige universiteter/institutter, vigtigst er mikroskopet tilknyttet et spektrometer på KU og FT-IR mikroskopet på Bioscience instituttet i Roskilde. Tabellen, *Fig. 3*, viser de elementære udgifter, der skal bruges til alle tre forsøg. Mængderne af de forskellige kemikalier er beregnet i **Bilag 4**.

4.5 Tidsplan

Selve forsøgene vil ikke kræve meget tid andet end én dag hver, hvilket gør tisplanen simpel. Udførslerne af forsøgene vil blive foretaget i løbet af foråret 2018.

5 Konklusion og perspektivering

Hvad end forsøgets resultater ender med at blive, er det med sikkerhed, at det vil give anledning til videre forskning indenfor området og forhåbentlig også anledning til en standardiseret metode for mikroplastik detektion og kvantificering i fødevareprodukter.

Sandsynligheden for at der er mikroplastik i marine relaterede fødevareprodukter, eller almindelige fødevareprodukter, er relativ stor, da tilstedeværelsen af mikroplastik bl.a. er i drikkevandet og i luften. Derfor er det også forventet at detektere mikroplastik i fødevareprodukter. Hvis der dog ikke bliver fundet mikroplastik i forsøget, vil der med stor sandsynlighed være fejlkilder. Problematikken er altså, om den nye metode er optimal. Hertil kan det siges, at metoden ikke vil være fejlfri, og det er derfor påkrævet at lave gentagene forsøg og undersøgelser, inden man kan nå til en endelig konklusion. Hvis dette bliver opfyldt, og man får bekræftet tilstedeværelsen af mikroplastik i fødevareprodukter, vil det være passende at undersøge mikroplastiks helbredsmæssige konsekvenser hos mennesker, da vi ubevidst vil være i direkte kontakt med mikroplastik flere gange om dagen.

Der er etableret et samarbejde med en gruppe unge mennesker fra den tyske version af projekt forskerspirer "Jugend Forscht", som også arbejder med detektion og kvantificering af mikroplastik dog i hav sedimenter. Samarbejdet vil kunne hjælpe med at belyse fordele og ulemper ved metoden, da gruppen arbejder med Raman scattering.

6 Kontakter

Bo Wegge Laursen (Forskerkontakt)

Professor og direktør for Nano-Science Center

Institute of Chemistry, Københavns Universitet

Robin Lenz

Ph.d. cand.

Department for Biological Oceanography, Leibniz institute for Baltic Sea Research

Jakob Strand

Seniorforsker

Sektion for marin biodiversitet og eksperimentel økologi, Institut for Bioscience

Renske Vroom

Junior Scientist

Aquatic Ecology and Environmental Biology, Radbound University

(Billedet anvendt som forside i dette projekt tilhører Renske Vroom)

6.1 Tak til alle

En særlig tak til alle der har været mig behjælpelig med projektet, hvad end det er råd, vigtig information eller vejledning. Projektet her ville ikke have været til uden den modtagede hjælp og støtte.

Litteraturlisten

1. Jambeck, Jenna R., Roland Geyer, Chris Wilcox, Theodore R. Siegler, Miriam Perryman, Anthony Andrady, Ramani Narayan, and Kara Lavender Law. 'Plastic Waste Inputs from Land into the Ocean'. *Science* 347, no. 6223 (12 February 2015): 768. doi:10.1126/science.1260352.

2. Andrady, Anthony L. 'Microplastics in the Marine Environment'. *Marine Pollution Bulletin* 62, no. 8 (1 August 2011): 1596–1605. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.

3. Cole, Matthew, Pennie Lindeque, Elaine Fileman, Claudia Halsband, Rhys Goodhead, Julian Moger, and Tamara S. Galloway. 'Microplastic Ingestion by Zooplankton'. *Environmental Science & Technology* 47, no. 12 (18 June 2013): 6646–55. doi:10.1021/es400663f.

4. Wilson, David Sloan. 'Food Size Selection Among Copepods'. *Ecology* 54, no. 4 (1 July 1973): 909–14. doi:10.2307/1935688.

5. Setälä, Outi, Vivi Fleming-Lehtinen, and Maiju Lehtiniemi. 'Ingestion and Transfer of Microplastics in the Planktonic Food Web'. *Environmental Pollution* 185 (1 February 2014): 77–83. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.013.

6. De Witte, B., L. Devriese, K. Bekaert, S. Hoffman, G. Vandermeersch, K. Cooreman, and J. Robbens. 'Quality Assessment of the Blue Mussel (Mytilus Edulis): Comparison between Commercial and Wild Types'. *Marine Pollution Bulletin* 85, no. 1 (15 August 2014): 146–55. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.06.006.

7. Choy, Ca, and Jc Drazen. 'Plastic for Dinner? Observations of Frequent Debris Ingestion by Pelagic Predatory Fishes from the Central North Pacific'. *Marine Ecology Progress Series* 485 (27 June 2013): 155–63. doi:10.3354/meps10342.

8. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). 'Presence of Microplastics and Nanoplastics in Food, with Particular Focus on Seafood'. *EFSA Journal* 14, no. 6 (1 June 2016): n/a-n/a. doi:10.2903/j.efsa.2016.4501.

9. Avio, Carlo Giacomo, Stefania Gorbi, Massimo Milan, Maura Benedetti, Daniele Fattorini, Giuseppe d'Errico, Marianna Pauletto, Luca Bargelloni, and Francesco Regoli. 'Pollutants Bioavailability and Toxicological Risk from Microplastics to Marine Mussels'. *Environmental Pollution* 198 (1 March 2015): 211–22. doi:10.1016/j.envpol.2014.12.021.

10. Browne, Mark A., Awantha Dissanayake, Tamara S. Galloway, David M. Lowe, and Richard C. Thompson. 'Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, Mytilus Edulis (L.)'. *Environmental Science & Technology* 42, no. 13 (1 July 2008): 5026–31. doi:10.1021/es800249a.

11. Lu, Yifeng, Yan Zhang, Yongfeng Deng, Wei Jiang, Yanping Zhao, Jinju Geng, Lili Ding, and Hongqiang Ren. 'Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (Danio Rerio) and Toxic Effects in Liver'. *Environmental Science & Technology* 50, no. 7 (5 April 2016): 4054–60. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00183.

12. Chrstensen, Søren 'Miljøteknologer Har Fundet Mikroplast i Dansk Drikkevand | Cphbusiness'. Accessed 22 September 2017. /om-cphbusiness/nyheder/2017/09/miljoeteknologer-har-fundet-mikroplast-i-dansk-drikkevand.

13. Cole, Matthew, Pennie Lindeque, Claudia Halsband, and Tamara S. Galloway. 'Microplastics as Contaminants in the Marine Environment: A Review'. *Marine Pollution Bulletin* 62, no. 12 (1 December 2011): 2588–97. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.

14. Maes, Thomas, Rebecca Jessop, Nikolaus Wellner, Karsten Haupt, and Andrew G. Mayes. 'A Rapid-Screening Approach to Detect and Quantify Microplastics Based on Fluorescent Tagging with Nile Red'. *Scientific Reports* 7 (16 March 2017). doi:10.1038/srep44501.

15. Greenspan, P., E. P. Mayer, and S. D. Fowler. 'Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets.' *The Journal of Cell Biology* 100, no. 3 (1 March 1985): 965–73. doi:10.1083/jcb.100.3.965.

16. Andrady, A. L. Using flow cytometry to detect micro- and nano-scale polymer particles on Proceedings of the Second Research Workshop on Microplastic Marine Debris. *NOAA Tech. Memo* 54 (2010).

17. Shim, Won Joon, Young Kyoung Song, Sang Hee Hong, and Mi Jang. 'Identification and Quantification of Microplastics Using Nile Red Staining'. *Marine Pollution Bulletin* 113, no. 1 (15 December 2016): 469–76. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.10.049.

18. Fischer, Elke Kerstin, Lisa Paglialonga, Elisa Czech, and Matthias Tamminga. 'Microplastic Pollution in Lakes and Lake Shoreline Sediments – A Case Study on Lake Bolsena and Lake Chiusi (Central Italy)'. *Environmental Pollution* 213, no. Supplement C (1 June 2016): 648–57. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.012.

19. ICES. 2015. ICES Special Request Advice Northeast Atlantic and Arctic Ocean. OSPAR request on development of a common monitoring protocol for plastic particles in fish stomachs and selected shellfish on the basis of existing fish disease surveys. IICES Advice 2015, Book 1 (June), 1-6

20. Enders, Kristina, Robin Lenz, Sabrina Beer, and Colin A. Stedmon. 'Extraction of Microplastic from Biota: Recommended Acidic Digestion Destroys Common Plastic Polymers'. *ICES Journal of Marine Science* 74, no. 1 (1 January 2017): 326–31. doi:10.1093/icesjms/fsw173.

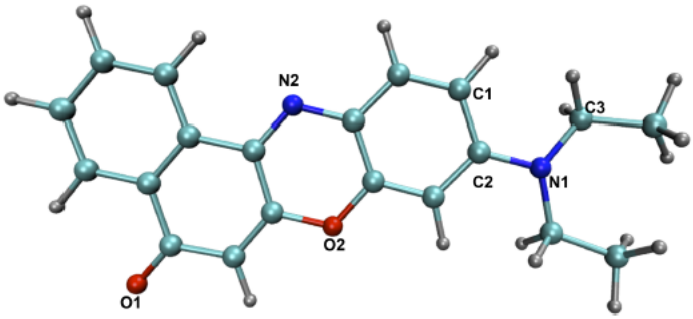
21. Gasperi, Johnny, Rachid Dris, Cécile Mirande-Bret, Corinne Mandin, Valérie Langlois, and Bruno Tassin. 'First Overview of Microplastics in Indoor and Outdoor Air', 2015. https://hal-enpc.archives-ouvertes.fr/hal-01195546.

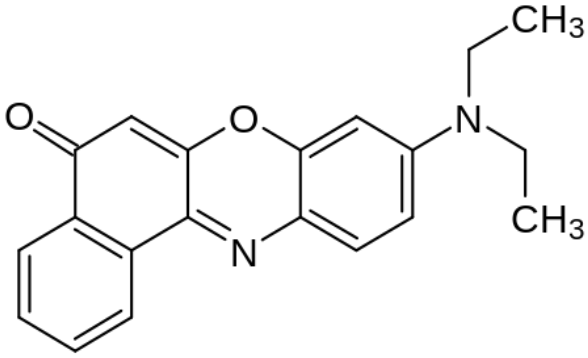
22. Mason, Sherri, Mary Kosuth. 'Invisibles'. Accessed 15 October 2017. http://orbmedia.org/stories/Invisibles_plastics.

23. Zuehlsdorff, T. J., P. D. Haynes, M. C. Payne, and N. D. M. Hine. 'Predicting Solvatochromic Shifts and Colours of a Solvated Organic Dye: The Example of Nile Red'. *The Journal of Chemical Physics* 146, no. 12 (28 March 2017): 124504. https://doi.org/10.1063/1.4979196.

Bilag

1 – Nile Red kemisk struktur og 3D repræsentation samt generel info



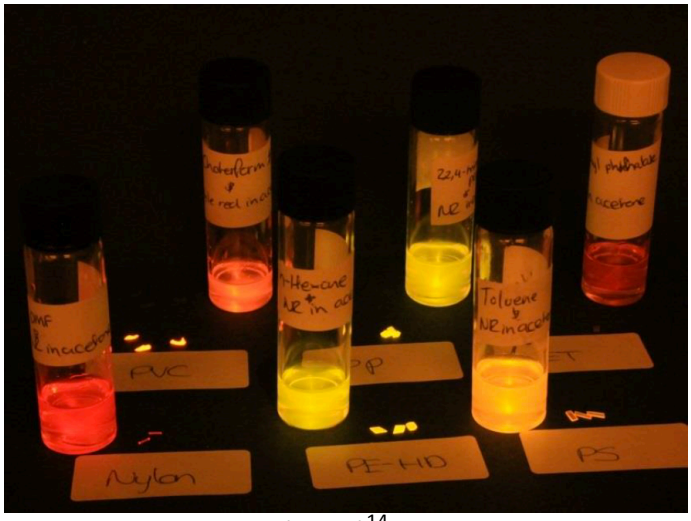


Den dihedrale vinkel, som står for rotationen af diethylamino gruppen i forhold til det aromatiske ring system er defineret ved C1-C2-N1-C3. Dette er en nævneværdig karakteristika ved Nile Red. Netop dette har en stor indflydelse på molekylets absorptionsevne Zuehlsdorff *et al.* (2017)[23].

Syntesen af Nile Red foregår ved at koge Nile Blue og svovlsyre under reflux som beskrevet af SD Fowler & P. Greenspan (1985)[15]. Ydermere er Nile Red yderst anvendt indenfor cellebiologi og besidder egenskaben solvatochromisme.

Kemiske formel: $C_{20}H_{18}N_2O_2$
Molarmasse: 318.369 g/mol
IUPAC navn: 9-diethylamino-5-benzo[α]phenoxazinon

2 – Gruppering af plastik efter farve, solvatochromisme



Billede af Maes *et al.* (2017)[14]

Det kan tydeligt ses, at farvenavngivningen er meget subjektiv og derfor ikke en god metode. Derfor ville det være meget mere oplagt, at måle den specifikke bølgelængde og fluorescens intensitet for at få et objektivt og kvalificeret mål for plastik type.

Her kan forskellen af farve ved de forskellige plastik polymerer tydeligt ses.

De forskellige plastik polymerer og deres farve:

Plastik	Farve
PVC Plastikvinylchlorid	Orange
Nylon Polyamid	Rød
PE-HD Høj densitet polyethylen	Gul
PP Polypropylen	Gul
PS Polystyren	Gyldent
PET Polyethylenterephthalat	Mørk rød

3 – Nedbrydning af organisk materiale ved brug af KOH og NaClO

Table 5. Descriptive test results for digestion effectiveness of KOH (I), NaClO (II), KOH: NaClO (III), and VIP1 (IV).

	Treatment	Post treatment
I	100% KOH	Layer of black/brown slime afloat, no big pieces remain.
IIa	30% NaClO	Milky solution, fish stomach still floating as one piece.
IIb	100% NaClO	Only half of mixture added because of very strong foam formation, risk of spillage
III	**1:1 (KOH:NaClO)**	**Sample tissue completely dissolved**
IVa	30% VIP1	Sample mostly dissolved, slimy sediment remaining.
IVb	100% VIP1	Sample dissolved better, less slimy sediment remaining.

a and b indicate when different concentrations were applied. The most effective treatment is highlighted in bold.

Enders *et al.* (2017)[20]

Her kan de forskellige midler ses, hvor det mest effektive middel er skrevet med fed skrift. KOH:NaClO opløsningen formåede at nedbryde det organiske materiale fuldkommen.

Table 4. Evaluation of Raman spectra changes after chemical treatments with the acid mix, saturated KOH and KOH:NaClO 30% solution
Colour legend:

Recognizable, largely identical
Recognizable, with noted peak changes if applicable
Not recognizable
n/a: not measured

	Acid mixture	KOH, saturated solution	30% KOH: NaClO
PP			
LDPE			
HDPE			
PS	slightly noisy, florescence		
EPS	n/a	n/a	
ABS	not recognizable, change in peak positions and fluorescence. 1605 cm^{-1} peak remains	higher noise level than in spectrum of untreated ABS	higher noise level than in spectrum of untreated ABS
PA	n/a	missing peak at 147 cm^{-1}	peak at 147 cm^{-1} weakened
PET		peak at 3080 cm^{-1} and 861 cm^{-1} enhanced, new peaks at 1418 cm^{-1} and 1132 cm^{-1}	
PC		new peak at 1065 cm^{-1}	
PVC	fluorescence, weaker main peaks at 704 and 637 cm^{-1} indicating degradation processes	weaker main peaks at 704 and 637 cm^{-1} indicating degradation processes	
PMMA	new peak at 1054 and 1308 cm^{-1}	new peak at 1070 cm^{-1}	
PTFE	n/a	n/a	

The spectra measured are presented in the Supplementary Materials. Grey shadings symbolize the degree of spectral matching compared to spectra of the untreated clean polymer.

Enders *et al.* (2017)[20]

Det kan ses, ud fra et Raman spektre, at den 30% KOH:NaClO opløsning intet skade har forårsaget på plastik polymererne, med undtagelse af en meget lille skade af ABS plastikken.

4 – Mængder til forsøg

4.1 Pilot forsøg

(Her vil der være ét af hvert fødevareprodukt, og opløsningsmidlet er 30% KOH:NaClO opløsning)

Fødevareprodukterne	Mængder opløsningsmiddel
Makrel = ca. 750g.	3.750mL
Torsk filet = ca. 250g.	1.250mL
Pakke blåmuslinger = ca. 500g.	2.500mL
Makrelguf (Glyngøre) = 190g.	950mL
Tun i olie = 140g.	700mL
Grønlandske rejer (Irmas) = 150g.	750mL
I alt = Ca. 1.980g.	I alt = 9.900mL

For at lave 9.900mL opløsningsmiddel vil 1.485mL KOH (1.663,2 g.) og 1.485mL NaClO blive brugt.

4.2 Primære forsøg

Fødevareprodukterne	Mængder opløsningsmiddel
Makrel = ca. 1.500g.	7.500mL
Torsk filet = ca. 500g.	2.500mL
Pakke blåmuslinger = ca. 1.000g.	5.000mL
Makrelguf (Glyngøre) = 380g.	1.900mL
Tun i olie = 280g.	1.400mL
Grønlandske rejer (Irmas) = 300g.	1.500mL
I alt = Ca. 3.960g.	I alt = 19.800mL

For at lave 19.800mL opløsningsmiddel vil 2.970mL KOH (3.326,4 g.) og 2.970mL NaClO blive brugt.

4.3 Samlede mængde

I alt vil det være, begge forsøg tilsammen, 29.700mL opløsningsmiddel, hvori der indgår 4.455mL KOH (4.989,6 g.) og 4.455mL NaClO.