

# Micro-CT als innovatieve visualisatietechniek van microplastics in mariene organismen

Van Echelpoel Wout

Laboratorium voor Milieutoxicologie, Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent  
E-mail: [wout.vanechelpoel@gmail.com](mailto:wout.vanechelpoel@gmail.com)

De globale plasticproductie is de afgelopen decennia enorm gestegen, namelijk van 99 miljoen ton in 1989 tot 280 miljoen ton in 2011 (PlasticsEurope, 2012), hetgeen eveneens weerspiegeld wordt in een stijging van de proportionele plastichoeveelheid in de totale afvalstroom tot een huidige gemiddelde van ongeveer 10% (Barnes *et al.*, 2009). Incorrecte verwerking, accidentele verspilling of laksheid zijn maar enkele oorzaken waardoor plastics in het milieu terechtkomen, waarna transport naar de oceanen plaatsvindt. Geschat wordt dat er zo ongeveer 10% van de totale geproduceerde hoeveelheid plastic jaarlijks in de oceanen terechtkomt (Thompson, 2006). Blootstelling van deze plastics aan UV-B-straling veroorzaakt microcracking (Andrady, 2011), hetgeen, in combinatie met een fysische kracht (Barnes *et al.*, 2009), leidt tot het opbreken van de plastics in steeds kleinere componenten. De aanwezige oceaanstromen transporteren voornamelijk drijvende en gesuspenderde plastics met verscheidene garbage patches als gevolg.

Een mogelijk gevolg van de aanwezigheid van deze plastics is een herverdeling van de pollutanten die in vrije vorm voorkomen in de oceanen. Dit leidt tot het instellen van een nieuw evenwicht tussen het omgevende water en het plastic, met een mogelijkheid van opconcentratie van pollutanten aanwezig in het mariene milieu, waaronder polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs), polychloorbifenylen (PCBs), polybroomdifenylethers (PBDEs), etc. (Hirai *et al.*, 2011; Mato *et al.*, 2001) door de hydrofobe eigenschappen van zowel het plastic als de verbinding (Andrady, 2011; Mato *et al.*, 2001). Deze gezamenlijke eigenschap zorgt ervoor dat de reeds onderzochte evenwichten tussen de vrije en geadsorbeerde hoeveelheid pollutant een gelijkaardige grootteorde kennen als de  $K_{ow}$ -waarde van de pollutant in kwestie (Müller *et al.*, 2001). Naast deze preferentiële adsorptie vindt er tevens een evenwichtsinstelling plaats van zware metalen (Ashton *et al.*, 2010) en ook fouling door organismen, waaronder biofilms, zeepokken, mollusken en enkele anderen (Barnes, 2002), wordt beschreven. In combinatie met voormeld transport ondervinden deze hydrofobe verbindingen, zware metalen en organismen een globale verspreiding, mogelijks zelfs tot in Antarctica, dat momenteel nog beschermd wordt door de Antarctische Stroom (Zarfl & Matthies, 2010; Barnes, 2002).

Plastic kan fragmenteren in deeltjes die kleiner zijn dan 5mm waardoor zij microplastics genoemd worden (Arthur *et al.*, 2008). Deze kunnen in grote lijnen onderverdeeld worden in twee groepen, namelijk de primaire en secundaire microplastics. De primaire zijn voor een specifieke functie geproduceerd en komen o.a. via huidreinigers, industriële activiteiten en accidentele verspilling doorheen de zuiveringsinstallatie terecht in de rivieren (Cole *et al.*, 2011). De secundaire microplastics worden gevormd door de geleidelijke verwerking van grotere eenheden plastic.

Doordat filter feeders in staat zijn om microplastics met microscopische afmetingen op te nemen via ingestie en transport doorheen de darmwand (Browne *et al.*, 2008; Brillant & MacDonald, 2002; von Moos *et al.*, 2012), bestaat er een mogelijk gevaar tot bioaccumulatie en transport van microplastics doorheen het voedselweb (Wright *et al.*, 2013). In combinatie met een mogelijke desorptie van geadsorbeerde pollutanten kan dit een gezondheidsrisico voor vele organismen, inclusief de mens, met zich meebrengen.

De huidige technieken voor de visualisatie van opgenomen microplastics zijn zeer tijdsintensief en voornamelijk destructief van aard (Slizova *et al.*, 2003). Een alternatief wordt gevonden bij micro-CT, waarbij hoogenergetische elektromagnetische stralen (X-stralen) gebruikt worden voor het opbouwen van een virtueel, driedimensionaal beeld. Door de recente verbeteringen van de resolutie is het mogelijk geworden om het toepassingsgebied van X-stralen uit te breiden van medische CAT-scans naar micro- en zelfs nanometerniveau (Mizutani & Suzuki, 2012).

Het gebruik van X-stralen is gebaseerd op dichtheidsverschillen. Door de gelijkaardige dichtheid van water, plastic en organisch weefsel (Davit *et al.*, 2011) is het aangeraden om het water te verwijderen via een alcoholreeks en de microplastics of het organisch weefsel te behandelen om het contrast zo groot mogelijk te maken. Hiervoor werd gebruik gemaakt van artificieel verzwaarde microplastics (polyethyleen met  $BaSO_4$ ) waarmee het toepassingsgebied van deze techniek beperkt is tot laboratoriumstudies.

Binnen het uitgevoerde onderzoek kunnen er twee belangrijke parameters geïdentificeerd worden, met name de blootstellingduur en de behandeling voorafgaand aan de analyse. Wat de blootstellingduur betreft, werden er drie tijdsperiodes gedefinieerd, zijnde 'kort' (enkele uren), 'middellang' (twee tot vier dagen) en 'lang' (een week). Gedurende de korte en middellange periode werden hoge plasticconcentraties gebruikt, gaande tot 100.000 partikels per liter, terwijl er voor de lange periode voor een lagere concentratie werd gekozen, namelijk tussen 5 en 20 partikels per liter.

De mosselen gebruikt voor de korte blootstelling werden via zure digestie behandeld (Claessens *et al.*, 2013), waarna dit residu gefilterd werd over een 5µm-cellulosenitraatmembraan (Whatman, AE98) en onder de lichtmicroscop bestudeerd werd. Het doel was om te bepalen of een korte blootstelling reeds voldoende zou zijn voor mosselen om een consistente opname van microplastics te vertonen. Echter, dit leidde tot een zeer beperkte consistentie in het aantal opgenomen microplastics en voldeed slechts in een beperkt aantal gevallen aan het verwachte patroon, zijnde een hogere opname bij zowel een hogere concentratie als een langere blootstelling. Enkele mogelijke oorzaken omtrent deze inconsistentie werden geïdentificeerd, namelijk: de filteractiviteit, de retentie-efficiëntie, het voedingsregime, de onderzochte oppervlakte van de gebruikte filter en de densiteit van de gebruikte microplastics.

Het uitvoeren van de middellange blootstelling werd gevolgd door verschillende nabehandelingen die gebruikt worden voor het optimaliseren van de toestand van het weefsel voor micro-CT-analyse. Drie verschillende technieken werden met elkaar vergeleken op basis van vier parameters: tijdsintensiviteit, resultaat, economisch en milieuvriendelijkheid. De verschillende behandelingen zijn: eenvoudige droging op 60 °C, behandeling met fosfomolybdeenzuur (PMA) en behandeling met hexamethyldisilazaan (HMDS). Van deze drie technieken vertoonde de HMDS-behandeling het beste resultaat. Artificieel verzwaarde microplastics waren duidelijk zichtbaar in de darm en in het weefsel.

Na bepaling van de optimale behandeling werden mosselen gedurende middellange periode blootgesteld en na afloop van deze periode onderworpen aan twee verschillende gut clearance methodes: blootstelling gevolgd door 24 uur zonder voeding en blootstelling gevolgd door 24 uur zonder voeding, gevolgd door 24 uur met voeding. Via de feces kan gesteld worden dat het toepassen van 24 uur zonder voeding, gevolgd door 24 uur met voeding efficiënter is dan enkel 24 uur zonder voeding. Echter, de micro-CT-analyse toont reeds volledige afwezigheid van microplastics in de darm na 24 uur zonder voeding.

De mosselen voor de lange blootstellingduur werden blootgesteld aan een meer milieurelevante concentratie, gedurende een langere periode. Het doel van deze langere periode was onderzoeken of het mogelijk is om een massabalans op te stellen en, indien mogelijk, om dit te vereenvoudigen door enkel gebruik te maken van fecesanalyse. De bekomen massabalansen, die de microplastics verdeelden over drie compartimenten, zijnde organisme, feces en water, toonden echter aan dat het niet aan te raden is om dit te benaderen via fecesanalyse of louter te baseren op de micro-CT-beelden. Problemen met betrekking tot identificatie van de microplastics door o.a. organisch materiaal en kristallisatie verhinderden een accurate kwantificatie van microplastics aanwezig in de feces.

Door gebruik te maken van micro-CT als innovatieve visualisatietechniek werd met andere woorden aangetoond dat deze artificieel verzwaarde microplastics opgenomen worden door de mossel, *Mytilus edulis* en dat deze vervolgens translocatie in het weefsel ondergaan. Een algemene voorbehandeling voor het verhogen van de densiteit van het volledige monster dient hierbij nog steeds uitgevoerd te worden, hetgeen mogelijk is met HMDS. Zoals elke techniek wordt ook micro-CT gekenmerkt door een aantal parameters, waaronder resolutie, instellingen en geometrie. De resolutie dient namelijk zo klein mogelijk te zijn om een adequate identificatie uit te voeren. De kleine afmetingen van de gebruikte microplastics (10 tot 20µm) in combinatie met de behaalde resoluties (tussen 4 en 5µm) resulteerden in een beperkte omlijning van de individuele deeltjes, waardoor samengeklitte deeltjes gemist kunnen worden. Kleurschakeringen kunnen ingesteld worden in MyVGL (de software voor verwerking van de geproduceerde micro-CT-beelden) om de overgangsgebieden te identificeren, hetgeen een specifiek patroon dient te volgen in opeenvolgende beelden teneinde te voldoen aan de vereiste symmetrie en geometrie kenmerkend voor de gebruikte sferische microplastics.

De opname van microplastics door mariene organismen kan via micro-CT op laboratoriumniveau bevestigd worden en kan leiden tot mogelijke gevolgen zowel op een laag als op een hoog trofisch niveau. Gevolgen binnen het lage trofische niveau spelen zich voornamelijk af in het organisme zelf, waaronder opvulling van de maag en darm, verhoogde granulocytvorming en verlaging van de lysosomale membraanstabieliteit (von Moos *et al.*, 2012), hetgeen kan leiden tot vrijgave van

hydrolasen, gevolgd door celnecrose bij zeer hoge concentraties (Futerman & van Meer, 2004). Niet enkel de microplastics zelf kunnen leiden tot problemen, maar ook de geadsorbeerde polluenten kunnen gevolgen hebben die voornamelijk optreden na desorptie. Ook op hoger trofisch niveau kunnen er gevolgen optreden van voormelde microplasticopname, voornamelijk door de zure omgeving in de maag waardoor organisch materiaal afgebroken wordt en de opgenomen microplastics vervolgens vrij voorkomen in de maag. Deze vrije microplastics kunnen mogelijks doorheen de darmwand opgenomen worden, tezamen met eventueel geadsorbeerde polluenten, die vervolgens kunnen desorberen en doorheen het organisme getransporteerd kunnen worden. Verder onderzoek naar het gedrag van microplastics in organismen alsook het gedrag van geadsorbeerde polluenten is met andere woorden onontbeerlijk om de volledige problematiek in kaart te brengen. De opvolging van geadsorbeerde polluenten wordt alvast voorzien door de International Pellet Watch. Echter, ook standaardisatie voor microplasticidentificatie wordt door vele auteurs vermeld als een essentieel gegeven naar de toekomst toe (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Andradý, 2011; Barnes *et al.*, 2009; Cole *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2008). Een zeer belangrijk potentieel onderzoeksonderwerp betreft de gevolgen van deze microplasticopname, meerbepaald de weefsels waar deze partikels eventueel opgeslagen worden, de desorptiesnelheid van geadsorbeerde polluenten in de zure omgeving van de maag en de (toxicologische) gevolgen van deze desorptie. Dit kan uitgevoerd worden op een laag trofisch niveau, maar kan eveneens uitgevoerd worden op hoog trofisch niveau, waarbij men kan bepalen of er mogelijks biomagnificatie in het voedselweb optreedt. Er zijn met andere woorden nog veel mogelijkheden.

## Bibliografie

- Andradý A. L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, Issue 62, pp. 1596 - 1605.
- Arthur C., J. Baker. & H. Bamford. 2008. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris. University of Washington Tacoma, Tacoma, WA, USA, NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-30.
- Ashton K., L. Holmes and A. Turner. 2010. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, Issue 60, pp. 2050 - 2055.
- Barnes D.K.A. 2002. Invasions by marine life on plastic debris. *Nature*, Issue 416, pp. 808 - 809.
- Barnes D.K.A., F. Galgani, R.C. Thompson and M. Barlaz. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Phil. Trans. R. Soc. B*, Issue 364, pp. 1985 - 1998.
- Brillant M. and G. MacDonald. 2002. Postingestive selection in the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) on the basis of chemical properties of particles. *Marine Biology*, Issue 141, pp. 457 - 465.
- Browne M.A. *et al.* 2008. Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ. Sci. Technol.*, Issue 42, pp. 5026 - 5031.
- Claessens M., L. Van Cauwenberghe, M.B. Vandegehuchte and C.R. Janssen. 2013. New techniques for the detection of microplastics. *Marine Pollution Bulletin*, Issue 1 - 2, pp. 227 - 233.
- Cole M., P. Lindeque, C. Halsband and T.S. Galloway. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, Issue 62, pp. 2588 - 2597.
- Davit Y. *et al.* 2011. Imaging biofilm in porous media using X-ray computed microtomography. *Journal of Microscopy*, Issue 242 (1), pp. 15 - 25.
- Futerman A.H. and G. van Meer. 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Issue 5 (7), pp. 554 - 565.
- Hidalgo-Ruz V., L. Gutow, R.C. Thompson and M. Thiel. 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology*, Issue 46, pp. 3060 - 3075.
- Hirai H. *et al.* 2011. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Marine Pollution Bulletin*, Issue 62, pp. 1683 - 1692.
- Mato Y. *et al.* 2001. Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. *Environ. Sci. Technol.*, Issue 35, pp. 318 - 324.
- Mizutani R. and Y. Suzuki. 2012. X-ray microtomography in biology. *Micron*, Issue 43, pp. 104 - 115.
- Müller J.F., K. Manomani, M.R. Mortimer and M.S. McLachlan. 2001. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in the polyethylene/water system. *Fresenius J. Anal. Chem.*, Issue 371, pp. 816 - 822.
- PlasticsEurope. 2012. *Plastics - the Facts 2012*. november, pp. 1 - 40.
- Shah A.A., F. Hasan, A. Hameed and S. Ahmed. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, Issue 26, pp. 246 - 265.
- Slizova D., O. Krs and B. Pospisilova. 2003. Alternative Method of Rapid Drying Vascular Specimens for Scanning Electron Microscopy. *J Endovasc Ther*, Issue 10, pp. 285 - 287.

- Thompson R C. 2006. Plastic debris in the marine environment: consequences and solutions. In: J. C. Krause, H. Nordheim & S. Bräger, red. *Marine Nature Conservation in Europe*. Stralsund, Germany: Federal Agency for Nature Conservation, pp. 107 - 115.
- von Moos N., P. Burkhardt-Holm and A. Köhler. 2012. Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environmental Science & Technology*, Issue 46, pp. 11327 - 11335.
- Wright S.L., R.C. Thompson and T.S. Galloway. 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, Issue 178, pp. 483 - 492.
- Zarfl C. and M. Matthies. 2010. Are marine plastic particles transport vectors for organic pollutants to the Arctic?. *Marine Pollution Bulletin*, Issue 60, pp. 1810 - 1814.