

Projekttitle: Nachweis von Mikroplastik in Meerwasserproben

Teilnehmerin/Teilnehmer (mit Alter): Jason Heider (18), Niels Carlsohn (19), Jannes Eidam (19)

Schule: Staatliche Gemeinschaftsschule „Kaleidoskop“ Jena

Projektbetreuung: Dr. Christina Walther

Thema des Projekts: Aufreinigung und Detektion von Mikroplastik aus Meerwasserproben mit einfachen Mitteln

Fachgebiet: Chemie

Wettbewerbssparte: Jugend forscht

Bundesland: Thüringen

Wettbewerbsjahr 2025



KALEIDOSKOP Jena
Staatliche Gemeinschaftsschule
Jenaplanhschule Lobeda

1 Projektüberblick

In diesem Projekt wird der Frage, wie hoch die Konzentration der Mikroplastikstoffe in der Ostsee ist, nachgegangen. Hierfür werden an unterschiedlichen Küstenabschnitten der Ostsee Meerwasserproben genommen, die anschließend gefiltert und mit Wasserstoffperoxid aufgereinigt werden. Unter der Verwendung des Fluorochroms Nilrot werden die in den Proben enthaltenen Mikroplastikpartikel selektiv angefärbt und unter Fluoreszenzbeobachtung mittels eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Für eine vergleichende Betrachtung der Ergebnisse wurden aus der Nordsee, dem Mittelmeer und dem Schwarzen Meer ebenfalls Proben entnommen und auf die gleiche Weise analysiert.

2 Inhaltsverzeichnis

1	Projektüberblick	1
2	Inhaltsverzeichnis	1
3	Fachliche Kurzfassung	2
4	Motivation und Fragestellung	2
5	Hintergrund und theoretische Grundlagen	2
5.1	Definition Mikroplastik	2
5.2	Filtration zur Trennung von Wasser und Mikroplastik.....	2
5.3	Wasserstoffperoxid zur Probenaufbereitung.....	2
5.4	Nilrot zur Detektion	3
5.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	3
6	Vorgehensweise	3
7	Protokolle	4
7.1	Protokoll: Validierungsexperiment - Wirksamkeit von Nilrot	4
7.2	Protokoll: Validierungsexperiment - Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid	6
7.3	Protokoll: Validierungsexperiment - Saaleprobe.....	8
7.4	Protokoll: Experiment – Mikroplastik in der Ostsee	9
8	Fazit und Ausblick.....	12
9	Quellen- und Literaturverzeichnis.....	13
10	Unterstützungsleistungen	13

3 Fachliche Kurzfassung

Unsere Nachweismethode basiert auf dem selektiven Anfärben der Mikroplastikpartikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot. Um die Partikel im Anschluss detektieren zu können verwendeten wir die Fluoreszenzmikroskopie mit einer Exzitationswellenlänge von 395 nm und einem Emissionslichtfilter mit 620 nm. Um die Meerwasserproben zuvor auf das Mikroplastik zu konzentrieren, nutzten wir einen Edelstahl-Rundfilter mit einer Maschenweite von 10 µm. Für die Aufreinigung des Filterkuchens setzten wir 30%-iges Wasserstoffperoxid ein, damit das, in den Proben enthaltene, organische Material degradiert werden konnte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir in jeder unserer Meerwasserproben Mikroplastikpartikel nachweisen konnten, was für eine weite Verbreitung innerhalb der Meere spricht.

4 Motivation und Fragestellung

Eine Welt ohne Kunststoffe ist kaum vorstellbar, da sie in nahezu allen Bereichen des Lebens präsent sind – sei es als Verpackungsmaterial, Baustoff oder in Produkten wie Haushaltsgeräten und Elektronik. Kunststoffe sind längst unverzichtbar geworden. Doch trotz der zahlreichen Vorteile stellt sich die Frage nach den möglichen negativen Auswirkungen, insbesondere durch Mikroplastik. Die Bedeutung von Mikroplastik und dessen Gefahren in marinen Ökosystemen wurde bisher unterschätzt. Die Motivation hinter diesem Projekt ist es, dieses noch junge Forschungsgebiet weiter zu erkunden und die Öffentlichkeit über die Risiken von Mikroplastik zu sensibilisieren. Das Ziel unseres Projekts war es mit einfachen und uns zur Verfügung stehenden Mitteln eine Nachweismethode für Mikroplastik in Meerwasserproben zu entwickeln und diese entwickelte Methodik auf Meerwasserproben anzuwenden. Dabei wurden neun Meerwasserproben aus der Ostsee, zwei aus der Nordsee und jeweils eine aus dem Mittelmeer und dem Schwarzen Meer unter gleichen Bedingungen entnommen und beprobt.

5 Hintergrund und theoretische Grundlagen

5.1 Definition Mikroplastik

Als Mikroplastik bezeichnet man Kunststoff Partikel, „welche kleiner als 5 mm sind“ (Umweltbundesamt (BMU/ UBA) 2020). Man unterscheidet zwischen „primären Mikroplastik“, die für industrielle Zwecke genutzt werden und „sekundären Mikroplastik“, welche aus natürlicher „Degradation von Makroplastik“ (ebd.) entstehen (vgl. ebd.). Die Besonderheit hierbei liegt, dass Mikroplastik aus „synthetischen Polymerwerkstoffen [bestehen]“ (Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2024: 2) und aus denselben Gründen nicht wasserlöslich oder biologisch abbaubar sind (vgl. ebd.).

5.2 Filtration zur Trennung von Wasser und Mikroplastik

Filtration bezeichnet das Abtrennen von Feststoffen aus Flüssigkeiten durch die Nutzung von Filtern, also „poröse[n] Trennflächen, deren Poren kleiner sein müssen als die abzufiltrierenden Teilchen“ (Kruse 1988: 64).

Um die in unseren Proben enthaltenen Mikrokunststoff-Partikel zählbar zu machen, müssen diese von dem Meerwasser abgetrennt werden. Außerdem wirkt der Fluoreszenzmarker Nilrot hydrophob (vgl. Sturm et al. 2019: 12), sodass er sich nicht in wässriger Umgebung einsetzen lässt.

5.3 Wasserstoffperoxid zur Probenaufbereitung

Der Fluoreszenzmarker Nilrot kann an in den Proben enthaltenes hydrophobes organisches Material, beispielsweise an Zellbestandteile wie Fettsäuren binden (vgl. Sturm et al. 2019: 12). Um bei dem Färbeprozess falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, wird daher in der Literatur empfohlen, im

Vorhinein die „Nicht-Mikrokunststoff-Teilchen“, welche in der Probe enthalten sein können, zu entfernen oder zu zersetzen (vgl. Sturm et al. 2019: 12).

Da eine mechanische Trennung von Mikrokunststoffen von anderen festen Bestandteilen der Probe aufgrund ähnlicher Partikelgrößen und -gewichte nur unzureichend möglich ist wird verbreitet eine oxidative Behandlung der Proben angewendet, um die enthaltenen organischen Feststoffe wie Pflanzenfasern, Algen oder Mikroorganismen zu degradieren. Hierzu eignet sich beispielsweise Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (vgl. Sturm et al. 2019: 14), das als starkes Oxidationsmittel wirkt und in Gegenwart von Katalysatoren rasch zerfällt (vgl. Hofmann 1963: 81f).

5.4 Nilrot zur Detektion

„Nilrot ist ein Phenoxazin-Farbstoff“ (Sturm et al. 2019: 12). Dieser fluoresziert in hydrophoben Umgebungen stark. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde ursprünglich zum Anfärben von Zellmembranen, Fetteinlagerungen (vgl. Bayer 2022: 30f) und weiteren unpolaren Zellbestandteilen (vgl. Sturm et al. 2019: 12) verwendet. Im Unterschied zu früher wird Nilrot heutzutage auch zum Anfärben von Mikrokunststoffen verwendet (vgl. ebd.), wobei dieser „vor allem über Van-der-Waals Wechselwirkungen [...] an den Polymeroberflächen [bindet]“ (Sturm et al. 2019: 13).

Eine geeignete Farbstoffkonzentration von Nilrot zum Einfärben von Kunststoffen liegt innerhalb eines Bereiches von 1 und $1000 \frac{\mu g}{ml}$ (vgl. Maes et al. 2017: 2). Eine ebenso ermittelte Inkubationszeit liegt zwischen fünf Minuten und 66 Stunden, wobei Einwirkungszeiten bis 30 bzw. 60 Minuten zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität führten, welche aber anschließend nicht weiter anstieg, sondern stagnierte. Die meisten Studien wählten eine Inkubation mit $10 \frac{\mu g}{ml}$ Nilrot für 30 Minuten zur Färbung von Mikrokunststoffen (vgl. ebd.).

5.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, Moleküle selektiv zum Erleuchten zu bringen, die als bunte Lichtpunkte vor einem meist schwarzen Hintergrund gut erkennbar sind (vgl. Schmitz; Desel 2018: 83).

Ein fluoreszierendes Molekül wird durch Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung angeregt. Dabei absorbiert das Molekül Photonen der energiereichen kurzwelligigen Strahlung. Dies wird als Exzitation bezeichnet. Durch das Photon werden die Elektronen angeregt und in einen „höheren energiereichen kurzlebigen Zustand überführt“ (ebd.), was auch als Quantensprung bezeichnet wird. Je doch sind die Elektronen gemäß den Grundsätzen der Thermodynamik bestrebt, einen möglichst energiearmen Zustand anzunehmen, wodurch sie nach 10^{-12} bis 10^{-9} Sekunden ihre zuvor aufgenommene Energie als sichtbares Licht wieder abgeben (Emission) und auf ihren Grundzustand zurückkehren. Dabei ist die emittierte Strahlung langwelliger und damit auch energieärmer als die vorher absorbierte Strahlung, denn im angeregten Zustand findet ein Energieverlust in Form von Schwingungsenergie und thermischer Energie statt (vgl. ebd.).

6 Vorgehensweise

Für die Entwicklung unseres Versuchsprotokolls begannen wir mit einer umfassenden Literaturrecherche (u.a. Bayer, Sturm et al. und Maes et al.), um darauf basierend erste Ansätze zu entwickeln, die wir im weiteren Schritt zu einem Versuchsdesign zusammengeführt haben. Um sicher gehen zu können, dass das von uns entwickelte Versuchsdesign anwendbar ist, führten wir ein Gespräch mit den DoktorandInnen Kristina Enders und Robin Lenz vom Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden, die auch zum Thema Mikroplastik forschen. Hier erhielten wir wichtige Erkenntnisse und die benötigten Materialien (Edelstahlfilter, Referenzmikroplastikpartikel) für unser Experiment. Im Anschluss daran begannen wir mit unseren ausführlichen Validierungsexperimenten, die alle jeweils in der Forscherwerkstatt von uns durchgeführt wurden. Das erste Validierungsexperiment bezog sich auf die Wirksamkeit

von Nilrot beim Einfärben von Mikroplastikpartikeln, wofür jeweils 10 bis 15 Referenzmikroplastikpartikel fünf gängiger Kunststoffarten auf einer Petrischale abgezählt, mit einer Nilrot in Aceton-Lösung versetzt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurden. Anschließend folgte das zweite Validierungsexperiment zur Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid nach einem Einwirkungszeitraum von 20-24 Stunden. Hierzu wurden drei Proben vorbereitet, die in 4 ml Reinstwasser gelöst waren. Die erste Probe enthielt 10 Moosblättchen und kein Mikroplastik, die zweite enthielt 10 Moosblättchen und 20 Referenzmikroplastikpartikel und die dritte Probe enthielt keine Moosblättchen und 20 Referenzmikroplastikpartikel. Diese drei Proben wurden gefiltert, mit Wasserstoffperoxid versetzt und erneut gefiltert. Im weiteren Validierungsschritt wurde sie mit Nilrot beträufelt und unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Allerdings konnten zunächst keine Mikroplastikpartikel wiedergefunden werden. Erst in einem Wiederholungsexperiment mit einem leicht abgewandelten Filterschritt wurden die enthaltenen Mikroplastikpartikel dagegen fast vollständig wieder aufgefunden. Mit der nun erworbenen Sicherheit unseres Versuchsdesigns probierten wir uns im dritten Validierungsexperiment an unserer ersten Wasserprobe, die für den Anfang eine Saaleprobe darstellte, in der wir jeweils zehn Referenzmikroplastikpartikeln an Polypropylen (PP), Polystyrol (PS) und Polycaprolactam (PA6) hinzugaben. Diese Probe wurde anschließend gefiltert, mit Wasserstoffperoxid aufgereinigt, mit Nilrot versetzt und unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Mit unserem validierten Versuchsdesign fingen wir schließlich mit der Erprobung unserer insgesamt zwölf Meerwasserprobe an. Unter der Verwendung des Fluorochroms Nilrot wurden die in den Proben enthaltenen Mikroplastikpartikel selektiv angefärbt und unter Fluoreszenzbeobachtung mittels eines Fluoreszenzmikroskops schließlich ausgewertet.

7 Protokolle

7.1 Protokoll: Validierungsexperiment - Wirksamkeit von Nilrot

Einleitung:

In diesem Validierungsversuch sollte die Methode zur Detektion von Mikroplastik mit Hilfe des Phenoxazin-Farbstoffs „Nilrot“ getestet werden, um darauf basierend unsere Detektion von Mikroplastik in Meerwasserproben auszulegen.

In der aktuellen Literatur wird die Möglichkeit eines Einsatzes von Nilrot auf theoretischer Basis diskutiert und daran gearbeitet, Methoden zu entwickeln, mit Hilfe von Nilrot schneller große Mengen an Proben zu verarbeiten. Derzeit wird verbreitet noch auf die Massenspektrometrie als etablierter Goldstandard zur Quantifizierung von Mikroplastik zurückgegriffen. Die Nilrot-Methode kommt noch selten zur Proben-Auswertung zum Einsatz.

Nilrot bindet vornehmlich über Van-der-Waals-Wechselwirkungen an unpolare Stoffe, wodurch Mikroplastik selektiv angefärbt werden können (vgl. Sturm et al. 2019: 13).

Das Ziel dieses Experiments sollte sein, die Fähigkeit von Nilrot zur Anfärbung verschiedener Mikroplastik-Referenzproben zu validieren. Der Nachweis der Färbung sollte visuell geprüft werden.

Material und Methoden:

Voraussetzung für eine erfolgreiche Validierung ist ein Probenansatz, der eine vorbestimmte Anzahl von Mikroplastik-Partikeln enthält. Dazu wurden Partikel der folgenden fünf gängigen Kunststoffarten als Referenzproben verwendet: Polycaprolactam (PA6), Polystyrol (PS), Polypropylen (PP), Polyethylen (PE) und Polyethylenterephthalat (PET). Die Größe der Partikel betrug bei PA6 und PP mehr als 71 µm, im Fall von PET mehr als 50 µm und bei PS beziehungsweise PE 100 bis 200 µm. Also eine Größenordnung, die auch unter realistischen Umständen erwartet werden kann. Von den Kunststoffarten PA6, PS, PP, PE und PET wurden jeweils zehn bis 15 Partikel, mit Hilfe einer feinen Pinzette und einer Nadel, unter einem Stereo-Mikroskop in eine Glas-Petrischale abgezählt, mit 0,5 ml 10 µg/ml

Nilrot Aceton-Lösung beträufelt und anschließend mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Daraufhin wurden die Proben unter einem Stereomikroskop mit Fluoreszenzmodul mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von ≈ 395 nm bestrahlt und anschließend mit Hilfe eines orangefarbenen Lichtfilters (≈ 620 nm) die fluoreszierenden Mikrokunststoffpartikel ausgezählt (vgl. Tabelle 1). Stereomikroskope unterscheiden sich geringfügig von den gängigen Durchlicht-Mikroskopen, denn sie haben sowohl die Lichtquelle als auch die Linse oberhalb des Objektisches. Sie ähneln daher einer klassischen Lupe und ermöglichen die Beobachtung dreidimensionaler Objekte, besitzen jedoch eine technisch bedingte begrenzte Vergrößerungsfähigkeit. Parallel zu den Referenzproben wurde eine Negativprobe gemacht, die genauso wie die anderen Proben behandelt wurde. Vor dem Experiment wurden alle benutzten Geräte und Materialien mit Hilfe von Ethanol gereinigt.

Ergebnisse:

Fast alle Mikrokunststoffpartikel konnten fluoreszenzmarkiert wieder aufgefunden werden (siehe Tabelle 1). Dabei wurde eine unterschiedlich starke Fluoreszenz bei den einzelnen Kunststofftypen festgestellt. So fluoreszierte Polystyrol (PS) am stärksten, während Polyethylen (PE) am schwächsten fluoreszierte. In der Negativ-Probe wurden keine Kunststoffpartikel nachgewiesen, jedoch fanden sich in den Probenansätzen „Polystyrol (PS)“ und „Polyethylen (PE)“ jeweils zwei Kunststoffpartikel mehr als zuvor dazu gegeben wurde.

Tabelle 1 Ergebnisse zur Quantifizierung von verschiedenen Mikrokunststoffe mit Hilfe von Nilrot

Kunststoffart	PA6	PS	PP	PE	PET	Negativ-Probe
Anzahl hinzugegebener Mikrokunststoffpartikel	10	15	15	12	10	--
Anzahl wiedergefundener Mikrokunststoffpartikel	10	17	14	14	10	--
Relative Einschätzung des emittierten Lichts von Nilrot als Schulnote	gut	sehr gut	ausreichend	befriedigend	gut	--

Diskussion:

Nilrot ist eine effektive Möglichkeit, um Mikrokunststoffe, speziell die in diesem Experiment beprobten Kunststoffe, zu markieren. Dies wird aus dem Wiederfinden nahezu aller zuvor hinzugegebener Partikel geschlossen (siehe Tabelle 1). Die schlechte Fluoreszenz der Mikrokunststoffe PP und PE ist zwar im direkten Vergleich zu Kunststoffarten wie PS aufgefallen, jedoch stellt dies kein Hindernis dar, um PP

und PE in Meerwasserproben detektieren zu können, da trotzdem eine klare Unterscheidung zu der Umgebung möglich war. Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass Nilrot als Feststoff nicht fluoresziert. Dies ermöglicht einen längeren Einwirkzeitraum, bei dem auch gelöstes Nilrot auskristallisieren kann, ohne dass die Nilrot-Kristalle fluoreszieren und damit das Ergebnis verfälschen könnten. Bemerkenswert ist, dass bei zwei der sechs Proben mehr Partikel leuchteten als eigentlich abgezählt wurden. Diese Kontamination der Proben geschah höchst wahrscheinlich aus der Raumluft heraus, während diese exponiert waren. Vermutlich handelt es sich um in der Raumluft enthaltene Mikrokunststoffpartikel und -fasern. Da Nilrot jedoch ebenfalls auch organisches Zellgewebe färbt, könnte es sich unter Umständen auch um Hautschuppen oder ähnliches Material handeln. Folglich ist es wichtig, bei zukünftigen Experimenten und Messungen noch stärker auf einen Kontaminationsschutz der Proben zu achten. Dazu zählt ein gut belüfteter Raum, weitestgehender Verzicht auf kunststoffhaltige Laborgeräte und -materialien, kunststofffreie Kleidung, das Tragen von Handschuhen, das Abtöten von organischem Material, durch Einsatz von Wasserstoffperoxid und die zwingende Notwendigkeit einer Negativ-Probe.

7.2 Protokoll: Validierungsexperiment - Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid

Einleitung:

In diesem weiteren Versuch soll die Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid nach einem Einwirkzeitraum von 20 bis 24 Stunden überprüft werden, um darauf basierend unsere Detektion von Mikrokunststoffen in Meerwasserproben auszulegen.

Das Ziel dieses Experiments soll sein, herauszufinden ob das Wasserstoffperoxid nach 20-24 Stunden effektiv alle biogenen Materialien oxidiert, sodass diese nicht falsch-positive Ergebnisse liefern.

Material und Methoden:

Vor dem Experiment wurden alle benutzten Geräte und Materialien mit Hilfe von Ethanol gereinigt. Um die Gefahr von Kontaminationen zu minimieren, wurde eine möglichst staubarme Umgebung hergestellt. Hierzu wurde die Werkbank zunächst feucht abgewischt. Außerdem wurde auf plastikfreie Laborgeräte geachtet, und darauf, dass alle Beteiligten möglichst kunststofffreie Kleidung, mit einem Baumwollanteil von mindestens 80 %, trugen und zudem ein Laborkittel aus 100 % Baumwolle.

Es wurden drei Vergleichsproben aus Referenzmikrokunststoffpartikeln und Moosblättern in einer Glas-Petrischale hergestellt, wie in Tabelle 2 auf der folgenden Seite zu sehen. Diese Proben wurden dann unter der Nutzung einer Filteranlage, bestehend aus einem Erlenmeyerkolben, einer keramischen Filternutsche (\varnothing : 47 mm) und einem Edelstahlfilter (\varnothing : 47 mm) mit einer Maschenweite von 10 μ m gefiltert. Der Edelstahlfilter mit dem Filterkuchen wurde anschließend vorsichtig in eine Glas-Petrischale überführt. Jede dieser drei Proben wurde anschließend mit 20 ml Wasserstoffperoxid, aus einer Glaspipette, beträufelt, sodass der gesamte Filterkuchen mit Wasserstoffperoxid überdeckt war. Die Petrischale wurde abgedeckt und es wurde eine Einwirkzeit von 20 bis 24 Stunden eingehalten. Im Anschluss wurden die Proben erneut gefiltert und mit 5 ml 10 μ g/ml Nilrot in Aceton-Lösung, ebenfalls aus einer Glaspipette, beträufelt und eine Einwirkzeit von 30 Minuten eingehalten. Daraufhin wurden alle drei Proben unter einem Stereomikroskop mit Fluoreszenzmodul mit UV-Licht (395 nm) bestrahlt und mittels eines orangefarbenen Lichtfilters beobachtet. Die fluoreszierenden Mikrokunststoffpartikel wurden ausgezählt und die Wirkung des Wasserstoffperoxids auf die Bindungsfähigkeit der Moosblätter an Nilrot wurde unter Fluoreszenzbeobachtung und zusätzlich im Hellfeld untersucht. Das Experiment wurde mit einer leichten Anpassung wiederholt. In dem Wiederholungsexperiment wurde der Filterschritt unter aktiver Absaugung der Luft unter dem Filter mittels Vakuumpumpe durchgeführt und ansonsten exakt gleiche Bedingungen eingehalten.

Ergebnis:

Nach Zugabe des Wasserstoffperoxids wurde in den Probenbehältern eine geringe Schaumbildung festgestellt. Ebenso hatten die Moosblättchen ihre grüne Farbe verloren und wirkten gräulich. Beim Auswerten der Proben, nach dem Einsatz von Nilrot, konnten erstaunlicherweise keine Mikrokunststoffpartikel wiedergefunden werden. Ebenso ging bei der Filtration die Mehrzahl der Moosblättchen verloren. Bei den auf dem Filter verbliebenen Moosblättern wurde unter Fluoreszenzbeobachtung keine Fluoreszenz beobachtet. Im Hellfeld dagegen wurde an einzelnen Blättchen ein schwaches unspezifisches Farbsignal im lilafarbenen Lichtbereich festgestellt. Im Wiederholungsexperiment verblieben sowohl die in der Probe enthaltenen Kunststoff-Partikel als auch die Moosblättchen nach dem Filterschritt fast vollständig auf dem Filter.

Tabelle 2: Hergestellte Proben zur Validierung des Einsatzes von H₂O₂

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Kunststoffzugabe	--	10 Partikel PS 10 Partikel PP	10 Partikel PS 10 Partikel PP
Zugabe von organischem Material	10 Moosblätter der Art	10 Moosblätter der Art	--
Wasserzugabe	4ml destilliertes Wasser	4ml destilliertes Wasser	4ml destilliertes Wasser

Diskussion:

Die Schaumbildung nach dem Ende des Einwirkzeitraums von 20 bis 24 Stunden ist sehr wahrscheinlich auf den Zerfall von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff zurückzuführen: ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$).

Der Schaum wird höchstwahrscheinlich von dem molekularen Sauerstoff, der bei dem Zerfall entstanden ist, hervorgerufen.

Die Entfärbung der Moosblätter ist die Folge der sehr starken oxidativen Wirkung von Wasserstoffperoxid.

Der Filterschritt führte zu einem großen Verlust an Moosblättchen, wodurch es nahe liegt, dass bei diesem Schritt auch die Mikrokunststoffpartikel verloren gingen. Die wahrscheinliche Ursache war, dass der Edelstahlfilter nur lückenhaft mit der Filternutsche abschloss. Eine Lösung dieses Problems ist der Anschluss einer Vakuumpumpe, die einen Unterdruck erzeugt, der den Filter an die Filternutsche anzieht und die Proben nicht mehr am Filter vorbeifließen können. In einer Wiederholung des Experiments mit aktiver Absaugung mittels Vakuumpumpe und ansonsten unter exakt gleichen Bedingungen wurden fast alle in den Referenzproben befindlichen Kunststoff-Partikel nach dem Filtrationsschritt auf dem Filter wieder aufgefunden. Dieses Ergebnis stärkt unsere These, dass die fehlenden Partikel während des Filterns verloren gegangen sein müssen.

Die kaum vernehmbare lilafarbene Färbung einzelner Moosblätter unterschied sich deutlich von dem orangefarbenen Fluoreszenz-Signal der Mikrokunststoffpartikel. Die Färbung der Moosblättchen konnte nur beobachtet werden, wenn kein Emissionsfilter vor dem Okular angeschlossen war, sodass es nahe liegt, dass diese Wellenlänge des Lichtes herausgefiltert wurde und somit nicht störend für unsere Mikrokunststoff-Detektionsmethode ist.

7.3 Protokoll: Validierungsexperiment - Saaleprobe

Einleitung:

In diesem Validierungsexperiment sollte eine künstliche Probe ausgewertet werden, die möglichst realistisch unsere Meerwasserproben simulierte.

Für dieses Experiment wurde der Saale eine Wasserprobe entnommen, die etwa die gleiche Dichte an Schwebepartikeln besaß wie die vorher bereits entnommenen Salzwasserproben.

Ziel dieses Experiments ist die Validierung des aus den vorherigen experimentellen Erfahrungen abgeleiteten Versuchsprotokolls. Die wichtigste Zielgröße für uns war hierbei eine möglichst hohe Wiederfindungsrate der in die Probe gegebenen Referenzmikrokunststoffpartikel.

Material und Methoden:

Eine 0,75 Liter große Probe wurde der Saale in Ufernähe entnommen. Dabei wurde beachtet, dass sich Schwebepartikel in der Probe befinden. Der Probe wurde anschließend mit jeweils 10 Referenzmikroplastikpartikeln Polypropylen (PP), Polystyrol (PS) und Polycaprolactam (PA6) versetzt. Danach wurde sie mit Hilfe einer Filteranlage bestehend aus einem Edelstahlfilter (Ø: 47 mm) mit einer Maschenweite von 10 µm, einem Keramikfilterträger, einem Erlenmeyerkolben mit seitlichem Ansatz und einer Vakuumpumpe gefiltert. Der Filter wurde vorsichtig in eine Petrischale transferiert. Auf den Filterkuchen wurde 20 ml Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gegeben, sodass dieser komplett bedeckt war und eine Einwirkungszeit von 20 bis 24 Stunden beachtet. Die Probe wurde unter Verwendung eines zweiten gleichen Filtersiebs erneut gefiltert. Die Petrischale und der erste Filter wurden mit destilliertem Wasser gespült, das anschließend ebenfalls filtriert wurde. Danach wurde die Probe für 30 Minuten mit 5 ml 10 µg/ml Nilrot in Aceton-Lösung aus einer Glaspipette versetzt. Daraufhin wurde die Probe auf dem neuen Filter unter Fluoreszenzbeobachtung auf Mikrokunststoffe untersucht. Ebenso wurde der alte Filter untersucht. Vor dem Experiment wurden alle benutzten Geräte und Materialien mit Hilfe von Ethanol gereinigt. Es wurde darauf geachtet, dass alle beteiligten möglichst kunststofffreie Kleidung, mit einem Baumwollanteil von mindestens 80 %, trugen und zudem ein Laborkittel aus 100 % Baumwolle.

Ergebnisse:

In der Probe konnten von den insgesamt 30 hinzugegeben Mikrokunststoffen 28 wiedergefunden werden. Auf dem alten Filter konnten nach den durchgeführten Untersuchungen keine Mikrokunststoffe identifiziert werden.

Diskussion:

Die in diesem Experiment wiedergefundenen 28 Mikrokunststoffpartikel entsprechen einer Wiederfindungsrate von 93,3 %. Dadurch kann die Methode des selektiven Anfärbens der Mikrokunststoffe mit Hilfe von Nilrot als ein effektiver Weg angesehen werden, um Mikrokunststoffe in Wasserproben mit einfachen Mitteln zu detektieren.

Es besteht die Möglichkeit, dass das Saalewasser bereits Mikrokunststoffpartikel besaß und deshalb das Ergebnis verfälscht. Die Entscheidung, zusätzliche Referenzmikrokunststoff-Partikel hinzuzugeben, wurde getroffen, um im Falle, dass keine Mikrokunststoffpartikel in der Probe enthalten sind, trotzdem positiv Ergebnisse zu erhalten, damit dies zur Validierung der Methode beitragen kann.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist, dass auf dem ersten Filter, der zum Trennen von Saalewasser und Schwebepartikeln genutzt wurde, keine Mikrokunststoffe gefunden wurden. Somit ist auch hier das Ausspülen mit Wasser eine gute Möglichkeit, um Rückstände zu verhindern.

7.4 Protokoll: Experiment – Mikroplastik in der Ostsee

Einleitung:

Ziel dieses Experiments war es, die These, dass die Ostsee eine hohe Konzentration an Mikroplastikstoffen aufweist, zu überprüfen. Dies geschah anhand von neun Meerwasserproben, die jeweils an verschiedenen Küstenabschnitten der Ostsee entnommen wurden. Dabei sollte, wie bei den zuvor durchgeführten Validierungsexperimenten auch, die Methodik der Fluoreszenzmarkierung der Partikel mit Nilrot angewendet werden. Anhand von jeweils einer Meerwasserprobe aus der Nordsee, aus dem Mittelmeer und aus dem Schwarzen Meer, die unter den gleichen Bedingungen entnommen, gelagert und probiert wurden, sollen die Ergebnisse des Experiments vergleichend eingeordnet werden

Material und Methode:

Probennahme:

An den Messpunkten (siehe Tabelle 4) wurde jeweils eine 0,5 Liter große Wasserprobe entnommen. Die Entnahme erfolgte durch Abfüllen in 0,5 l fassende Einweg-Plastikflaschen. Dabei wurde beachtet, dass der Probepunkt ufer- und oberflächennah ist, um vergleichbare Proben zu erhalten. Die Probennummer sowie die Geodaten der Entnahmestelle wurden notiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung abgedunkelt und bei Raumtemperatur gelagert.

Aufreinigung der Proben:

Vor dem Experiment wurden alle benutzten Geräte und Materialien mit Hilfe von Ethanol gereinigt. Es wurde darauf geachtet, dass alle Beteiligten möglichst kunststofffreie Kleidung mit einem Baumwollanteil von mindestens 80 %, trugen und zudem einen Laborkittel aus 100 % Baumwolle. Ebenso wurden bis auf Schutzhandschuhe und Schutzbrille auf kunststoffhaltige Laborgeräte und Materialien verzichtet.

Zunächst wurden die Meerwasserproben mit Hilfe einer Filtervorrichtung gefiltert. Dazu wurde ein Edelstahl-Filter Sieb mit einem Durchmesser von 47 mm und einer Maschenweite von 10 µm verwendet, um die in der Probe enthaltenen Feststoffe mit einer Partikelgröße $\geq 10 \mu\text{m}$ abzuscheiden. Das Filtersieb wurde zunächst durch Abspülen mit destilliertem Wasser gereinigt und anschließend in einen Keramik-Filterträger passenden Innendurchmessers eingelegt. Die Einwegflasche wurde vorsichtig aufgeschraubt und der Flaschendeckel beiseitegelegt, um möglichst keinen Kunststoff-Abrieb zu erzeugen. Die Wasserprobe wurde vorsichtig geschwenkt, um eventuell in der Wasserprobe enthaltene Sedimente vom Flaschenboden zu lösen und anschließend langsam auf den Filter gegossen. An den Keramikträger war eine Vakuumpumpe angeschlossen, die einen einstellbaren Unterdruck erzeugte. Die Saugkraft der Pumpe wurde so eingestellt, dass das Filtersieb eng mit dem Keramik-Filterträger abschloss und die Wasserprobe den Filter zügig passierte und möglichst nicht in Kontakt mit der Innenwandung des Filterträgers kam, um ein Anhaften von in der Probe enthaltener Feststoffe an der Wandung des Filterträgers zu vermeiden. Nachdem die gesamte Probe gefiltert war, wurde der Edelstahlfilter samt Filterkuchen vorsichtig mit einer Pinzette entnommen und auf eine vorbereitete Petrischale transferiert. In der Petrischale wurde der Filterkuchen anschließend mit 20 ml 30 %-iger Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Lösung beträufelt, sodass er komplett bedeckt war. Danach wurde ein Einwirkzeitraum von 20 bis 24 Stunden eingehalten. Während dieser Zeitspanne wurde die Petrischale komplett abgedeckt, um eine Kontamination zu vermeiden. Das Filtrat wurde im Abfluss entsorgt. Nach dem Einwirkzeitraum wurde unter Verwendung eines zweiten identischen Edelstahlfilters das Wasserstoffperoxid abgeschieden, zudem wurden über der Filteranlage die Petrischale und der erste Filter mit destilliertem Wasser mehrfach gründlich ausgespült, um Rückstände zu verhindern.

Analyse der Proben mittels Fluoreszenz-Mikroskopie:

Der neue Filterkuchen wurde erneut vorsichtig in eine Petrischale transferiert und dort für 30 min mit 0,5 ml 10 µg/ml Nilrot in Aceton-Lösung versetzt. Im Anschluss wurde die Probe unter einem Stereomikroskop mit einer UV-Lichtquelle mit einer Wellenlänge von ≈ 395 nm und einem orangefarbenen Lichtfilter (620 nm) untersucht. Die orangefarben fluoreszierenden Kunststoffpartikel wurden ausgezählt, wobei die fluoreszierenden Partikel von jeweils zwei Personen optisch geprüft und nur die sicher als Kunststoffpartikel identifizierbaren Partikel (typisch scharfkantige Erscheinung) gezählt wurden.

Ergebnisse:

In allen Proben konnten Mikroplastikpartikel durch das Anfärben mit Nilrot nachgewiesen werden, wie in Tabelle 5 zu sehen ist.

Tabelle 5: Ergebnisse des Experiments

Name (Ort)	Anzahl Mikroplastikpartikel pro 0,5 Liter	Datum des Experiments
M1 (Lignano Sabbiadoro, IT)	10	22. August 2024
N1 (Schillig, DE)	2	23. Mai 2024
O1 (Warnemünde, DE)	6	30. Mai 2024
O2 (Kopenhagen, DK)	3	30. Mai 2024
N2 (Fiskebäckskil, SE)	18	06. Juni 2024
O3 (Trelleborg, SE)	9	06. Juni 2024
O4 (Ahrenshoop, DE)	23	06. Juni 2024
O5 (Zingst, DE)	1	19. Juni 20224
O6 (Rewal, PL)	10	19. Juni 20224
O7 (Wismar, DE)	8	19. Juni 20224
O8 (Kühlungsborn, DE)	5	22. August 2024
S1 (Batumi, Georgien)	6	22. August 2024

Tabelle 4: Informationen zur Meerwasserprobenaufnahme

Name	Meer	Ort, Land	Koordinaten (nach GoogleMaps-Standard)	Himmels- ausrichtung	Beschreibung des Aufnahmegebiets
M1	Mittelmeer (Adria)	Lignano Sabbiadoro, Italien	45°41'46.8"N 13°09'12.0"E	süd-östlich	Stark frequentierter Badestrand aus Sand mit direktem Zugang zum Badeort
N1	Nordsee	Schillig, Deutschland	53°42'04.6"N 8°01'52.2"E	nördlich	Frequentierter Badestrand aus Sand mit direktem Zugang zum Badeort
N2	Nordsee	Fiskebäckskil, Schweden	58°14'28.3"N 11°27'38.0"E	westlich	Hafengebiet des Ortes
O1	Ostsee	Warnemünde, Deutschland	54°10'39.0"N 12°5'34.0"E	nördlich	Kaimauer des Hafens
O2	Ostsee	Kopenhagen, Dänemark	55°41'34.7"N 12°35'57.7"E	östlich	Uferpromenade in Höhe der Bronzefigur der Meerjungfrau
O3	Ostsee	Trelleborg, Schweden	55°22'27.1"N 13°07'07.9"E	südlich	Uferanlage in Hafennähe
O4	Ostsee	Ahrenshoop, Deutschland	54°24'39.0"N 12°27'29.6"E	westlich	Naturbelassener Badestrand aus Sand
O5	Ostsee	Zingst, Deutschland	54°26'30.4"N 12°40'53.6"E	nördlich	Stark frequentierter Badestrand aus Sand mit direktem Zugang zum Badeort
O6	Ostsee	Rewal, Polen	54°05'19.5"N 15°02'02.8"E	nord-westlich	Frequentierter Badestrand aus Sand
O7	Ostsee	Wismar, Deutschland	53°53'58.2"N 11°27'25.8"E	nördlich	Kaimauer des Hafens
O8	Ostsee	Kühlungsborn, Deutschland	54°09'13.0"N 11°43'50.1"E	nördlich	Frequentierter Badestrand aus Sand mit direktem Zugang zum Badeort
S1	Schwarzes Meer	Batumi, Georgien	41°39'27.8"N 41°38'22.4"E	westlich	Stadtstrand aus grobem Kies

Diskussion:

Mit einem berechneten Durchschnittsgehalt von 8,125 Mikrokunststoffpartikeln pro 0,5 Liter in den Proben aus der Ostsee, lässt sich sagen, dass die Ostsee verglichen zum Schwarzen Meer (sechs Mikrokunststoffpartikel pro 0,5 l) einen erhöhten Gehalt an Mikrokunststoffen enthält. Jedoch konnten in der Probe aus dem Mittelmeer mit zehn Mikrokunststoffpartikel pro 0,5 l und in der Nordsee mit durchschnittlich zehn Mikrokunststoffpartikel pro 0,5 l ein ähnlich hoher Wert festgestellt werden, wodurch sich unsere zu Beginn des Experiments gestellte These, dass die Ostsee einen vergleichsweise hohen Mikrokunststoffgehalt besitzt, nur teilweise bestätigt. Natürlich ist die nur stichprobenartige Beprobung der Nordsee, des Mittelmeeres und des Schwarzen Meeres zu gering, um einen gesicherten Vergleich der Meere untereinander durchzuführen. Trotzdem ermöglicht es erste Annahmen, die in weiteren Untersuchungen noch bestätigt werden müssen.

Aufgrund von Transport und Lagerung der Meerwasserproben in Kunststoffbehältern könnte es zu einer Kontamination während dieser Zeit gekommen sein. Diese Möglichkeit wird von uns jedoch als gering eingeschätzt, da alle Behälter vor der Nutzung gründlich ausgespült wurden und ein Zerfall der Kunststoffe in diesem Zeitraum ohne äußere Einwirkung unwahrscheinlich ist. Während des Experiments kommt es zwingendermaßen dazu, dass die Proben der Raumluft exponiert sind und an dieser Stelle eine Kontaminierung stattfinden kann. Dies wurde versucht zu verhindern, indem vor dem Experiment alle benutzten Geräte und Materialien mit Hilfe von Ethanol gereinigt wurden, alle Beteiligten kunststofffreie Kleidung mit einem Baumwollanteil von mindestens 80% und einen Laborkittel aus 100% Baumwolle trugen. Zudem wurde während dem Experimentieren darauf geachtet, dass möglichst keine Geräte aus Kunststoffen genutzt wurden und eine konstante Belüftung des Raumes stattfand. Aufgrund der Nutzung eines Edelstahlfilters mit einer Maschenweite von 10 μm konnten nur Mikrokunststoffpartikel herausgefiltert und nachgewiesen werden, die größer als 10 μm waren. Deshalb wird angenommen, dass eine wesentlich höhere Dunkelziffer an Mikrokunststoffpartikeln insgesamt in den Proben vorhanden war.

Leider konnten wir die detektierten Mikrokunststoffpartikel nicht durch eine alternative Nachweismethode, wie beispielsweise FT-IR- oder Ramanspektroskopie, verifizieren. Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass einzelne unter den detektierten Partikeln auch von anderer Zusammensetzung als Mikroplastik waren. Jedoch wurden alle detektierten Partikel durch mindestens zwei Personen sowohl im Hellfeld als auch unter Fluoreszenzbeobachtung auf die typischen Merkmale von Mikrokunststoffen, wie zum Beispiel die typischen kantigen Umrisse, scharfe Kanten und „passende“ Emissionsfarbe der Fluoreszenz geprüft.

8 Fazit und Ausblick

Für unser Projekt und Experiment lässt sich festhalten, dass die von uns ausgewählte Methode, des selektiven Färbens des Mikroplastiks mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Nilrot sich bewährt hat. In drei verschiedenen Validierungsexperimenten testeten wir die Nachweissicherheit dieser Methodik und im dritten Validierungsexperimente konnten wir sogar eine Wiederfindungsrate der zuvor hinzugegeben Referenzmikroplastikpartikel von 93,3 % erreichen. In unserem Experiment konnten wir ein Mikroplastik-Durchschnittsgehalt von 16,25 Mikroplastikpartikel pro Liter Meerwasser in der Ostsee feststellen. Damit konnten wir unsere These, dass die Ostsee einen hohen Mikroplastikgehalt besitzt, bestätigen. Jedoch ist wichtig hinzuzufügen, dass dieser Wert im Vergleich zu den weiteren beprobten Meeren nicht heraussticht, denn die Nordsee und das Mittelmeer besitzen einen Mikroplastik-Durchschnittsgehalt von 20 Mikroplastikpartikel pro Liter Meerwasser. Im Gegensatz dazu jedoch konnten im Schwarzen Meer nur 12 Mikroplastikpartikel pro Liter Meerwasser nachgewiesen werden. Wichtig zu erwähnen ist zudem, dass es bei der ausgewählten Methode zu Fehlern, durch Kontamination der Proben während der Lagerung oder dem Experimentieren kommen konnte. Zusätzlich konnte nicht durch eine weitere Detektionsmethode, die von uns gefundenen Mikroplastikpartikel, bestätigt werden, dass bei den gezählten Mikroplastikpartikeln nicht auch andere Stoffe angefärbt und mit vermerkt wurden. Des Weiteren konnten nur Mikroplastikpartikel mit einem Durchmesser von $\geq 10 \mu\text{m}$ detektiert werden, da die Maschenweite des verwendeten Edelstahlfilters 10 μm entsprach.

9 Quellen- und Literaturverzeichnis

- Bayer, Marc (2022): Suche nach gefärbten Spuren der Plastik-Ära - Wie Forscher Kunststoffe in Umweltproben sichtbar machen wollen. GIT-Labor-Fachzeitschrift, (10/2022), S. 30–32. Online unter: https://analyticalscience.wiley.com/doi/10.1002/was.000600417/full/blaetterkatalog_git1022.pdf, [Zugriff: 09.01.2025].
- Bundesinstitut für Risikobewertung [BfR] (Hsg.) (2024): Mikroplastik: Fakten, Forschung und offene Fragen. Was ist Mikroplastik?, <https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/mikroplastik-fakten-forschung-und-offene-fragen.pdf>, [Zugriff: 13.01.2025].
- Hofmann, Karl A. (1963): Anorganische Chemie. 17., völlig neubearbeitete und erweiterte Auflage. Braunschweig: Friedr. Vieweg & Sohn.
- Kruse, Harald (1988): Laborfibel: Hinweise u. Anleitungen für d. Anfänger im chem. Laboratorium. Weinheim: VCH.
- Maes, Thomas; Jessop, Rebecca; Wellner, Nikolaus; Haupt, Karsten und Mayes, Andrew G. (2017): A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. Scientific Reports 7, 44501. Online unter: <https://doi.org/10.1038/srep44501>. [Zugriff: 09.01.2025].
- Sturm, Michael Toni; Kluczka, Sven; Wilde, Axel; Schuhen, Katrin (2019): Detektion von Mikroplastik im (Ab-) Wasser Die Suche nach dem Heiligen Gral, https://www.wohnmedizin.eu/files/detektion_von_mikroplastik_im_ab-wasser_-_die_suche_nach_dem_heiligen_gral.pdf, [Zugriff: 09.01.2025]
- Schmitz, Sabine und Desel, Christine (2018): Der Experimentator Zellbiologie. 1. Auflage. Berlin: Springer Spektrum.
- Umweltbundesamt [BMU/ UBA] (Hsg.) (2020): Was ist Mikroplastik?, <https://www.umweltbundesamt.de/service/uba-fragen/was-ist-mikroplastik>, [Zugriff: 13.01.2025].

10 Unterstützungsleistungen

Angabe von Unterstützungsleistungen

Kristina Enders und Robin Lenz, DoktorandInnen, Leibniz-Institut für Polymerforschung e.V., Dresden, haben uns bei der Durchführung unseres Projekts unterstützt. Sie haben uns bei einem persönlichen Gespräch mit unserem Versuchsdesign geholfen und uns sowohl Edelstahlfilter als auch Referenzmikroplastikpartikel zur Verfügung gestellt.

Dr. Christina Walther, Projektleitung, Schülerforschungszentrum, Jena, hat uns bei der Durchführung unseres Projekts unterstützt. Sie hat uns die Forscherwerkstatt für unsere Vorhaben zur Verfügung gestellt und alle essenziellen Materialien und Chemikalien zur weiteren Durchführung unserer Experimente arrangiert.

Sigrun Wald, Lehrerin für Chemie und Biologie, Kaleidoskop Schule, Jena, hat uns bei der Durchführung unseres Projekts unterstützt. Sie hat uns den Kontakt zu Frau Walther ermöglicht und bei der Ausarbeitung des vorläufigen Versuchsdesigns geholfen.

Arbeitsgruppe Chemiedidaktik, Jena, hat uns bei der Durchführung unseres Projekts unterstützt. Sie haben uns einer ihrer Saugflaschen für die Durchführung unserer Experimente zur Verfügung gestellt.