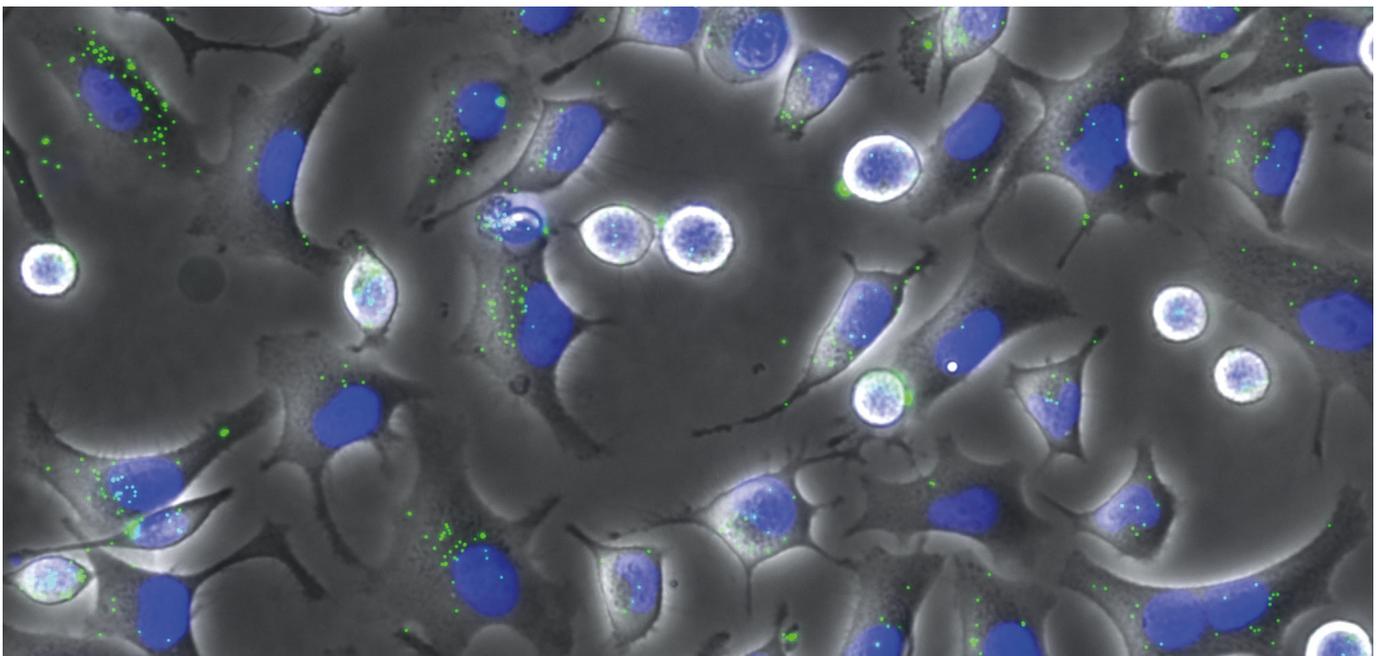


Martin Jekel | Stefan Dittmar | Aki Sebastian Ruhl (Hrsg.)

Mikroplastik im Wasserkreislauf

Probennahme, Probenaufbereitung, Analytik, Vorkommen und Bewertung



MiWA

Martin Jekel | Stefan Dittmar | Aki Sebastian Ruhl (Hrsg.)

Mikroplastik im Wasserkreislauf

Probennahme, Probenaufbereitung, Analytik, Vorkommen und Bewertung



Das diesem Bericht zu Grunde liegende Forschungsprojekt MiWa wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02WRS1378 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



RiSKWa

Partner:



Technische
Universität
München



UNIVERSITÄT
HEIDELBERG
ZUKUNFT
SEIT 1386

EBERHARD KARLS
UNIVERSITÄT
TÜBINGEN



Martin Jekel | Stefan Dittmar | Aki Sebastian Ruhl (Hrsg.)

Mikroplastik im Wasserkreislauf

Probennahme, Probenaufbereitung, Analytik, Vorkommen und
Bewertung (MiWa)

Martin Jekel¹, Philipp Anger⁷, Claus Gerhard Bannick⁹, Anne-Kathrin Barthel⁹,
Ulrike Braun², Thomas Braunbeck¹¹, Stefan Dittmar¹, Paul Eisentraut²,
Martin Elsner⁷, Regina Gnirß³, Tamara Grummt¹⁰, Lisa Hanslik¹¹,
Sven Huppertsberg⁶, Natalia P. Ivleva⁷, Philipp Klöckner⁵,
Thomas P. Knepper⁶, Heinz-R. Köhler¹², Stefanie Kraiss¹², Jochen Kuckelkorn¹⁰,
Elisabeth May¹², Yanina Katharina Müller⁸, Reinhard Nießner⁷,
Nathan Obermaier⁹, Jörg Oehlmann⁴, Marco Pittroff⁸, Thorsten Reemtsma⁵,
Hannah Schmiegel¹², Thomas Schmitt³, Christoph Schür⁴,
Florian Rüdiger Storck⁸, Claudia Strobel¹⁰, Rita Tribskorn¹², Stephan Wagner⁵,
Martin Wagner⁴, Cordula Sonja Witzig⁸, Nicole Zumbülte⁸, Aki Sebastian Ruhl¹

¹Fachgebiet Wasserreinhaltung, Technische Universität Berlin (TUB).

²Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin (BAM).

³Forschung und Entwicklung, Berliner Wasserbetriebe (BWB).

⁴Aquatische Ökotoxikologie, Goethe Universität Frankfurt (GU).

⁵Department Analytik, Helmholtz Zentrum für Umweltforschung, Leipzig (UFZ).

⁶Institute for Analytical Research, Hochschule Fresenius, Idstein (HSF).

⁷Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, Technische Universität München (TUM).

⁸Abteilung Analytik, TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe (TZW).

⁹Fachgebiet Abwassertechnikforschung, Umweltbundesamt, Berlin (UBA).

¹⁰Fachgebiet Toxikologie des Trink- und Badebeckenwassers, Umweltbundesamt,
Bad Elster (UBA).

¹¹Aquatische Ökologie und Toxikologie, Universität Heidelberg (UHEI).

¹²Institut für Evolution und Ökologie, Universität Tübingen (UTUE).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.dnb.de/> abrufbar.

Universitätsverlag der TU Berlin, 2020

<http://verlag.tu-berlin.de>

Fasanenstr. 88, 10623 Berlin

Tel.: +49 (0)30 314 76131 / Fax: -76133

E-Mail: publikationen@ub.tu-berlin.de

Alle Texte dieser Veröffentlichung – ausgenommen Zitate, Logos und anderweitig gekennzeichnete Teile – sind unter der CC-Lizenz CC BY lizenziert.

Lizenzvertrag: Creative Commons Namensnennung 4.0

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Umschlagfoto:

Umweltbundesamt, Fachgebiet II 3.6 | Lungenzellen (Pneumozyten) mit blauen Zellkernen und grüne Polystyrolpartikel mit einer Größe von etwa 0,2 µm (Ausschnitt) | CC BY 4.0

Druck: docupoint GmbH

Satz/Layout: Stefan Dittmar und Aki Sebastian Ruhl

ISBN 978-3-7983-3162-4 (print)

ISBN 978-3-7983-3163-1 (online)

Zugleich online veröffentlicht auf dem institutionellen Repositoryum der Technischen Universität Berlin:

DOI 10.14279/depositonce-10406

<http://dx.doi.org/10.14279/depositonce-10406>

Inhalt

1	Einleitung.....	5
1.1	Definitionen.....	6
1.2	Mögliche Eintragspfade.....	6
1.3	Projektziele.....	7
2	Probenahme.....	10
2.1	Probenahme in Straßenabläufen und deren Behandlungsanlagen.....	10
2.1.1	Durchführung der Probenahme.....	10
2.1.2	Probenahme-Techniken für Feststoffe.....	13
2.2	Oberflächengewässer.....	13
2.2.1	Entwicklung der Fraktionierten Filtration mittels Siebkaskade (UBA).....	13
2.2.2	Kontinuierliche Probenahme mittels Sedimentationskasten (UBA).....	16
2.2.3	Beprobung mittels Fraktionierter Filtration und Sedimentationskasten.....	17
2.2.4	Mehrstufige fraktionierende Filterkaskade (TZW).....	20
2.2.5	Probenahme mit schwimmenden Netzen (UFZ).....	24
2.3	Grund- und Trinkwasser (TZW).....	24
2.3.1	Allgemeines und Durchführung.....	24
2.3.2	Einführung des Prozessblindwerts.....	24
2.3.3	Probenahme-Kampagnen.....	26
3	Probenbehandlung und -aufbereitung.....	26
3.1	Behandlung für spektroskopische Verfahren.....	26
3.1.1	Vermeidung von Kontaminationen (TUM).....	26
3.1.2	Raman-Spektroskopie (TUM).....	29
3.1.3	Raman-Spektroskopie (TZW).....	30
3.1.4	Probenaufbereitung für FT-IR (HSF).....	33
3.2	Probenaufbereitung und Vorbehandlung für pyrolytische Verfahren (UBA).....	33
3.3	Aufbereitung für Elementanalysen (UFZ).....	36
4	Analytik.....	41
4.1	Raman-Spektroskopie (TUM).....	41
4.1.1	Optimierte Bedingungen für die RM-Analytik.....	41
4.1.2	Filterhalter.....	43
4.1.3	Statistische Auswahl von Partikeln.....	44
4.1.4	Partikelerkennung mit Otsu.....	46
4.1.5	Befunde in biologischen Proben in Kooperationen.....	47
4.1.6	Analytischer Prozess in der Entwicklung.....	52

4.2	Raman-Mikrospektroskopie (TZW)	53
4.3	FT-IR-Spektroskopie (HSF)	55
4.3.1	Methodenanpassung und Lösungsvorschläge	56
4.3.2	Methoden-Validierung	58
4.3.3	Ausblick.....	58
4.4	Thermische Extraktion mit GC/MS (TED-GC/MS) (BAM)	60
4.4.1	Beschreibung	60
4.4.2	Optimierung	61
4.4.3	Identifikation und Nachweisgrenzen.....	64
4.4.4	Quantifizierung.....	66
4.4.5	Limitationen deuterierten Polystyrols als interner Standard.....	67
4.5	Elementanalysen (UFZ).....	69
4.5.1	Elementgehalte	69
4.5.2	Elementgehalte in Reifenabrieb.....	70
4.6	Vergleichsversuche – Mikroplastikpartikel in flüssiger Matrix	72
4.6.1	Überblick.....	72
4.6.2	Herstellung der Vergleichsproben.....	73
4.6.3	Ergebnisse.....	76
4.6.4	Fazit und Ausblick.....	79
5	Befunde im urbanen Wasserhaushalt.....	81
5.1	Anlagen zur weitergehenden Abwasserreinigung (BWB)	81
5.1.1	Polstofffiltertuch	82
5.1.2	Scheibenfilteranlagen.....	83
5.1.3	Beprobung der Anlagen.....	84
5.2	Befunde in Kläranlagen (BAM)	89
5.3	Befunde in Oberflächenwasserbehandlung (BAM).....	91
5.3.1	TRWP-Konzentrationen in Niederschlagswasseraufbereitungsanlagen (UFZ)	93
5.3.2	Gegenüberstellung von zwei Methoden zur TRWP Quantifizierung.....	94
5.3.3	Partikelgrößenverteilung von TRWP	95
5.3.4	Untersuchung von Alterungsprozessen in Umweltproben	95
5.4	Befunde in Oberflächengewässern	96
5.4.1	Zürichsee (TZW).....	96
5.4.2	Elbe	96
5.4.3	Teltowkanal (BAM)	98
5.4.4	Fluss Parthe (UFZ).....	102
5.5	Befunde in Grund- und Trinkwasserproben (TZW)	103

6	Sorptionsuntersuchungen (HSF).....	104
6.1.1	Ergebnisse der Sorptionsuntersuchungen	105
6.1.2	Sorptionsverhalten	106
6.1.3	Wirkungen von organischen Kontaminanten mit MP (Organismenebene).....	107
6.1.4	Planung Realproben (HSF und UHEI).....	107
7	Biologische Wirkung.....	108
7.1	Untersuchte Fragestellungen	108
7.1.1	Goethe Universität	108
7.1.2	Gewebettransfer.....	108
7.1.3	Universität Heidelberg.....	111
7.1.4	Eberhard-Karls-Universität Tübingen	113
7.2	Effekte von Mikroplastik als alleiniger Stressor auf aquatische Organismen	113
7.2.1	Transkriptom-Studie mit <i>Radix balthica</i> (PS vs. Kaolin) (GU).....	113
7.2.2	Populationsexperiment mit <i>Daphnia magna</i> (PS vs. Kieselgur) (GU)	115
7.2.3	Multigenerationsstudie mit <i>Daphnia magna</i> I (PS vs. Kaolin) (GU)	117
7.2.4	Akuter Toxizitätstest mit <i>Chironomus riparius</i> (PS) (UTUE)	120
7.2.5	Akuter Toxizitätstest mit <i>Chironomus riparius</i> (PE) (UTUE)	121
7.2.6	Embryotest mit <i>Marisa cornuarietis</i> (PA, PMMA, PS) (UTUE).....	121
7.2.7	Exposition adulter <i>Marisa cornuarietis</i> (PS) (UTUE).....	122
7.2.8	Embryotest und anschließende Exposition der Larven der Bachforelle (PS) (UTUE)..	123
7.2.9	Experimente mit juvenilen Bachforellen (PS) (UTUE)	126
7.3	Kombinationseffekte mit Chemikalien auf aquatische Organismen.....	126
7.3.1	Multigenerationsstudie mit <i>Daphnia magna</i> II (PS & Rohabwasser) (GU)	126
7.3.2	Transfer von MP-Partikeln entlang Nahrungsketten (UHEI)	129
7.3.3	Akuter Toxizitätstest mit <i>Chironomus riparius</i> (PS und Thiacloprid) (UTUE)	131
7.3.4	Akuter Toxizitätstest mit <i>Chironomus riparius</i> (PS und Methiocarb) (UTUE)	134
7.3.5	Akuter Toxizitätstest mit <i>Chironomus riparius</i> (UTUE).....	136
7.3.6	Exposition adulter <i>Marisa cornuarietis</i> (PS und Cypermethrin) (UTUE)	137
7.3.7	Exposition adulter <i>Marisa cornuarietis</i> (PS und Methiocarb) (UTUE).....	139
7.3.8	Exposition adulter <i>Marisa cornuarietis</i> (PS und Amitriptylin) (UTUE)	145
7.3.9	Exposition von juvenilen Bachforellen (PS und Methiocarb) (UTUE).....	146
7.3.10	Exposition von frühen Entwicklungsstadien der Bachforelle (UTUE).....	146
7.3.11	Exposition juveniler Bachforellen (PS und Amitriptylin) (UTUE).....	149
7.3.12	Zebraäbrblingsembryonen (UHEI).....	151
7.3.13	Nachweis des Transfers von Schadstoffen auf Mikroplastik (UHEI)	152
7.3.14	Toxikologische Untersuchungen an real-belastetem MP (UHEI)	155

7.3.15	Quantifizierung der Aufnahme von Schadstoffen über MP (UHEI).....	158
7.3.16	Langzeitwirkung von schadstoffbelastetem MP auf Fische (UHEI)	159
7.4	Humantoxische Wirkungen (UBA).....	163
7.4.1	Material und Methoden	163
7.4.2	Ergebnisse.....	168
7.4.3	Bewertungsansätze	178
7.4.4	Schlussfolgerungen und Empfehlungen	179
8	Methodische Ansätze in rechtlichen Regelungen (UBA).....	180
9	Schlussfolgerungen und Empfehlungen	182
9.1	Probenahme, Aufbereitung, Analyse, Senken.....	182
9.1.1	Raman-Mikrospektroskopie (TZW, TUM).....	182
9.1.2	FT-IR.....	183
9.1.3	Elementanalysen	183
9.1.4	TED-GC/MS.....	184
9.1.5	Senken (BWB).....	184
9.1.6	Adsorptionsprozesse an MP	184
9.2	Biologische Untersuchungen.....	185
9.2.1	Allgemeine Herausforderungen und Empfehlungen (GU)	185
9.2.2	Embryotoxizität (UTUE)	187
9.2.3	Oxidativer Stress in Fischlarven (UTUE)	188
9.2.4	Effekte organischer Schadstoffe und deren Modulation durch MP (UTUE)	188
9.2.5	Effekte durch mit Mikroplastik belasteten Umweltproben (<i>C. riparius</i>) (UTUE)	189
9.2.6	Gewebettransfer von Mikroplastik (GU)	189
9.2.7	Inflammation und zelluläre Stressreaktion (GU).....	190
9.2.8	Mikroschadstoffe und Mikroplastik (GU).....	191
9.2.9	Toxizität von nativen MP-Partikeln (UHEI).....	192
9.2.10	Nahrungsketten (UHEI).....	193
9.2.11	Quantifizierung des Schadstofftransfers via MP (UHEI).....	194
9.2.12	Exposition gegenüber real belasteten Wasser- und Sedimentproben (UHEI)	195
9.2.13	Langzeitwirkungen einer Belastung mit MP-Partikeln (UHEI).....	196
9.2.14	Schlussfolgerungen tabellarisch (UHEI).....	197
10	Referenzen	198

1 Einleitung

Kunststoffe und Kunststoffprodukte (aus synthetischen Polymeren), umgangssprachlich auch Plastik oder Plaste genannt, sind heute wesentlicher Bestandteil unserer Lebensumwelt und haben vielfältige Aufgaben im häuslichen, gewerblichen und industriellen Bereich. Allein in Deutschland werden jedes Jahr ca. 12 Mio. t Kunststoffe in werkstofflicher Form verschiedenster Produkte neu auf den Markt gebracht, etwa 6 Mio. t der Kunststoffprodukte werden jährlich entsorgt, 99 % der Kunststoffabfälle werden verwertet und 1 % wird beseitigt (Conversio 2018). Damit bleiben jährlich 5 Mio. t an Kunststoffen im Bestand. Trotz umfassender Gesetzgebung gelingt es jedoch derzeit nicht zu verhindern, dass Kunststoffe direkt oder indirekt in die Umwelt eingetragen werden. Aufgrund der sehr langsamen Abbaudynamik verweilen diese Materialien in Abhängigkeit ihrer stofflichen Eigenschaften möglicherweise über mehrere hundert Jahre in den Ökosystemen (Moore 2008).

Die meisten Daten zu Kunststoffen in der Umwelt liegen derzeit aus dem marinen Bereich vor. Durchschnittlich drei Viertel der Stoffmenge des in den Ozeanen gefundenen Mülls besteht aus Kunststoffen (EC 2013). Ihr Vorkommen in Küstengewässern lässt sich bis Anfang der 1960er Jahre zurückverfolgen (Thompson et al. 2004). Zu den Quellen dieser Einträge gibt es unterschiedliche Angaben – sowohl landseitig als auch meerseitig – was darauf hindeutet, dass sich die Situation in den verschiedenen Meeresregionen sehr unterschiedlich gestaltet. Die Kunststoffbelastung der Umwelt hat somit, neben einer nationalen, eine europäische und internationale Dimension.

Meere spielen in der Betrachtung des Gesamtproblems eine besondere Rolle, da sie am Ende der Transportpfade stehen und somit eine abschließende Senke für Kunststoffe in der Umwelt darstellen. Dort und auf dem Weg dorthin kann eine Fragmentierung größerer Kunststoffteile stattfinden (Degradation), so dass sogenanntes sekundäres Mikroplastik (MP) entsteht. Des Weiteren gibt es Produkte, die aus primärem MP bestehen bzw. dieses beinhalten und direkt oder indirekt in die Umwelt eingetragen werden. Da MP-Partikel **sehr klein** sind (kleiner 5 mm, (Arthur et al. 2009)), können sie von Organismen, die an der Basis von Nahrungsnetzen stehen, aufgenommen werden. Ob und in welchem Umfang sie sich in Organismen über verschiedene Trophiestufen hinweg anreichern, ist bislang nicht ausreichend wissenschaftlich untersucht. Auch Effekte von MP auf limnische und marine Organismen werden diskutiert. Neben fehlenden Daten zu Aufnahme, Verbleib und Wirkung von MP auf Umwelt und Biota ist bisher keine wissenschaftsbasierte ökologische Bewertung erfolgt. Zudem sind derzeit keine Ansätze zur Umweltbewertung bzw. einer Risikoabschätzung verfügbar.

Der Großteil aller Kunststoffe besteht aus synthetisch erzeugten Makromolekülen oder Polymeren, welche sich aus wiederholenden Monomer-Einheiten zusammensetzen (Zweifel et al. 2009). Je nach Art und Verknüpfung der Monomere können Polymere mit verschiedenen Eigenschaften erzeugt werden. Ein Polymermolekül verfügt definitionsgemäß über eine molare Masse von über ca. 10.000 g/mol (Römpp Online 2014).

Das sind je nach Polymersorte 100–1.000 Monomer-Einheiten. In der Regel liegen für technische Polymere Molmassen von 50.000 bis 200.000 g/mol vor. Diese können ungeordnet oder teilweise geordnet als lineare Moleküle vorliegen oder als weit oder engmaschig verknüpftes Netzwerk. Die Struktur bestimmt die Verarbeitungseigenschaften der Polymere sowie ihr makroskopisches Erscheinungsbild. Kunststoffprodukte bestehen für den Alltagsgebrauch nicht nur aus dem Polymer selbst, sondern sind mit zusätzlichen Additiven ausgerüstet, welche die Materialeigenschaften optimieren oder beeinflussen. Dazu gehören Antioxidantien, Thermo- und Lichtstabilisatoren, Verarbeitungshilfsmittel, Füllstoffe, Pigmente, Flammschutzmittel etc. Die Degradation von Kunststoffprodukten in Fragmente oder MP verläuft unterschiedlich für verschiedene Polymere. Additivierungen können diesen Abbau entscheidend beeinflussen.

Die Einwirkungen auf Mensch und Umwelt, die mit der Nutzung von Kunststoffen einhergehen, werden sich voraussichtlich nicht mehr vollständig beseitigen lassen. Es ist davon auszugehen, dass Kunststoffe als Marker des Anthropozäns noch in ferner Zukunft nachweisbar sein werden. Im Fokus der Forschungsarbeiten steht derzeit, mögliche Beeinträchtigungen oder Gefährdungen, die von Kunststoffen ausgehen können, zu identifizieren, zu bewerten und zu minimieren. Dazu ist es nötig, eine Verminderung der Einträge in die Umwelt voranzutreiben. Eine abgestimmte und harmonisierte Untersuchungsmethodik ist dafür eine ebenso zentrale Voraussetzung wie die Bewertung des Umweltrisikos von MP in Süßwassersystemen.

1.1 Definitionen

Über lange Zeit gab es im Bereich der Wissenschaft und auch in der gesellschaftlichen und politischen Diskussion kein einheitliches Verständnis für den Begriff Mikroplastik (Hartmann et al. 2019). In verschiedenen wissenschaftlichen Publikationen wurden ganz unterschiedliche Größen angegeben (Hartmann et al. 2019). Dadurch war ein Vergleich der Ergebnisse, eine Bewertung von „Ist-Situationen“ oder auch eine politische Beratung nicht oder nur begrenzt möglich. Definitionen sind kein Selbstzweck. Sie beschreiben im jeweiligen Arbeits-Kontext die für diesen Bereich relevanten Eigenschaften. Das gilt sowohl für die Rechtssetzung als auch für biologische oder physikochemische Untersuchungsverfahren – einschließlich der Probenahme unterschiedlicher umweltrelevanter Matrices. Für Untersuchungsverfahren sind dies zunächst die Größe, Form (z. B. Partikel, Fasern, Plättchen) und die stofflichen Eigenschaften. Die Definition des Untersuchungsgegenstandes ist somit wesentliche Voraussetzung für die zu entwickelnden Untersuchungsverfahren (Anwendungsbereiche) sowie künftige (rechtliche oder normative) Regelungen.

Kunststoffe lassen sich nach ihrer Größe in Makro-, Mikro- oder Nanoplastik klassieren, wobei diese Klassen übergangslos miteinander verbunden sind. Der Begriff "Mikroplastik" (MP) wurde zuerst von Thompson im Jahr 2004 für kleine Kunststoffpartikel eingeführt (Thompson et al. 2004). Weitgehende Einigkeit in der internationalen Diskussion besteht darin, dass Partikel aus Kunststoffen, die kleiner 5 mm umfassen, als MP bezeichnet werden (EC 2017). Im Bereich der internationalen Normung wird nur noch zwischen Mikro- und Makroplastik unterschieden. Bei MP erfolgt eine Differenzierung zwischen großem (1–5 mm) und kleinem (1–1000 µm). Zusätzlich zu diesen Größenklassen wurden noch Randbedingungen für die Form von Kunststoffen (z. B. räumliche Ausdehnung) vereinbart. Kunststoffpartikel kleiner 1 µm werden nach ISO als Nanoplastik bezeichnet, jedoch nicht weiter differenziert. Um differenzierte Aussagen innerhalb der MP-Gruppe machen zu können, wurde ein differenziertes Klassifikationssystem eingeführt. Es wurden **Sieblinien** von 500–1.000, 100–500, 50–100, 10–50, 5–10 und < 5 µm festgelegt. Damit lassen sich später Untersuchungsergebnisse miteinander vergleichen.

Mit dem Begriff Kunststoff werden definitionsgemäß nur die thermoplastischen und duroplastischen Kunststoffe gefasst. Aus werkstoffwissenschaftlicher Sicht sind Kunststoffe eine Teilgruppe der Polymere. Die aus synthetischen Polymeren aufgebauten Elastomere (z. B. Styrol-Butadien-Kautschuk), chemisch modifizierte natürlichen Polymere (z. B. Viskose, Cellophan), sowie auf synthetischen Polymeren basierenden Produkte (z. B. Fasern, Lacke, Reifen) werden auch in den derzeitigen Forschungsaktivitäten mit betrachtet. Auch aus ihnen können Mikropartikel entstehen, die als synthetische Polymere identifiziert werden (Braun et al. 2018). Zur Vereinfachung werden im vorliegenden Dokument alle diese Materialien umgangssprachlich mit dem Begriff „Plastik/Mikroplastik“ zusammengefasst.

1.2 Mögliche Eintragspfade

Mögliche Eintragspfade von primärem und sekundärem MP in die Umwelt sollen in diesem Kapitel identifiziert und erläutert werden. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf den Eintrag von MP durch die Einleitung von gereinigtem und unbehandeltem Abwasser in die aquatische Umwelt über

Oberflächengewässer gelegt. Ist das MP erst einmal in der Kanalisation gelandet, kann es über folgende Transportwege in Oberflächengewässer und die gesamte Umwelt gelangen (Miklos et al. 2016):

- Bei Starkregenereignissen kann es zu Mischwasser-Entlastungen des Kanalnetzes kommen. Dabei gelangt unbehandeltes Abwasser direkt in die Oberflächengewässer.
- Beim Einsatz einer Trennkanalisation wird der Regenwasserkanal in der Regel ohne weitere Reinigungsschritte in Oberflächengewässer eingeleitet.
- Im Kläranlagenablauf können sich Restgehalte von MP befinden und über die Vorfluter in die Oberflächengewässer gelangen.
- Wenn der in Kläranlagen anfallende Klärschlamm stofflich (z. B. als Düngemittel) verwertet wird, kann auch der Schlamm MP-Partikel enthalten und auf diese Weise einen Eintragspfad in die Umwelt darstellen.

Neben den aufgeführten Transportwegen über die Kanalisation, kann Plastik auch über die unsachgemäße Entsorgung von Abfällen in die Umwelt gelangen und dort zu MP fragmentieren (DWA 2016). Eine Verbreitung von Plastikpartikeln über die Luft ist ebenfalls ein möglicher Transportweg. Der Eintrag von MP ins Grundwasser, zum Beispiel über die Versickerung von belastetem Wasser durch die Erdschichten, wird zurzeit intensiv diskutiert. Es gibt aber noch keine validen Ergebnisse von Studien, die MP im Grundwasser nachgewiesen haben.

Primäre MP-Partikel mit ihren Anwendungsgebieten in Kosmetikprodukten, Wasch-, Reinigungs-, und Arzneimitteln kommen überwiegend in Haushalten oder auch in der Industrie zum Einsatz. Nach ihrem Gebrauch werden sie in aller Regel zusammen mit dem anfallenden Schmutzwasser in die Kanalisation gespült. Wicke et al. (2016) zeigen, dass in Berlin jährlich ca. 192 Millionen m³ Schmutzwasser anfallen.

Schwieriger ist die Betrachtung der sekundären MP-Partikel. Sie fallen zum Beispiel beim Waschen von Kleidung in Form von synthetischen Fasern und Faserbruchstücken an. Diese Fasern finden sich im häuslichen Abwasser wieder und werden mit dem restlichen Schmutzwasser zusammen über die Kanalisation zur Kläranlage transportiert. Eine weitere Hauptquelle für sekundäres MP ist der Abrieb von Autoreifen aus Synthetikgummi. Dieser Abrieb sammelt sich auf den Straßen und wird entweder durch die Luft verteilt, oder kommt bei Regenereignissen mit dem gesamten anfallenden Regenwasser über Gullys entlang der Straßen zum Abfluss. Wicke et al. (2016) zeigen in ihrer Studie am Beispiel der Stadt Berlin, dass ca. 70 % des gesamten jährlichen Regenwasserabflusses über eine Trennkanalisation unmittelbar und ohne weiteren Reinigungsschritt in die Oberflächengewässer eingeleitet werden

Festzuhalten bleibt, dass sekundäres MP über direkte Eintragspfade mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in Oberflächengewässer und anschließend in die Weltmeere gelangen kann. Ein weiterer noch nicht betrachteter Eintragspfad ist das achtlose Wegwerfen oder unsachgemäße Entsorgen von Plastikmüll. Dieser Müll wird über Abschwemmungen abtransportiert landet oft an Stränden und in den Meeren. Dort kommt es zur Verwitterung oder Zerkleinerung durch mechanische Beanspruchung, Sonneneinstrahlung oder andere Abbauprozesse (Andrady 2017). Es wird davon ausgegangen, dass ca. 80 % der weltweit im Meer befindlichen Abfälle ihre Quelle an Land haben (MLS 2016). Als mögliche Quellen werden ein unzureichendes Abfall-Management oder Mischwasserüberläufe von Kanalnetzen genannt.

1.3 Projektziele

Es ist mit hoher Dringlichkeit eine einheitliche Methodik zur Bestimmung der Abundanz von MP in Süßgewässern und in Anlagen, in denen Abwasser gereinigt und Wasser aufbereitet wird, zu entwickeln. Diese Aufgabe stellt sich im Vergleich zur Analytik der gelösten organischen Spurenstoffe (wie sie als Schwerpunkt im RiSKWa-Programm weiterentwickelt wurde) als völlig anders gelagert dar. Es

handelt sich bei MP um partikuläre Stoffe mit Dichten über und unter $1,0 \text{ g/cm}^3$, die nicht homogen in der Wasserphase verteilt sind, sich teilweise ins Sediment verlagern, schweben oder aufschwimmen und die sehr unterschiedliche Partikelgrößen von unter $1 \text{ }\mu\text{m}$ bis 5 mm umfassen. Diese Polymerpartikel sind mit konventionellen Lösungsmitteln nur schwer oder gar nicht löslich und weisen sehr unterschiedliche Materialeigenschaften auf, insbesondere hinsichtlich Polymerart, Additivierung und Verarbeitung. Neben den MP-Partikeln liegen viele andere Partikelarten anorganischer und makromolekularer, organischer Natur vor, die nicht immer eindeutig und einfach von MP zu unterscheiden sind. MP wird bisher grundsätzlich als Kunststoffpartikel mit einem Durchmesser kleiner 5 mm definiert. Eine Untergrenze wird bislang nicht beschrieben. Da diese Definition keine wissenschaftliche Basis hat, soll im Vorhaben hinterfragt werden, ob diese Einteilung tatsächlich eine sinnvolle Unterscheidungsgröße zu Mesoplastik ($1\text{--}5 \text{ mm}$) und Makroplastik (über 5 mm) ist.

Das Vorhaben selbst fokussierte sich zunächst auf den Nachweis von Kunststoffen/Polymeren aus Anwendungen, von welchen ein besonders relevanter Beitrag zu erwarten ist. Das sind zum einen Thermoplaste aus dem Verpackungs- und Gebrauchsgüterbereich, hierzu zählen insbesondere **PE, PP, PET und PS** (Polyethylen, Polypropylen, Polyethylenterephthalat und Polystyrol), sowie Thermoplaste für Faseranwendungen (PET, PA, PP). Darüber hinaus sollen auch Polymeren aus Reifenabrieb nachgewiesen werden (SBR, Styrol-Butadien-Rubber, BR, Butadien-Rubber), weil hier – ausgehend von einer Abschätzung von ca. 133.000 t/a für Deutschland (Wagner et al. 2018) eine vergleichsweise hohe Emissionsquelle auch für den Süßwasserbereich erwartet wird. Letztlich soll auch die Freisetzung von PVC-Materialien und geschäumten PS-Materialien nachgewiesen werden, da diese insbesondere Anwendung in Bauprodukten finden.

Die für die Optimierung der Verfahren notwendigen cryogemahlene Mikroplastikpartikel werden nicht als reines Polymer vorliegen, sondern sind entsprechend ihrer späteren Anwendung mit Additiven ausgerüstet. Die Ausstattung der Modellpartikel mit Additiven soll möglichst auf ein Minimum reduziert werden, um komplexe Wechselwirkungen zu minimieren. Zellulosefasern sollen nicht untersucht werden, da sie nicht als synthetische Polymere definiert sind.

Es ist anzunehmen, dass es MP im Größenbereich von unter $1 \text{ }\mu\text{m}$ im Durchmesser (Kolloid- oder Nanobereich, damit Nanoplastik) in der Umwelt gibt. Da hierfür bisher aber keine Analysemethoden im Bereich der Einzeldetektion über spektroskopische Verfahren (IR, Raman) existieren, soll der Schwerpunkt dieses Verbundvorhabens bei MP-Partikeln im Partikelgrößenbereich über $1 \text{ }\mu\text{m}$ liegen. Für Gesamtgehaltsmessungen soll ein thermoanalytischer Detektionsansatz, der nicht auf bestimmte Partikelgrößen limitiert ist, weiterentwickelt werden. Für die hier genannten Detektionsverfahren sind jeweils spezifische Verfahren der Probenaufbereitung zu entwickeln, die zur Aufkonzentrierung der Kunststoffe jeder Probe führen und dazu dienen, klarere Detektionsergebnisse zu erhalten.

Das **Vorhaben integriert** anerkannte Arbeitsgruppen zur Analytik der MP mit neuen Verfahren, zur Erarbeitung einer standardisierbaren Probenahme für Wässer und Sedimente und einer geeigneten Probenaufarbeitung für die MP-Detektion mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren aus Proben verschiedener Medien. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das Risiko einer Kontamination bei der Probenahme und -aufbereitung besteht (z. B. Probesystem, Filter, Luft, Kleidung), welches es zu minimieren gilt.

Das Vorhaben sollte mehrere auf unterschiedlichen Techniken beruhende Analysemethoden zum Nachweis der Art und Menge an MP in Umweltproben bereitstellen, vergleichend einsetzen und daraus Schlussfolgerungen zum jeweils geeigneten Einsatzbereich ableiten. Mithilfe der harmonisierten Probenahme- und Analysetechniken werden verschiedene Umweltsysteme, einschließlich eines dicht besiedelten urbanen Raumes gezielt auf Quellen, Senken und den Verbleib von MP untersucht.

Toxikologische und ökotoxikologische Untersuchungen werden die Effekte von MP in Testsystemen unterschiedlicher Komplexität und Trophiestufen charakterisieren. Dabei wird auch die Interaktion mit „klassischen“ Schadstoffen betrachtet. Somit wird das Vorhaben vertiefte Kenntnisse über die Interaktion von MP mit Biota und Wirkungen auf das aquatische Ökosystem und den Menschen liefern.

Ziel des Verbundes MiWa ist es, eine erste, nachvollziehbare, übergreifende und für die verschiedenen rechtlichen Anforderungen (AbwasserVO, OberflächengewVO, GrundwasserVO, TrinkwVO) notwendige Bewertung des erkannten Problembereichs MP im anthropogen geprägten Wasserkreislauf vorzunehmen. Diese Bewertung wird erstmals auf fortentwickelten und vergleichend eingesetzten analytischen Verfahren beruhen und damit sehr viel validere Daten zum Auftreten von MP in Süßsystemen liefern. Sie wird darüber hinaus neue Erkenntnisse zu möglichen biologischen Wirkungen einbeziehen.

Daraus werden sinnvolle und erfolgversprechende Anforderungen abgeleitet und Maßnahmen geplant, getestet, validiert und mittelfristig umgesetzt werden, von der Vermeidung, der Verminderung und der Emissionskontrolle an Punktquellen bis zum aktiven Gewässerschutz und der sicheren Trinkwasserversorgung. Für den Vollzug, Stoffstrombilanzen oder umfassende Datenerhebungen sind einfache, kostengünstige und harmonisierte Untersuchungsverfahren eine wichtige Voraussetzung. Die im Projekt entwickelten Verfahren müssen daher in der Praxis umsetzbar sein.

2 Probenahme

Um das Vorkommen von Kunststoffen in der Umwelt bewerten zu können, sind eine Vielzahl vergleichbarer und repräsentativer Proben aus unterschiedlichen Medien zu entnehmen. Im Rahmen des MiWa-Projektes standen vor allem das wässrige Medium und die entsprechende Probenahme von wässrigen Medien im Fokus. Neben Abwasser aus Kläranlagen waren auch Oberflächenabläufe aus urbanen Gebieten und Oberflächengewässer Untersuchungsgegenstand. Um die Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus verschiedenen Gewässern gewährleisten zu können, ist die Probenahme nach gleichen Verfahren für die unterschiedlichen Gewässer zu erfolgen. Für die Beprobung von Wasser gibt es verschiedene Herangehensweisen, die umfänglich in Normen beschrieben sind (ISO 2006).

2.1 Probenahme in Straßenabläufen und deren Behandlungsanlagen

Zur Untersuchung von **Reifenpartikeln** in der Umwelt wurden Proben aus dem Straßenraum gewonnen. Hierfür wurden verschiedene Behandlungsanlagen für Straßenabwässer aus dem Raum Leipzig und Berlin beprobt. Folgende Ziele wurden bei der Probenahme verfolgt:

- Beprobung von Umweltkompartimenten mit hohen Reifenpartikelkonzentrationen zur Methodenentwicklung
- Charakterisierung von Partikeln aus Behandlungssystemen mit unterschiedlichem Partikelalter und Entstehungsbedingungen
- Anwendung der entwickelten Methode auf verschiedene Matrices
- Bestimmung von Reifenpartikel-Konzentrationen in verschiedenen Umweltkompartimenten

2.1.1 Durchführung der Probenahme

Der **Oberflächenabfluss** wurde untersucht, indem der Zu- und Ablauf an Retentionsbodenfiltern am Halensee beprobt wurde. Hierfür wurde der Standort Halensee festgelegt, weil der Standort aufgrund seiner Nähe unter anderem zur stark befahrenen Autobahn einen Hotspot für MP (aus Reifenabrieb) darstellt.

Der Halensee ist ein glazial natürlich entstandener See der kleinen Grunewald-Seenkette und liegt im Ortsteil Grunewald des Berliner Bezirks Charlottenburg-Wilmersdorf. Der Halensee wird hauptsächlich von Regenwasser gespeist, welches über die Regenwasserkanalisation der angrenzenden Gebiete in den See geleitet wird. Der an der Nordspitze des Sees gelegene Friedenthalpark wird von vielen Berlinern als Naherholungsort genutzt. Das Ufer des Sees besteht zum größten Teil aus Privatgrundstücken.

Das ehemalige Freibad Halensee wurde 2002 geschlossen, und 2003 wurde ein Badeverbot für den gesamten See ausgesprochen. Grund dafür war die erhöhte Keimbelastung des Sees. Als Gegenmaßnahme erfolgte der Bau eines Retentionsbodenfilters (RBF), der 2007 in Betrieb genommen wurde. Der Großteil des Regenwasserzuflusses in den See (ca. 75 %), welcher von den Straßen und vor allem von der Autobahn (A 100) stammt, wird nun vor der Einleitung in den Halensee gereinigt (LAGESO 2016). Dadurch konnte eine deutliche Verbesserung der Wasserqualität erzielt werden. Seit der Badesaison 2016 ist das Baden im Halensee wieder erlaubt (LAGESO 2016). Knapp ein Viertel der Regenwassereinleitungen gelangen ungereinigt in den Halensee. Dieses Regenwasser stammt von versiegelten und teilversiegelten Flächen aus den Einzugsgebieten (EZG) Wallotstraße und Margaretenstraße.

Die Probenahmen am Retentionsbodenfilter am Halensee wurden durch UFZ und TUB durchgeführt. Die anschließende Untersuchung der Proben wurde vom UFZ übernommen.

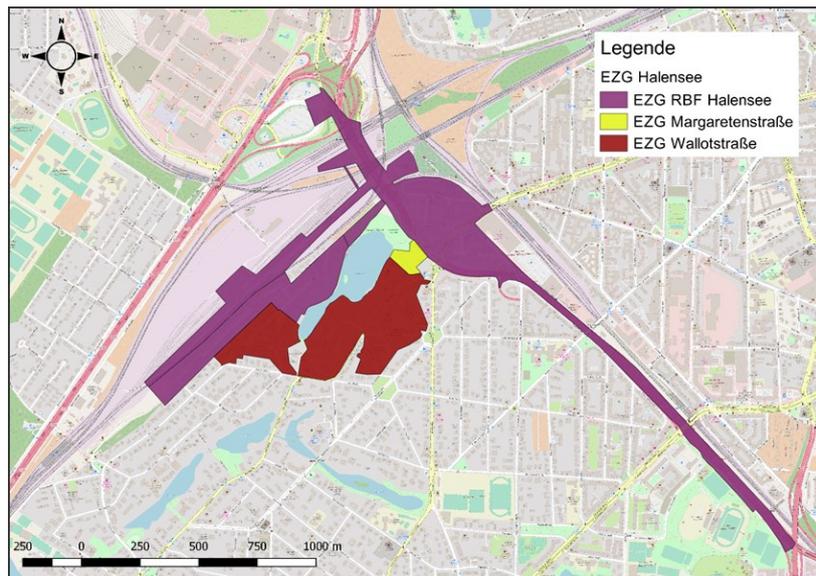


Abbildung 1: Einleitungsstellen Halensee (verändert nach OPENSTREETMAP)

Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aus einer **mehrstufigen Regenwasser-Behandlungsanlage** für Straßenabläufe in Berlin Halensee durch das UFZ in Zusammenarbeit mit dem BWB und TUB gewonnen. Das Straßenabwasser der Autobahn A100 wird hier zunächst in das Sedimentationsbecken (HAL_SED) eingeleitet. Nach Absetzen sedimentierbarer Partikel wird das vorgereinigte Wasser in den höher gelegenen Retentionsbodenfilter (HAL_RBF) gepumpt. Hier erfolgt die weitere Reinigung durch Versickerung im mit Schilf bewachsenen Bodenfilter. Das drainierte Wasser wird schließlich in den Halensee geleitet. Abbildung 2 zeigt Beispielfotos der Probenahme in Berlin Halensee. Die Probenahme wurde mehrfach wiederholt, da eine große Menge des Sediments für die Methodenentwicklung benötigt wurde und verschiedene Zustände des Sedimentationsbeckens (z. B. nach einem 6-monatigen Zeitraum ohne Reinigung und unmittelbar nach der Reinigung des Sedimentbeckens) untersucht werden sollten.

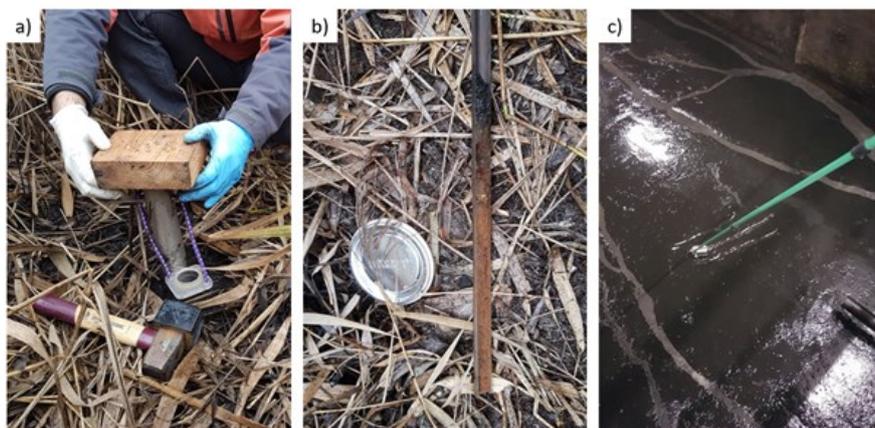


Abbildung 2: Beispielfotos der Probenahme vom 10.11.2017 mit Entnahme der Bodenprobe mittels Stechzylinder (a), Aufnahme des Bodenprofils mittels Stechbohrer nach Pürckhauer (b) und Schöpfprobe aus dem Sedimentationsbecken (c)

Weitere Proben wurden in Kooperation mit der Autobahnmeisterei Leipzig aus einem Behandlungssystem der Autobahn A38 bei Leipzig genommen (Pösgraben). Hier wird das Straßenabwasser in zwei hintereinander angelegten Sedimentationsteichen gereinigt und schließlich in die Vorflut eingeleitet. Der erste Teich (LE_S1) dient dabei der Vorklärung, während der zweite Teich (LE_S2) zur weiteren

Aufreinigung dient. Diese Sedimentationsteiche sind in regelmäßigen Abständen an der Autobahn vorzufinden. Das System am Pösgraben wurde zweimal beprobt. Die Probenahme-Technik wurde optimiert, und unterschiedliche Stellen am Ein- und Auslass beprobt um Informationen über die Verteilung von TRWP in den Teichen zu gewinnen. Zusätzlich wurde noch eine Anlage gleicher Bauweise an der A38 beprobt (Königsbachgraben, LE_S3, LE_S4).

An einigen Ausfahrten, wie zum Beispiel an der Ausfahrt Ost der A14 erlaubt die Topographie keine Einrichtung von Sedimentationsteichen. Hier wurden daher Versickerungsmulden eingerichtet, in denen das Straßenabwasser im Boden versickert. Aufgrund einer langen Trockenperiode im Sommer 2018 war diese Mulde komplett ausgetrocknet und eine Beprobung mittels Stechzylindern möglich (12.09.2018). Hier wurden hohe Reifenpartikelkonzentrationen aufgrund der Anreicherung im Sediment erwartet. Proben wurden an drei Punkten in der Mulde in verschiedenen Horizonten bis 30 cm Tiefe gewonnen.

Um Proben aus dem Stadtgebiet Leipzig zu erhalten, wurde in Zusammenarbeit mit KWL auch ein Rückhaltebecken an der Messeallee beprobt. Hier konnte allerdings nur eine Wasserprobe mit geringem Feststoffanteil genommen werden, welche für die angestrebten Untersuchungen ungeeignet war.

Tabelle 1: Übersicht Probenahmen von Oberflächenabflüssen und Behandlungsanlagen

Datum	Ort	Proben	Probenahme-Technik
30.05.2017	Berlin Halensee	Sedimentbeprobung wegen Starkregen nicht möglich; Beprobung des Zulaufs (4 x 1 L)	Schöpfbecher an Teleskopstab
21.06.2017	Leipzig Messeallee	Wasserprobe mit geringem Feststoffanteil	Schöpfprobe mit Eimer an Seil
10.11.2017	Berlin Halensee	Beprobung des Sedimentationsbeckens sowie des Retentionsbodenfilters	Schöpfbecher an Teleskopstab, Bodenkerne entnommen mit Stechzylinder
13.03.2018	Leipzig A38 Pösgraben	Sedimentproben mit Ekman-Greifer aus Teich S1, S2	Ekman-Greifer
25.05.2018	Berlin Halensee	Beprobung des Sedimentationsbeckens	Schöpfbecher an Teleskopstab
12.09.2018	Leipzig A14 Ausfahrt Ost	Bodenproben aus trockener Versickerungsmulde	Bodenkerne entnommen mit Pürckhauer-Stechbohrer und Riverside-Bohrer
17.10.2018	Leipzig A38 Pösgraben, Königsbachgraben	Sedimentproben aus S1, S2, S3, S4 jeweils in der Nähe des Zulaufs und Abflaufs	Schöpfbecher an Teleskopstab
24.10.2018	Berlin Halensee	Beprobung des Sedimentbeckens, Retentionsbodenfilter, Verteilerrinne	Schöpfprobe mit Becher an Teleskopstab, Entnahme von Schlamm aus Schleuse mit Löffel, Bodenprobe mit Schaufel entnommen
19.10.2018	Leipzig Straßenreinigung	Probe Straßenkehricht	Entnahme von Kehricht mit Schaufel aus Umladestation (durchgeführt von Straßenreinigung Leipzig)
06.12.2018	Berlin Halensee	Sedimente für Kooperation mit Uni Tübingen	Schöpfprobe mit Becher an Teleskopstab, ca. 30 L
25.03.2019	Berlin Halensee	Beprobung Sediment und überstehendes Wasser	Schöpfprobe mit Becher an Teleskopstab
08.04.2019	Leipzig Straßenreinigung, Gullys Gerichtsweg	Entnahme von Kehricht aus Straßenreinigungsfahrzeugen; Beprobung von Laubfang aus Gully	Entnahme von Kehricht mit Schaufel aus Umladestation

Schließlich wurden noch Straßenkehrrichtproben von der Straßenreinigung Leipzig gewonnen. Diese wurden aus einer Umladeanlage entnommen, in welche die Reinigungsfahrzeuge den Kehricht geben, damit dieser entwässert und die Feststoffe entsorgt werden können. Die Probenahme erfolgte nach Entladen der Fahrzeuge in die Umladeanlage und vor der Entwässerung. Eine erste Probe wurde von der Straßenreinigung zur Verfügung gestellt (Oktober 2018). Weitere Proben, aufgelöst nach den Stadtgebieten in denen die Reinigungsfahrzeuge eingesetzt wurden, konnten im April 2019 genommen werden. Eine Probennahme aus Laubfängen von Straßenabläufen (Gullys) am 08.04.2019 war nicht erfolgreich, da kein geeignetes Probenmaterial gewonnen werden konnte. Eine Übersicht der durchgeführten Probennahmen ist in Tabelle 1 zu finden.

2.1.2 Probenahme-Techniken für Feststoffe

Zur Probenahme von **Feststoffen** wurde eine Reihe verschiedener Techniken eingesetzt:

- Schöpfprobenahme mit Becher an Teleskopstange zur Entnahme von Sediment
- Schöpfprobenahme mit Eimer an Seil zur Entnahme von Sediment
- Stechzylinder und Schaufel zur Entnahme von Bodenproben aus dem Retentionsbodenfilter
- Beprobung Sediment der Versickerungsmulde mittels Stechbohrer
- Sedimentbeprobung mit Ekmangreifer

Zur Beprobung von **Schwebstoffen** wurden folgende Verfahren eingesetzt:

- Schöpfprobenahme mit Eimer an Seil zur Entnahme von Wasser
- Schöpfprobe mit Becher an Teleskopstange

2.2 Oberflächengewässer

Innerhalb aller Schritte einer gesamten Analyse treten oft während der Probenahme die größten Fehler auf, wenn man die enthaltenen Feststoffe zum Ziel hat. Deshalb müssen die einzelnen Schritte der Probenahme intensiv auf ihre Repräsentativität und Reproduzierbarkeit in Bezug auf den jeweils spezifischen Analyten (hier Kunststoffe/MP) untersucht werden. Um die die Repräsentativität auf die Zielstoffe zu untersuchen, bedarf es einer Vielzahl an Messreihen, um Schwankungsbreiten der Untersuchung und die Wiederfindung der Merkmalsträger zu ermitteln. Die Reproduzierbarkeit kann dabei im Labor mit dotierten Proben überprüft werden.

Darüber hinaus muss die Probenahme zum einen die Gegebenheiten des Geländes, sowie Besonderheiten des untersuchten Mediums Wasser oder Feststoff berücksichtigen und zum anderen die gegebenen Rahmenbedingungen der Probenaufbereitung und anschließenden Detektion (z. B. eine gewisse Probenmasse) beinhalten. Die Entwicklung bzw. Auswahl der Probennahmetechnik ist dementsprechend ein komplexer Prozess, der neben Validierungsversuchen der einzelnen Techniken auch den Vergleich unterschiedlicher Techniken miteinschließt.

Die folgenden Abschnitte thematisieren die Entwicklungen und den Vergleich von zwei Probenahme-Techniken, die stellvertretend für eine Einzelbeprobung bzw. kontinuierliche Beprobung stehen. Anschließend werden Ergebnisse der Untersuchung einer Kläranlage und eines Oberflächengewässers präsentiert.

2.2.1 Entwicklung der Fraktionierten Filtration mittels Siebkaskade (UBA)

Die fraktionierte Filtration wird mit Sieben (ATECHNIK GmbH, Deutschland) unterschiedlicher Siebweiten durchgeführt. Diese können bei geringen Schwebstoffgehalten bzw. schnellen Filtergeschwindigkeiten (große Siebweiten: 1.000, 500, 100 und 50 μm) in einer Filterkaskade angeordnet werden (Abbildung 3).

Mit kleiner werdenden Siebweiten verringert sich tendenziell auch die Filtergeschwindigkeit, so dass die vorfiltrierten Wässer aufgefangen werden müssen und mit einer separaten Filtration mit kleinen Siebweiten (10 μm , 5 μm) filtriert werden. In diesem Zusammenhang sind für eine repräsentative Be-
 probung insbesondere bei kleineren Fraktionen ggf. auch andere Volumina ausreichend und können entsprechend eingestellt werden (Braun et al. 2018).



Abbildung 3: Siebturm für die fraktionierte Filtration mit großen Porenweiten

Um die fraktionierte Filtration zu validieren, wurden Wiederfindungsversuche mit einer Partikeldispersion in Modellwasser durchgeführt (Bannick et al. 2019). Dieses bestand aus Leitungswasser (150 L) und bekannten Bestandteilen organischer und mineralischer Materialien. Der Schwebstoffgehalt des Wassers betrug 40 mg/L (das entspricht 6 g in 150 L). Die Validierung der Fraktionierten Filtration fand mit Sieben der Siebweite 500, 100, 50 und 20 μm statt.

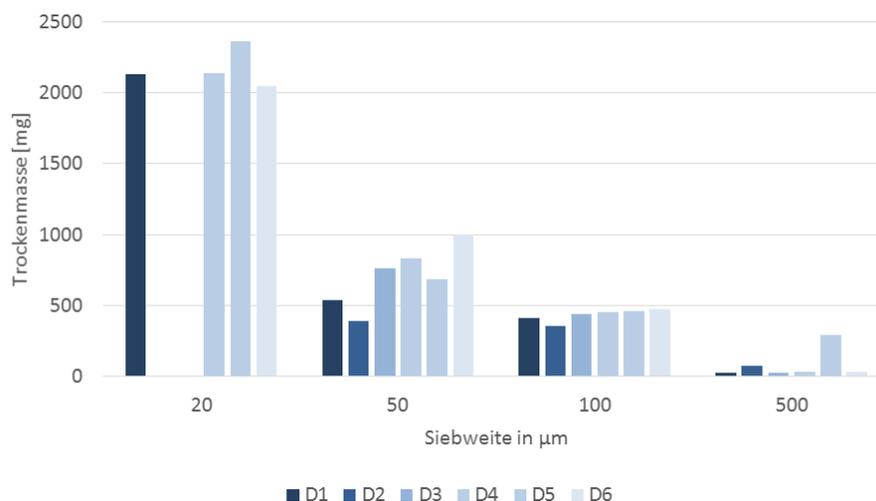


Abbildung 4: Gewonnene Trockenmassen der Versuche mit künstlichem Abwasser ohne PE/PS-Zusatz

In der ersten Versuchsreihe wurde das gesamte Wasservolumen über die Siebkaskade gegeben und die Masse der Feststoffe anschließend entfernt, getrocknet und gravimetrisch bestimmt. In der zweiten Versuchsreihe wurden zusätzlich die Polymere Polyethylen (PE) und Polystyrol (PS) zugegeben. Auch hier wurde das gesamte Wasser über die Siebe gegeben und die gewonnenen Feststoffe gravimetrisch bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Polymere durch TED-GC/MS-Messungen.

Abbildung 4 zeigt die gewonnenen Trockenmassen der sechs Versuchsdurchläufe ohne PE und PS. Bei den Versuchen D2 und D3 stand kein 20 µm Sieb zur Verfügung, dementsprechend wurden auch keine Trockenmassen in dieser Siebenfraktion gewonnen. Die Trockenmassen im 20 µm Sieb bilden bei den restlichen Versuchen jeweils mehr als 50 % der gesamten Trockenmassen und sind dementsprechend besonders relevant.

Abgesehen davon ist die Verteilung der Trockenmassen ähnlich. Der hohe Wert der Trockenmasse in der 500 µm Fraktion von D5 geht möglicherweise auf unterschiedliche Durchflüsse durch die manuelle Filtration zurück. Bei einem geringeren Durchfluss werden die Partikel mit einer geringeren Geschwindigkeit auf die Siebe gedrückt, was Aggregation auf dem Filter und die Bildung sektoraler Porenverschlüsse begünstigt.

In Abbildung 5 ist die gewonnene Trockenmasse der Versuche mit der künstlichen Dispersion in Wasser inklusive PE/PS dargestellt. In den Sieben mit den Siebweiten von 20, 50 und 100 µm treten zum Teil deutliche Trockenmasse-Schwankungen auf. In der Fraktion größer 500 µm ist die Trockenmasse relativ konstant, allerdings auch verglichen mit den anderen Trockenmassen gering (13–26 mg).

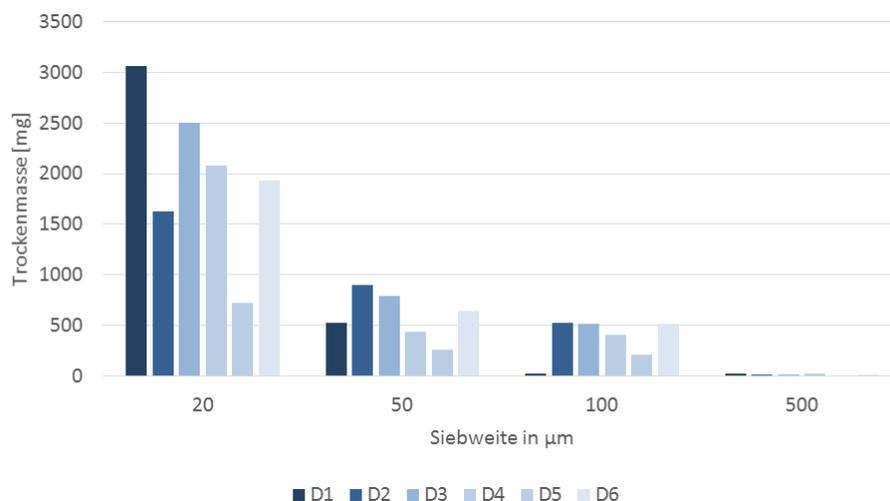


Abbildung 5: Gewonnene Trockenmassen der Versuche mit künstlichem Abwasser und PE/PS-Zusatz

Im Vergleich zu der Versuchsreihe ohne PE/PS zeigt die Versuchsreihe mit PE/PS eine höhere Standardabweichung in den Siebweiten 20 und 100 µm. Die Standardabweichung im 50 µm Sieb ist ähnlich. Für die großen Abweichungen im 500 µm Sieb ist vor allem der fünfte Durchgang der Versuchsreihe ohne PE/PS verantwortlich.

Abbildung 6 zeigt die gesamte Trockenmasse der beiden Versuchsreihen mit und ohne PE/PS. Es zeigt sich, dass die Gesamttrockenmasse der beiden Versuchsreihen ähnlich ist und lediglich D5 mit MP eine vergleichsweise geringe Trockenmasse aufweist. Zu berücksichtigen ist, dass bei D2 und D3 ohne MP das 20 µm Sieb nicht eingesetzt werden konnte. Die Wiederfindungsraten liegen im Durchschnitt bei etwas über 50 %. Insbesondere in der Versuchsreihe mit MP zeigt sich, dass sich die in Abbildung 5 gezeigten, deutlichen Unterschiede in den Fraktionen nicht unmittelbar auf die Gesamttrockenmasse auswirken. Die sektorale Verschließung bzw. Teilverschließung der Poren kann zu einem erhöhten

Rückhalt kleinerer Partikel in größeren Siebweiten führen, der gesamte Rückhalt der Fraktionierten Filtration wird dadurch aber nur bedingt beeinflusst. Ohne eine Weiterentwicklung und Validierung der Fraktionierten Filtration ist eine repräsentative Probenahme einzelner Fraktionen mit manuellem Betrieb nur bedingt möglich.

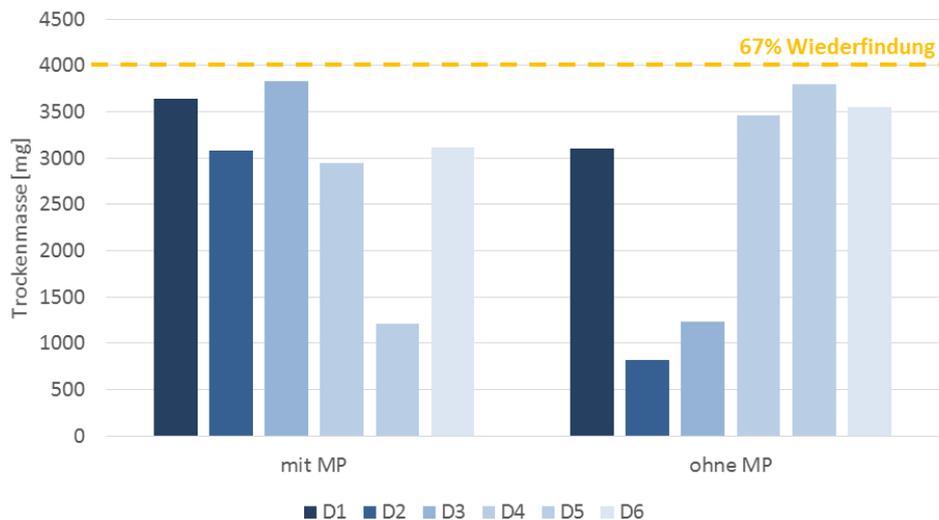


Abbildung 6: Wiederfindungsraten der verschiedenen Versuche mit künstlichem Abwasser und PE/PS-Zusatz

Bei den Versuchen mit PE und PS wurden auch Wiederfindungen der Polymere untersucht. Tabelle 2 zeigt die Wiederfindungsraten in den unterschiedlichen Größenfraktionen. Sowohl der PE- als auch der PS-Gehalt in der kleinsten Fraktion liegen deutlich über dem erwarteten Wert. In den Fraktionen ab 50 µm liegt der PE Gehalt unter dem erwarteten Gehalt, der gemessene PS Gehalt bei 50–100 µm deutlich über und bei > 100 µm unter dem erwarteten Gehalt. Bezogen auf die Gesamtmassen bei PE und PS zeigt sich, dass die Wiederfindungsraten von PE etwas unter dem erwarteten Wert liegt (81 %) und die Wiederfindungsrate von PS etwas über dem erwarteten Wert (110 %).

Hier ist zu berücksichtigen, dass die unterschiedlichen Fraktionen (wegen der oben beschriebenen Effekte durch möglicherweise blockierte Poren) kleinere Partikel in größeren Fraktionen und somit nicht die erwarteten Gehalte aufweisen. In weiteren Versuchen zeigte sich, dass dieser Effekt durch Rühren im Filter bzw. kontinuierliches Abspülen des Filters minimiert werden kann.

Tabelle 2: Polymerspezifische Wiederfindungsraten in den unterschiedlichen Größenfraktionen

Größenfraktion	>100 µm		50–100 µm		20–50 µm		Summe	
	PE	PS	PE	PS	PE	PS	PE	PS
Erwarteter Gehalt [mg]	17,4	58,9	15,9	1,0	21,6	0,1	54,9	60,0
Gemessener Gehalt [mg]	13,2 ± 2,1	53,7 ± 2,4	10,8 ± 2,8	9,2 ± 1,0	24,8 ± 11,3	3,2 ± 0,7	48,8 ± 5,4	66,2 ± 1,4

2.2.2 Kontinuierliche Probenahme mittels Sedimentationskasten (UBA)

Sedimentationskästen werden seit langem für die Beprobung von suspendierten Feststoffen im Bereich Gewässer eingesetzt. Das in den Versuchen verwendete Modell entspricht dem Sedimentationskasten, der auch in der Umweltprobenbank des Bundes eingesetzt wird (Umweltprobenbank 2017).

Der Laborversuch mit einer Partikeldispersion in Wassern und dem Sedimentationskasten (Abbildung 7) hatte eine Versuchsdauer von zwei Wochen. Zu Beginn wurden die gleichen bekannten Bestandteile organischer und mineralischer Substanz zugegeben. Nach einer Woche wurden 6 g der Substanz nachdotiert. Der Sedimentationskasten wurde mittels Pumpe im kontinuierlichen Kreislaufbetrieb gefahren. Die beiden Probenahme-Techniken sind dementsprechend nur bedingt miteinander zu vergleichen. Der Inhalt des Sedimentationskastens wurde nach der Beendigung des Versuches fraktioniert filtriert.

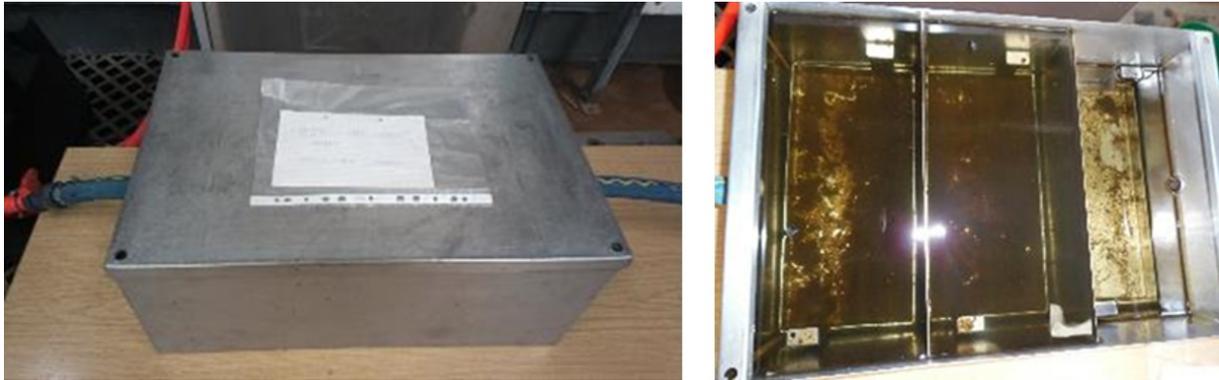


Abbildung 7: Sedimentationskasten

Die Massen der Feststoffe aus dem Sedimentationskasten sind in Abbildung 8 dargestellt. Der Großteil der sedimentierten Stoffe wird im 100 μm Sieb zurückgehalten (rund 70 %) und unterscheidet sich so deutlich von der Fraktionierten Filtration (FF: Großteil im 20 μm Sieb). In den anderen Fraktionen finden sich rund 30 % der Trockenmasse. Durch die höheren Auf- bzw. Absinkgeschwindigkeiten größerer Partikel (im Vergleich zu kleineren) kann eine Verschiebung in den größeren μm -Bereich erklärt werden. Allerdings wären in diesem Fall weitergehende Partikelgrößenanalysen wichtig, um die Ergebnisse weiter zu verifizieren.

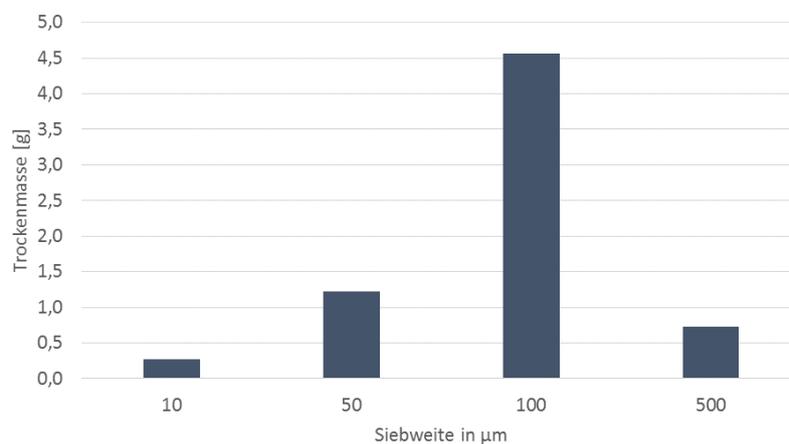


Abbildung 8: Gewonnene Trockenmasse in den unterschiedlichen Sieben

2.2.3 Beprobung mittels Fraktionierter Filtration und Sedimentationskasten

In Vorversuchen im Labormaßstab wurde die prinzipielle Eignung der o.g. Probenahme-Technik analysiert. Die Techniken wurden anschließend zur Beprobung von Umweltmatrices eingesetzt.

2.2.3.1 Beprobungen des Klarlaufs der Kläranlage Ruhleben

Die Kläranlage Ruhleben ist eine von sechs Berliner Kläranlagen und behandelt rund ein Drittel des anfallenden Abwassers. Der Klarlauf der Kläranlage Ruhleben wurde im August und November 2016 beprobt. Dabei wurde 1 m^3 Klarlauf über die Siebe (500, 100 und 50 μm) der Fraktionierten Filtration

gegeben. Zusätzlich wurden zu Beginn und am Ende der Probenahme die abfiltrierbaren Stoffe (AFS) bestimmt. Abbildung 9 zeigt, dass der Klarlauf Feststoffgehalte zwischen 1 mg/L und 6 mg/L aufweist, die während der ca. zweistündigen Probenahme ein teilweise deutlich anderes Gehaltsniveau erreichten. Diese Veränderungen lassen sich auf die Unterschiede im Zulauf während des Tagesganges zurückführen.

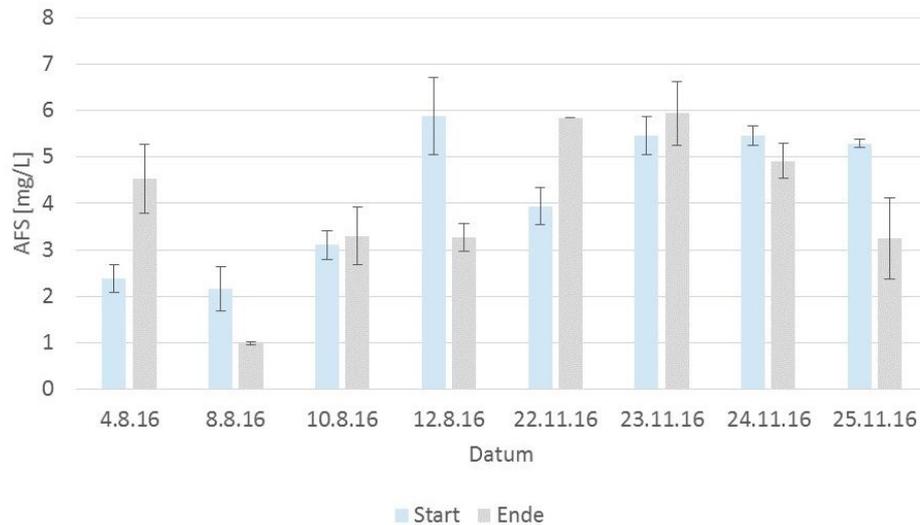


Abbildung 9: Start- und End-AFS an den Probenahmetagen

In Abbildung 10 sind die gewonnenen Trockenmassen in den einzelnen Fraktionen und die theoretische Wiederfindungsrate dargestellt. Die Wiederfindungsrate wurde mit den in Abbildung 8 dargestellten AFS Werten berechnet und stellt damit eine erste Annäherung der Wiederfindung der Feststoffe dar. Darüber hinaus werden Partikel (auch Fasern etc.), die das 50 µm Sieb passieren, nicht in die Berechnung der Wiederfindungsraten einbezogen. Durch die hier durchgeführte Fraktionierte Filtration können demnach zwischen 43 % und 90 % der abfiltrierbaren Stoffe zurückgehalten werden. Deutliche Unterschiede zeigen sich zwischen den einzelnen Tagen aber auch zwischen der Beprobung im Sommer und im Winterhalbjahr.

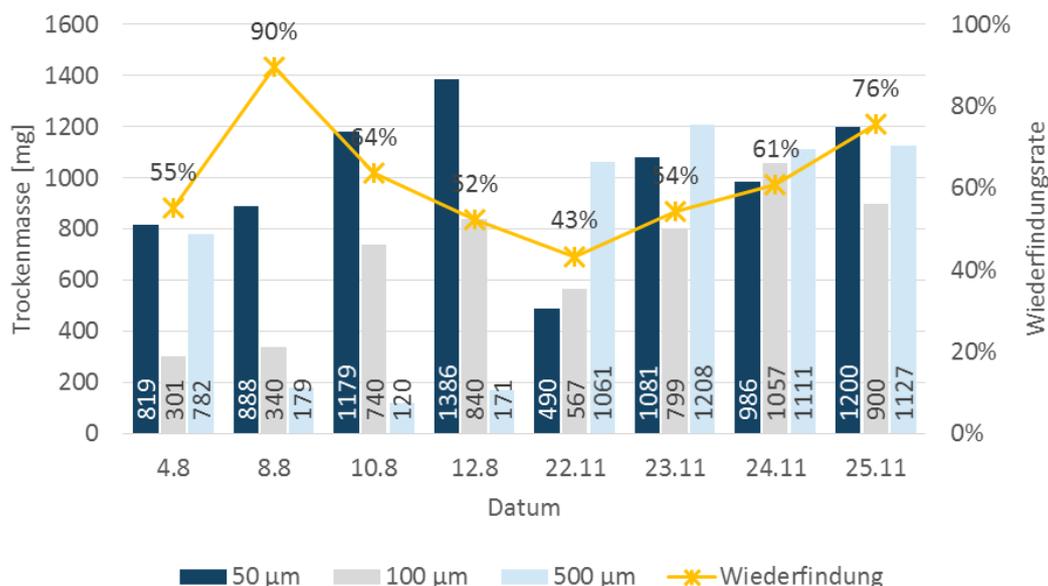


Abbildung 10: Gewonnene Trockenmassen an den unterschiedlichen Tagen in den jeweiligen Fraktionen

Die Trockenmassen in den unterschiedlichen Fraktionen sind vor allem im August ausgeprägter, während sie vom 23.11–25.11 ähnlich sind. Zwischen August und November zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Fraktion größer 500 µm. Im Mittel liegt die gewonnene Trockenmasse im November mit 1.127 mg rund 4-mal über der gewonnenen Trockenmasse im August (Mittelwert: 313 mg).

2.2.3.2 Beprobungen des Teltowkanals

Der südlich in Berlin verlaufende Teltowkanal wurde mit unterschiedlichen Probenahme-Techniken beprobt. Neben der Fraktionierten Filtration erfolgte eine Beprobung mit Hilfe des Sedimentationskastens. Im Juli und November 2017 sowie im April 2018 wurde im Rahmen umfangreicher Probenahme-Kampagnen die Fraktionierte Filtration am Teltowkanal eingesetzt. Dabei wurden jeweils 1 m³ des Wassers über Siebe mit den Siebweiten 500, 100 und 50 µm gegeben. Abbildung 11 zeigt die gewonnenen Massen an den unterschiedlichen Probenahmetagen. Am 25.04.2018 ist sowohl in der 50 µm als auch in der 100 µm Fraktion deutlich weniger Masse, in der 500 µm Fraktion deutlich mehr. Der 20.07.2017 und der 14.11.2018 haben in der 100 µm und 500 µm Fraktion ähnliche Massen, unterscheiden sich allerdings in der 50 µm Fraktion deutlich.

Die Ergebnisse der Fraktionierten Filtration zeigen, dass die Feststoffgehalte voneinander abweichen. Die Abweichungen zeigen sich sowohl in den einzelnen Fraktionen als auch in Bezug auf die Gesamtmassen. Sie liegen größenordnungsmäßig im gleichen Bereich. Die Unterschiede können zunächst durch die unterschiedlichen Tage bedingt sein. Ein Einfluss der manuellen Filtration ist jedoch nicht auszuschließen.

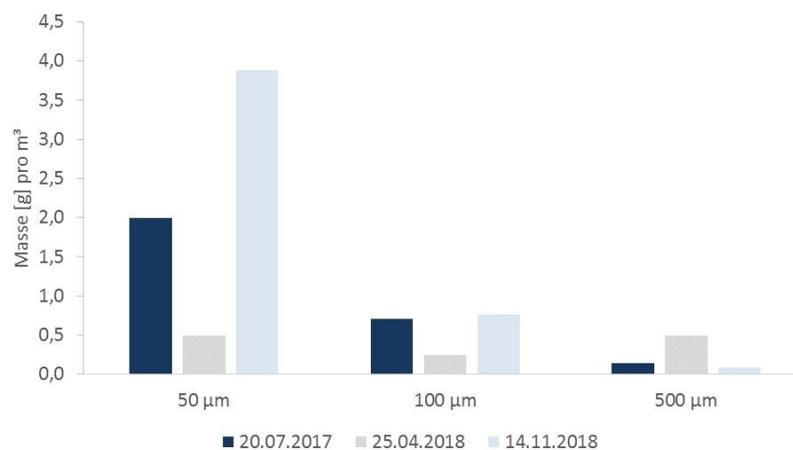


Abbildung 11: Gewonnene Massen in den jeweiligen Sieben an unterschiedlichen Probenahmetagen

Am Teltowkanal fanden außerdem Probenahmen mit den Sedimentationskästen statt. Hier wurde ein Modell mit Pumpenbetrieb und ein Modell mit freier Durchströmung im Gewässer untersucht. Die Untersuchungen fanden an und in der Messstation des Landes Brandenburg in Höhe des Kanalkilometers 6,7 statt. Zum Einhängen des Sedimentationskastens in den Kanal (SK Kanal) wurde ein Poller genutzt. Der Sedimentationskasten wurde in 50 cm Tiefe der Wassersäule mittels Metallketten fixiert. Ein weiterer Sedimentationskasten wurde in der Messstation (SK Messstation) an den regulären Pumpenstrom der kontinuierlichen Parametermessung angeschlossen. Der Durchfluss wurde auf 9 Liter pro Minute eingestellt. Die Verweilzeit beider Sedimentationskästen betrug 14 Tage.

Abbildung 12 zeigt die Massen der gewonnenen Feststoffe der beiden Sedimentationskästen, deren Inhalt anschließend im Labor einer fraktionierten Filtration über die bekannten Siebfraktionen unterzogen wurde. Es zeigen sich Unterschiede zwischen den beiden Versuchsansätzen sowohl innerhalb der Fraktionen als auch in Bezug auf die Gesamtmassen zwischen den Tagen. Insbesondere für die

Fraktion über 500 μm zeigen sich deutliche Unterschiede. Diese Unterschiede sind aufgrund der durchgeführten Einzeluntersuchungen nicht ohne weiteres zu interpretieren. Eine Ursache dafür kann abweichendes Strömungsverhalten innerhalb der Sedimentationskästen durch unterschiedlichen Betrieb (frei durchströmt/Pumpenbetrieb) sein. Auch Unterschiede während der manuellen Filtration können dafür verantwortlich sein.

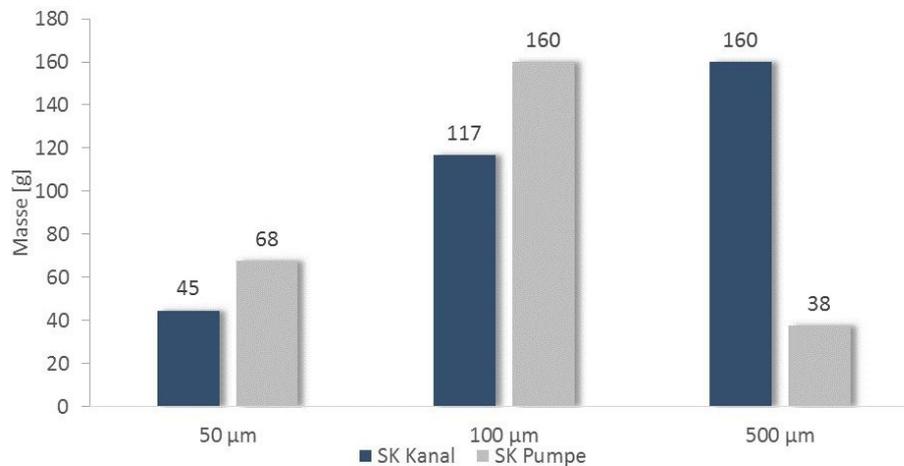


Abbildung 12: Sedimentierte Massen [g] aus den Sedimentationskästen

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass sowohl die fraktionierte Filtration, als auch der Einsatz des Sedimentationskastens für die Beprobung von suspendierten Partikeln aus verschiedenen Wässern (Klarlauf einer Kläranlage, Oberflächengewässer) mit unterschiedlichen Gehalten suspendierter Partikel geeignet ist.

Mit diesen Verfahren kann die Entnahme von Stichproben als auch eine integrative Beprobung über längere Zeiträume durchgeführt werden. Die Inhalte der Sedimentationskästen konnten ohne weiteres im Labor fraktioniert filtriert werden. Die Fraktionierte Filtration verhindert weitgehend eine Filterkuchenbildung (wobei Teilporenschlüsse nicht auszuschließen sind) und erlaubt somit eine zumindest grobe Klassierung der suspendierten Feststoffe aus verschiedenen Wässern. Beide Verfahren sind jedoch weiter zu entwickeln. Insbesondere die manuelle Filtration führt absehbar zu Unterschieden der gewonnenen suspendierten Feststoffe in den verschiedenen Siebfraktionen. Weiterführende Untersuchungen sind auch hinsichtlich der Ermittlung repräsentativer Probenvolumina in Bezug auf das Vorkommen von Mikroplastikpartikeln durchzuführen.

2.2.4 Mehrstufige fraktionierende Filterkaskade (TZW)

Im Gegensatz zu anthropogenen organischen Spurenstoffen sind MP-Partikel in der Wasserphase inhomogen verteilt und in geringen Konzentrationen vorhanden, sodass eine repräsentative Probenahme ein entsprechend größeres Probenvolumen voraussetzt. Im Rahmen von MiWa wurde am TZW eine mehrstufige fraktionierende Filterkaskade (siehe Abbildung 13) entwickelt und validiert. Unter Verwendung dieser Filterkaskade können große Wasservolumen von mehreren Kubikmetern, zur Anreicherung von MP-Partikel mit einem Durchmesser $> 5 \mu\text{m}$, beprobt werden. Dies war zu Beginn des Verbundprojekts MiWa in der Form nicht realisierbar.

Bei der Probenahme mittels Filtration werden alle Partikel mit einem größeren Durchmesser als die verwendete Filtersieb-Maschenweite auf dem Filtersieb zurückgehalten. In einer Filterkaskade werden mehrere immer engmaschiger werdende Filtersiebe in Reihe geschaltet (siehe Abbildung 13). Dadurch werden die in der Wasserphase befindlichen Partikel bereits während der Probenahme entsprechend ihres Durchmessers fraktioniert und die Ausbildung von Filterkuchen sowie die komplette Zusetzung der Filtersiebe verzögert.

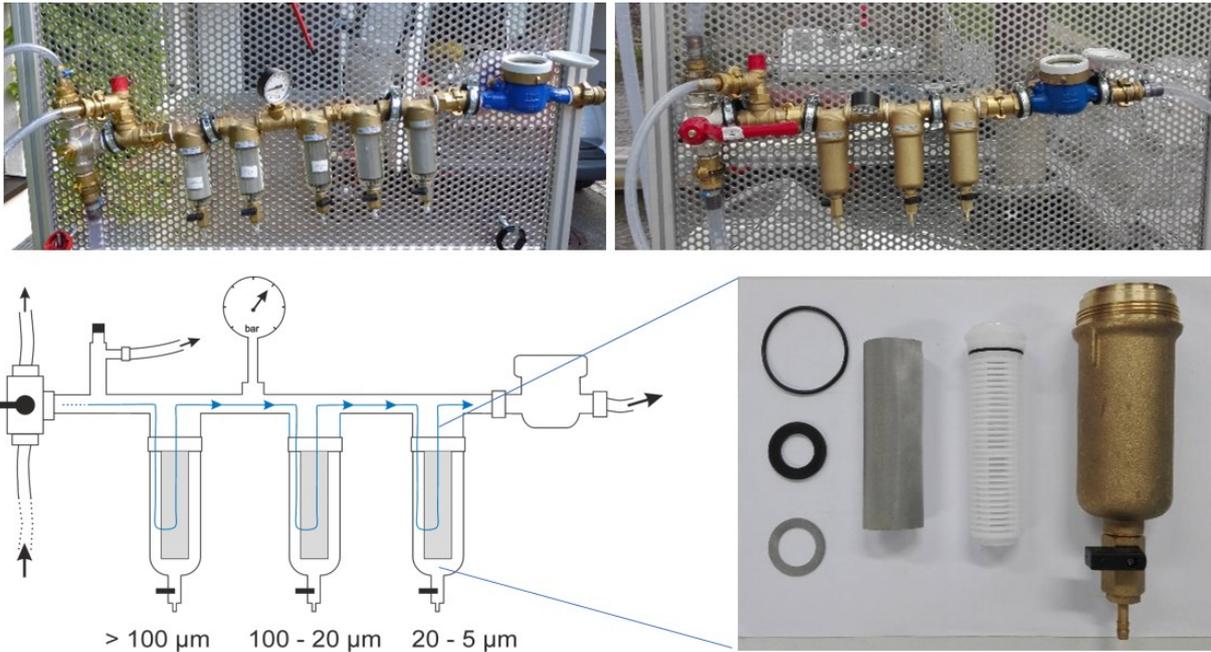


Abbildung 13: Fraktionierende Filterkaskade mit fünf Filterkerzen (links oben), optimierte Filterkaskade mit drei Filterkerzen (rechts oben), Schema der optimierten Filterkaskade (links unten) sowie Edelstahlfiltersieb, POM-Stützkörper und Messing-Filterkerzengehäuse (rechts unten)

Die Filterkaskade wurde im Verlauf des Projekts mehrfach mit Blick auf die Anforderungen der Probenahmedurchführung, der Analytik mittels Raman-Mikrospektroskopie und der Blindwertvermeidung optimiert. Die erste erfolgreich im Projekt eingesetzte Filterkaskade enthielt fünf Filterkerzen (Mini-Plus-FF06-3/4AAM, Honeywell, Mosbach, Deutschland) bestehend aus je einem Polyoxymethylen (POM)-Stützkörper und einem abnehmbaren Edelstahlfiltersieb, mit den absteigenden Maschenweiten 100, 50, 20, 10 und 5 µm. Die Filterkerzen sind in entsprechenden Filterkerzengehäusen verbaut. Zu Beginn wurden Filterkerzengehäuse aus durchsichtigem Trogamid, einem modifizierten Polyamid, verwendet. Auf diese Weise konnten die Filterkerzen während der ersten Probenahme visuell überwacht werden. Durch Abrieb, z. B. beim Ausbau der Filterkerzen, wurden vermehrt Trogamid-Blindwerte beobachtet, welche zwar spektroskopisch eindeutig von anderen Polyamiden unterschieden werden können, aber unerwünscht sind. Der Austausch von Trogamid- durch Messing-Filterkerzengehäuse führte zur erfolgreichen Eliminierung der Trogamid-Blindwerte. Die Reduktion der Filterkerzenanzahl von fünf auf drei führte zu einer Beschleunigung der Analytik ohne Informationsverlust, da sich die Teilprobenanzahl reduzierte. Am TZW haben sich die Maschenweiten 100, 20 und 5 µm, unter Berücksichtigung der im Raman-Mikrospektrometer verbauten Objektive, etabliert.

Die Filtersiebe werden von der Rolf Körner GmbH (Niederzier, Deutschland) bezogen. Die 20 und 5 µm Filtersiebe sind auf einer Edelstahl-Stützsicht aus 250 µm Maschengewebe angebracht. Als eine Weiterentwicklung der Filtersiebe werden diese speziell konisch gefertigt und an der Kopfnah verschweißt, um die leicht konische Form der POM-Stützkörper zu berücksichtigen und eine optimale Dichtigkeit der Filterkaskade zu gewährleisten. Die Filtersiebe sind aus Köpertressengewebe gefertigt. Die Maschenweiten lassen sich je nach Fragestellung variieren, indem entsprechend andere Filtersiebe in die Filterkaskade eingesetzt werden. Zur Überprüfung des Drucks ist in jede Kaskade ein Manometer eingebaut. Die Enden der Filterkaskade waren zunächst mit drehbaren GeKa-Kupplungen versehen, zur einfacheren Handhabung sind diese durch frei drehbare und justierbare GEKA-Schnellkupplungen ausgetauscht worden.

Unmittelbar vor der Filterkaskade ist ein Dreiwegehahn sowie ein Überdruckventil eingebaut um zu gewährleisten, dass der Druck innerhalb der Filterkaskade 3 bar nicht übersteigt. Hinter der Filterkaskade ist zur Überprüfung des durchfließenden Wasservolumens ein MNK-Flügelradwasserzähler (Q3; ZENNER, Saarbrücken, Deutschland) angebracht. Abgehend vom Dreiwegehahn, dem Überdruckventil und nach der Wasseruhr befindet sich jeweils ein Polyvinylchlorid (PVC)-Ablaufschlauch. Während der Probenahme wird die Filterkaskade, z. B. mit Hilfe von Fahrradständern, stabilisiert und aufrecht gelagert. Eine aufrechte Lagerung der Filterkaskade sowie der Wasseruhr ist notwendig um einen möglichst gleichmäßigen Fluss durch die Filterkaskade sowie eine korrekte Messung des filtrierten Wasservolumens zu gewährleisten. Zudem ist beim Aufbau der Filterkaskade darauf zu achten, dass diese mit dem hinteren Ende in Fließrichtung leicht erhöht befestigt wird um ein schnelleres Entweichen der sich in der Filterkaskade befindlichen Luft zu ermöglichen. Dieser Aufbau wird sowohl bei der Probenahme in Oberflächengewässern als auch in Trinkwasserwerken verwendet und zusammen mit der Filterkaskade im Folgenden als Probenahme-Apparatur bezeichnet.

Zur Validierung wurde die Filterkaskade in einen Trinkwasserprüfstand nach DIN-Norm (EN 13443-1) eingebaut und eine Suspension mit Referenzpartikeln unterschiedlicher Polymersorten sowie Größe (Polyethylen (PE): 5–220 µm, Polymethylmethacrylat (PMMA): 5–85 µm und 5–250 µm, PVC: 5–220 µm; bereitgestellt von Goodfellow, Hamburg, Deutschland) über die Filterkaskade filtriert. Das Experiment wurde im Triplikate durchgeführt und erzielte eine mittlere Gesamtwiederfindung von 81 %. Die Gesamtwiederfindung deckt die Probenahme, die Partikelextraktion und Überführung auf den Analysenfilter (siehe Abschnitt 3.1.3) sowie die Raman mikrospektroskopische Messung (siehe Abschnitt 4.2) ab. Ein hinter die Filterkaskade angeschlossenes Partikelzählgerät (LDS 1/1 Sensor 21467; Fa. Klotz, Bad Liebenzell, Deutschland, Partikel > 10 µm im Durchmesser detektierbar) wurde genutzt um zusätzlich die Dichtigkeit der Filterkaskade zu überprüfen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle Partikel > 10 µm erfolgreich von der Filterkaskade zurückgehalten werden.

Zur Blindwertvermeidung wird die Filterkaskade vor jeder Probenahme im Labor mit Reinstwasser (18,2 MΩ·cm, 0,2 µm filtriert, arium 611 UF system; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) unter Reinraumbedingungen in Laminar Flow Boxen (HEPA-H14 Reinraumklasse ISO 5; Thulab GmbH, Langgöns, Deutschland) gereinigt, zusammengebaut und die Enden luftdicht mit GEKA-Blindkupplungen verschlossen. In diesem geschlossenen Zustand wird die Filterkaskade ins Feld transportiert und dort unter Minimierung der Expositionszeit an der Umgebungsluft in den restlichen Probenahme-Aufbau eingebunden. Nach der Probenahme wird die Filterkaskade in geschlossenem Zustand ins Labor zurück transportiert und erst wieder unter den Laminar Flow Boxen geöffnet. Auf diese Weise wird eine Kontamination der Filterkaskade auf ein Minimum reduziert. Zusätzlich zu dieser Maßnahme wurde sukzessive die Erfassung eines Prozessblindwerts eingeführt, welcher alle Blindwerte in der Prozesskette berücksichtigt (siehe Abschnitt 2.2.4). Darüber hinaus wurden alle im Labor verwendeten sowie in der Filterkaskade verbauten Materialien mittels Raman-Mikrospektroskopie eingemessen und der Analysendatenbank hinzugefügt. Die verwendeten PVC-Schläuche wurden hinsichtlich ihrer Partikelfreisetzung untersucht, wobei kein Abrieb feststellbar war.

2.2.4.1 Allgemeines und Durchführung

Zur Förderung von Wasservolumen zwischen 0,2 m³ und 1 m³ Rohwasser aus Oberflächengewässern wird eine leistungsfähige Flügelrad-Tauchpumpe (MP1, Eijkelkamp Soil & Water, EM Giesbeek, 1,3 kW, maximale Installationstiefe 90 m) verwendet. Die MP1 ist aus Edelstahl gefertigt und wird mit einem Frequenzwandler betrieben. Zudem kann mit ihrer Hilfe eine Probenahme aus mehreren Metern Höhe erfolgen, sodass auch Probenahmen in schlecht zugänglichen Bereichen oder von Brücken aus (siehe Abbildung 14) durchgeführt werden können. Die Pumpe ist der Probenahme-Apparatur vorgeschaltet und wird über einen PVC-Schlauch mittels GeKa-Kupplungen an den Dreiwegehahn der Probenahme-Apparatur angeschlossen und mittels Hanf-Seil gesichert.

Die Eintauchtiefe der MP1 muss für jedes Oberflächengewässer individuell festgelegt werden, dabei ist auf die minimal erforderliche Gewässertiefe von ca. 30 cm unterhalb der Pumpe zu achten. Mittels Seilen und Schwimmvorrichtungen kann die Fixierung der MP1 in einer konstanten Tiefe gewährleistet werden (siehe Abbildung 14).

Zu Beginn einer Probennahme werden alle der Filterkaskade vorgeschalteten Schläuche sowie der Dreiwegehahn für mindestens 10 Minuten mit dem zu beprobenden Wasser gespült. Die eigentliche Probenahme wird durch langsames Umlegen des Dreiwegehahns gestartet und zunächst mit geringem Fördervolumen die Luft aus der Filterkaskade gespült. Anschließend wird die Pumpenleistung erhöht bis zu einem Druck von maximal 3 bar am Manometer. Während der Probenahme wird regelmäßig die Dichtigkeit des gesamten Aufbaus sowie der Druck und Durchfluss überwacht. Durch Ausbildung eines Filterkuchens kommt es im Laufe der Probenahme zu einer Druckerhöhung. Erreicht der Druck die 3 bar Grenze, wird die Förderrate reduziert und die Probenahme bis zu einem Durchfluss von ca. 3 L/min fortgesetzt.

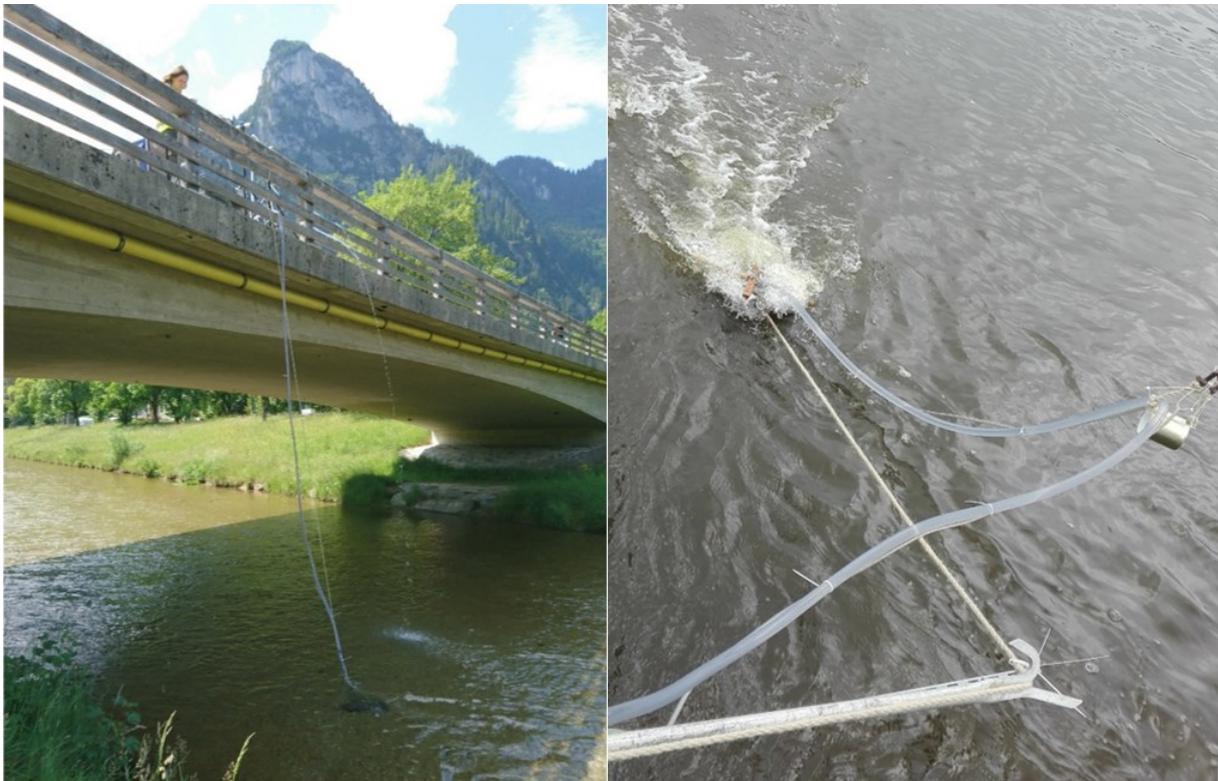


Abbildung 14: Beprobung von einer Brücke aus (links) und Befestigung der MP1 mit Schwimmvorrichtung bei Probenahme vom Schiff aus

2.2.4.2 Probenahme-Kampagnen

Eine erste orientierende Serie an Probenahmen wurde vom 08.–11.09.2015 auf dem Zürichsee bei Zürich, Schweiz, mit der fünfstufigen Filterkaskade durchgeführt. Der See wurde vom Boot aus in verschiedenen Tiefen beprobt (0,5 m, 9 m, 20 m und 30 m). Die Probe aus 30 m Tiefe wurde direkt über einen Auslass im Wasserwerk der Wasserversorgung Zürich entnommen, in einer Edelstahlwanne gesammelt und anschließend das Rohwasser von dort über die Filterkaskade gepumpt. Bei Zusetzen der 10 µm und 5 µm Filterkerzen, wurden diese aus der Filterkaskade entfernt und die Probenahme weitergeführt. Dies war nicht bei allen Probenahme-Tiefen nötig. Insgesamt wurde je Probenahme-Tiefe ein Volumen zwischen 213 L und 1023 L beprobt.

Im Sommer 2017 wurde im Rahmen der **Elbschwimmstaffel** erstmalig die Elbe an sechs Stellen entlang ihres Längsgradienten zwischen Bad Schandau und Geesthacht über eine Strecke von 538 km, unter

Verwendung der optimierten Filterkaskade mit drei Filterkerzen und Messing-Filterkerzengehäuse, beprobt. Die ersten vier Probenahmestellen wurden von Stegen oder Anlegern aus beprobt, während die letzten beiden Probenahmen von Bord des Forschungsschiffs MS Elbegrund aus beprobt wurden. Somit fokussierten sich die ersten vier Probenahmestellen auf die Uferseiten und die letzten beiden Probenahmestellen auf die Flussmitte. Das Rohwasser der Elbe beinhaltet viele Störstoffe (Trübung ca. 5 FNU), wie beispielsweise Kieselalgen, Grünalgen, Sediment. Während einer durchschnittlichen Probenahme-Dauer von 2–3 Stunden wurde an den verschiedenen Probenahmestellen ein Volumen von 250 L bis 400 L beprobt.

Die Elbschwimmstaffel 2017 wurde als Aktion des Bundesministeriums für Bildung und Forschung im Rahmen des „Wissenschaftsjahr 2016*17 – Meere und Ozeane“ (BMBF 2017) durchgeführt.

2.2.5 Probenahme mit schwimmenden Netzen (UFZ)

Für die Untersuchung zum Eintrag von MP in Flüssen im urbanen Raum wurde der Fluss Parthe in Leipzig an zwei Stellen beprobt. Ein Probenahmepunkt (P1) lag oberhalb des Stadtgebiets und war von ländlicher Nutzung geprägt. Der zweite Probenahmepunkt (P2) lag im Stadtgebiet Leipzig ca. 700 m vor der Mündung der Parthe in die Weiße Elster und war von einer urbanen Umgebung geprägt. Die Probenahme wurde mit stationären schwimmenden Netzen mit einer Maschenweite von 500 x 500 µm und einer Öffnungsweite von 30 x 30 cm durchgeführt. Die Eintauchtiefe der Netze betrug 20 cm, die Probenahme erfolgte über 24 h an zehn verschiedenen Tagen in den Jahren 2016 und 2017. Bei der Probenahme wurden jeweils über 340 m³ beprobt. In den gesammelten Proben wurden die MP-Mengen bestimmt.

2.3 Grund- und Trinkwasser (TZW)

2.3.1 Allgemeines und Durchführung

Ein Schwerpunkt im MiWa-Projekt lag auf der Untersuchung der Effizienz verschiedener Aufbereitungsschritte in Trinkwasseraufbereitungsanlagen in Hinblick auf die MP-Entfernung. Bei den entsprechenden, umfangreichen Probenahmen in Grund- und Trinkwässern wurde die Probenahme-Apparatur zur fraktionierenden Filtration eingesetzt.

Bei Probenahmen von Trinkwässern direkt nach der Aufbereitung im Wasserwerk wird ein PVC-Schlauch an einen Auslass der Trinkwasserhauptleitung mittels GeKa-Kupplung angeschlossen und über den Dreiwegehahn mit der Filterkaskade gekoppelt. Zunächst wird der PVC-Schlauch für 15 Minuten gespült und die Probenahme durch Umlegen des Dreiwegehahns gestartet. Wie auch bei der Probenahme in Oberflächengewässern wird die leicht nach oben geneigte Filterkaskade zunächst langsam mit dem Wasser durchströmt. Sobald die gesamte Luft aus der Filterkaskade entwichen ist, wird der Durchfluss erhöht. Der Maximaldruck von 3 bar am Manometer wird bei Probenahmen von Trinkwässern nur sehr selten und nur bei hohen Leitungsdrücken (ca. > 7 bar) erreicht, da ein Zusetzen der Filterkerzen durch die geringe Partikelfracht im Trinkwasser vernachlässigbar gering ist. Bei Trink- und Grundwässern kann mit dem hier beschriebenen Aufbau problemlos ein größeres Wasservolumen (bis zu 20 m³) beprobt werden. Die Durchflussgeschwindigkeit hängt dabei stark vom anliegenden Leitungsdruck ab.

2.3.2 Einführung des Prozessblindwerts

Im Verlauf des Projekts zeigte sich, dass die Vermeidung von Blindwerten sowie die Ermittlung eines Prozessblindwerts essentiell für die Erhebung belastbarer Daten sind.

Darum wird seit der Umstellung auf die optimierte Filterkaskade für jede Trinkwasserprobenahme ein Prozessbildwert mitgeführt. Dies wird durch Nachschaltung einer weiteren Filterkaskade an die Probenahme-Apparatur realisiert (siehe Abbildung 15). Die Probenahme-Filterkaskade fungiert dabei als Vorfilter, sodass nur Partikel < 5 µm in die Blindwert-Filterkaskade gelangen. Die Blindwert-Filterkaskade wird von der Reinigung im Labor über die Probenahme und Aufbereitung bis hin zur Analyse identisch zur Probenahme-Filterkaskade behandelt. Die MP-Partikel-Befunde der Probe werden mit den zugehörigen Blindwert-Befunden abgeglichen.



Abbildung 15: Trinkwasserprobenahme mit fraktionierender Filterkaskade (links) und Prozessblindwert (rechts)

Tabelle 3: Zusammenstellung der durchgeführten Trinkwasser-Probenahme

		Rohwasser- quelle	Probenahmestelle	Filtriertes Volumen in m ³	Probenahme- datum
Fünfstufige Filter- kaskade	Hauswasseran- schluss	Grundwasser	Nach Leitungsnetz	7,2	17.04.2017
	DWTP 1	Grundwasser	Eingang Wasserwerk	2,5	06.09.2016
	DWTP 1	Grundwasser	Ausgang Wasserwerk	10,1	06.09.2016
Optimierte Filterkaskade	Hauswasseran- schluss	Grundwasser	Nach Leitungsnetz	1,3	14.11.2017
	DWTP 2	Grundwasser	Ausgang Wasserwerk	13,7	24.01.2018
	WV A	Stausee	Ausgang Wasserwerk	3,1	10.07.2018
	WV B	Stausee	Ausgang Wasserwerk	5,7	26.06.2018
	WV C	Grundwasser	Ausgang Wasserwerk	1,0	14.08.2018
	WV D	Grundwasser	Ausgang Wasserwerk	1,3	24.01.2018
	WV E	Fließgewässer	Ausgang Wasserwerk	1,1	06.08.2018
WV F	Fließgewässer	Ausgang Wasserwerk	3,1	17.07.2018	

2.3.3 Probenahme-Kampagnen

Das TZW hat im Rahmen von MiWa deutschlandweit sechs Trinkwasserwerke beprobt (siehe Tabelle 3). Die Probennahmen wurden direkt im Wasserwerk durchgeführt. Die Wahl der Trinkwasserwerke wurde unter Berücksichtigung unterschiedlicher Rohwasserquellen vorgenommen. So wurden Trinkwässer untersucht, die aus Grundwasser, Talsperren/Stauseen sowie dem Uferfiltrat von Flüssen gewonnen werden. Zudem wurden in zwei Wasserwerken auch nach der Sandfiltration Proben genommen. Mit der fünfstufigen Filterkaskade wurde ein Grundwasser sowie das daraus gewonnene Trinkwasser untersucht.

3 Probenbehandlung und -aufbereitung

3.1 Behandlung für spektroskopische Verfahren

3.1.1 Vermeidung von Kontaminationen (TUM)

Alle eingesetzten Gerätschaften werden in einem Ultraschallbad mit Reinstwasser und 0,01 % Novachem Surfactant 100 (Postnova Analytics GmbH, DE) für 30 min gereinigt. Anschließend werden die Gerätschaften mit fusselfreien Tüchern (Thorlabs GmbH, DE) getrocknet und in eine Laminar-Flow-Box (Reinraumklasse ISO 5 nach ISO 14644-1, Spetec GmbH, DE) überführt.

Wo möglich, sind Gerätschaften aus Kunststoff durch Glas- oder Metall-Gerätschaften zu ersetzen. Ist letzteres nicht möglich, ist auf Polymere auszuweichen, die sehr selten eingesetzt werden, sodass ein Antreffen in der Umwelt als unwahrscheinlich erachtet werden kann, oder auf Polymere wie Naturkautschuk auszuweichen. So wird beispielsweise anstelle der in „normalen“ Laboren verwendeten PE-Spritzflasche eine aus den Fluorpolymeren FEP (Fluorethylenpropylen, Vorratsgefäß) und ETFE (Ethylen-Tetrafluorethylen-Copolymer, Steigrohr und Schraubverschluss) hergestellte Spritzflasche (Carl Roth GmbH, DE) verwendet.

3.1.1.1 Erkennen von Kontaminationen

Zur Erkennung von Kontaminationen wurde ein 2-stufiges Vorgehen entwickelt, dass aus Einzel-Techniken der Reinraum- und der forensischen Forschung adaptiert wurde.

Im ersten Schritt des 2-stufigen Verfahrens werden mittels einer UV-/Weißlicht-Taschenlampe (Nitecore, CU6), die UV-Licht mit einer Maximalleistung von 3 000 mW bei 365 nm emittiert und eine 440 Lumen CREE XP-G2 LED für die Weißlichtbeleuchtung besitzt, schnell und unkompliziert Kontaminationen an z. B. Glas-Equipment sichtbar gemacht. Unter UV-Beleuchtung heben sich alle Partikel, die fluoreszieren vom Hintergrund ab und sind so leichter zu erkennen. Mit Weißlicht werden Kontaminationen sichtbar gemacht in dem die zu untersuchende Oberfläche unter einem sehr kleinen Einfallswinkel, sprich im Streiflicht, bestrahlt wird. Dies ist am Beispiel eines frischen Objektglaträgers im Vergleich zur UV-Licht-Beleuchtung gezeigt (Abbildung 16). Die Beleuchtung mit Weißlicht im Streiflicht erscheint noch effizienter und macht die Kontamination auf demselben Objektträger besser sichtbar.

Mit diesem ersten Schritt kann der Erfolg von Reinigungsschritten unmittelbar bewertet und gegebenenfalls nachgereinigt werden. Der große Vorteil ist hier die Unmittelbarkeit des Ergebnisses. Es ist nicht notwendig auf einen meist deutlich zeitintensiveren analytischen Prozessblindwert zu warten. Eine Kontamination durch die gereinigte Oberfläche kann sofort ausgeschlossen werden. Dies wiederum hilft bei der Bewertung von parallel laufenden und nachträglich ausgewerteten Prozessblindwerten. Die optische Erkennung von Kontaminationen auf Oberflächen kann die Blindwertbestimmungen allerdings zukünftig nicht ersetzen.

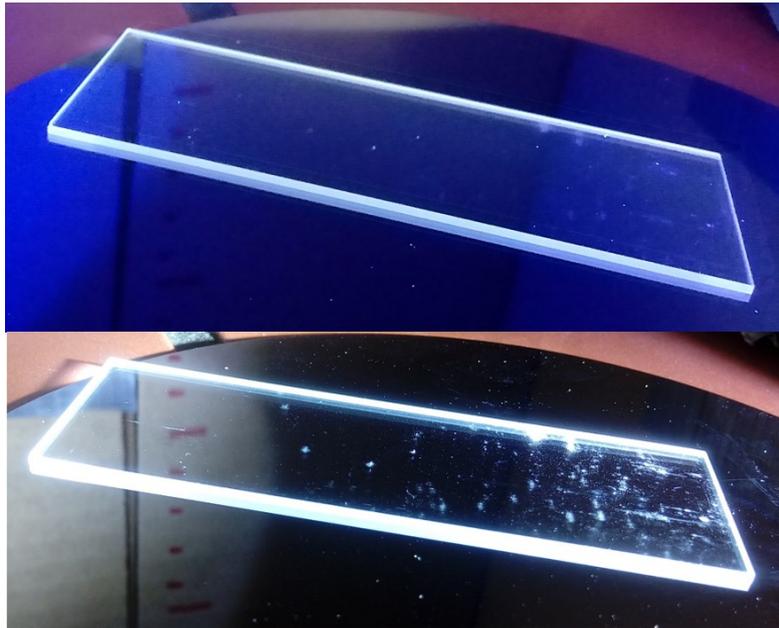


Abbildung 16: Frischer Objektträger unter UV-Beleuchtung (oben) und Weißlicht-Beleuchtung im Streiflicht (unten)

Für den zweiten Schritt wurde das sogenannte Tape Lifting (De Wael et al. 2008) oder Tape Lift Screening (Woodall et al. 2015) optimiert und weiterentwickelt. Bei diesem Verfahren wird ein Klebestreifen auf die zu untersuchende Oberfläche appliziert, wieder abgezogen, auf einen Glasträger geklebt und anschließend Raman-mikrospektroskopisch analysiert. Der große Vorteil dieser Methode ist die zielgenaue Oberflächenanalyse, die durch die Kombination mit der Raman-Mikrospektroskopie auch eine qualitative Beurteilung der Kontamination ermöglicht.

Für das Tape Lift Screening wurden 4 Kriterien definiert, anhand derer acht verschiedene Klebebänder verglichen wurde. Die Kriterien waren wie folgt:

Partikelsichtbarkeit: Klebebänder werden kategorisiert

- + Klebeband kann ohne Einschränkung genutzt werden
- 0 Klebeband kann eingeschränkt genutzt werden – leichte Blasenbildung oder wenige Klebereste auf Glasträger
- Klebeband ist ungeeignet – starke Blasenbildung oder Klebereste auf Glasträger

Partikelaufnahme und -wiederfindung: Aufnahme einer bestimmten Zahl von MP-Partikel, Zahl der Partikel vorher und nachher auf der Oberfläche bzw. Klebeband wird verglichen

Klebedauerhaftigkeit: Partikelaufnahme und -Wiederfindungstest nach vorherigem 10-maligem Auf- und Abkleben des Klebebandes auf einer sauberen Oberfläche

Spektraler Hintergrund des Klebebands: Aufnahme von Spektren des Tapes und Kategorisierung

- + Klebeband zeigt kein Raman-Signal
- 0 Klebeband zeigt Raman-Signal, aber Analyt-Banden sind noch erkennbar
- Klebeband zeigt Raman-Signal, das Analyt-Banden überdeckt

Die Ergebnisse der Evaluierung verschiedener Klebebänder sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Ergebnisse der Klebebänder-Evaluierung anhand der Bewertungskriterien Partikelsichtbarkeit (Partikelsicht.), Partikelaufnahme, Klebedauerhaftigkeit (Klebedauerhaft.) und spektraler Hintergrund

Klebeband	Typ	Partikel-sicht.	Partikel-aufnahme	Klebe-dau-erhaft.	Spektraler Hintergrund
tesa® Malerband PERFECT	Malerkrepp, Washi-Papier	-	0	0	0
Papiervlies KM 975	Doppelseitig, Papier	-	0	0	0
Tesa extra Power® Universal	Gaffer-Tape	-	0	0	0
Eigenmarke klebe-shop24.de KS 283-T-19	Transparentes Tape	0	0	0	PVC
3M 4828	Transparentes Tape	+	0.26 ± 0.13 (n = 3)	0.45 ± 0.18 (n = 3)	PE
Eigenmarke klebe-shop24.de KS 29-T-12	Transparentes Tape	+	0.50 ± 0.50 (n = 3)	0.50 ± 0.44 (n = 3)	PP
tesafilm® TRANSPARENT	Transparentes Tape	+	0.57 ± 0.42 (n = 3)	0.73 ± 0.25 (n = 4)	PP
Shurtape J-LAR®	Transparentes Tape	+	0.78 ± 0.26 (n = 3)	0.96 ± 0.06 (n = 3)	PP

Alle nicht transparenten Klebebänder zeigen deutliche Schwächen bei der Partikelsichtbarkeit. Dies ist unter anderem auf Klebereste, die sich vom Trägermaterial lösen und an der beprobten Oberfläche zurückbleiben, zurückzuführen. Dies ist in der folgenden Raman-mikrospektroskopischen Analyse ein Problem, da die so induzierten Löcher auf dem Klebeband als Partikel missinterpretiert werden. Besonders geeignet scheinen daher transparente Klebebänder zu sein, denen allerdings allen gemein ist, auf einem Polymer-basiertem Substrat aufgebaut zu sein. Dies bedeutet, dass diese Polymere nur schwer bis gar nicht mit diesen Klebebändern zu identifizieren sind. Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass ein optimales Klebeband bisher nicht gefunden wurde, dass z. B. das Shurtape von J-LAR® jedoch ausreichend gute Eigenschaften aufweist, um eingesetzt zu werden. Der Objektträger muß gereinigt werden, da er durch den Kontakt mit dem Klebeband vermutlich kontaminiert wird.

3.1.1.2 Entfernen von Kontaminationen

Gegenwärtig wird folgendes Reinigungsschema am IWC-TUM eingesetzt: Alle eingesetzten Gerätschaften werden in einem Ultraschallbad, das mit einer 0,01 %-igen Novachem SF 100-Lösung (Postnova Analytics GmbH) gefüllt ist, für 30 Minuten gereinigt. Novachem SF 100 (Postnova Analytics GmbH)

wird vor dem Einsatz über einen 0,2 µm Spritzenfilter gereinigt. Die nassen Glasgeräte werden mit fussel-freien Tüchern getrocknet und sauber gerieben. Die Glasgeräte werden mit einer UV/Weißlicht-Taschenlampe auf noch vorhandene Verunreinigungen getestet und gegebenenfalls mit einem fussel-freien Tuch nachgereinigt.

3.1.2 Raman-Spektroskopie (TUM)

3.1.2.1 (Mini-) Microplastic Sediment Separator (MPSS)

Für die Probenaufbereitung wurde am IWC-TUM der Munich Microplastic Sediment Separator (MPSS) entwickelt (Imhof et al. 2012). Dieser kann mit Proben bis zu ca. 6 L befüllt werden. Im Rahmen des Projektes MiWa wurde aufbauend auf der Probenkammer des MPSS eine miniaturisierte Version entwickelt (mini-MPSS, Abbildung 17).

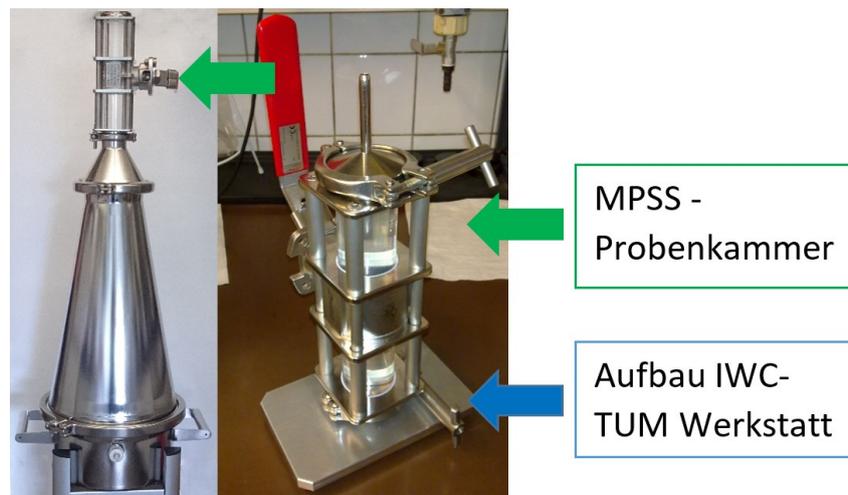


Abbildung 17: MicroPlastic Sediment Separator (Fa. Hydro-Bios Apparatebau GmbH) (links) und mini-MPSS zur Dichttrennung kleiner Probenvolumina (rechts)

Diese kann mit Proben bis zu einem Volumen von ca. 50 mL befüllt werden. Der Nachteil der geringeren Füllmenge wird durch die geringere Aufstiegsstrecke ausgeglichen. Wie von Klöckner et al. (2019) beschrieben kann die Aufstiegszeit eines Partikels in der ZnCl₂-Lösung mit der aus der umgeformten Stokes-Gleichung erhaltenen Aufstiegs-geschwindigkeit v_p berechnet werden:

$$v_p = \frac{9}{2} \cdot \frac{r^2 \cdot g \cdot (\rho_p - \rho_f)}{\eta} \quad \text{Formel 1}$$

r ist hierbei der Radius der als Sphären angenommenen Partikel, g die Gravitationskonstante, ρ_p die Dichte der Partikel (z. B. 1 g·cm⁻³), ρ_f die Dichte des Trennfluids ZnCl₂ (1,6 g·cm⁻³) und η die dynamische Viskosität (10 mPa·s, als Abschätzung der Viskosität, die zwischen Wasser (1 mPa·s) und Olivenöl (100 mPa·s) liegt). Für die 17 cm der Probenkammer benötigen beispielsweise 3,06 µm große Partikel 19 Stunden, 10 µm große Partikel benötigen hingegen nur 1,8 Stunden. In diesem Zusammenhang sollte auch darauf hingewiesen werden, dass für den MPSS entsprechend längere Aufstiegszeiten eingeplant werden müssen. Um die lange Aufstiegszeit über die gesamte Länge des MPSS zu vermeiden ist es daher sinnvoll erst die ZnCl₂-Lösung vorzulegen und die Probe anschließend vorsichtig und in kleinen Portionen aufzugeben.

Im Rahmen verschiedener Experimente mit Polystyrol-Referenzpartikeln (bereitgestellt von der TU Berlin) wurde eine problematische morphologische Veränderung der Referenzpartikel bei der Aufarbeitung sowohl im MPSS als auch im mini-MPSS festgestellt. Die als Schüttung in den MPSS gegebenen

Partikel wurden letztlich als zusammenhängender Filterkuchen erhalten (Abbildung 18). Dadurch und durch das starke Auftreten von Fluoreszenz wurde eine sinnvolle Wiederfindungsbestimmung deutlich erschwert.

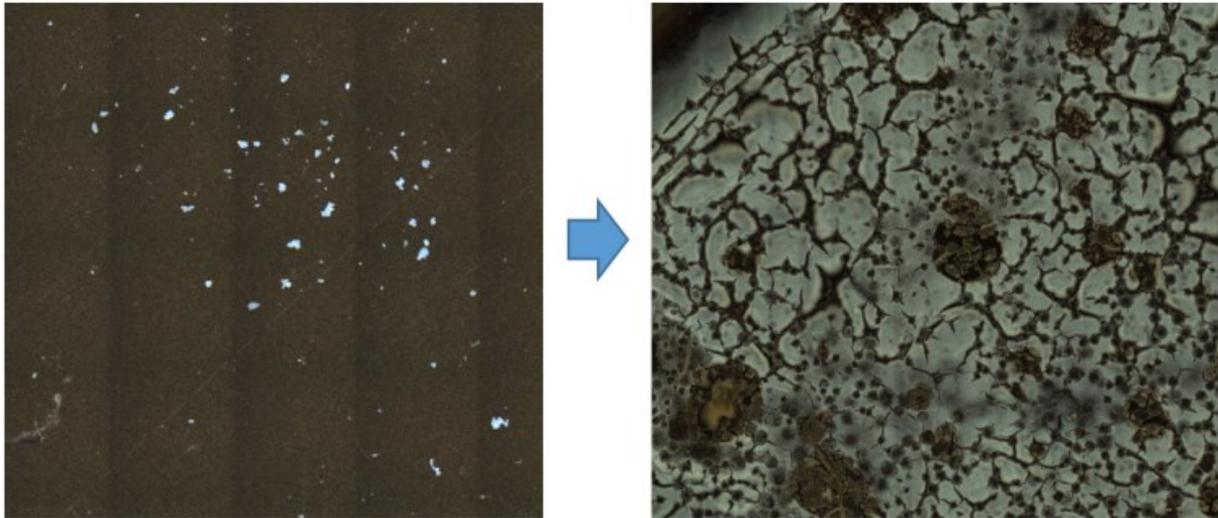


Abbildung 18: Veränderung der Polystyrol-Referenzpartikel (bereitgestellt von der TU Berlin) nach Aufarbeitung mit $ZnCl_2$ -Lösung

3.1.3 Raman-Spektroskopie (TZW)

Zur Blindwertvermeidung werden alle im Labor eingesetzten Glasgeräte, Filterkerzen sowie Edelstahl-Probenhalter vor Verwendung gespült, mittels dreifacher dreiminütiger Ultraschallextraktion (Elmasonic P 180 H, 100 % Stärke bei 37 kHz, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Deutschland) von eventuell anhaftenden Partikeln befreit und anschließend nochmals mit partikelfreiem Reinstwasser nachgespült (18,2 $M\Omega\cdot cm$, 0,2 μm filtriert, arium 611 UF System, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland; Partikelfreiheit wird regelmäßige durch Blindwertuntersuchungen überprüft). Chemikalien werden vor der Verwendung über Glasfaserfilter (1,2 μm Porenweite, VWR, Leuven, Belgien) filtriert. Zudem werden Laborkittel aus 100 %-Baumwolle getragen.

Nach erfolgreicher Probenahme werden die auf den Filtersiebenen angereicherten Partikel mittels Ultraschallextraktion von den Filtersiebenen extrahiert. Dafür wird die Filterkaskade in der Laminar Flow Box aufgehängt und die Abläufe der Filterkerzengehäuse nacheinander geöffnet, um das in der Filterkaskade befindliche Wasser ablaufen zu lassen. Die Filtersiebe werden in 250 ml Bechergläsern dreimal für je 3 Minuten im Ultraschallbad in Reinstwasser extrahiert. Bei Proben aus Oberflächengewässern werden die Extrakte der jeweiligen Partikelfraktion (5–20 μm , 20–100 μm und > 100 μm) in pyrolysierten und nachgereinigten Braunglasflaschen gesammelt und mit dem jeweiligen Filterkerzengehäuse-Ablauf vereinigt. Bei Grund- und Trinkwasserproben ist in der Regel kein weiterer Aufbereitungsschritt erforderlich, sodass die gesamten Extrakte der jeweiligen Partikelfraktion zusammen mit dem zugehörigen Filterkerzengehäuse-Ablauf (zusammengenommen bis zu 2 L) direkt mittels Vakuumfiltration auf den Polytetrafluorethylen (PTFE)-Filtermembran (1–2 μm , $\varnothing = 25$ mm, Pieper Filter, Bad Zwischenahn) filtriert und anschließend analysiert werden.

Auf den PTFE-Analysenfilter überführte Proben werden bis zur μ -Raman Messung in gereinigten Glas Petri Schalen aufbewahrt.

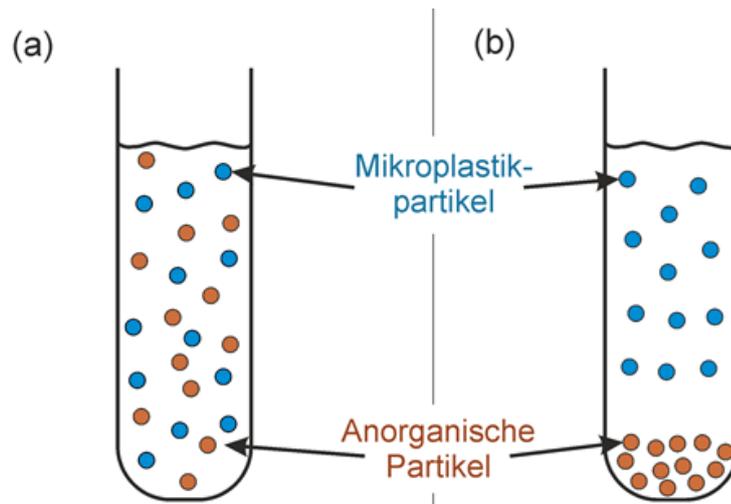


Abbildung 20: Schema der Verteilung von MP-Partikeln und anorganischen Partikeln in einem Zentrifugenglas (a) vor der Dichttrennung und (b) nach der Dichttrennung

3.1.3.4 Enzymatischer Verdau

Anhand der Elbe-Proben zeigt sich, dass die alleinige Aufbereitung der Organik mit Ozonstarkwasser nicht immer ausreichend ist um Proben mit einem hohen Gehalt an natürlichen, biogenen Partikeln entsprechend für die μ -Raman Analytik aufzubereiten. In den Proben der Elbe befanden sich primär Grün- und Braunalgen sowie ein großer Anteil Kieselalgen, sodass ein enzymatischer Verdau der Organik im Rahmen einer Masterarbeit (Müller 2018) optimiert wurde.

Beim enzymatischen Verdau wird die Probe zunächst mit Proteinase K ($w > 99\%$, Roth, Karlsruhe) zur Entfernung der Proteinschicht, welche die Alge umgibt, behandelt (4 Tage, 50°C). Anschließend erfolgt die Behandlung mit Cellulase (ASA enzymes, Wolfenbüttel) zum Auflösen der Celluloseschicht der Alge (7 Tage, 40°C). Die genauen Reaktions-Randbedingungen wie pH-Wert und Temperatur für den Einsatz des jeweiligen Enzyms können aus Müller (2018) entnommen werden. Die Methode führt zu einer deutlichen Reduktion der Algen auf dem Analysenfilter (siehe Abbildung 21).

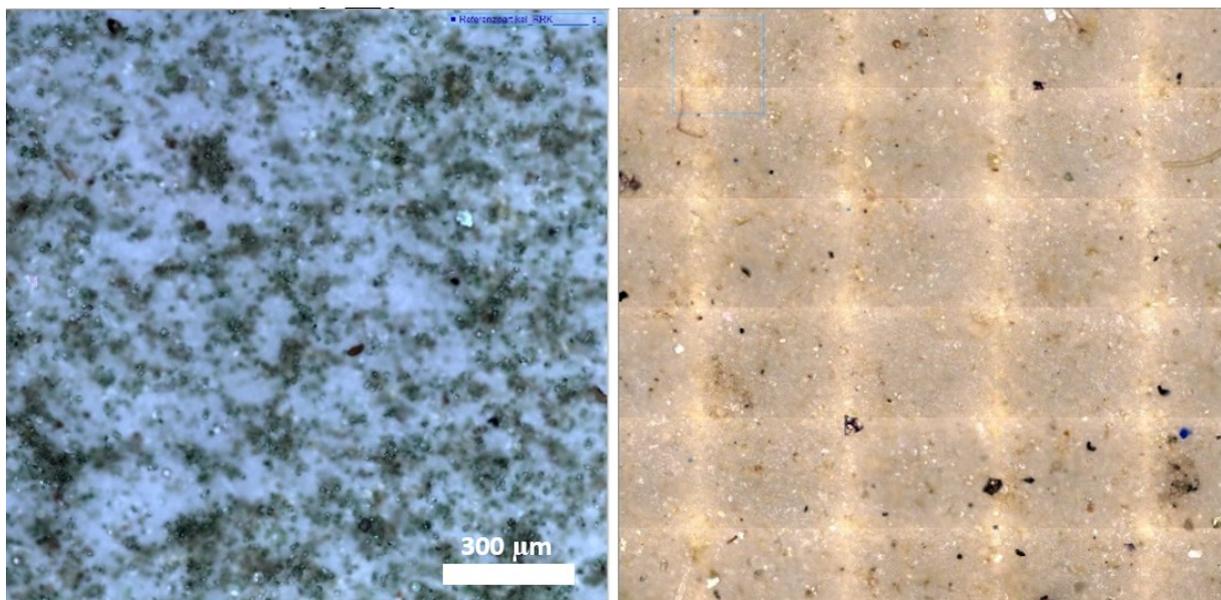


Abbildung 21: PTFE- Filterbelegung vor (links) und nach (rechts) der Enzym Behandlung

3.1.3.5 Sonderaufbereitung bei Trinkwasserproben: Eisen/Manganausfällungen

Primär bei Grund- und Trinkwasserproben kann es zu Eisen- und Manganausfällungen kommen, welche direkt auf dem PTFE-Analysenfilter mittels verdünnter Salzsäure (2,5 % bzw. 7,5 %; EMSURE, Merck, Darmstadt, Deutschland) und einer Expositionszeit von 30–90 Minuten, entfernt werden können.

Der Einsatz von schwach konzentrierter Salzsäure (2,5 %) wurde in Versuchen mit MP-Referenzpartikeln (PA, Polypropylen (PP), PE, Polyethylenterephthalat (PET)) überprüft. Es konnten keine Veränderungen in Gewicht, Oberflächenbeschaffenheit sowie den Raman-Spektren festgestellt werden.

3.1.4 Probenaufbereitung für FT-IR (HSF)

Zur Probenaufbereitung verwenden die spektroskopisch analysierenden Partner größtenteils eine Dichteseperation, um anorganische Probenbestandteile abzutrennen. In weiteren Schritten werden oxidative und saure Medien verwendet, um den Anteil störender Organik zu verringern sowie zur Reduktion der Partikelanzahlen also Messpunkte. Der homogene Übertrag auf Filter für anschließende Analysen stellt eine Herausforderung dar und ist im Weiteren aufgeführt. Der methodische Ansatz wird hier für wässrige Proben beschrieben, kann aber auch für feste Proben wie Sedimente oder Böden erweitert werden (Klein et al. 2015).

Mittels einer Standard-Dispersion der TU Berlin wurde die Wiederfindung (70 %) für die Messmethodik (Mikro-FT-IR) bestimmt. Anhand von Realproben der Elbschwimmstaffel wurde die Probenvorbereitung um eine Dichtentrennung mit Natriumchlorid-Lösung und eine oxidative Aufarbeitung mit einer Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid erweitert. Diese Probenvorbereitung zeigte eine vollständige Oxidation der organischen Matrix. Die Polymere mit höchster umweltrelevanter Abundanz (PE, PP, PS und PVC) konnten noch zweifelsfrei identifiziert werden.

3.2 Probenaufbereitung und Vorbehandlung für pyrolytische Verfahren (UBA)

Die Probenaufbereitung steht zwischen Probennahme und Detektion und ist das Mittel um die Probenso vorzubereiten, dass sie mit den verschiedenen Detektionsverfahren analysiert werden können. Die Probenaufbereitung richtet sich nach der zu untersuchenden Umweltmatrix (z. B. Qualität der natürlichen Begleitorganik, Anteile von anorganischen Stoffen), der zu untersuchenden Probenmenge, sowie der gewählten Detektionsmethode (Braun et al. 2018). Hier sind differenzierte Vorgehensweisen je nach Umweltprobe und Detektionsverfahren notwendig. Die im Rahmen des vorliegenden Projektes notwendige Probenaufbereitung fokussiert auf pyrolytische Verfahren (TED-GC/MS).

Die Probenaufbereitung beginnt mit dem Eintreffen der Proben ins Labor. Je nach Herkunft der Proben kann vor der Trocknung eine Hygienisierung notwendig sein. In Bezug auf die späteren Untersuchungen an der trockenen Probensubstanz müssen geeignete Maßnahmen zur Verhinderung von Infektionen getroffen werden – besonders bei Entnahme und Analyse von fäkalkontaminierten Proben. Dazu gehört auch behandeltes Abwasser aus Kläranlagen. Viele Mikroorganismen (Bakterien, Protozoen, sogar Helminthen-Eier) und Viren haben die Fähigkeit extreme Umweltbedingungen zu überleben und über einen längeren Zeitraum zu überdauern, um dann zu voller Aktivität zurückkehren zu können. Auch nach der biologischen Behandlung wird z. B. gereinigtes Abwasser noch eine große Anzahl potenziell pathogener Mikroorganismen und Viren enthalten, die durch Verschlucken oder Einatmen Infektionen verursachen können. Um dies zu verhindern erfolgt eine Wasserdampfsterilisation (Bannick et al. 2019).

Die konzentrierten Feststoffe aus den Wässern werden eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Dies ist ein sehr schonendes Trocknungsverfahren, bei dem davon auszugehen ist, dass die Kunst-

stoffe keiner weiteren Degradation unterliegen. In der Regel können suspendierte Feststoffe aus verschiedenen Wässern sofort nach der Trocknung und Homogenisierung mittels TED-GC/MS auf Kunststoffe untersucht werden. In bestimmten Fällen sind weitergehende Aufbereitungsschritte notwendig.

Zum einen kann es erforderlich sein, den Anteil der natürlichen Organik (postmortale organische Substanz) zu reduzieren. Diese Entfernung muss so schonend erfolgen, dass die in der Probe enthaltenen Kunststoffe in Bezug auf die spätere Detektion nicht nachteilig verändert oder gar zerstört werden. Um dies nachzuweisen wurden drei verschiedene Massenkunststoffe (PE, PA, PS) verschiedenen Oxidationsmitteln ausgesetzt und nach der Aufbereitung auf ihre Stabilität hin untersucht. Neben Wasserstoffperoxid in unterschiedlicher Konzentration, führt eine Behandlung der organischen Substanz mit schwachen Säuren und Laugen zu einer Reduktion des Organik-Anteils.

Der Erfolg der Reduktion der organischen Substanz hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab.

Dazu gehören insbesondere:

- die Art des Oxidationsmittels
- die Dauer der Behandlung (Reaktionszeit)
- die Konzentration des Oxidationsmittels
- die Menge und Typ der zu behandelnden Matrix, einschließlich katalytisch wirksamer Bestandteile
- die Temperatur
- die Abfolge verschiedener Behandlungsschritte

Auf Basis von Vorversuchen mit realen Umweltproben, wurden Konzentrationsbereiche und Wirkdauer der drei Reagentien H_2O_2 , HNO_3 und KOH ermittelt. Die Ergebnisse sind hier im Einzelnen nicht dargestellt. Hingewiesen werden soll jedoch auf den Umstand, dass es zu exothermen Reaktionen kommen kann, die zur starken Erwärmung der Probe führen.

Um die Wirkung der Oxidationsmittel auf die verschiedenen Polymere zu untersuchen, wurden verschiedene Konzentrationen und Einwirkzeiten (3, 6 und 24 h) getestet.

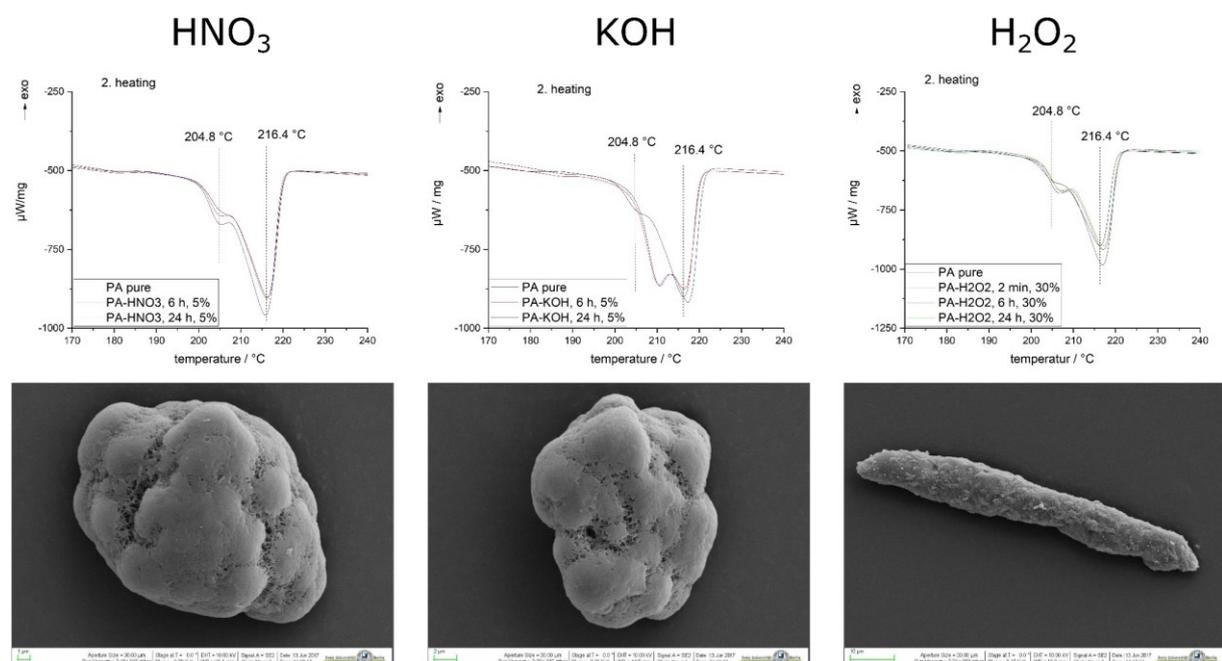


Abbildung 22: Ergebnisse der DSC-Messung und REM Aufnahmen von PA-Partikeln nach Einwirkung verschiedener Oxidationsmittel

Für die Versuche wurden jeweils 1 g Polymerpulver mit jeweils 100 mL Oxidationsmittel versetzt. Es erfolgte dann eine Entnahme eines Aliquots der jeweiligen Kunststoffe nach 3, 6 und 24 h. Da sich Polyamid in Vorversuchen als besonders labil erwiesen hatte, wurde hier noch eine sehr kurze Einwirkzeit von 2 Minuten geprüft. Die Veränderungen der Polymere wurden dann mit unterschiedlichen Nachweisverfahren überprüft. Hierbei wurden zunächst Proben mit langen Einwirkzeiten (24 und 6 h) sowie den höheren Konzentrationen der Oxidationsmittel betrachtet. Für Polyamid erfolgten Untersuchungen mit Differenzieller Scanning Kalorimetrie (DSC (Rodríguez Chialanza et al. 2018)) sowie dem Rasterelektronenmikroskop (REM). Der Nachweis von Veränderungen am Polystyrol erfolgte mittels Gel-Permeationschromatographie (GPC (Hintersteiner et al. 2015)). Mögliche Einwirkungen der Oxidationsmittel auf Polyethylen wurden mit IR-Spektroskopie vermessen. Im Folgenden sind die Ergebnisse dargestellt.

Die Ergebnisse in Abbildung 22 zeigen, dass für alle eingesetzten Agenzien eine Degradation der Polymerketten detektiert werden konnte. PA wird durch alle Oxidationsmittel chemisch verändert. Auch geringe Behandlungszeiten und Konzentrationen führen zu Veränderungen. Mittels REM Aufnahmen konnte bei H_2O_2 ein Einfluss auf die Partikelgröße und Form nachgewiesen werden.

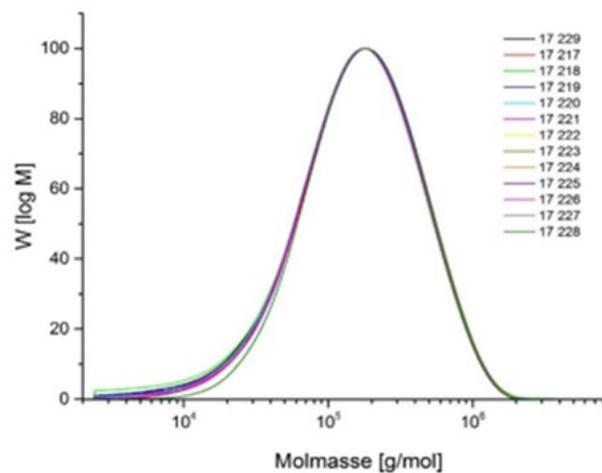


Abbildung 23: Ergebnisse der GPC-Messung an PS-Partikeln nach Einwirkung verschiedener Oxidationsmittel

Abbildung 23 zeigt, dass die Oxidationsmittel keinen Einfluss auf die Struktur des Polystyrols aufweisen.

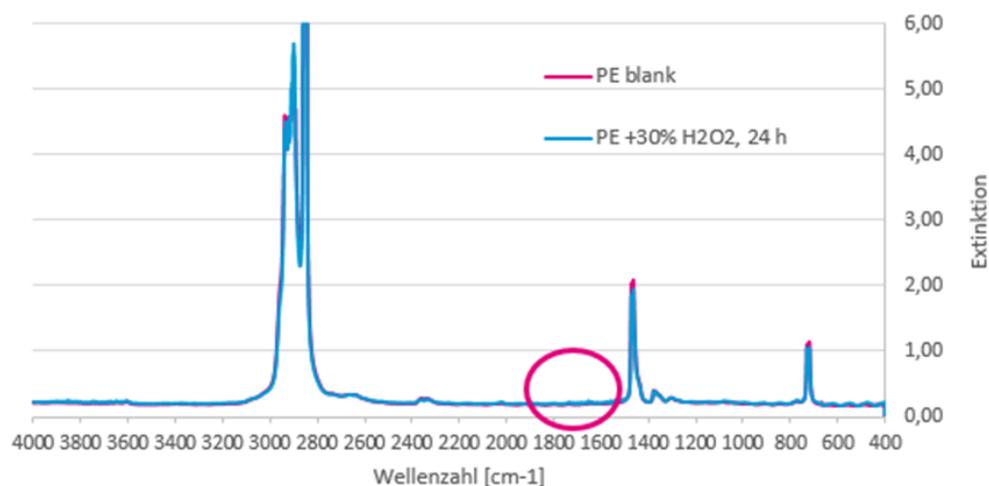


Abbildung 24: Ergebnisse der FTIR-Messung an PE-Partikeln nach Einwirkung verschiedener Oxidationsmittel

Ein Zeichen für die Degradation von PE ist das Auftreten von Carbonyl-Banden im Bereich der Wellenzahlen 1600–1800 cm^{-1} (Kappler et al. 2016). Im Vergleich des unbehandelten PE mit dem PE der höchsten H_2O_2 -Konzentration bei gleichzeitig längster Wirkdauer, konnten keine Carbonyl-Banden nachgewiesen werden (Abbildung 24). Insofern wird davon ausgegangen, dass die verwendeten Oxidationsmittel keinen Einfluss auf die Struktur des PE haben.

3.3 Aufbereitung für Elementanalysen (UFZ)

Die Untersuchung von Reifenabriebspartikeln in von Proben über ihre Elementzusammensetzung erfolgte nach Mikrowellensäureaufschluss in Lösung. Hierfür wurden die Plastikproben zunächst mit Reinstwasser gewaschen und anschließend mit einem Keramikmesser auf einer Glasplatte in ca. 1–2 mm große Stücke geschnitten. Anschließend erfolgte der Verdau in der Mikrowelle unter Verwendung von HNO_3 , H_2O_2 und HCl . Da die Reaktivität der Polymere sich stark unterscheidet, konnten nicht alle Polymere mit einer Methode aufgeschlossen werden. Deshalb wurden die Volumenverhältnisse der zugegebenen Säuren und Oxidationsmittel je nach Polymertyp angepasst. Für die Temperatur- und Druckregelung wurde auf vorgeschlagene Programme des Herstellers zurückgegriffen ($T_{\text{max}} = 240\text{ }^\circ\text{C}$, $p_{\text{max}} = 60\text{ bar}$). Neben dem Säureaufschluss wurde noch eine Veraschung in Sauerstoffatmosphäre unter Zuhilfenahme von Mikrowellen geprüft. Diese war für die untersuchten Plastiksarten erfolgreich, allerdings nicht für Gummi. Aufgrund des erhöhten Aufwands und einem geringen Probendurchsatz wurde weiterhin der Säureaufschluss verwendet.

Zur Untersuchung von Reifenabrieb aus partikulären Umweltproben war eine Anreicherung aus der Probenmatrix erforderlich. Hierzu wurde ein Verfahren zur Dichteseparation entwickelt. Neben der Dichteseparation im Becherglas sowie im Erlenmeyerkolben, welche vor allem wegen der Adsorption an der Glaswand beim Dekantieren ungeeignet waren, wurden die in Abbildung 25 schematisch dargestellten Verfahren geprüft. Für die Probenvorbereitung wurden die Proben zunächst auf eine Korngröße von unter 500 μm gesiebt.

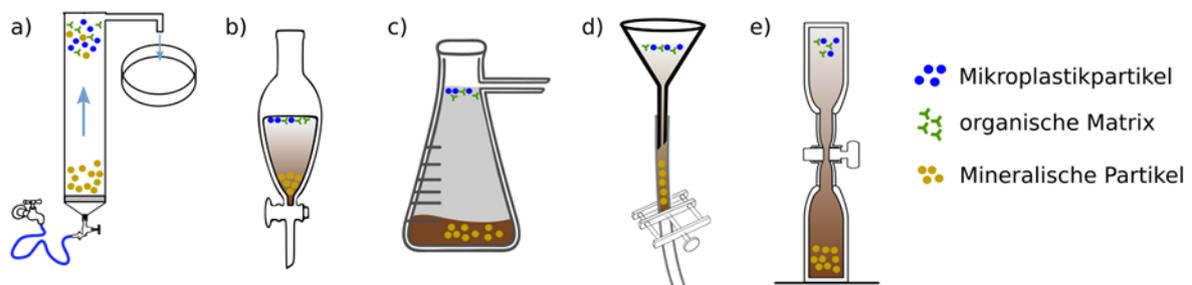


Abbildung 25: Geprüfte Verfahren zur Dichteseparation von Reifenabrieb aus partikulären Umweltproben. a) Wirbelbettreaktor nach Claessens et al. (2013), b) Separation im Scheidetrichter (z. B. (Löder et al. 2017)), c) Modifizierter Erlenmeyerkolben mit Auslass nach Klein et al. (2015), d) Trichter mit aufgestülptem Schlauch, welcher mit einer Schlauchklemme abgeklemmt ist, e) Eigenbau einer Separationseinheit aus Glas ähnlich einem kleinen MPSS (Imhof et al. 2012)

Diese geprüften Methoden waren aufgrund folgender Umstände nicht zufriedenstellend umsetzbar:

- Kontaminationsrisiko durch offenes System (a)
- beschränkte minimale Partikelgröße (a)
- schwer kontrollierbare Reinigung (a, b, e)
- Verstopfen der Gefäße (b, c, d)
- Adhäsion an Gefäßwand (b, c, d, e)
- Durchmischung der Probe nicht ausreichend (b, d, e)
- Turbulenz bei physischer Separation der aufgeschwemmten und sedimentierten Phasen (b, d)

Eine geeignete Methode wurde schließlich mit Hilfe eines Messkolbens und aufgestülpten Schlauchs entwickelt (Abbildung 26a). Diese Methode beruhte auf der schwerkraftbasierten Dichteseparation von Partikeln über einen Zeitraum von ca. 23 h. Hierfür wurden zunächst ca. 1–2 g der Probe im Messkolben in 10 mL der Schwerelösung Natriumpolywolframat (engl. sodium-polytungstate, SPT) mit einem Magnetrührer dispergiert (15 min). Anschließend wurde während des Rührens weitere SPT-Lösung hinzugegeben. Nach einer 10-minütigen Behandlung im Ultraschallbad wurde der Schlauch aufgesetzt und unter weiterem Rühren (15 min) SPT Lösung bis zu einer Gesamthöhe von ca. 16 cm aufgefüllt. Schließlich ruhten die Proben für 23 h. Die aufgeschwemmten Partikel konnten anschließend durch Abklemmen des Schlauches und Ausspülen der oberen Schlauchhälfte abfiltriert werden. Um Rückstände des SPT zu entfernen, wurde die Probe bei der Filtration mit Reinstwasser (Milli-Q) gespült.

Die Wiederfindung für diese Methode wurde auf verschiedene Weise geprüft:

- Durch Auszählen von groben Partikeln (300–1.000 μm), dotiert in Sand (90–250 μm)
- Durch Elementanalyse von dotierten Partikeln in Sand und Sediment
- Durch Bestimmung des SBR-Gehaltes mittels TED-GC/MS in der Gesamtprobe und der angereicherten Fraktion einer Realprobe

Für die Methodenentwicklung wurden Reifenpartikel (TP_{mix}) verwendet. TP_{mix} stammt aus einer Recyclinganlage für PKW-Reifen (PVP Triptis GmbH). Diese werden von Textil- und Drahtgeflecht befreit und anschließend vermahlen ($< 600 \mu\text{m}$). Mit TP_{mix} dotiert in Sand wurde durch Auszählen eine Wiederfindung von $99,0 \pm 2,0 \%$ bei einer Gesamtzahl von 20 Partikeln ermittelt ($n = 5$). Dies wurde auch mit PE Partikeln durchgeführt, wobei die Wiederfindung $87,0 \pm 6,2 \%$ ($n=3$) betrug. Die über die Elementanalyse (Zn) bestimmte Wiederfindung betrug zwischen 78–123 % bei dotierten TP_{mix} -Partikeln in Sediment aus dem Tegeler See (dotierte Konzentration 2–200 mg TP_{mix} /g (Klöckner et al. 2019)). Für dotierte TP_{mix} -Partikel dotiert in Sand betrug die Wiederfindung $90,0 \pm 2,7 \%$ ($n = 4$; Konzentrationen 20, 40, 100, 200 mg/g). Die Analyse einer Realprobe aus dem Absetzbecken in Berlin Halensee mittels TED-GC/MS ergab eine TRWP Anreicherung von $91,0 \pm 0,7 \%$ ($n=3$) in der aufgeschwemmten Fraktion im Vergleich zur Gesamtprobe bei einer Dichte der SPT-Lösung von $1,9 \text{ g/cm}^3$ (Klöckner et al. 2019).

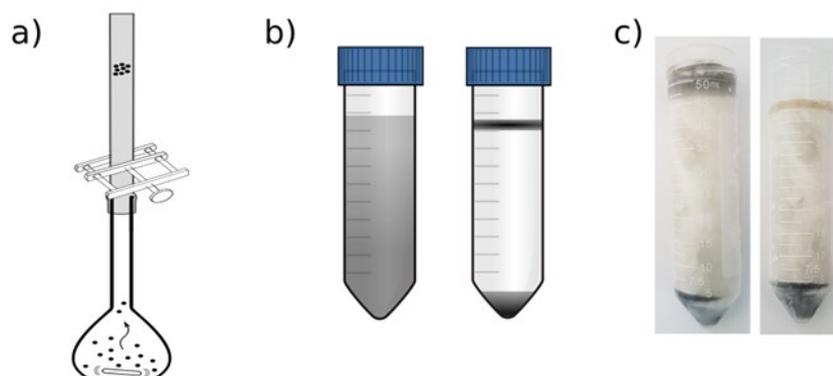


Abbildung 26: Methoden zur Dichteseparation von Reifenabrieb aus Umweltproben. Die Separation erfolgte schwerkraftbasiert (a) sowie mit Hilfe von Zentrifugation (b). Bei der Zentrifugation wurden die Phasen durch Einfrieren fixiert und die aufgeschwemmte Fraktion wurde mit Reinstwasser ausgespült (c)

Die Effektivität der Dichteseparation wurde zudem anhand von Berechnungen der Sedimentationsgeschwindigkeit verschiedener Partikel mit einer modifizierten Stokes Gleichung überprüft (Klöckner et al. 2019). Unter Annahme sphärischer Partikel mit einer Dichte von $1,80 \text{ g/cm}^3$ oder geringer und einer Größe von mindestens $10 \mu\text{m}$ kann von einer vollständigen Anreicherung in der aufgeschwemmten Fraktion ausgegangen werden (Dichte der SPT Lösung: $1,9 \text{ g/cm}^3$). Partikel mit einer Dichte größer der

Schwerflüssigkeit (min. $1,95 \text{ g/cm}^3$) und einer Größe $> 10 \text{ }\mu\text{m}$ setzen sich innerhalb der 23 h Separationsdauer ab. Partikel unter $10 \text{ }\mu\text{m}$ bleiben teilweise suspendiert und eine vollständige Anreicherung ist nicht möglich.

Eine wiederholte Durchführung der Dichteseparation zur Maximierung der TRWP Anreicherung wurde für nicht notwendig befunden: Bereits beim ersten Separationsvorgang wurden 95 % der in drei wiederholten Separationen angereicherten Masse entnommen.

Um die Präzision der Separation, die Reproduzierbarkeit, die Anreicherung von Partikeln $< 10 \text{ }\mu\text{m}$ sowie die benötigte Dauer der Aufbereitung zu optimieren wurde zudem eine auf Zentrifugation basierende Methode entwickelt (Abbildung 26b). Nach der Zentrifugation wurde die Probe eingefroren, um die aufgeschwemmte und abgesetzte Phase trennen zu können. Die aufgeschwemmte Fraktion (obere 5 mL) konnte nach Einfrieren nun mit Reinstwasser ausgespült und auf einem Cellulosenitrat-Filter ($1 \text{ }\mu\text{m}$) abgeschieden werden.

Für die Zentrifugationsmethode wurde ebenfalls die Mindestgröße der Partikel berechnet. Durch die hohe Zentrifugalkraft von $1952 \times g$ sollten mit dieser Methode Partikel einer Dichte von $1,80 \text{ g/cm}^3$ bis zu einer Mindestgröße von $1 \text{ }\mu\text{m}$ anzureichern sein (bei einer SPT-Dichte von $1,9 \text{ g/cm}^3$ und 15 min Zentrifugationsdauer).

Um Aggregation und Adsorption an die Gefäßwand der Partikel zu verhindern, wurde der Einsatz verschiedener Tenside in der SPT-Lösung geprüft (Zentrifugationsmethode). Drei gängige Tenside, Nova-Chem Surfactant 100, Tween 20 und Tween 80 wurden in einer Konzentration von 0,5 % (vol) in die SPT Lösung hinzugegeben. Bei keinem der Tenside wurde eine signifikante Änderung der Elementgehalte oder eine Veränderung der Partikelgrößenverteilung in der aufgeschwemmten Fraktion festgestellt. Zudem wurde nach ca. einer Woche das Entstehen von Flocken in der SPT Lösung beobachtet, welche auf die Tensidzugabe zurückzuführen waren. Dies könnte in dem für die Lagerung empfohlenen niedrigen pH-Wert von 3 der SPT-Lösung begründet sein. Eine Verwendung von Tensiden in SPT Lösung war daher nicht zielführend.

Die Analytik von Reifenabrieb beruhte auf der Quantifizierung von Zn in der aufgeschwemmten Fraktion (siehe Abschnitt 4.5). Um die Selektivität der Dichteseparationsmethode bezüglich anderer Zn-Spezies beurteilen zu können, wurden Sedimentproben aus dem Tegeler See dotiert. Die löslichen Zn-Spezies ZnSO_4 , ZnCl_2 und ZnO wurden in der SPT-Lösung gelöst und waren in der sedimentierten und aufgeschwemmten Fraktion jeweils nur in Gehalten $< 2 \%$ der dotierten Menge aufzufinden. ZnS ist schlecht löslich und 84 % der dotierten Menge wurde in der sedimentierten Fraktion gefunden. Ca. 11 % des dotierten ZnS waren in der aufgeschwemmten Fraktion enthalten, wohingegen die restlichen 5 % in Lösung gingen. Die gelösten Anteile wurden jeweils aus der Massenbilanz berechnet, da eine Analyse der SPT Lösung aufgrund der hohen Salzgehalte stark fehlerbehaftet war. Die Anwesenheit anderer Zn-Spezies scheint die Quantifizierung von TRWP in der aufgeschwemmten Fraktion also nicht stark zu beeinträchtigen, da lösliche Spezies in der SPT-Lösung gelöst werden, bereits gelöste Spezies mit der Filtration und mineralische Zn-Quellen mit der Sedimentation der Partikel entfernt werden.

Die Wiederfindung wurde in den Zentrifugenröhrchen mit PS Partikeln in einer Größe von $100\text{--}315 \text{ }\mu\text{m}$ bestimmt. Bei 20 hinzugegebenen Partikeln betrug die mittlere Wiederfindung $93 \pm 12 \%$. Eine zweistufige Separation von Proben wurde ebenfalls geprüft. Hierfür wurde die Probe zunächst mit einer gesättigten NaCl-Lösung (Dichte= $1,2 \text{ g/cm}^3$) separiert. Anschließend wurden die Fraktionen filtriert und die sedimentierte Fraktion wurde einer weiteren Dichteseparation bei Dichte $1,9 \text{ g/cm}^3$ unterzogen. Die resultierende Fraktion bestand somit aus Partikeln mit Dichte $1,2\text{--}1,9 \text{ g/cm}^3$. Für eine Probe aus dem Absetzbecken in Berlin Halensee wurde hiermit eine Reduktion des Zn-Gehalts der aufgeschwemmten Fraktion um $26 \pm 8 \%$ erreicht. Die zweistufige Separation wurde weiter angepasst für

eine Zielfraktion von 1,5–1,9 g/cm³. Die Wiederfindung der zweistufigen Dichteseparation wurde mit einer isolierten Fraktion des Halensee-Sediment geprüft, welche in Sediment aus dem Tegeler See dotiert wurde (10 mg/g). Über die Bestimmung des Zn-Gehalts in der Zielfraktion wurde eine mittlere Wiederfindung von 101 % bestimmt (n = 2), allerdings war im dritten Replikat der Hintergrundwert so groß, dass die Wiederfindung hier 0 % betrug. Die zweistufige Separation führte nur bei dem Sediment des Halensee-Systems zu einer maßgeblichen Verringerung der zu untersuchenden Masse. Bei den meisten Proben (z. B. Straßenkehrichtproben, Sedimente der Behandlungsanlage A38) war die aufgeschwemmte Fraktion schon bei einer einstufigen Separation sehr gering (< 10 %). Daher wurde die zweistufige Separation nicht für alle Proben umgesetzt.

Für die Elementanalyse mussten die vorbereiteten Proben noch aufgeschlossen werden. Dies erfolgte mittels Mikrowellensäureaufschluss. Ein vom Hersteller vorgeschlagenes Protokoll beinhaltete die Zugabe von 6 mL HNO₃ und 2 mL H₂O₂ (Methode A). Weitere geprüfte Verfahren waren die Zugabe von 5 mL HNO₃, 1 mL HCl und 1 mL H₂O₂ (Methode B) sowie die Verwendung von Königswasser (Methode C). Die Aufschlussmethoden wurden mit TP_{mix} geprüft. Bi, Co, Cu, Pb, Al, Ca, K, Na, S und Zn wurden mit allen Aufschlussmethoden ungefähr gleich gut erfasst - die relative Standardabweichung bei Sediment und TP_{mix} lag jeweils bei < 10 %. Aufschlussmethode B zeigte fast keinen Unterschied im Vergleich zu C, führte aber tendenziell zu geringeren Konzentrationen. Cr und Fe wurden mit Methode A besser aufgeschlossen als mit C. Dieser Unterschied war aber nur für Cr statistisch signifikant (zweiseitiger t-test; a = 0,05; abhängige Stichproben). Königswasser erzielte höhere Konzentrationen bei Ba, Sb, Sn, Si, Ti. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (zweiseitiger t-test; a = 0,05; abhängige Stichproben). Aufgrund der einfacheren Umsetzbarkeit und der größtenteils vergleichbaren Ergebnisse wurde bei weiteren Aufschlüssen auf die vom Hersteller vorgeschlagene Methode zurückgegriffen (Methode A).

Um eine alternative Fraktionierungsmethode zu prüfen, wurde die Feld-Fluss-Fraktionierung in einer rotierenden aufgewickelten Säule (RCC, rotating coiled column) auf die Anwendbarkeit für Proben aus dem Straßenraum untersucht. Dieses Verfahren wurde in der Literatur bereits für Straßenstaub angewandt (Fedotov et al. 2014). Zunächst wurden zwei Sorten PE-Partikel fraktioniert, um die Trennung nach Partikelgröße zu untersuchen. Auch wenn die Größenverteilungen in den Fraktionen nicht ganz mit den erwarteten Korngrößen der Partikel übereinstimmten (Abbildung 27) war das System geeignet, um Partikel gleicher Dichte nach Korngrößen zu fraktionieren.

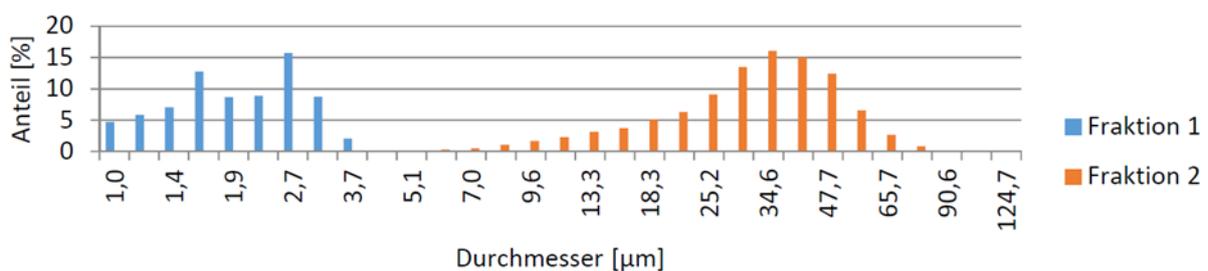


Abbildung 27: Dotierte Partikel waren PE Partikel (MPP-620VF, Micro Powders Inc., Tarrytown, NY, USA) mit einer Größe von 5–7 µm (max. 22 µm) sowie PE Partikel (MPP-1241 Micro Powders Inc., Tarrytown, NY, USA) mit einer Größe von 20–25 µm (max. 110 µm)

Eine Auftrennung der gleichen Partikel dotiert in Sand führte allerdings nicht zu einer effektiven Fraktionierung der Partikel (nicht gezeigt). Dies war auf die gleichzeitige Elution kleiner Partikel hoher Dichte mit größeren Partikeln geringerer Dichte zurückzuführen. Zudem war die Fraktionierung von Sediment aus dem Tegeler See nicht erfolgreich, da in jeder Fraktion eine breite Korngrößenverteilung aufzufinden war (Abbildung 28). Deshalb wurde die Fraktionierung mittels RCC im Projekt nicht weiterverfolgt.

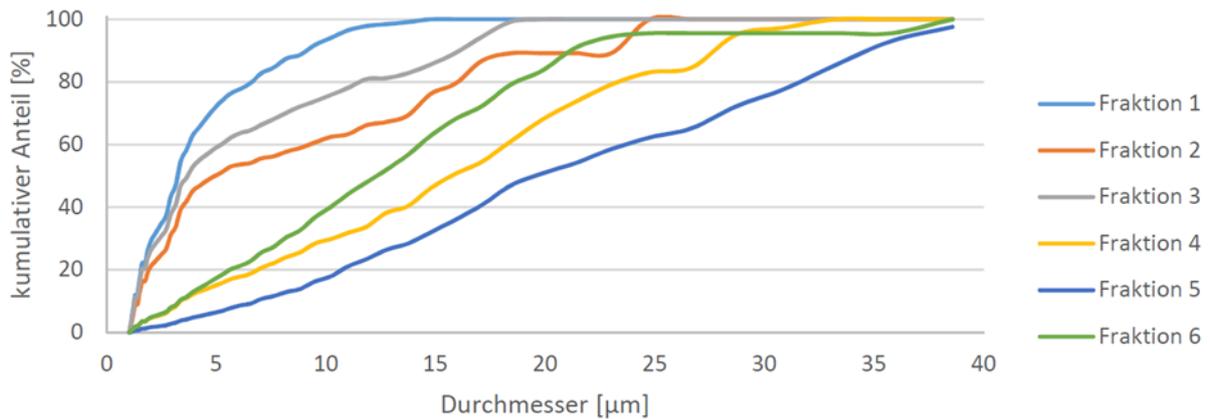


Abbildung 28: Kumulative Partikelvolumenverteilung einer Sedimentprobe aus dem Tegeler See (50 mg), fraktioniert bei 800 rpm mit einer Flussrate von 0.28 mL/min (Fraktion 1) bis 2.38 mL/min (Fraktion 6) über einen Zeitraum von 13 h

Für die Untersuchung mit bildgebenden Verfahren (LA-ICP-MS, LDI-TOF-MS) war eine Fixierung der Partikel auf einem Objektträger notwendig. Für die Analysen mussten die Partikel dauerhaft fixiert sein und sich weder im Vakuum noch unter Beschuss mit dem Laser lösen. Zudem sollten die Partikel nach Möglichkeit nicht auf der Oberseite mit dem Fixierungsmedium beschichtet werden. Hierfür wurden verschiedene Fixierungsmethoden geprüft. Die besten Ergebnisse wurden für LDI-TOF mit leitfähigem doppelseitigem Klebeband auf Indium-Zinn-Oxid Objektträgern erreicht (Abbildung 29), wohingegen für LA-ICP-MS Nagellack und TippEx besser geeignet waren. Sekundenkleber, Nagelkleber, Haarspray, Klarlack und Epoxidharz waren nicht geeignet.



Abbildung 29: Beispielfoto von fixierten Partikeln auf doppelseitigem und leitfähigem Klebeband

4 Analytik

4.1 Raman-Spektroskopie (TUM)

Am IWC-TUM wurde die Analytik von MP mittels Raman-Mikrospektroskopie (RM) weiterentwickelt. Zu Vor- und Nachteilen dieser Methode im Vergleich mit anderen Methoden wurde an anderer Stelle bereits ausführlich berichtet (Anger et al. 2018, Huppertsberg and Knepper 2018, Ivleva et al. 2017, Renner et al. 2018).

4.1.1 Optimierte Bedingungen für die RM-Analytik

In einer Reihe von Experimenten wurden verschiedene Parameter der Raman-mikrospektroskopischen Analyse von MP optimiert. Darunter waren sechs Filtermaterialien, drei Laserwellenlängen und vier Beleuchtungsarten. Es wurden Polytetrafluorethylen- (PTFE), Nitrocellulose-, Polyethersulfon- (PES), Silicium-, Polycarbonat- (PC) und goldbeschichtete Polycarbonat-Filter hinsichtlich Partikelsichtbarkeit im Dunkel- und Hellfeld, der morphologischen Peak-Peak-Höhen im Filterhalter und ihrem Preis verglichen. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Vergleich von sechs Filtermaterialien auf ihre Eignung für Raman-mikrospektroskopische Analysen von MP

Filtermaterial	Partikelsichtbarkeit (DF/HF)	Peak-Peak-Höhe	Preis	Eignung
Polytetrafluorethylen (PTFE)	0 / 0	240 μm	+	-
Nitrocellulose	- / 0	350 μm	+	-
Polyethersulfon (PES)	- / +	89 μm	+	-
Silicium	+ / +	30 μm	-	+
Polycarbonat	+ / -	5–113 μm	+	0
goldbeschichtetes Polycarbonat	+ / +	4–30 μm	0	+

Die untersuchten Filter sind stark unterschiedlich geeignet für die Raman-mikrospektroskopische Analyse von MP. Sowohl der PTFE- als auch der Nitrocellulose-Filter besitzen eine sehr große Peak-Peak-Höhe, was sie nur teilweise geeignet macht. Aufgrund der Position der Peaks von PTFE, ist PTFE durchaus als RM-Analysenfilter geeignet und wird in der TZW-Analytik erfolgreich eingesetzt. Auch der PES-Filter weist eine relativ große Peak-Peak-Höhe auf. Die Partikelsichtbarkeit im Dunkelfeld ist ebenfalls nicht besonders gut. Der Polycarbonat-Filter zeigt zwar eine bessere Peak-Peak-Höhe, jedoch ist hier die Partikelsichtbarkeit im Hellfeld nicht zufriedenstellend. Am besten geeignet sind Silicium-, sowie goldbeschichtete Polycarbonat-Filter. Beide besitzen sehr niedrige Peak-Peak-Höhen und sehr gute Partikelsichtbarkeiten im Hell- und Dunkelfeld. Allerdings sind diese beiden Filter auch die teuersten.

Für Raman-Systeme stehen im Allgemeinen Laser im Bereich des sichtbaren Lichts zur Verfügung. Mit abnehmender Wellenlänge wird einerseits das Messsignal verstärkt und die Messzeit verkürzt, andererseits nehmen auch mögliche Fluoreszenzen zu, die das gesuchte Signal überdecken. Für diesen Vergleich wurden die häufig eingesetzten Wellenlängen 532 nm, 633 nm und 785 nm hinsichtlich Zeitbedarf zur Aufnahme eines kompletten Spektrums, Zeitbedarf zur Aufnahme eines hinreichend guten Spektrums zur Auswertung und ihrer Anfälligkeit für Fluoreszenz-Effekte untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Vergleich dreier Laserwellenlängen auf ihre Eignung zur Raman-mikrospektroskopische Analyse von MP (*Zeitbedarf 1: Anzahl der benötigten spektralen Fenster zur Aufnahme eines vollständigen Spektrums unter Verwendung eines optischen Gitters mit 600 Linien/mm; †Zeitbedarf 2: Zeit um ein auswertbares Spektrum aufzunehmen)

Laserwellenlänge	Zeitbedarf 1*	Zeitbedarf 2†	Fluoreszenz	Eignung
532 nm	3	+	-	+
633 nm	4	0	0	+
785 nm	6	-	+	0

Die untersuchten Laserwellenlängen unterscheiden sich vor allem hinsichtlich des Zeitbedarfs voneinander. Ein Laser mit 785 nm benötigt deutlich mehr Zeit für ein vollständiges und gut auswertbares Spektrum. Auch, wenn für diesen Laser im Allgemeinen weniger Fluoreszenz zu beobachten ist, wiegt dies den Zeitnachteil nicht auf. Geeignet sind Laserwellenlängen von 532 nm und 633 nm. Sie brauchen deutlich weniger Zeit zur Aufnahme eines vollständigen und auswertbaren Spektrums, als Laser mit 785 nm. Die auftretende Fluoreszenz hindert zwar die Identifikation, doch ist es meist möglich durch chemische Behandlung der Probe fluoreszierende Stoffe zu entfernen. Außerdem können MP-Signale auch auf einem Fluoreszenzuntergrund erkannt werden.

Die Raman-Mikrospektroskopie ermöglicht über das integrierte Mikroskop optische Aufnahmen und damit eine optische Fokussierung des Lasers auf die Probe. Es stehen am WITec alpha 300 R vier verschiedene Beleuchtungsarten zur Verfügung: zwei Fluoreszenzfilter, Hellfeld und Dunkelfeld. Diese wurden hinsichtlich der Partikelsichtbarkeit auf den vorher untersuchten Filtern bewertet. Hierzu wurden sechs verschiedene Proben unter den verschiedenen Beleuchtungsarten hinsichtlich Partikelsichtbarkeit bewertet. Waren die Partikel ausreichend gut sichtbar, wurde dieser Filter mit „+“ bewertet, bei moderater Sichtbarkeit mit „±“ und bei ungenügender Sichtbarkeit mit „-“. Die Häufigkeiten der verschiedenen Ergebnisse für die verschiedenen Filter wurden gezählt und sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Vergleich verschiedener Beleuchtungsarten hinsichtlich Eignung zur RM-Analyse von MP

Beleuchtungsart	Partikelsichtbarkeit	Eignung
Fluoreszenz exc.: 592/24 em.: 675/100	0 + / 0 ± / 6 -	-
Fluoreszenz exc.: 470/40 em.: 525/50	0 + / 2 ± / 4 -	-
Hellfeld	2 + / 3 ± / 1 -	0
Dunkelfeld	3 + / 1 ± / 2 -	+

Die Beleuchtung mit Fluoreszenz war in keinem Fall ausreichend um Partikel hinreichend erkennen zu können. Hellfeld und Dunkelfeld hingegen ermöglichen beide, zum Teil auf unterschiedlichen Filtern, eine hinreichende Partikelsichtbarkeit. Die Beleuchtung mit Dunkelfeld, insbesondere auf den reflektierenden Filtern aus Silicium und goldbeschichtetem Polycarbonat, liefert die besten Ergebnisse.

Die aus diesen Experimenten abgeleitete Empfehlung zur optimalen Wahl des Filtermaterials und der Beleuchtung ist somit die Kombination aus Dunkelfeld und Silicium- oder goldbeschichtetem Polycarbonat-Filter in Verbindung mit einem 532 nm oder 633 nm Laser. Polycarbonat kann dann allerdings nicht bestimmt werden.

4.1.2 Filterhalter

Für eine optimierte Analytik mit RM ist aufgrund der Konfokalität der Methode eine präzise Fokussierung des Konfokalpunktes des Lasers auf den zu untersuchenden Partikeln vonnöten. Konfokalität bedeutet, dass nur ein sehr kleines Probenvolumen (ca. $0,3\ \mu\text{m}$ lateral und $2,6\ \mu\text{m}$ axial, bei $\lambda_0 = 532\ \text{nm}$, Objektiv mit $100\times$ Vergrößerung und $NA = 0,9$, nach (Everall 2010, Zoubir 2012)) angeregt wird und nur aus diesem Informationen erhalten werden. Durch die Entwicklung eines Filterhalters wurde die Rauigkeit der Probe auf ein Minimum reduziert und damit eine optimale Fokussierung ermöglicht.

Es wurden zwei Sets von Filterhaltern gebaut, einerseits massive Filterhalter (Abbildung 30a und b), andererseits Filterhalter zur Verwendung mit Beleuchtung von der Unterseite bzw. Transmissionsmessung und daher mit Aussparung im Zentrum (Abbildung 30c und d). Für beide Filterhaltersets wurden Halter für Filter mit einem Durchmesser von 45–50 mm und von 20–25 mm entwickelt.

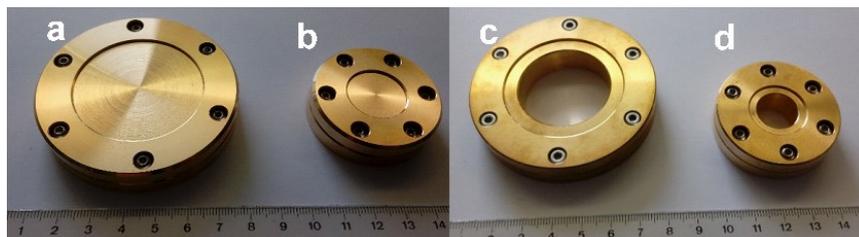


Abbildung 30: Verschiedene Typen von Filterhaltern: a) Filterhalter massiv, Durchmesser 50 mm; b) Filterhalter massiv, Durchmesser 25 mm; c) Filterhalter mit Loch, Durchmesser 50 mm; d) Filterhalter mit Loch, Durchmesser 25 mm

Zur Fixierung wird ein Filter auf den unteren Teil des Filterhalters aufgelegt. Dieser wird mit dem oberen Teil gegriffen und mit Schrauben fixiert (Abbildung 31). Diese Art der Fixierung hat den Vorteil reversibel zu sein. Der Filter kann so oft im Filterhalter positioniert werden bis er vollständig eben aufliegt. Dies ist im Vergleich zu möglichem Aufkleben des Filters auf einen Glasträger von Vorteil. Spätere Kontrollmessungen oder weitergehende Analysen des Filters nach Entfernen des Filters aus dem Filterhalter sind ebenfalls nur durch die reversible Fixierung möglich.

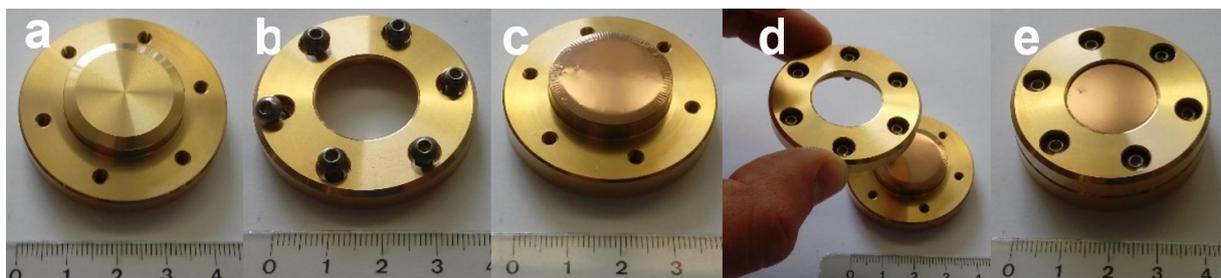


Abbildung 31: Fixierung eines Filters im Filterhalter: a) unterer Teil des Filterhalters; b) oberer Teil des Filterhalters; c) Filter auf dem unteren Teil aufgelegt; d) Anbringen des oberen Teil des Filterhalters; e) Fixierung des Filters durch zusammenschrauben des oberen und unteren Teils des Filterhalters

Der Filterhalter wurde mithilfe der TrueSurface2-Option des WITec alpha 300R auf seine Rauigkeit hin untersucht. Hierfür wurden Filter mit einer Matrix beladen, diese wieder vollständig heruntergespült und schließlich im Filterhalter positioniert bzw. auf einen Glasträger gelegt, bzw. auf einen Glasträger aufgeklebt. Die Ergebnisse der Oberflächenmessungen sind in Abbildung 32 zu sehen. Die Rauigkeit wurde anhand der Peak-Peak-Höhe bestimmt. Diese ist als Größe des z-Achsenabschnitts zwischen höchstem und niedrigstem Punkt des Filters definiert.

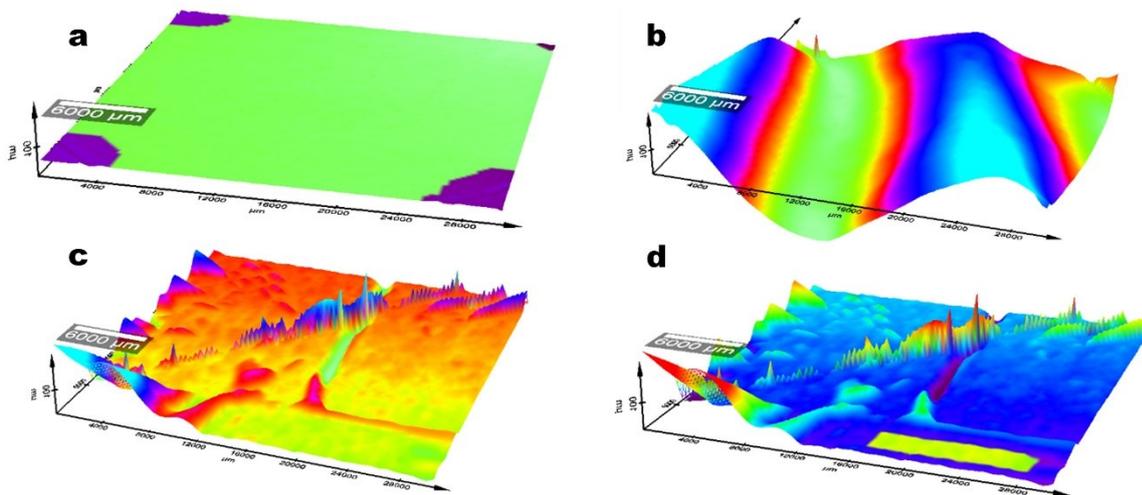


Abbildung 32: Vergleich der Oberflächenrauigkeit verschiedener Fixierungsmöglichkeiten: a) Filterhalter; b) Filter auf einen Glasträger gelegt; c) Filter auf einen Glasträger geklebt; d) Filter auf einen Glasträger geklebt – Auszug

Die bestimmten Peak-Peak-Höhen sind in Tabelle 8 gegeben. Der Filterhalter zeigt mit 30 μm Peak-Peak-Höhe den geringsten Wert. Die Peak-Peak-Höhe für den auf den Glasträger gelegten Filter ist mit 868 μm deutlich größer. In derselben Größenordnung befindet sich der Wert für den auf den Glasträger geklebten Filter mit 591 μm . Diese Werte sind zu hoch um die entsprechenden Fixierungsmöglichkeiten für eine automatisierte Messung zu verwenden. Für den geklebten Filter wurde zusätzlich ein flacher Teil des Filters analysiert. Dieser Bereich besitzt eine Peak-Peak-Höhe die in derselben Größenordnung wie der des Filterhalters liegt (43 μm). Allerdings kann dieser Wert nicht für den gesamten Bereich gewährleistet werden. Somit ist der am IWC-TUM entwickelte Filterhalter optimal für die Raman-Mikroskopische Analysen. Der Filterhalter wurde auch für MiWa-Projektpartner (TZW, UFZ) am IWC-TUM gefertigt und bei den Projektpartnern eingesetzt. Leider hat sich für die am TZW verwendeten PTFE-Filter gezeigt, dass der TUM-Filterhalter zu einer größeren Wölbung des Filters führt, als der TZW-Filterhalter (Magnetplatte + Metallring).

Tabelle 8: Vergleich der Peak-Peak-Höhen verschiedener Fixierungsarten

Fixierungsart	Peak-Peak-Höhe / μm
Filterhalter	30
Glasträger – gelegt	868
Glasträger – geklebt	591
Glasträger – geklebt (Auszug)	43

4.1.3 Statistische Auswahl von Partikeln

Auf einem typischen Filter für die MP-Analytik befinden sich nach eigenen Erfahrungen zwischen 100.000 und 1.000.000 Partikel. Nur durch die reine Messzeit von z. B. 10 s pro Partikel benötigt die Messung damit zwischen 11,6 und 116 Tagen, wenn alle Partikel gemessen werden sollen. Da dies aus praktischen Überlegungen schwer bis unmöglich zu realisieren ist, ist es nötig die Zahl der zu messenden Partikel auf ein Minimum zu beschränken. Um die Zahl an zu messenden Partikeln zu ermitteln, die unter gewissen Annahmen ausreichend ist um den Gesamt-MP-Gehalt der Probe mit einer bestimmten statistischen Sicherheit zu bestimmen, wurde ein statistisches Modell aus den Sozialwissenschaften adaptiert. Die so bestimmten MP-Gehalte erhalten damit unabhängig einer Mehrfachbestimmung eine statistische Bewertung. Dies ist insbesondere für die MP-Analytik wünschenswert, da durch

die sehr zeitaufwendige Analytik eine Mehrfachbestimmung meist nur schwer zu realisieren ist. Die Ergebnisse dieses Unterpunktes wurden bereits veröffentlicht (Anger et al. 2018).

Um dieses einfache Modell anwenden zu können, sind die folgenden Annahmen über die Probe zu treffen:

1. Alle Partikel auf dem Filter gehören entweder der Gruppe MP oder der Gruppe nicht-MP an
2. Alle Partikel auf dem Filter liegen separiert vor
3. Alle Partikel sind willkürlich auf dem Filter verteilt. Das MP/nicht-MP-Verhältnis ist in jedem Bereich des Filters konstant – keine Konzentrierung von MP oder nicht-MP in bestimmten Bereichen
4. Partikel-Konzentrierung bei gleichbleibendem MP/nicht-MP-Verhältnis ist jedoch möglich
5. Alle Partikel auf dem Filter werden mit Bilderkennung identifiziert
6. Unabhängig von ihrer Größe werden alle Partikel als Einzelmesspunkte behandelt
7. Die Raman-spektroskopische Messung ist fehlerfrei

Diese Annahmen stellen eine starke Einschränkung zu realen Filtern dar. Es ist jedoch hiermit möglich eine untere Grenze an zu messenden Partikeln zu definieren. Damit wird es ermöglicht MP-Analysen von Filtern mittels RM zu bewerten. Wird die Mindestzahl an zu messenden Partikeln unterschritten kann davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis eine schlechtere statistische Sicherheit besitzt als die für die Berechnung angenommene. Die zu messende Zahl an Partikeln n wird mittels Formel 2 berechnet.

$$n \geq \frac{P(1 - P)}{\frac{e^2}{\sigma^2} + \frac{P(1 - P)}{N}} \quad \text{Formel 2}$$

P bezeichnet den angenommenen MP-Anteil in der Probe, e stellt den tolerierten Fehlerbereich dar, σ ist der Wert des Prognose-Intervalls für einen 90 %-Vertrauensbereich und N stellt die Gesamtzahl an Partikeln auf dem Filter dar.

In Tabelle 9 sind Beispiele für tolerierte Fehler e von 10 % gegeben. Die zu messenden Partikel n hängen maßgeblich vom angenommenen MP-Gehalt P ab und schwanken zwischen 5.147 und 352.428 Partikeln für einen MP-Gehalt P von 5 % bzw. 0,05 %.

Tabelle 9: Zahl der zu messenden Partikel für einen Filter mit $N=10^6$ Partikeln, $\sigma = 1,65$ (90 %) und einem toleriertem Fehlerbereich $e = 10$ %, P wurde von 0,05 % bis 5 % variiert (e ist in allen drei Fällen 10 % des angenommenen MP-Anteils P . Das bedeutet, dass der in Dezimalen angegebene Wert mit abnehmendem MP-Anteil P auch abnimmt)*

Variablen	$P = 5$ % MP	$P = 0,5$ % MP	$P = 0,05$ % MP
$e^* =$	0,005	0,0005	0,00005
$n \geq$	5.147	51.394	352.428

In Tabelle 10 sind Beispiele für höhere tolerierte Fehler e gegeben. Für einen MP-Gehalt P von 5 % und einem tolerierten Fehler e von 20 % sind 1.292 Partikel zu messen. Wird ein Fehler e von 30 % toleriert, liegt für einen MP-Gehalt P von 0,5 % die Zahl der zu messenden Partikel n bei 5.984.

Tabelle 10: Zahl der zu messenden Partikel für einen Filter mit $N = 10^6$ Partikeln, $\sigma = 1,65$ (90 %) und einem toleriertem Fehlerbereich $e = 20$ % ($P = 5$ %) bzw. 30 % ($P = 0,5$ %; 0,05)

Variablen	$P = 5$ % MP	$P = 0,5$ % MP	$P = 0,05$ % MP
$e =$	0,01	0,0015	0,00015
$n \geq$	1 292	5 984	57 022

In Abbildung 33 ist der Zusammenhang zwischen der zu messenden Zahl an Partikeln n und dem tolerierten Fehler e gezeigt. Für eine Probe mit einem MP-Gehalt P von 2 % ist es notwendig 13.000 Partikel zu messen, um die durch graue Horizontalen dargestellten 10 % Fehlerbereich einzuhalten. Aus Abbildung 33 ist ersichtlich, dass mit zunehmender Probengröße die Abnahme an zu erwartendem Fehler immer kleiner ausfällt. Unabhängig von den gewählten Parametern ist es somit in keinem Fall notwendig alle Partikel zu messen, solange ein minimaler Fehler toleriert wird. Es ist vielmehr so, dass ab einem gewissen Punkt der tolerierte Fehler nur durch einen erheblich erhöhten Messaufwand minimal verbessert werden kann.

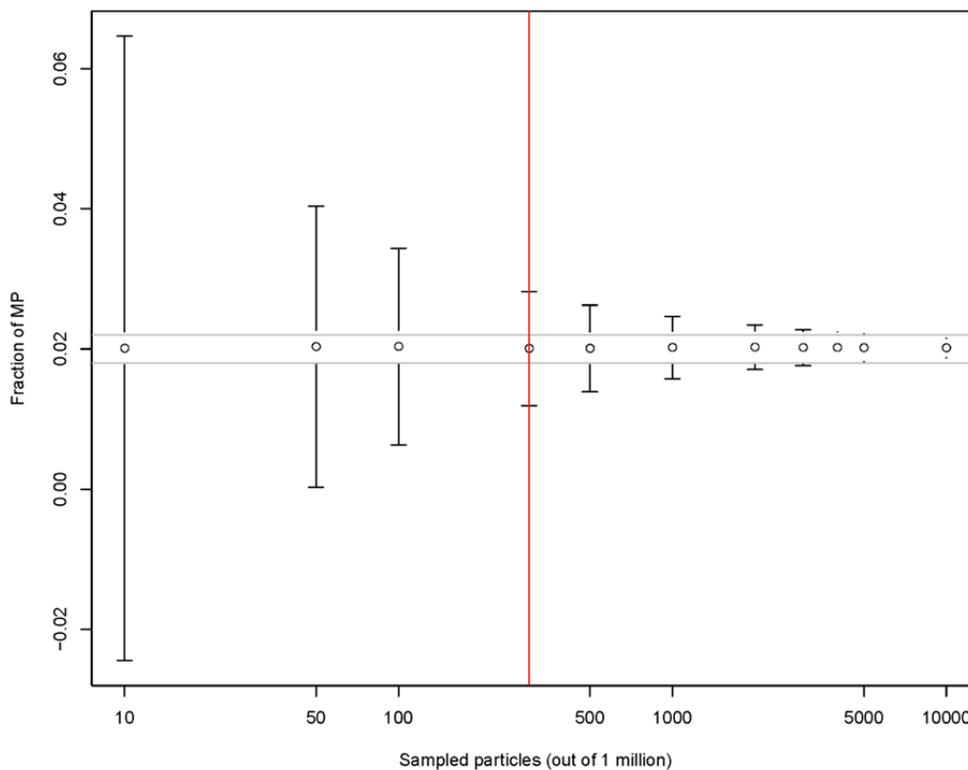


Abbildung 33: Korrelation der Zahl der zu messenden Partikel n und dem toleriertem Fehlerbereich e (10 %, graue Horizontalen) für einen angenommenen MP-Gehalt P von 2 %. Die rote Linie markiert eine typische gemessene Partikelzahl von 300, die in der Anfangsphase des Vorhabens erfasst wurden

4.1.4 Partikelerkennung mit Otsu

Die Partikelerkennung auf dem Filter wurde anfangs durch den Experimentator vorgenommen (Imhof et al. 2016a). Dieser Prozess ist einerseits sehr zeitaufwendig und andererseits in seiner Natur begründet ein subjektiver. Es ist wünschenswert diesen Prozess zu automatisieren und zu objektivieren. Es wurde daher ein Algorithmus zur Partikelerkennung mithilfe der Programmiersprache Java aus verschiedenen ImageJ plugins zu einem frei zugänglichen (Open source) Software-Paket zusammengefasst. Mit diesem Paket ist es möglich optische Bilder aus der Raman-Mikrospektroskopie auf Partikel zu untersuchen. Für die gefundenen Partikel werden x - und y -Koordinaten, der minimale und der maximale Feret-Durchmesser sowie die Fläche der Partikel ausgegeben. Der maximale Feret-Durchmesser beschreibt die größte Ausdehnung eines Partikels. Basierend auf den Ergebnissen der Bilderkennung können dann die zu untersuchenden Partikel ausgewählt werden und am Raman-Mikrospektroskop automatisch untersucht werden. Die Ergebnisse dieses Unterpunktes wurden bereits veröffentlicht (Anger et al. 2019).

Die Automatisierung stellt einen fundamentalen Fortschritt zu früheren Methoden dar, die auf der Partikel-Auswahl des Experimentators beruhen. Letztere ist auch nach jahrelanger Expertise immer einem Bias unterworfen, der durch die Auswahl mittels Algorithmus nicht zwingend wegfällt, aber zumindest steuerbar und reproduzierbar wird. Damit wird es möglich Bedingungen für eine optimale Analyse zu finden und Ergebnisse vergleichbarer zu machen. Die Partikelerkennung folgt dem Schema in Abbildung 34.

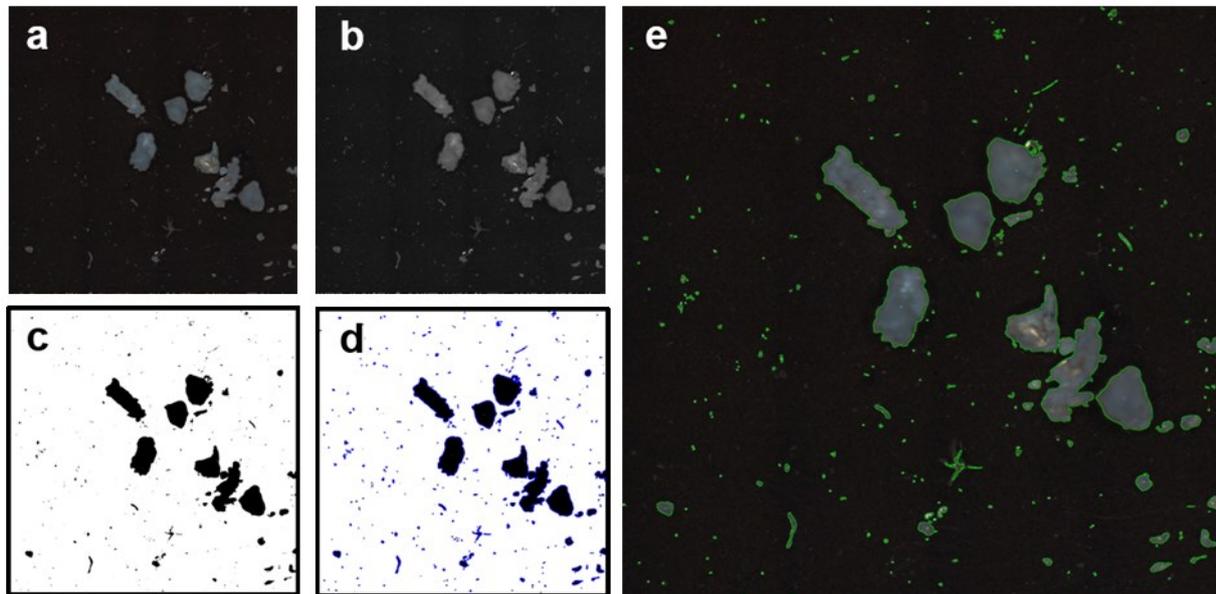


Abbildung 34: Schema der Bilderkennung: (a) Originalbild, (b) Umwandlung in ein Graustufenbild, (c) Umwandlung in ein binäres Bild durch Otsu's Algorithmus, (d) Partikelerkennung, (e) mit den gefundenen Partikeln überlagertes Originalbild

Für die Partikelerkennung wird das Originalbild zunächst in ein Graustufenbild umgewandelt. Auf dieses kann Otsu's Algorithmus angewandt werden, der das Bild in zwei Gruppen, Partikel und Hintergrund, teilt. Somit ist es möglich Partikel zu erkennen und deren Koordinaten und morphologischen Parameter wie minimalen und maximalen Feret-Durchmesser zu bestimmen.

4.1.5 Befunde in biologischen Proben in Kooperationen

In Zusammenarbeit mit der Eberhard-Karls-Universität Tübingen wurden Versuche zur Analyse von MP in Schnitten von Mägen und Därmen von Bachforellen durchgeführt. Die Schnitte waren zum Teil gefärbt, und es wurde untersucht, ob diese Färbung die Raman-mikrospektroskopische Analyse durch z. B. Fluoreszenz beeinträchtigt. Aufnahmen im Hell- und Dunkelfeld sowie mittels Fluoreszenzmikroskopie illustrieren die Schnitte (Abbildung 35).

Die Untersuchungen zeigten, dass die Färbung stark fluoresziert und damit auch die Raman-mikrospektroskopische Analyse stark erschwert. In den untersuchten Schnitten sollte kein MP gefunden werden, sondern nur die Färbung getestet werden. Die folgenden untersuchten Schnitte waren ungefärbt.

In einer weiteren Reihe von Schnitten von Mägen und Därmen von Bachforellen wurde nach zugesetztem MP gesucht. Es handelt sich um in Paraffin eingebettete ungefärbte Proben. In Abbildung 36 ist ein Ausschnitt dieser Schnitte zu sehen. Die Raman-mikrospektroskopische Analyse des untersuchten dunklen Partikels ergab, dass es sich bei dem erkennbaren Partikel um Kohle handelt und nicht um MP. Die zugehörigen Spektren zeigt Abbildung 37.

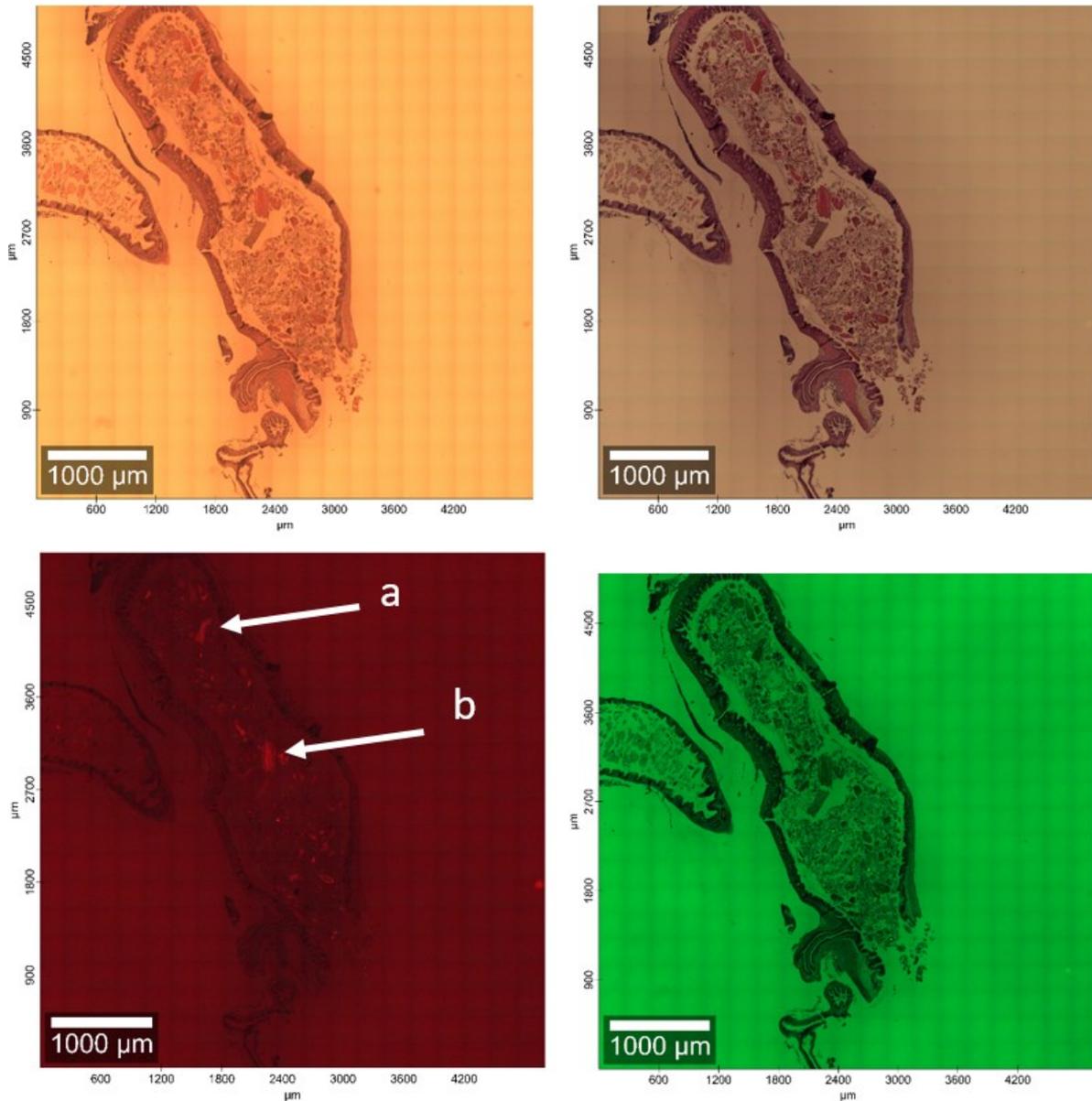


Abbildung 35: Gefärbter Schnitt eines Bachforellendarms. Im Uhrzeigersinn beginnend links oben: Hellfeld, Dunkelfeld, Fluoreszenzbeleuchtung (exc.: 470/40 nm, em.: 525/50 nm), Fluoreszenzbeleuchtung (exc.: 592/24 nm, em.: 675/100 nm)

Es wurden auf zwölf der bereitgestellten Schnitte insgesamt über 300 Einzelspektren und über zehn Maps aufgenommen. Die meistens der untersuchten Partikel-ähnlichen Strukturen zeigten das Spektrum von Paraffin, in wenigen Fällen auch Fluoreszenz. Trotz intensiver Bemühungen Raman-Signale von MP zu finden zeigen diese Experimente wie schwer der Nachweis von MP in Biota ist. Die Lokalisation von Partikeln in dicht gepackter Matrix ist ungleich schwerer als die Lokalisation vereinzelter Partikel auf einem gut kontrastierenden Filter. Zusätzlich ist mit einem Matrixhintergrund im Spektrum zu rechnen. Dies bedeutet, dass mögliche MP-Signale von Paraffin-Signalen überlagert sein können. Im Vorfeld wurde vermutet, dass durch die konfokale Messanordnung des Raman-Mikroskops zwischen Matrix und möglichem MP-Partikel differenziert werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse können diese Vermutung weder widerlegen noch bestätigen. Sie zeigen jedoch, dass die Analytik von Biota ungleich schwerer als die von Filterproben ist. Somit wurden im Rahmen des Verbundprojektes MiWa für die Weiterentwicklung und Optimierung der MP-Analyse in Gewebeschnitten wichtige Vorarbeiten erzielt und Limitierungen erkannt. Für zukünftige Projekte die sich im speziellen mit der Biota-Analytik beschäftigen gibt es daher noch Potential.

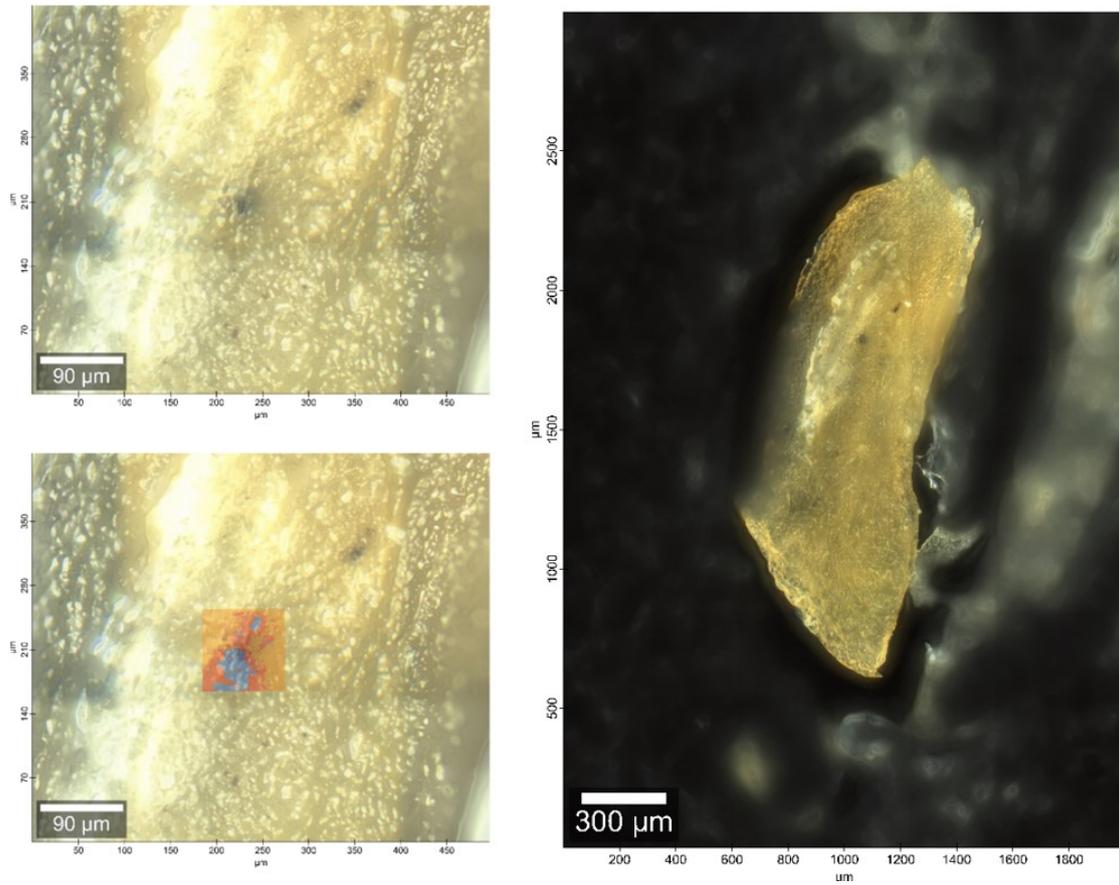


Abbildung 36: Darstellung eines dunklen Partikels im Magen/Darm-Schnitt einer Bachforelle. Von oben links im Uhrzeigersinn: detaillierter Ausschnitt des untersuchten Bereichs, Übersicht der untersuchten Stelle, Falschfarbenbild des untersuchten Bereichs (blau – Kohle, orange – Paraffin, rot – Fluoreszenz)

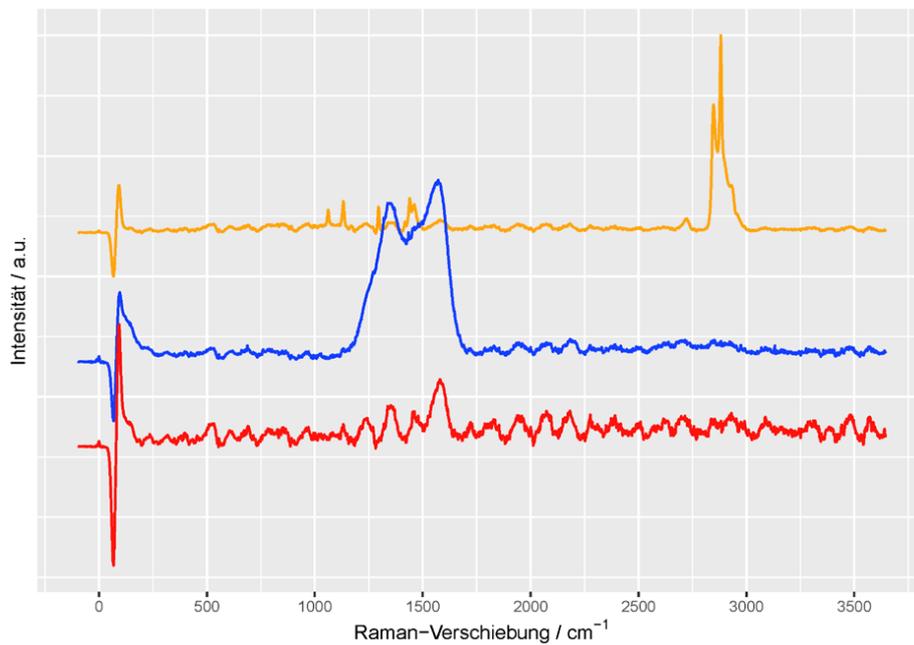


Abbildung 37: Spektren der in den gleichen Farben codierten Bereiche aus Abbildung 36. Orange – Paraffin, rot – Fluoreszenzspektrum nach Hintergrundkorrektur, blau – Kohle

In Zusammenarbeit mit der Goethe-Universität Frankfurt wurden Versuche zur Analyse von MP in *Daphnia magna* durchgeführt. Die zu untersuchenden Objekte wurden mit Polystyrol-Partikeln mit einem Durchmesser von 1 μm gefüttert. Die fertigen Präparate wurden in Paraformaldehyd fixiert und in eine Fructose-Lösung (10 g Fructose in 10 mL) überführt. Alternativ dazu wurden auch Präparate im Fixierungsmittel belassen um zu untersuchen ob die Überführung in Fructose die RM-Analytik stört.

Erste Messungen von *Daphnia magna* zeigten starke Fluoreszenz und Überlagerung der für die Identifikation sehr wichtigen Bande des Polystyrols bei 1.000 cm^{-1} durch Raman-Banden von Carotinoiden (Abbildung 38).

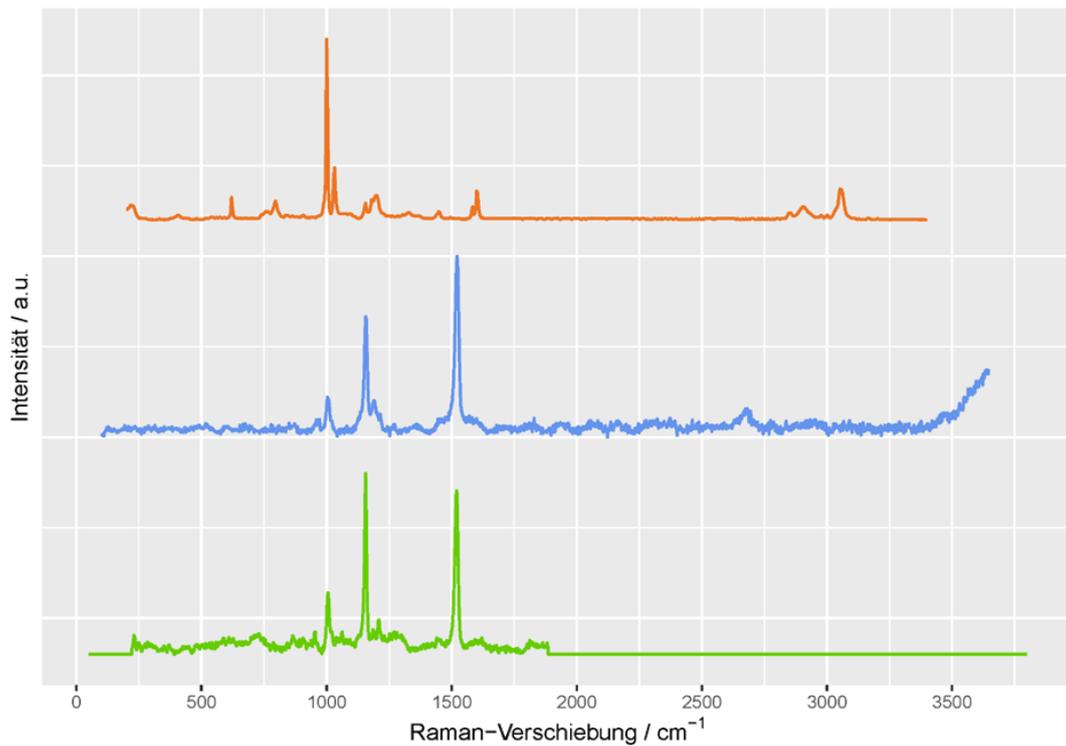


Abbildung 38: Carotinoid-Spektren: Orange – Referenzspektrum von Polystyrol; blau – aufgenommen in *Daphnia magna*; grün – Referenzspektrum von Carotinoiden

Durch längeres Bestrahlen der Probe mit einem Laser, sog. bleaching, wurde versucht die Fluoreszenz zu verringern. Abbildung 39 zeigt den Darm von *Daphnia magna* vor und nach erfolgtem bleaching. Die geringere Grünfärbung nach dem bleaching deutet daraufhin, dass Farbstoffe zerstört wurden, die Fluoreszenz induzieren können.

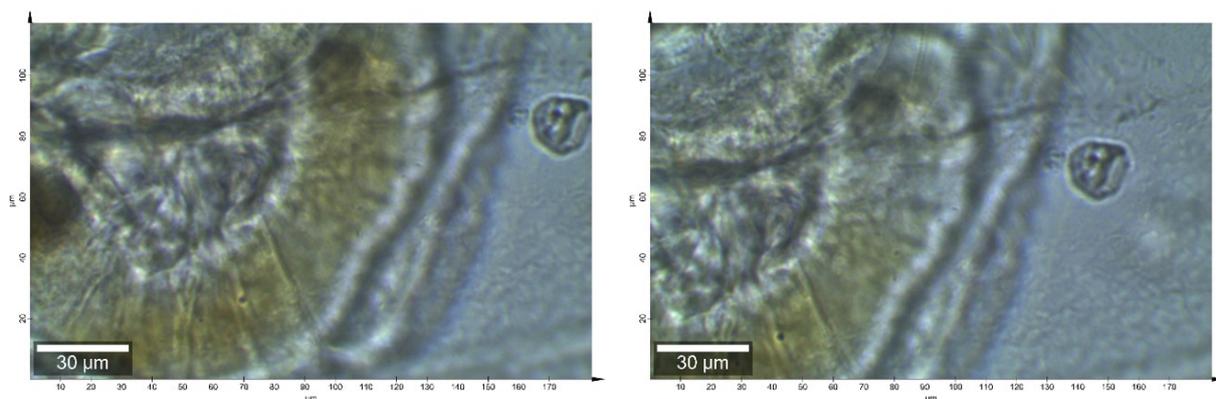


Abbildung 39: Mikroskopische Aufnahme von *Daphnia magna* (Darmausschnitt)

Es wurden insgesamt 24 Maps und einige Einzelspektren an verschiedenen *Daphnia magna*-Präparaten aufgenommen. Zusätzlich wurden die den Daphnien gefütterten Polystyrol-Partikel Raman-Mikrospektroskopisch analysiert (Abbildung 40 und Abbildung 41)

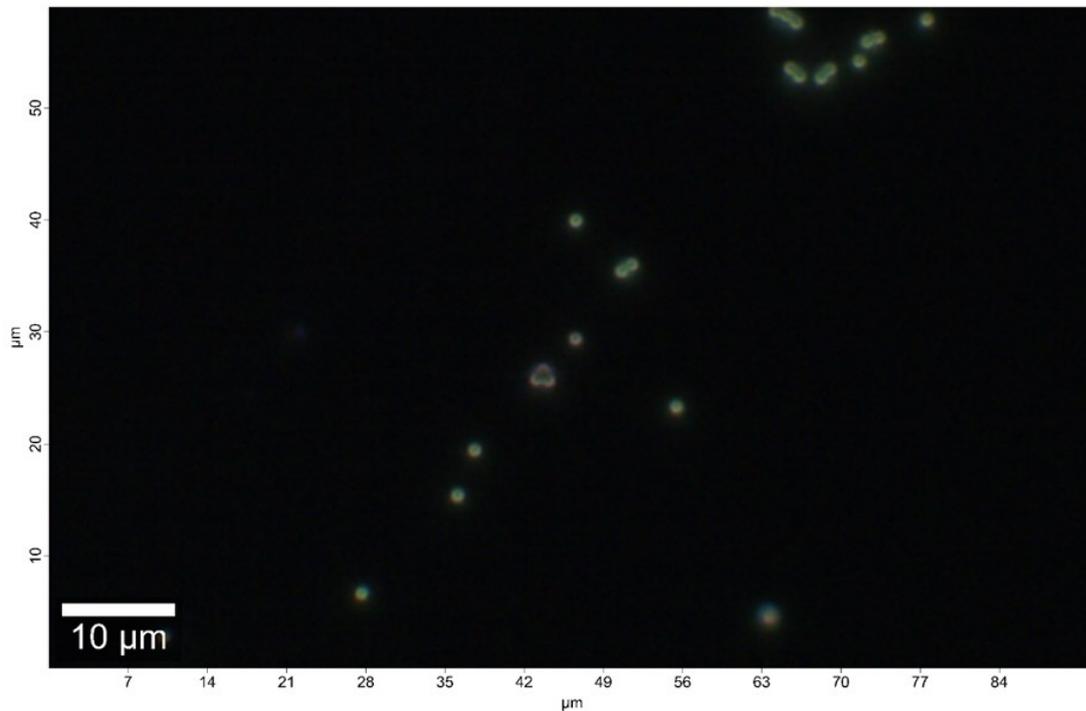


Abbildung 40: Mikroskopische Aufnahme der Polystyrol-Partikel im Raman-Mikroskop. Die Partikel besitzen einen Durchmesser von 1000 nm. Das zugehörige Raman-Spektrum zeigt Abbildung 41

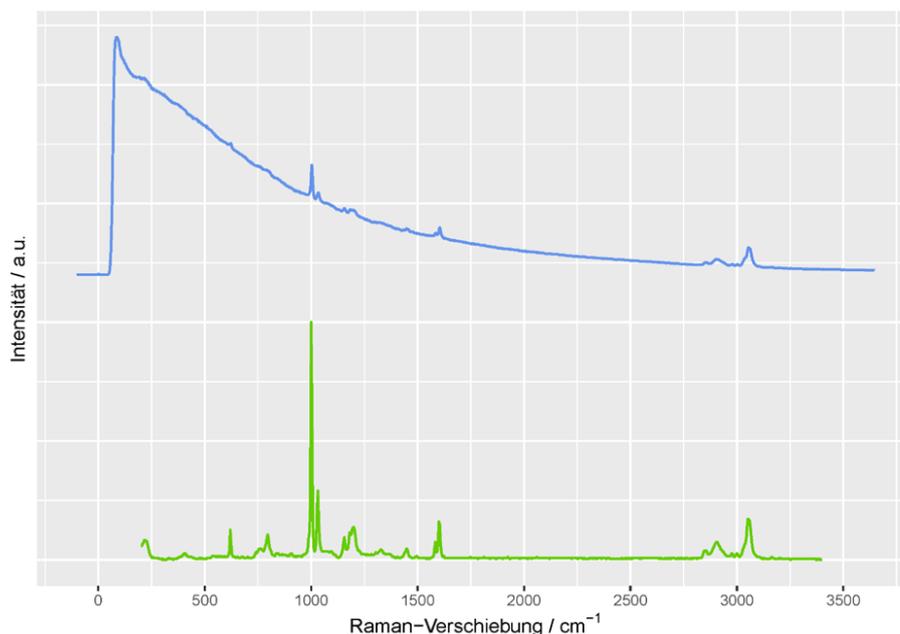


Abbildung 41: Spektrum der den Daphnien gefütterten Polystyrol-Partikel: Blau – Polystyrol-Partikel; grün – Referenzspektrum

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen die prinzipielle Eignung der Raman-Mikrospektroskopie zur Analyse von 1 µm kleinen Polystyrol-Partikeln. Dieselbe Analyse in *Daphnia magna* ist ungleich schwerer, da hier die nötige Lokalisation von solch kleinen partikulären Strukturen die Analytik deutlich verkompliziert. Im vorliegenden Umfang konnte kein Polystyrol in *Daphnia magna* identifiziert werden. Dies

lässt sich damit begründen, dass sich in den Daphnien nur ein kleiner Teil Polystyrol-Partikel befindet, die mit nur einer geringen Wahrscheinlichkeit vom Laserlicht erfasst werden konnten. Die Raman-Mikrospektroskopie arbeitet mit einer räumlichen Auflösung von ca. 300 nm. Dies bedeutet einerseits, dass sehr kleine Partikel analysiert werden können aber andererseits auch, dass keine großen Flächen auf einmal analysiert werden können. Alternativ ist natürlich auch möglich, dass *Daphnia magna* keine Polystyrol-Partikel dieser Größenordnung im Darm anreichert. Dies ist aber unwahrscheinlich, da auch in eigenen Arbeiten schon MP-Partikel (PVC, ca. 10 µm) im Darm von Daphnien identifiziert werden konnten. Eine Unterscheidung aufgrund Polymerart und ein Rückgang der Aufnahme bei kleinerer Größe ist nicht zu erwarten.

4.1.6 Analytischer Prozess in der Entwicklung

Die hier gezeigten Ergebnisse stellen den innerhalb von drei Jahren erlangten Forschungsfortschritt in MiWa dar (Tabelle 11).

Tabelle 11: Vergleich der analytischen Anfänge der MP-Analytik mit dem gegenwärtigen Stand der Technik

	Analyse nach Imhof et al. 2016 (Imhof et al. 2016b)	Aktuelles Analyseschema am IWC-TUM
Spezifikationen der RM-Analyse		
Analysierte Fläche/Partikel	5 Bereiche, unterteilt in 9 Unterbereiche, 1,6 % der Filterfläche (47 mm Durchmesser)	Partikel auf dem gesamten Filter können gefunden und ausgewählt werden
RM Messung	Manuell	Automatisch durch Raman-System
Partikel-Erkennung	Manuell	Automatisch durch Software basierend auf <i>Otsu's</i> Algorithmus
Partikelauswahl	Manuell	Automatisch durch Algorithmus
Partikelanzahl	Ca. 300 Partikel pro Filter	7 000 Partikel pro Filter
Benötigte Zeit	2 Arbeitstage für Experimentator	2 Arbeitstage für das Raman-System und wenige Stunden für den Experimentator
Statistik		Statistische Aussage möglich
Vermeidung von Kontaminationen		
Kleidung	Baumwollkittel	Baumwollkittel
Benötigte Flüssigkeiten	Filtration über 0.2 µm Polycarbonat-Filter	Filtration über 0.2 µm Spritzenfilter
Blind-Probe		Prozess-Blindfilter
Labor		Laminar Flow Box (<i>Reinraumklasse ISO 5 nach ISO 14644-1</i>)
Glasequipment		Gereinigt mit 0,01 % Novachem SF 100 (<i>Postnova Analytics GmbH, DE</i>) -Lösung im Ultraschallbad Abschlussreinigung mit fusselfreien Tüchern (<i>Thorlabs GmbH, DE</i>) Kontrolle mit UV/Weißlicht-Lampe (<i>Fa. Nitecore, CU6</i>)

Innerhalb von zwei Messtagen können 7.000 Partikel gemessen werden. Durch Umstellen von Formel 2 nach dem Fehler e wird Formel 3 erhalten.

$$e = \sqrt{\left(\frac{P(1-P)}{n} - \frac{P(1-P)}{N}\right) \cdot \sigma^2} \quad \text{Formel 3}$$

Durch Einsetzen von $n = 7.000$ Partikel, $N = 10^6$ Partikel, $\sigma = 1,65$ (90 % Vertrauensintervall) und abgestuften Gehalten an MP $P = 5 \%$, 1% , $0,5 \%$ und $0,05 \%$ werden die Fehler e in Tabelle 9 erhalten.

Tabelle 12: Berechnete Fehler e für eine hypothetischen Filter mit $n = 7.000$ Partikeln, $N = 10^6$ Partikeln und $\sigma = 1,65$

Variablen	$P = 5 \%$ MP	$P = 1 \%$ MP	$P = 0,5 \%$ MP	$P = 0,05 \%$ MP
e in %	8,6 %	19,6 %	27,7 %	87,9 %

Tabelle 12 macht deutlich, dass eine Entfernung der anorganischen und organischen Begleitmatrix aus komplexen (Umwelt-)Proben, welche zur wesentlichen Erhöhung des Plastik-/Nicht-Plastikpartikel-Verhältnisses führt von großer Bedeutung ist. Darüber hinaus wird durch die Matrix-Entfernung eine Interferenz durch Fluoreszenz minimiert. Somit kann eine zuverlässigere Detektion, Identifizierung, Quantifizierung und damit eine repräsentative MP-Analyse mittels Raman-Mikrospektroskopie realisiert werden.

4.2 Raman-Mikrospektroskopie (TZW)

Abgestimmt auf die Probenahme mit der fraktionierenden Filterkaskade wurde am TZW eine Methode zur Analytik mittels Raman-Mikrospektroskopie entwickelt, validiert und etabliert. Hierzu wurden die Raman Systeme XploRA PLUS und LabRAM HR Evolution von Horiba (SAS France, Villeneuve d'Ascq, Frankreich) verwendet. Neben zahlreichen Entwicklungen am TZW wurde die automatisierte Partikelerkennung der Gerätesoftware LabSpec (SAS France, Villeneuve d'Ascq, Frankreich) in enger Zusammenarbeit mit dem Hersteller Horiba weiterentwickelt.

Zunächst wurde am TZW ein geeignetes Filtermaterial für die MP-Partikel Analyse mittels Raman-Mikrospektroskopie ausgewählt. Kriterien waren dabei eine Porengröße $< 3 \mu\text{m}$, eine plane und strukturfreie Oberfläche, gute Filtrationseigenschaften, chemische Stabilität des Materials, keine Fluoreszenz oder Raman Signale im Bereich der Banden gängiger Polymere sowie Kosteneffizienz. Eine Reihe an Filtermaterialien (u.a. Polycarbonat mit Goldbeschichtung, Aluminiumoxid und PTFE) wurde ausführlich getestet, dabei wiesen die PTFE-Filtermembranen die beste Eignung auf. PTFE hat eine hohe chemische Beständigkeit gegenüber den meisten Chemikalien und eine ausreichend plane und gering strukturierte Oberfläche bei guten Filtrationseigenschaften. PTFE zeigt weder Fluoreszenz noch Raman Banden im Bereich der CH-Schwingungen ($2.800\text{--}3.200 \text{ cm}^{-1}$), welche bei den meisten Polymeren vorhanden sind. Auch in der Fingerprint-Region sind alle in der MP-Forschung relevanten Polymere eindeutig auf dem PTFE Filterhintergrund zu identifizieren. Der einzige Nachteil der PTFE-Filtermembranen besteht darin, dass PTFE-Partikel darauf nicht quantifizierbar sind. Aus diesem Nachteil ergeben sich allerdings auch diverse Vorteile: PTFE-Spritzflaschen können bedenkenlos im Labor verwendet und PTFE als Dichtmaterial in der Filtrationskaskade verbaut werden.

Für die Raman-mikrospektroskopische Messung auf PTFE-Filtermembranen ist die Nutzung des Hellfeldes geeignet. Dies wurde durch Wiederfindungsversuche mit Polystyrolpartikeln überprüft.

Um die Filtermembran unter dem Mikroskop der Raman Systeme zu fixieren, wurde am TZW eigens ein Filterhalter entwickelt. Das Funktionsprinzip des Filterhalters basiert darauf, dass die Filtermembran durch einen Metallring auf eine Magnetplatte gedrückt wird. Hierdurch wird das Verrutschen der Filtermembran während der Messung vermieden und eine ausreichend plane Oberfläche erreicht. Verbleibende, minimale Unebenheiten der Filtermembran werden durch einen automatisierten Fokus der Raman Systeme ausgeglichen.

Die einfachste Möglichkeit zur Raman-mikrospektroskopischen Analyse von MP ist die manuelle Fokussierung und Messung einzelner Partikel. Aufgrund der erheblichen Anzahl an Partikeln in Realproben (MP- und natürliche Partikel), stellt eine automatische Partikelerkennung eine deutliche Steigerung der Effizienz dar. Hierdurch kann eine höhere Partikelanzahl bei deutlich geringerem Aufwand an Arbeits- und Messzeit analysiert werden.

In Zusammenarbeit mit Horiba wurde folgende Vorgehensweise zur MP-Analyse mittels Horiba Raman Systemen und dem Modul „Particle Finder“ entwickelt:

Zunächst wird der Mittelpunkt der Probe manuell bestimmt und im Raman System als Koordinatenursprung festgelegt. Anschließend werden mit dem Modul „Particle Finder“ einzelne Partikel auf der Filtermembran ausgehend vom Schwarz-Weiß-Kontrast des mikroskopischen Bildes erkannt. Die Koordinaten der erkannten Partikel werden gespeichert, sodass nachträglich eine Lokalisierung und gegebenenfalls Nachmessung einzelner Partikel möglich ist. Um eine gute Partikelerkennung zu gewährleisten, wird vor Beginn der Messung der Helligkeitsbereich für die relevanten Partikel ausgewählt. Die Software erlaubt zudem die Angabe einer minimalen Partikelgröße, sodass nur Partikel oberhalb dieser Grenze von dem „Particle Finder“ erfasst werden.

Dies ist vorallem bei Proben, die mittels fraktionierender Filtration gewonnen wurden, sinnvoll und steigert die Messeffizienz erheblich. Da die Partikel bereits in ähnlichen Größenklassen vorliegen, wird zudem die automatische Fokussierung, die für jeden Bildausschnitt unmittelbar vor der Partikelerkennung durch den „ParticleFinder“ durchgeführt wird, erleichtert. Auf die erkannten Partikel wird der Reihe nach ein Laserstrahl fokussiert und das unelastisch gestreute Licht (Raman-Effekt) detektiert. Im Vorfeld werden Parameter wie die Messzeit, Anzahl der Wiederholungen, Laserwellenlänge, Laserleistung, verwendetes Gitter und Spaltbreite individuell für die Probe festgelegt. Durch Änderung der Laserwellenlänge oder Spaltbreite kann beispielsweise der Fluoreszenz von Probenbestandteilen entgegengewirkt werden.

Mittels Raman-Mikrospektroskopie können sehr kleine Partikel mit einem Durchmesser von bis zu 1 μm gemessen werden. Da Trinkwasser- und Oberflächenwasserproben sehr viele Partikel enthalten und jedes Partikel individuell angefahren werden muss, ist die Messzeit sehr hoch. Zur Reduktion der Messzeit wird nicht die gesamte Filtermembran untersucht, sondern es werden einzelne, repräsentative Felder auf der Filtermembran ausgewählt und die dort detektierten MP-Partikel auf die gesamte Probe extrapoliert (siehe Abbildung 42). Trotz Automatisierung der Partikelerkennung und Messung von ca. 20–30 % der Filterfläche, ergibt sich eine durchschnittliche Messzeit von mehreren Stunden bis zu einer Woche pro Filtermembran. Am TZW werden bis zu 825.000 Partikel pro Filter gemessen. Davon ist zumeist nur ein geringer Anteil MP, während ein Großteil auf den Filterhintergrund sowie auf in der Probe enthaltene, bei der Probenaufbereitung nicht vollständig entfernbare, organische und anorganische Partikel entfällt.

Die Auswertung wurde anfangs manuell durch einen Vergleich der gemessenen Spektren mit der Datenbank „Know-it-all“ (Biorad, Hercules, CA, USA) sowie einer selbst erstellten Datenbank durchgeführt. Eine deutliche Beschleunigung der Auswertung wurde durch die semi-automatische Auswertung mit der Software TrueMatch (WITec, Ulm, Deutschland) erreicht. Zur Qualitätssicherung werden alle als Polymer identifizierten Spektren manuell gegengeprüft. Entscheidend für eine zuverlässige Analyse von MP-Partikeln ist, dass es nicht zu einer Überlagerung von Partikeln auf der Filtermembran kommt, da sonst Partikel nicht oder falsch erkannt werden. Einer Überlagerung von kleineren Partikeln durch größere wird durch die Fraktionierung in Teilproben während der Probenahme entgegengewirkt. Dennoch muss auch bei der Filtration der Extrakte auf die Filtermembranen darauf geachtet werden, dass es zu keiner Überladung der Filtermembran mit Partikeln kommt.

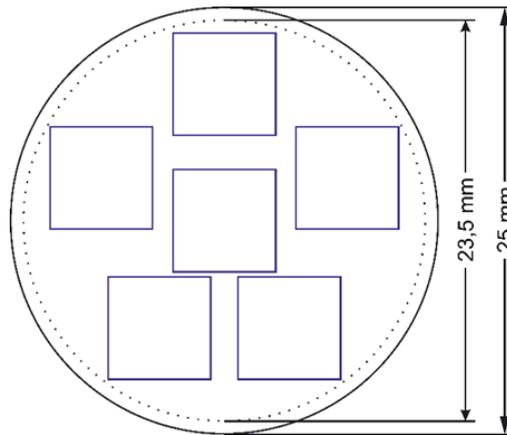


Abbildung 42: Schematische Darstellung der untersuchten Filterausschnitte auf einer PTFE-Filtermembran mit 23,5 mm effektivem Filterdurchmesser und 25 mm Gesamtdurchmesser

4.3 FT-IR-Spektroskopie (HSF)

Projektziel war es, MP-Partikel auf einem Filter mittels softwaregestützter Partikelerkennung zu erfassen und das Material jedes Partikels mittels FT-IR-Spektroskopie zu identifizieren. Als allgemein vereinfachtes Verfahren wird eine Filtration von wässrigen Proben auf einer Filtermembran durchgeführt. Die Filtermembran besteht aus Aluminiumoxid und ist somit für IR-Strahlung mit Wellenzahlen über 1500 cm^{-1} transparent. Als Messmodus für das IR-Spektrometer ist Transmission für die Identifizierung von Polymerpartikeln am besten geeignet, da der IR-Strahl das gesamte Teilchen durchdringt und so die Klassifizierung in Polymere und natürliche Partikel erfolgen kann. Da der IR-Strahl den gesamten Partikel durchdringt, sind die aufgenommenen Spektren weniger anfällig für Störungen durch Oberflächenmodifikationen wie Bio-Fouling und Sorption organischer Substanzen (NOM), welche die Identifizierung von MP-Partikeln mittels Oberflächentechniken beeinflussen können.

Die erzeugten IR-Spektren von MP-Partikeln werden einem Datenbankvergleich unterzogen, welcher die Spektren der Partikel einem Polymer oder natürlichem Material zuordnet. Um eine geeignete Datenbank zu erstellen, wurden Spektren verschiedener Referenzmaterialien, einschließlich der wichtigsten Homopolymermaterialien wie Polyethylen (PE), Polypropylen (PP), Polyethylenterephthalat (PET), Polystyrol (PS), Polyvinylchlorid (PVC), Polycarbonat (PC) und Polyamid (PA) aufgenommen. Der Vorteil einer vereinfachten Datenbank ist eine Erleichterung der Entscheidung, ob ein Partikel polymeren Ursprungs ist oder nicht, was darüber hinaus auch die Ausgabe und damit die Auswertung erleichtert. Ein Argument für spezifischere Datenbanken mit mehr Polymertypen, einschließlich Copolymeren, ist, dass durch Identifizierung des Polymermaterials die Quelle der Kontamination aufgeklärt werden könnte (Schmidt et al. 2017). Da allerdings der größte Teil des MP sekundären Ursprungs ist und somit die Polymere bereits verwittert, mit Biofilm bewachsen und z. T. transformiert sind, ist es zweifelhaft, ob eine Aufklärung und Zuordnung der Quelle realisierbar ist (Eubeler et al. 2010, Foulon et al. 2016, Lambert and Wagner 2016).

Die beschriebene Strategie erfordert eine vollständige Übertragung der (MP)-Partikel auf eine Filtermembran und eine speziell angefertigte Edelstahlhalterung, um den Filter auf dem Mikroskopie-Tisch zu fixieren. Dies ermöglicht den Nachweis auf der Filtermembran mittels FT-IR-Mikroskopie. Der Algorithmus zur Partikelerkennung basiert auf dem Kontrast zwischen der Filtermembran (Hintergrund) und der Partikel selbst. Als nächster Schritt erfolgt eine Zuordnung von Messbereichen, die durch vorherige Partikeldetektion bestimmt wurden. Für jedes Partikel bzw. jeden Messpunkt wird ein Spektrum des Partikels und ein zusätzliches Referenzspektrum des Filtermaterials aufgezeichnet. Nach Untergrundkorrektur werden die resultierenden Partikelspektren mit der Datenbank verglichen. Die untersuchten Bilder besitzen eine Fläche von 4 mm^2 , was nur 0,82 % der gesamten Filterfläche entspricht.

Abhängig von der Anzahl der Partikel auf einer Filtermembran ist es aus Zeitgründen nicht möglich, alle Partikel auf dem Filter zu untersuchen. Bereits die Messung einer 4 mm² Filterfläche dauert je nach Anzahl der detektierten Partikel zwischen 30 und 120 Minuten. Die Spektrenaufnahme der gesamten Filteroberfläche dauert mindestens 2,5 Tage.

Diese Tatsachen führen zu drei Hauptproblemen, die für alle spektroskopischen Methoden, die die Partikeldetektion auf verschiedenen Filtern verwenden, gleich sind. Das erste Problem betrifft geeignete Parameter für die Aufzeichnung von "sauberen" Spektren in einem akzeptablen Zeitrahmen. Das zweite Problem betrifft die Entscheidung, ob ein Partikel ein synthetisches Polymer ist oder nicht, die durch den Vergleich mit der Datenbank und anhand des Korrelationsfaktors getroffen wird. Die letzte Frage ist, wie viel Filterfläche oder Anzahl der Partikel untersucht werden muss, um reproduzierbare und repräsentative Ergebnisse für die Probeneinheit zu erzielen.

4.3.1 Methodenanpassung und Lösungsvorschläge

Die Parameter für die IR-Messung wurden nach mehreren Messungen von Standardpartikeln auf verschiedenen Filtermaterialien und der AnoDisc-Membran ausgewählt. Eine Auflösung von 4 cm⁻¹ und eine Scanzahl von zwei wurden als akzeptabel angenommen, da höhere Auflösungen und Anzahlen von Scans keine verbesserten Korrelationsfaktoren zeigten, aber längere Messzeiten erforderten. Zu berücksichtigen ist, dass eine Verdoppelung der Auflösung gleichbedeutend mit der Verdoppelung des Spiegelpfads und damit einer Verdoppelung der erforderlichen Messzeit ist. Das Gleiche gilt für die Ansammlung von Scans. Die gewählten Parameter waren Grundlage für die weitere Methodvalidierung.

Parameter für die Partikeldetektion können für die verwendete Software (Perkin Elmer) nicht standardisiert werden, da diese Parameter stark von der Art und Aussehen der Probe abhängen. Insbesondere bei der Arbeit mit Oberflächenwasserproben oder Sedimentproben ist eine Änderung des Kontrasts und der Helligkeit entscheidend, um vernünftige Ergebnisse für die Partikeldetektion sicherzustellen. Als Faustregel gilt, dass Helligkeit und Kontrast hohe Werte haben sollten. Dies führt nach eigenen Erfahrungen zu den besten Ergebnissen hinsichtlich der Partikelanzahl. Weitere Ansätze zur Partikeldetektion implementieren modifizierte Algorithmen und werden an anderer Stelle beschrieben (Anger et al. 2019).

Die untere Grenze für den Korrelationsfaktor wurde durch 10-fache Messung des gleichen Partikels (reines PS) auf einer AnoDisc-Membran bestimmt. Ein Korrelationsfaktor für jede einzelne Messung wurde über einen Datenbankvergleich ermittelt. Als untere Grenze wurde die Standardabweichung der Korrelationsfaktoren berechnet und die dreifache Standardabweichung vom Mittelwert des Korrelationsfaktors abgezogen.

Das gleiche Experiment wurde wiederholt, nachdem Partikel 24 Stunden lang mit Huminstoffen inkubiert wurden, da Oberflächenveränderungen für MP-Partikel in der Umwelt sehr wahrscheinlich sind. Oberflächenveränderungen umfassen neben der Beladung mit Huminstoffen auch Biofilmbildung, Versprödung oder eine Kombination davon. Beide Korrelationsfaktoren der Einzelmessungen und die resultierenden Grenzen sind in Abbildung 44 dargestellt. Die Korrelationsfaktoren waren in diesem methodischen Aufbau nicht von der Oberflächenmodifikation abhängig. Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt, ob Partikel mit Huminstoffen beschichtet waren oder nicht. Als Ergebnis wurde ein Korrelationsfaktor von 0,6 als untere Grenze gewählt, was einem Konfidenzintervall von 95 % entspricht, sodass MP nicht fälschlicherweise als nichtpolymere Partikel klassifiziert wird.

Die Methodik kann durchaus als robust angesehen werden, da Oberflächenmodifikationen von Partikeln die Qualifikation als MP-Partikel nicht beeinträchtigten.

Auf Basis der optimierten Methode wurden Reproduzierbarkeit und Korrektheit bestimmt. Die Robustheit ist der zentrale Vorteil der FT-IR-Mikroskopie gegenüber anderen spektroskopischen Ansätzen wie der Raman-Mikroskopie. Die Raman-Spektroskopie ist eine Oberflächentechnik und weist Interferenzen aufgrund von Fluoreszenz, resultierend u.a. von Huminstoffen und Algen auf den Oberflächen, als gravierenden Nachteil auf. Allerdings ist der wesentliche Vorteil der Raman-Spektroskopie gegenüber FT-IR die minimal nachweisbare Partikelgröße von bis zu 1 μm (Anger et al. 2018). Dieser Vorteil von Raman birgt allerdings auch eine weitere große Herausforderung, nämlich die nachweisbaren Partikelzahlen derselben Probe. Diese sind für Raman daher viel höher als für FT-IR, was automatisch zu einer drastischen Zunahme von Messzeiten führen kann (Anger et al. 2018, Huppertsberg and Knepper 2018). Das Scannen ganzer Filter oder Messungen jedes einzelnen Partikels sind weder für die Raman- noch für FT-IR-Mikroskopie in akzeptablen Messzeiten realisierbar. Die Aufnahme von Spektren und Bildern ist sehr zeitaufwändig und die Messung eines gesamten Filters kann für FT-IR leicht 48 Stunden dauern. Bei Raman können sich die Messzeiten sogar auf Monate oder Jahre summieren, was einerseits abhängig von den ausgewählten Parametern und andererseits von der Gesamtzahl der Partikel auf dem Filter ist. Selbst bei vollautomatischen Verfahren überschreiten die Messzeiten einen angemessenen Zeitrahmen für die Routineanalyse. Somit sind die Messungen ganzer Filter nicht möglich.

Für die Erstellung valider Ergebnisse in einem noch sinnvollen Zeitrahmen haben wir eine Messroutine entwickelt. Die Fläche der zu messenden Proben deckt zwischen 8 und 20 % der gesamten Filterfläche ab. Das Schema der Vorlage ist in Abbildung 43 zu sehen. Jeder Messbereich hat eine Größe von 2x2 mm und befindet sich in einer helikalen Matrix. Dieser Aufbau der einzelnen Messbereiche wurde gewählt, um die gesamte Filterfläche möglichst gleichmäßig abzudecken und damit die Chance auf eine fehlerhafte Extrapolation aufgrund lokaler Partikel-Hotspots zu minimieren.

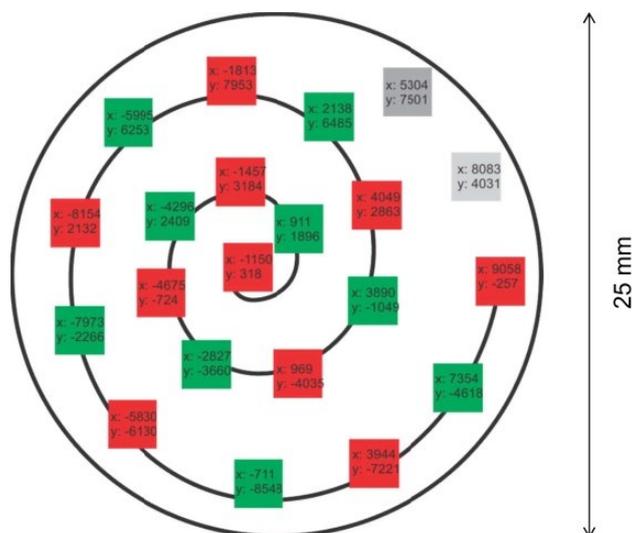


Abbildung 43: Anordnung der 2x2 mm Messflächen auf einem AnoDisc(R)-Filter mit jeweiligen X- und Y-Koordinaten ausgehend vom Mittelpunkt des Filters als (0/0)

Eine besonders hohe Hydrophobizität von MP-Partikeln stellt ein ernstes Problem für einen zuverlässigen Nachweis dar. MP-Partikel, insbesondere makellose Partikel, weisen ein hohes Aggregationspotential auf, da die Oberfläche nicht verwittert oder beschichtet und somit stark hydrophob ist. Diese Partikel neigen zu Aggregatbildung und Haftung an allen Arten von Oberflächen. Um dies zu verhindern/minimieren, wurde ein Tensid (SF 100) zur Stabilisierung der Suspension zugesetzt. Die Stabilisierung ist einerseits wichtig, um für einen quantitativen Transfer aller MP-Partikel auf den Filter zu sorgen und Partikelverluste zu minimieren. Andererseits ist sie erforderlich, um eine homogene Verteilung der MP-Partikel auf dem Filter zu erzeugen. Ein weiterer Vorteil von stabilisierten Suspensionen

im Labor erzeugter MP-Partikel besteht darin, dass eine Aliquotierung definierter Volumina mit bekannten Partikelzahlen möglich ist. Dies ist die Grundlage für die folgende Validierung. Die Methodenentwicklung und Auswahl des Tensids sind an anderer Stelle beschrieben (Eitzen et al. 2019). Eine stabilisierte Referenzsuspension mit bekannten Partikelkonzentrationen und Größenverteilungen wurde von der TU Berlin zur Verfügung gestellt. Diese Referenzsuspension wurde zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit, Genauigkeit und Korrektheit der entwickelten Methode verwendet.

4.3.2 Methoden-Validierung

Die Kontamination mit Artefakten stellt auch in der FT-IR-Spektroskopie ein wesentliches Problem dar. Es wurden Blindproben gemessen, um festzustellen, ob und wie viele Partikel während der Probenvorbereitung und anschließender Messung verschleppt wurden (Wesch et al. 2017, Wiesheu et al. 2016). In allen untersuchten Blindproben konnten keine MP-Partikel nachgewiesen werden, obwohl das gesamte Verfahren nicht in partikelfreien Arbeitsbereichen durchgeführt wurde. Dies zeigt, dass eine Kontamination der Luft mit Partikeln $> 25 \mu\text{m}$ sehr unwahrscheinlich ist und keine signifikante Rolle für den Nachweis mittels FT-IR-Mikroskopie spielt. Aufgrund des Gewichts von MP-Partikeln ist eine Verschleppung durch Luft durch große Partikel weniger wahrscheinlich. Da auch i.d.R. keine Klassifizierung von Fasern erfolgte, ist eine Verschleppung durch Staub oder Textilien als unwahrscheinlich anzusehen. Diese Blindwertproblematik hängt aber stark von der gewählten Methodik ab und wäre für die Raman-Spektroskopie ein durchaus relevantes Problem.

Die Reproduzierbarkeit wurde durch eine Dreifach-Messung eines Aliquots der Referenzsuspension bestimmt. Die Präzision wurde einmal mit einer Dichtentrennung (Probenmatrix war Sand und MP) und einmal ohne bestimmt. Beide relativen Standardabweichungen betragen $< 20 \%$ (16,5 und 19,4 %), was akzeptabel war. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde eine Probe mit einem Aliquot der Referenzsuspension versetzt. Diese wurde einmal direkt auf einer Anodisc-Membran und einmal nach einer oxidativen Behandlung mit H_2O_2 : H_2SO_4 ; 1: 3 für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gefiltert. Beide Experimente ergaben akzeptable Wiederfindungsraten (88,4 % mit 540 nachgewiesenen Partikeln, keine Probenvorbehandlung, RSD 16,5 %) und 101,1 % (190 nachgewiesene Partikel, oxidative Behandlung, RSD 35 %). Es scheint, dass die Wiederfindung und damit die Korrektheit im Wesentlichen von der Partikelanzahl und der homogenen Verteilung abhängig sind. Dies wurde bei der Bestimmung der Richtigkeit in Vergleichsstudien bestätigt. Insbesondere für spektrometrische Untersuchungen sind viel höhere Massen- und damit Partikelkonzentrationen erforderlich, um die hohe Nachweisgrenze zu überwinden (Dumichen et al. 2017). Dies führt zu Proben mit sehr hohen Partikelkonzentrationen, die mit Einzelpartikeltechniken (FT-IR und Raman) nicht korrekt bestimmt werden können

4.3.3 Ausblick

Die FT-IR-Mikroskopie ist eine robuste Methode für niedrige bis mittlere Partikelzahlen von 150–1000 Partikel pro Probe. Höhere Partikelzahlen haben die Tendenz zu Agglomerationen und somit heterogenen Verteilungen, was eine korrekte Quantifizierung behindert. Daher ist bei hohen Partikelkonzentrationen eine Unterschätzung der MP-Partikelkonzentrationen wahrscheinlich. Dies ist in Abbildung 44 zu sehen, da die Anzahl der kleinen Partikel um ein bis zwei Größenordnungen zu niedrig bestimmt wird, während bei größeren Partikeln (50–100 μm) das Gegenteil zu beobachten war. Trotzdem waren die MP-Partikel nicht homogen verteilt und agglomerierten während der Probenvorbereitung.

Die Probenvorbereitung zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Wiederfindung oder Präzision der Nachweismethode. Da nur Partikel $> 20 \mu\text{m}$ mittels FT-IR-Mikroskopie nachgewiesen werden können, traten keine Probleme mit Blindwerten durch Verschleppung von Artefakten auf. Kleine MP-Partikel oder -Fasern in der Luft und sehr kleine suspendierte Partikel können mit dieser mikroskopischen FT-IR-Methode nicht erfasst werden.

Im Vergleich zu anderen spektrometrischen Ansätzen weist diese Methode der MP-Detektion mittels FT-IR-Mikroskopie mehrere Vorteile, aber auch einige Einschränkungen auf. Die Detektion mittels Raman-Mikroskopie erfasst Partikel mit einer Größe von bis zu 1 μm , leidet jedoch unter einer mühsamen Probenvorbereitung. Diese Probenvorbereitung ist erforderlich, um Kontaminationen zu vermeiden, sowie die Eigenfluoreszenz der Matrix zu unterbinden. Zusätzlich ist jede mikroskopische Methode mit den Problemen der heterogenen Partikelverteilung auf dem Filtermaterial (Filterkuchenbildung und Filterporenverschlüsse) und der Verstopfung aufgrund hoher Partikelzahlen konfrontiert. Das Problem mit hohen Partikelzahlen verstärkt sich mit abnehmender Größe nachweisbarer Partikel. Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass Partikel $< 20 \mu\text{m}$ ein bis zwei Größenordnungen häufiger vorkommen als Partikel $> 20 \mu\text{m}$, was zu einer höheren Anzahl von Partikeln führt, die untersucht werden müssen.

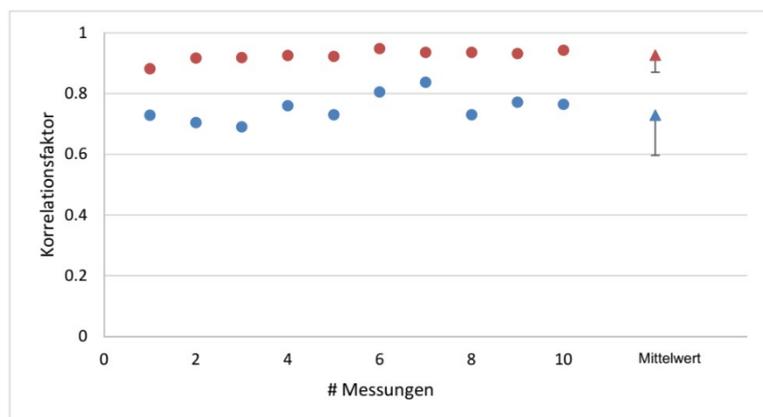


Abbildung 44: Korrelationsfaktoren für PS und die daraus resultierenden Annahmekriterien für einen positiven Datenbank Befund. Wiederholungsmessung von einem PS Partikel sind als Punkte angegeben (blau: in Wasser, rot: mit Huminstoffen ($\beta = 2 \text{ mg/L}$) für 24 h inkubiert). Die Dreiecke geben die Mittelwerte beider Messreihen an und der negative Fehlerbalken den Grenzwert für einen positiven Befund

HSF entwickelte eine Software für eine vereinfachte Auswertung der Fourier-Transform Infrarot Mikroskopie (Mikro-FT-IR). Diese ermöglicht die externe Speicherung aller Messparameter mit den jeweiligen Ergebnissen und verringert die Zeit, die für die manuelle Auswertung hinsichtlich der Zuordnung von Partikelgrößen und Polymermaterial notwendig war.

Zusammenfassend stellt die FT-IR-Methode eine einfache und robuste Methode dar, die in allen Laboren ohne Einschränkungen angewendet werden kann. Die Probenvorbereitung und -messung erfolgt zu Forschungszwecken in einem akzeptablen Zeitrahmen (eintägige Probenvorbereitung, vier bis acht Stunden Messzeit) und unterliegt keinen wesentlichen Einschränkungen. Abhängig von der analytischen Frage kann diese Methode für alle Arten von Umweltproben und Partikelgrößen $> 20 \mu\text{m}$ angewendet werden.

Es wurden Realproben und MP-Suspensionen von Projektpartnern verwendet, um Methodenparameter wie Präzision, Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsraten zu überprüfen. HSF hat an verschiedenen projektinternen und externen Vergleichsuntersuchungen teilgenommen, um die Richtigkeit der Methodik zu bestimmen. Bei der Bestimmung der Präzision der Methode konnten relative Standardabweichungen für Direktmessungen (16 %) und Messungen mit vorausgehender Dichtentrennung (19 %) unter 20 % gehalten werden. Die Wiederfindung für MP-Suspensionen, die direkt gemessen wurden und keine Probenvorbereitung durchlaufen haben betrug 88 %. Die oxidative Aufarbeitung zeigte keinen negativen Einfluss auf die Wiederfindungen (Ausnahmen bei oxidationsempfindlichen Polymeren). Diese lagen bei 101 %, allerdings mit höheren Standardabweichungen (Abbildung 45).

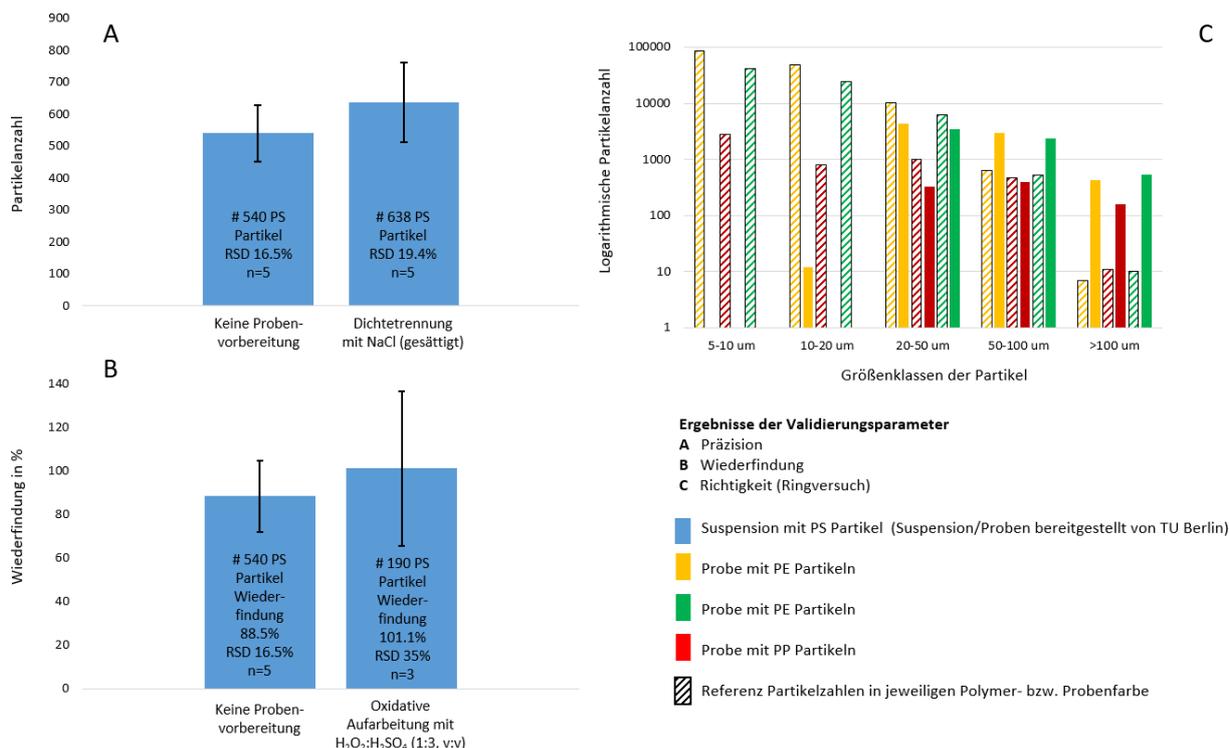


Abbildung 45: Ergebnisse der Methodvalidierung für die entwickelte FT-IR Methodik

4.4 Thermische Extraktion mit GC/MS (TED-GC/MS) (BAM)

Der Nachweis von MP mittels TED-GC/MS erfolgt anhand von spezifischen Zersetzungsproduktmarkern. Bei der TED-GC/MS wird die Probe unter inerten Bedingungen pyrolysiert und die Pyrolysegase werden auf einem Festphasenadsorber gesammelt, der sich während des gesamten Pyrolyseprozesses am Auslass des Ofens befindet. Nach dem Beladungsvorgang wird der Festphasenadsorber in die GC/MS-Einheit überführt. Die Zersetzungsprodukte werden remobilisiert, kryofokussiert und dann in das GC-System injiziert. Dort werden die einzelnen Zersetzungsprodukte chromatographisch getrennt und anhand von spezifischen Massenspektren identifiziert.

Im Rahmen des Projektes wurde dazu eine voll automatisierte Einheit aufgebaut, sowie auf die Analytik von MP optimiert.

4.4.1 Beschreibung

Thermoextraktion: Bis zu 100 mg Probenmaterial werden in einer thermogravimetrischen Analysenwaage unter Stickstoffatmosphäre pyrolysiert. Die Zersetzungsprodukte werden mit einem Stickstoffstrom aus der Thermowaage transportiert und durch eine beheizte Kopplungsvorrichtung über einen Festphasen-Absorber (SorbStar) aus Polydimethylsiloxan (PDMS) geführt. Es besteht die Möglichkeit, den Absorber nur in ausgewählten Temperaturbereichen, in denen sich die Polymere zersetzen, an den Zersetzungsproduktgasstrom zu koppeln. Dadurch ist z. B. der Ausschluss von niedrig siedenden Matrixkomponenten von der weiteren Analyse möglich.

Thermodesorption: Nachdem der Absorber mit einem repräsentativen Ausschnitt der Zersetzungsprodukte beladen ist, transportiert ein Autosampler den Absorber zu einer thermischen Desorption mit Gaschromatographen und Massenspektrometer. Hier werden die Zersetzungsprodukte vom Absorber thermisch remobilisiert, in einem Kaltaufgabesystem kryofokussiert, auf der chromatographischen Säule getrennt und im Massenspektrometer im Scanmodus detektiert. Durch die Autosampler der Analysenwaage und des GC-MS-Systems sind vollautomatische Messungen möglich.

Die Standardparameter für die Thermoextraktion sind: 25–600 °C mit einer Heizrate von 10 °C/min unter 30 mL/min N₂, Sorption der Zersetzungsprodukte zwischen 25 und 600 °C oder zwischen 350 und 600 °C. Im Anschluss an die Thermoextraktion wird automatisch ein Ausheizschritt an der Thermo- waage durchgeführt, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Dazu wird die Thermowaage unter 80 mL/min synthetischer Luft auf 1000 °C erhitzt und diese Temperatur für 25 min gehalten. Die Routine- parameter für den Thermodesorptionsschritt sowie die gaschromatographische Trennung und mas- senspektrometrische Detektion der Zersetzungsprodukte können der Tabelle 13 entnommen werden. Abbildung 46 zeigt das zentrale Kopplungsmodul des Gerätes. Die Analysenzeit für einen kompletten Lauf beträgt rund 140 Minuten. Als interner Standard wird deuteriertes Polystyrol verwendet.

Tabelle 13: Routine-Messparameter der TED-GC/MS

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Thermodesorption		Gaschromatograph (GC)	
Starttemperatur /°C	50	Flussrate (He) / ml min ⁻¹	1
Heizrate /°C min ⁻¹	40	Starttemperatur /°C	40
Endtemperatur /°C	200	Heizrate /°C min ⁻¹	5
Transferline Temperature /°C	250	Endtemperatur /°C	300
Kaltaufgabesystem		Haltezeit / min	
Starttemperatur /°C	-100	Massenspektrometer (MS)	
Heizrate /°C s ⁻¹	12	Scanreichweite / m z ⁻¹	35–350
Endtemperatur /°C	270	Quadrupoltemperatur /°C	150
		Ionenquellentemperatur /°C	230

4.4.2 Optimierung

Zur Optimierung des ersten Verfahrensschritts, die Thermoextraktion per TGA, wurden die Parameter Heizrate und Spülgasstrom sowie Probenmasse variiert. Als Modellsystem wurden PP und eine Schwebstoffmatrix verwendet. Die Hauptzersetzungsprodukte des PP sind Tri-, Tetra- und Pentamere. Die Ausbeute der einzelnen Zersetzungsprodukte ist abhängig von der Heizrate. Je schneller geheizt wird, desto mehr kleine Zersetzungsprodukte (Trimere) entstehen. Entsprechend weniger große Zer- setzungsprodukte (Pentamere des Propylens, Dimere des deuterierten Styrols) werden gebildet. Um die Vergleichbarkeit von Analysen zu gewährleisten, muss die Heizrate daher konstant gehalten wer- den. Da kleine Zersetzungsprodukte anderer Polymere häufig unspezifisch sind und auch von Mat- rixkomponenten entwickelt werden können, sollte die Heizrate nicht zu hoch gewählt werden. Sehr große Zersetzungsprodukte haben in der Regel nur geringe Dampfdrücke, scheiden sich an kühleren Geräteteilen ab und gasen nur langsam aus. Dadurch wird das GC/MS-System kontaminiert, so dass auch eine zu geringe Heizrate vermieden werden sollte. Eine zu geringe Heizrate erhöht außerdem die Analysenzeit. Als Kompromiss wird bei einer Heizrate von 10 °C/min gearbeitet. In der Variation des Spülgasstromes zeigte sich grob folgender Trend: Je höher der Spülgasstrom, desto geringer die Sig- nalausbeute. Ein höherer Gasstrom geht einher mit kürzerer Kontaktzeit des Zersetzungsgasstroms mit dem Festphasenabsorber. Andererseits können zu geringe Spülgasströme zu stationären Volumina in- nerhalb des Gerätes führen, die Kontaminationen verursachen. Als Kompromiss wird bei einem Volu- menstrom von 30 mL/min gearbeitet. Zu berücksichtigen ist, dass zusätzlich die Waagen-Elektronik

durch einen Stickstoffstrom von 20 mL/min und das Kopplungsmodul durch einen Stickstoffstrom von 6 mL/min gespült werden. Sämtliche Spülgasströme werden vor dem Festphasenabsorber vereint. Es wurden Reynoldszahlen berechnet, um abzuschätzen, ob der Spülgasstrom z. B. an Verengungen turbulent werden könnte. Aus den Berechnungen wurde abgeleitet, dass mit allen verwendeten als auch mit dem maximal einstellbaren Spülgasströmen von laminaren Flüssen ausgegangen werden kann. Abbildung 47 verdeutlicht die Abhängigkeiten der Signal-Intensitäten bezüglich der Parameter Heizrate und Spülgasvolumenstrom.

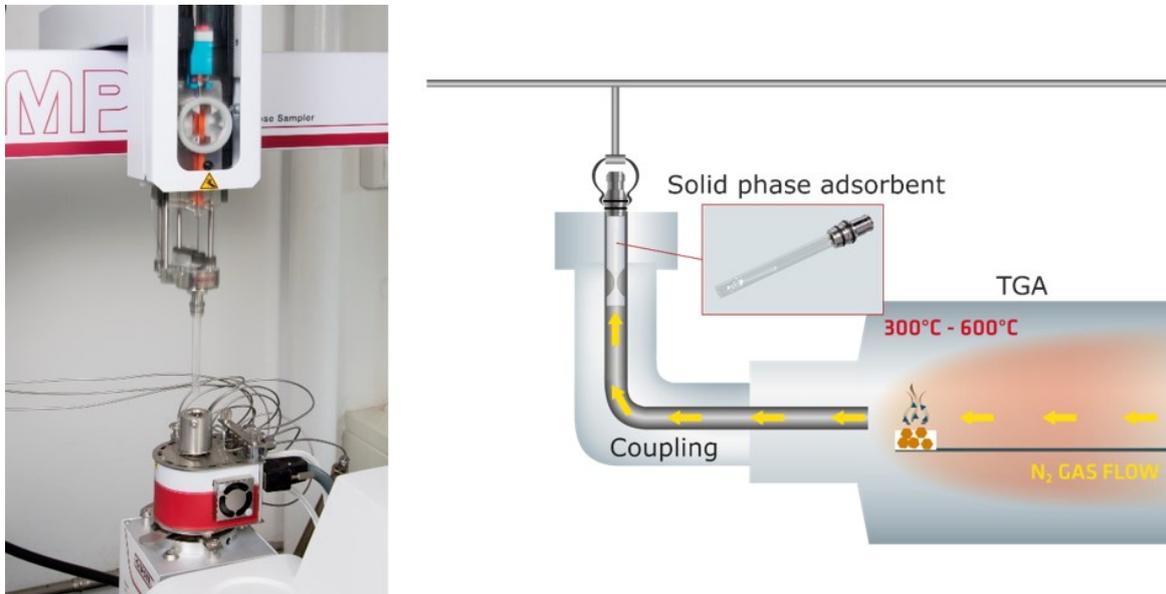


Abbildung 46: Schnittstelle zwischen den zwei Verfahrensschritten: Kopplung zwischen TGA und GC-MS

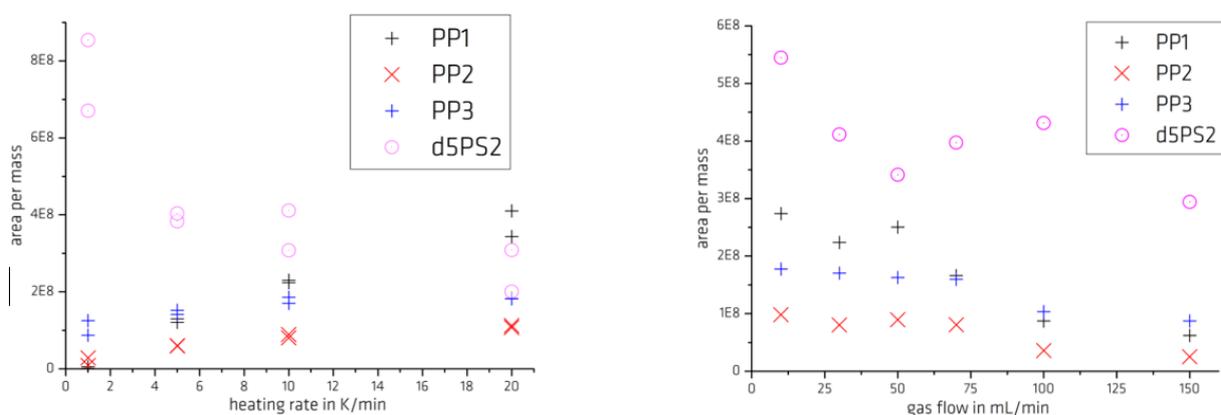


Abbildung 47: Peakflächen, normiert auf Polymermasse. PP1 bezeichnet das Propylentriemer, PP2 ein Signal eines Tetramers, PP3 ein Signal eines Pentamers und d5PS2 das Signal des Styroidimers

Aus den Peakflächen bei der Variation der Probenmasse lassen sich Kalibriergeraden erstellen. Diese Kalibriergeraden wurden für das PP alleine und PP in einer Schwebstoffmatrix verglichen (Abbildung 48). Da Zersetzungsprodukte der Matrix und des PP um Adsorberplätze auf der Festphase konkurrieren, sind die Signalintensitäten mit Matrix geringer und die Empfindlichkeit reduziert. Die Signalintensitäten des internen Standards sind in ähnlichem Umfang betroffen, so dass bei der Darstellung von Peakflächen-Verhältnissen zu Massenverhältnissen dieser Effekt eine geringere Rolle spielt. Durch Normierung von Analytpeakflächen auf Peakflächen von Zersetzungsprodukten des internen Standards können Matrixeinflüsse auf die Quantifizierung ausgeglichen werden.

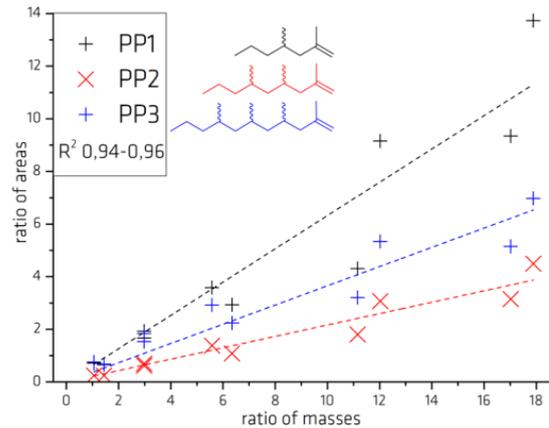
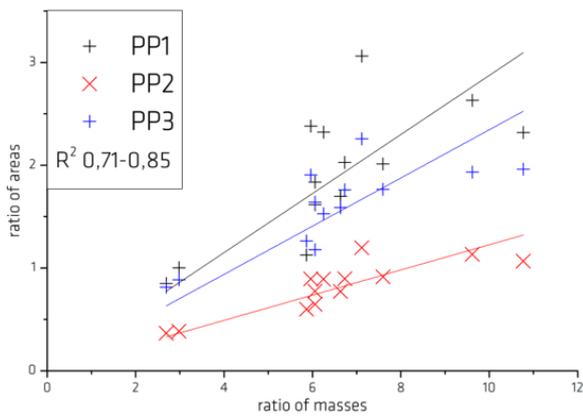


Abbildung 48: Kalibriergeraden für PP ohne (links) und mit Schwebstoffmatrix (rechts)

Die Standardabweichung bei Mehrfachmessung von reinen Polymeren mit dem TED-GC/MS-System beträgt rund 30 %. Durch die Verwendung des internen Standards konnte dieser Wert auf 17 % verbessert werden. In Schwebstoffmatrix verbessert sich die Reproduzierbarkeit weiter bis auf 13 % Abweichung. Am automatisierten System werden Zersetzungsprodukte niedriger molarer Masse besser sorbiert als am Vorläufersystem mit der manuellen Kopplung. Dadurch wird das Signal des Monomers des deuterierten PS als Referenzsignal nutzbar, wodurch sich die relative Standardabweichung bis auf 4 % verringern lässt. Abbildung 49 zeigt die Peakflächen eines Propylenpentamers bei Mehrfachmessung.

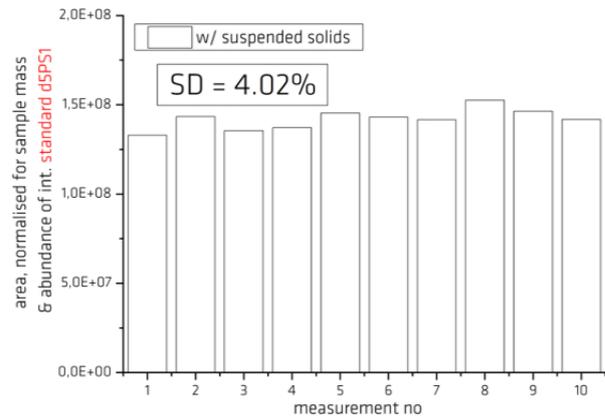
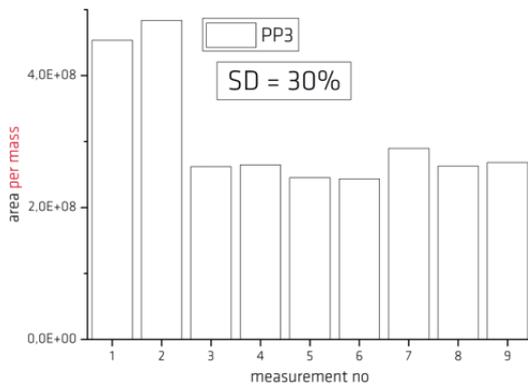


Abbildung 49: Peakflächen eines Propylenpentamers bei Mehrfachmessung, ohne und mit Optimierung durch internen Standard, Matrix und Berücksichtigung kleiner Zersetzungsprodukte

Anschließend erfolgten erste stationäre Simulationen, um die am Sorbstar ablaufenden Prozesse besser zu verstehen. Abbildung 50 zeigt die Strömungsgeschwindigkeiten, die in einem Desorptionsröhrchen, gefüllt mit einem Sorbstar, auftreten können. Es ist zu erkennen, dass es an der Verjüngung des Röhrchens zu hohen Strömungsgeschwindigkeiten kommt, im restlichen Teil herrschen moderate Strömungsgeschwindigkeiten mit überwiegend laminaren Strömungen.

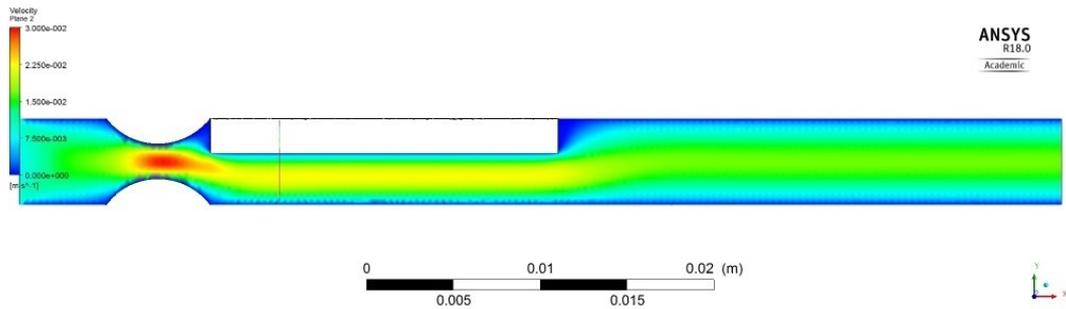


Abbildung 50: Erste statische Simulationsansätze zum Verständnis der Vorgänge am Sorbstar

Zusätzlich wurde die für die Thermoextraktion verwendete Masse an PDMS variiert. Hierfür wurden verschiedene Massen des Sorbstars in das Desorptionsröhrchen gegeben und für die Messung eines Blindwerts (nur deuteriertes Polystyrol, D5-PS) eingesetzt. Höhere Massen an PDMS führten zu einem Anstieg der Signale des deuterierten Styrols sowie des Dimers des Styrols. Signale des Trimers blieben unverändert. Dies lässt darauf schließen, dass größere Mengen an PDMS zu einer höheren Empfindlichkeit der Methode führen und dementsprechend keine Reduzierung der PDMS Masse zu empfehlen ist. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass aufgrund der unterschiedlichen Größen der PDMS-Stücke die Position im Desorptionsröhrchen sowie im TDU-Heizbereich nicht vergleichbar sind und diese zu veränderten Strömungsbedingungen führen könnten. Die maximal einsetzbare Menge an PDMS ist außerdem durch den TDU-Heizbereich (untere 30 mm) eingeschränkt.

Zusätzlich wurden Versuche durchgeführt, um den Sorptionsort der Analyten auf dem Festphasenmaterial aufzuklären. Als Modellsubstanz diente wiederum der interne Standard D5-PS. Die Thermoextraktion wurde unter Verwendung des Sorbstars wie gewohnt durchgeführt. Anschließend wurde die Festphase geteilt (unten, Mitte unten, Mitte oben, oben) und die einzelnen Stücke mittels TED-GC/MS analysiert. Die erhaltenen Peakflächen der Markersubstanzen wurden anschließend verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass sich die größeren Produkte verstärkt im vorderen Bereich der Festphase befinden (Trimere, Dimere) und die kleineren Degradationsprodukte (Monomere) gleichmäßig auf dem gesamten Sorbstar verteilt sind.

4.4.3 Identifikation und Nachweisgrenzen

Abbildung 51 und Abbildung 52 zeigen Chromatogramme der Zersetzungsprodukte der Polymere, sowie deren relevante Markermoleküle, diese können, mit wenigen Ausnahmen, nicht aus polymerfreien Umweltmatrices nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen der einzelnen Polymere, berechnet als fünffaches Signal-zu-Rausch-Verhältnis, sind in der Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Nachweisgrenzen der TED-GC/MS

Polymer	LOD in μg
PE	2,2
PP	0,14
PS	0,08
PET	0,24
PMMA	0,12
PA6	0,24
PA6.6	3,4
SBR	0,06
NR	0,03

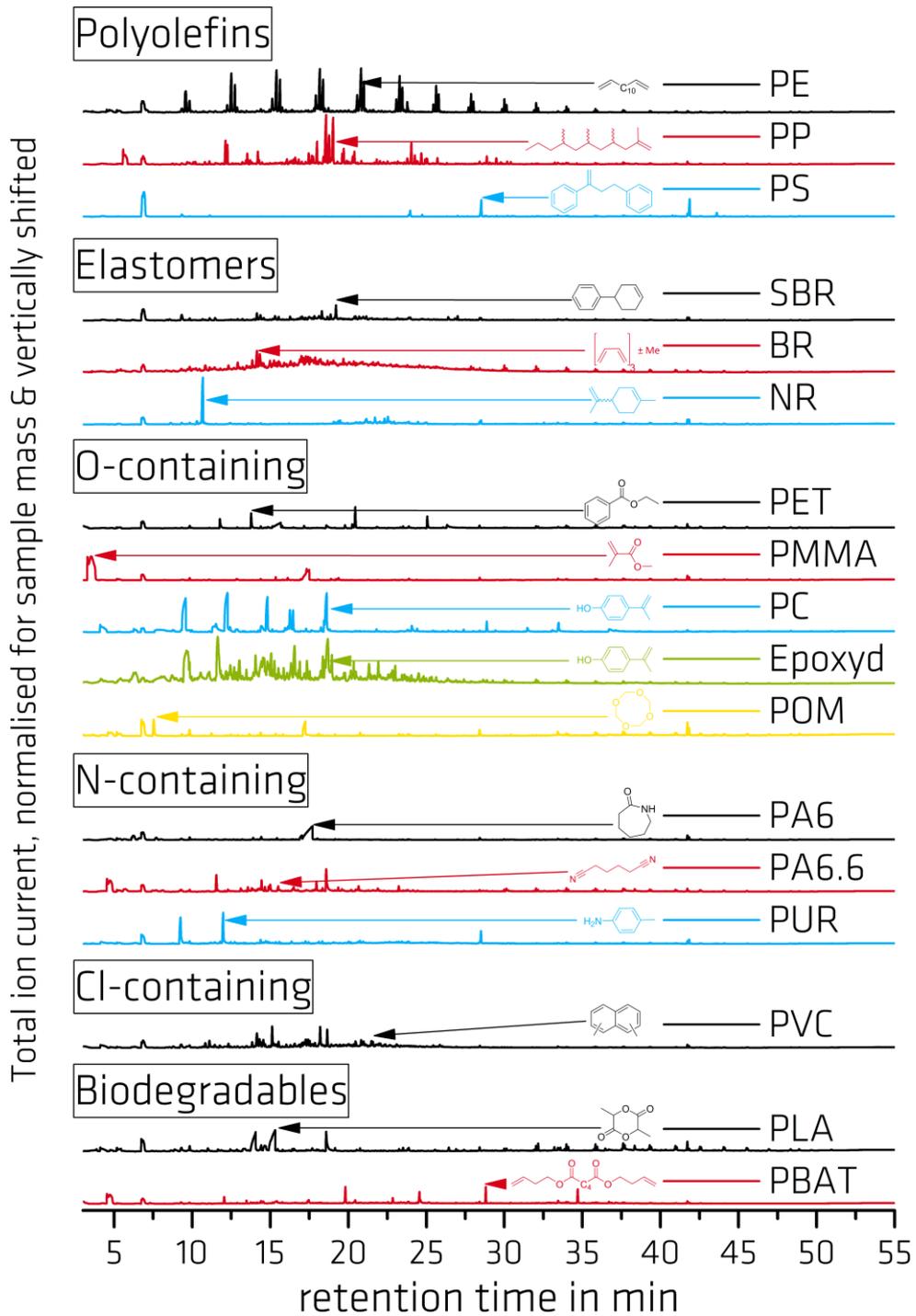


Abbildung 51: Darstellung von TED-Chromatogrammen von Polymeren mit ausgewählten Zersetzungsproduktmarkern einzelner Polymere

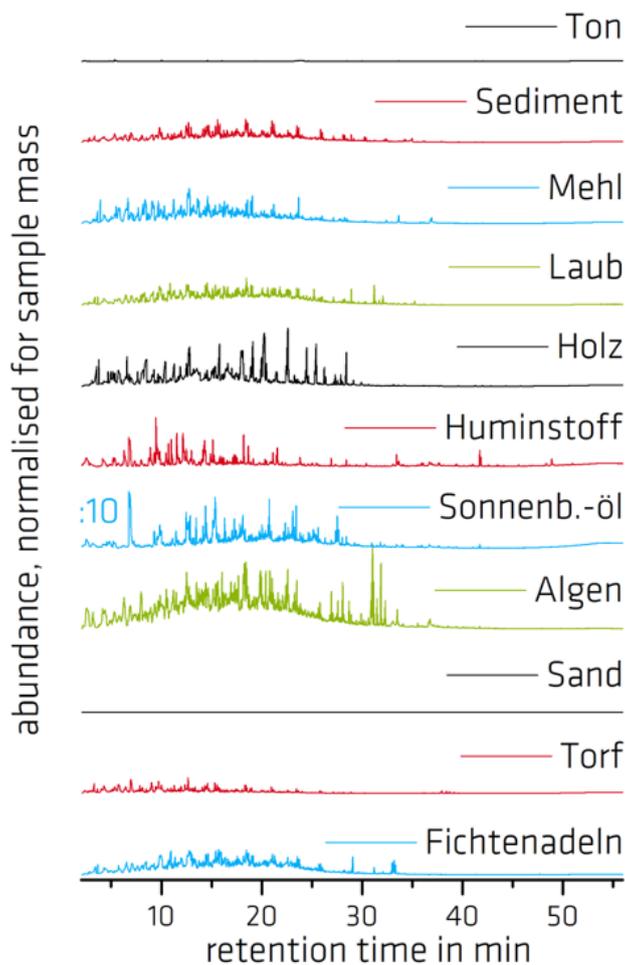


Abbildung 52: TED-Chromatogrammen von Umweltmatrixes

4.4.4 Quantifizierung

Zur Quantifizierung stehen verschiedene Ansätze zur Auswahl. Wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben, können Kalibriergeraden für die einzelnen Polymere erstellt und zur Quantifizierung genutzt werden. Der Aufwand, der zur Erstellung der Kalibrierkurven für die verschiedenen Kunststoffe in verschiedenen Matrices betrieben werden müsste, ist aber nicht zu rechtfertigen. Die Nutzung von externen Kalibrierkurven ohne Berücksichtigung von Matrixeffekten ist mit zu großen Unsicherheiten behaftet.

Eine Alternative wäre die Quantifizierung über Isotopenstandards, die dem Probenmaterial hinzugefügt werden. Unter der Annahme, dass sich diese Standards exakt wie die normalen Polymere verhalten, ließe sich durch einen einfachen Dreisatz die Menge an Polymer bestimmen. Der hohe Preis der Isotopenstandards (250–3.000 \$/g, Polymer Source) relativiert sich durch die geringen pro Analysengang benötigten Mengen (5–50 µg). Allerdings stehen nur wenige isotopenmarkierte Polymerstandards kommerziell zur Verfügung und die Handhabung solch geringer Mengen ist problematisch, da sich mit wenigen Ausnahmen keine Lösungen herstellen lassen. Einzig deuteriertes PS ist erhältlich und leicht löslich in Toluol, so dass diese Quantifizierungsmethode auf PS beschränkt ist.

Die Ein-Punkt-Standardaddition ist zur Quantifizierung aller anderen Kunststoffe ein guter Kompromiss aus Mehraufwand und Ergebnisgenauigkeit. Hierbei wird die Probe mit den qualitativ detektierten Polymeren dotiert und erneut gemessen. Dadurch werden Matrixeffekte berücksichtigt. Aus den Differenzen der Flächen und der Masse der zugegebenen Polymere lassen sich Responsefaktoren berech-

nen. Diese geben an, welche Peakfläche von einer bestimmten Menge Polymer in der jeweiligen Probenmatrix verursacht wird. Mithilfe dieser Responsefaktoren und den ursprünglichen Peakflächen kann schließlich quantifiziert werden.

Zur quantitativen Auswertung der Signale wurden verschiedene Ansätze durchgeführt. Zum einen wurden Kalibrierreihen mit verschiedenen Polymeren aufgenommen, zum anderen über ein Additionsverfahren Polymermengen in Proben bestimmt, siehe Abbildung 53. Bisher zeigt sich das Additionsverfahren als das genauere Verfahren, der Mehraufwand ist aber erheblich, da pro Probe mit zusätzlichen Messungen gerechnet werden muss. Deshalb wurde bei größeren Messserien entweder I) extern ohne Matrix kalibriert oder II) ausgewählte Proben der Messserie als Grundlage für Kalibrierungen mit Matrix genutzt und die erhaltenen Responsefaktoren für die gesamte Messserie verwendet.

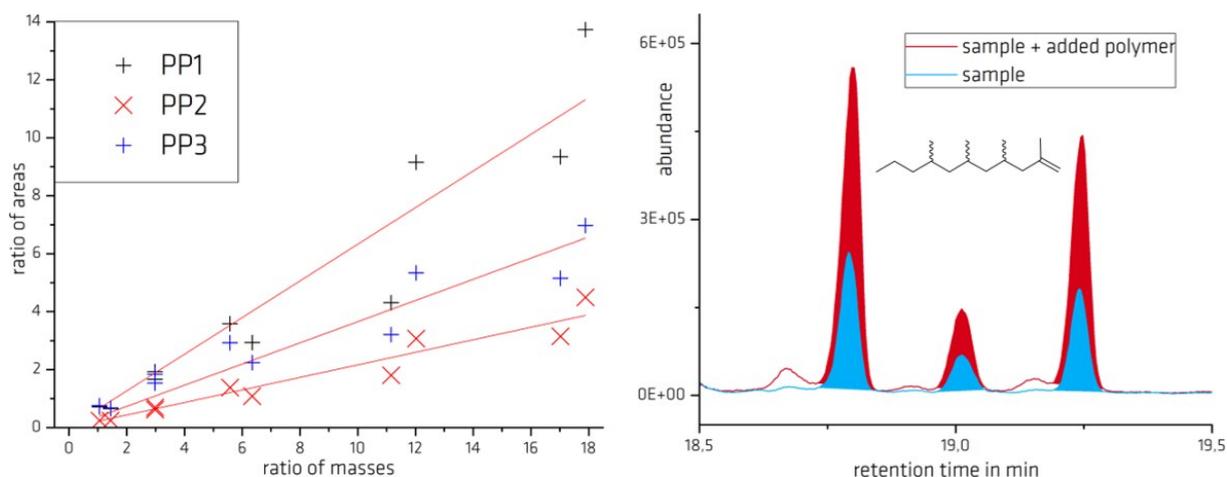


Abbildung 53: Darstellung verschiedener Quantifizierungsverfahren für MP: Kalibrierkurven (links), Additionsverfahren (rechts)

4.4.5 Limitationen deuterierten Polystyrols als interner Standard

Um die Vergleichbarkeit und Standardabweichung der TED-GC/MS-Messungen zu verbessern, wird zu jeder Messung eine konstante und gut reproduzierbare Menge an deuteriertem Polystyrol hinzugegeben und anschließend die Peaks im Chromatogramm auf Peaks von Zersetzungsprodukten des D5-PS normiert. Unter bestimmten Umständen ist allerdings ein Austausch der Deuteriumatome an den Zersetzungsprodukten zu beobachten. Abbildung 54 (linke Hälfte) verdeutlicht das Auftreten des Wasserstoff-Deuterium-Austausches anhand von Ionenspurchromatogrammen der Molekülmassen von normalem Styrol (m/z 104), 5-fach deuteriertem Styrol (m/z 109) sowie aller Substitutionsgrade dazwischen (m/z 105–108). Auf der linken Seite der Abbildung ist ein Chromatogramm dargestellt, in dem Styrol und d5-Styrol ohne H/D-Austausch nebeneinander gemessen wurden; auf der rechten Seite findet ein Austausch statt und die Styrolisotopologen mit unterschiedlichen Deuterierungsgrad sind im Chromatogramm deutlich sichtbar. Hierdurch ist die Eignung der Substanz als interner Standard nicht mehr gegeben, da der Austausch bei normalen Polymeren nicht auftreten kann. Wird das Deuterium zu einem großen Anteil oder gar komplett ausgetauscht, so können auch falschpositive Befunde von PS durch den Standard verursacht werden.

Nach derzeitigem Kenntnisstand sind dafür ein geringer Organikgehalt in der Probe in Verbindung mit Erdalkali- und Aluminium(ionen) verantwortlich. Der Austausch ist umso stärker, je feiner die Materialien vorliegen. Matrices, in denen der Isotopenaustausch beobachtet wurde, umfassen Sand- und Bodenproben sowie Proben mit einem hohen Gehalt an Glasfasern. In diesen Matrices liegen die Erdalkali- und Aluminiumionen in einer Silikatmatrix vor, die selbst aber keinen Einfluss auf den Austausch

hat. Dies zeigten Untersuchungen an verschiedenen anorganischen Verbindungen. Eine einfache Gegenmaßnahme zur Unterdrückung des Isotopenaustausches ist die Erhöhung des Organikanteils in problematischen Proben, z. B. durch das Hinzufügen von Torf. Abbildung 54 (rechte Hälfte) zeigt Peakflächen von Styrol und d5-Styrol bei einer Blindwertmessung (kein Austausch), bei Messung von gemahlenem Seesand (starker Austausch mit Bildung von Styrol) sowie bei Messungen von gemahlenem Seesand mit 5 % Torfanteil (kein Austausch) und unterschiedlichen Schichtungen der Komponenten. Unterschiedliche Schichtungen der Sand-, Torf- und Standardkomponenten im Tiegel sind für die Austauschreaktion nicht relevant. Die Peakflächen des d5-Styrols erreichen hier zwar nicht die Ausgangswerte des Blindwertes, liegen aber im normalen Bereich für Umweltproben wie im Diagramm des Mischwasserüberlaufs gezeigt.

Die Verwendung von ^{13}C -markierten Verbindungen an Stelle von deuterierten Substanzen ist höchstwahrscheinlich eine weitere, wenn auch kostenintensivere Alternative (nicht untersucht).

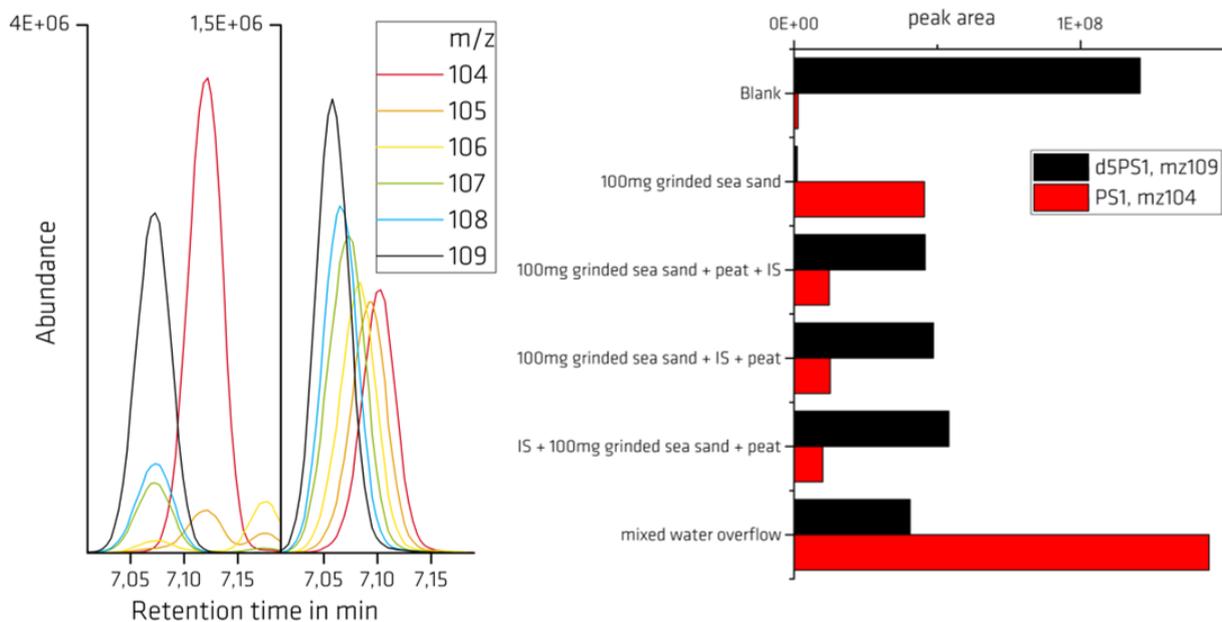


Abbildung 54: Ionenspurchromatogramme der Molekülmassen von Styrol mit unterschiedlichem Deuteriumsstitutionsgrad, ohne und mit Wasserstoff/Deuterium-Austausch, rechts: Peakflächen von Styrol und d5-Styrol bei Messungen von Blindwert, Seesand, Seesand und Torf sowie einer typischen Umweltprobe

Während des Projektfortschrittes stellte sich heraus, dass die Pyrolyse von bestimmten Fettsäuren ebenfalls zur Bildung von Alkadienen führt und dadurch die Quantifizierung des PE, welches über die Alkadiene durchgeführt wird, erschwert wird. Es stellte sich heraus, dass das Alkadien, welches zur Auswertung verwendet wurde, nicht durch die Pyrolyse von PE entsteht. Das korrekte PE-Signal co-eluiert mit einem Keton, welches sich nach ersten Untersuchungen als Oxidationsprodukt des PE herausstellte. Es wurden deshalb erneute TED-GC-MS Messungen unter Verwendung einer HP-5 Säule durchgeführt, die zur chromatographischen Trennung von Keton und Alkadien führten. Dies ermöglichte die störungsfreie Quantifizierung von PE in diesen Proben.

4.5 Elementanalysen (UFZ)

4.5.1 Elementgehalte

Wie bereits in Abschnitt 3.3 beschrieben, erfolgte die Elementanalytik nach Mikrowellensäureaufschluss in Lösung mittels ICP-MS und ICP-OES. Zudem wurden Feststoffe mit LA-ICP-MS auf ihre Elementzusammensetzung untersucht. Die Untersuchung von PE Referenzmaterialien (ERM-EC681 und ERM-EC680, IRMM, Belgien) mit bekannten Elementgehalten mittels ICP-MS zeigte eine gute Übereinstimmung mit den zertifizierten Konzentrationen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Zertifizierte und gemessene Elementgehalte von Referenzmaterial mit geringer (EC-680m) und hoher (EC-681m) Elementkonzentration.

Element	ERM-EC680m, zertifiziert	ICP-MS	ERM-EC681m zertifiziert	ICP-MS
	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]	[mg/kg]
As	4,7 ± 0,4	4,4	17 ± 1,2	15
Cd	20,8 ± 0,9	20	146 ± 5	130
Cr	9,6 ± 0,5	9,4	45,1 ± 1,9	40
Pb	11,3 ± 0,4	11	69,7 ± 2,5	65
S	86 ± 9	78	640 ± 100	570
Sb	9,6 ± 0,7	9,5	86 ± 7	78
Sn	20,7 ± 1,6	20	99 ± 6	93
Zn	194 ± 12	180	1170 ± 40	1010

Für die Bestimmung der Elementgehalte von Kunststoffen wurden insgesamt 173 Proben untersucht. Zu den untersuchten Proben gehörten folgende Kunststoffsorten: PE (n = 46), PP (n=36), Reifenlauffläche (n=30), PVC (n = 10), EPS (n = 7), PUR (n = 4), PES (n = 1), SAN (n = 1) und PET (n = 1). Das Probenaset beinhaltete Haushaltsgegenstände, Abfälle aus dem urbanen Raum, Plastik aus einer Talsperre (UFZ Magdeburg), Gegenstände aus dem Elektrobedarf, Plastik aus dem Pazifik sowie Laufflächen gebrauchter PKW Reifen. Bei der Auswertung mit multivariater Statistik erfolgte ein Ersetzen aller Werte unterhalb der Nachweisgrenze mit 0,5·LOQ. Bei der Berechnung von Medianwerten wurden Werte unterhalb der Nachweisgrenze nicht berücksichtigt. Die ermittelten Elementkonzentrationen lagen im µg/kg-Bereich (Tabelle 16) bzw. µg/g-Bereich für Mengenelemente (Al, Ca, Fe, K, Mg Na, P, S, Si, Ti).

Tabelle 16: Elementgehalte untersuchter Plastikproben für ausgewählte Elemente. Werte unter der Nachweisgrenze wurden nicht berücksichtigt.

	As	Ba	Bi	Cd	Co	Cr	Cu	Pb	Sb	Sn	Zn
Median (µg/kg)	0,172	2,70	0,120	0,037	0,047	0,830	1,65	0,315	0,890	0,621	39,2
Standardabweichung	1,77	1540	1260	7,66	3,19	16,1	235	76,1	1450	149	638
Anzahl Beobachtungen	91	143	22	97	127	141	142	139	41	78	116

Zwischen den Polymersorten wurden nur geringe Unterschiede in der Elementzusammensetzung festgestellt. Um die Zusammensetzung weiter zu untersuchen, wurden Methoden der multivariaten Statistik eingesetzt. Eine Hauptkomponentenanalyse war insofern nicht erfolgreich, als dass die zwei ersten Hauptkomponenten zusammen nur ca. 38 % der Gesamtvariation erklärten. Eine k-means-Clusteranalyse führte lediglich zu einer Abgrenzung der Reifenproben von anderen Polymersorten. Eine Wiederholung der Clusteranalyse ohne die Reifenproben führte weder zu einem clustern nach Polymersorte noch nach Probenherkunft. Es kann also festgehalten werden, dass im Rahmen der betrachteten

Proben keine spezifische Elementzusammensetzung für bestimmte Polymersorten identifiziert werden konnte außer im Falle der Reifenproben. Die elementare Zusammensetzung von Reifenlaufflächen unterschied sich maßgeblich von den Plastikproben. Weitere Methoden der multivariaten Statistik (hierarchische Clusteranalyse, support vector machines) führten nicht zu anderen Ergebnissen.

4.5.2 Elementgehalte in Reifenabrieb

Die Elementgehalte der Reifenproben stimmten weitgehend mit Literaturwerten überein (Tabelle 17). S und Zn waren mit > 8 g/kg drei Größenordnungen höher konzentriert als die anderen betrachteten Elemente. Zudem war Zn das Element mit der geringsten Schwankung zwischen den Proben (relative Standardabweichung 23 %). Um ein geeignetes Element zur Quantifizierung zu identifizieren, wurden Wiederfindungsversuche mit TP_{mix} dotiert in Sediment aus dem Tegeler See durchgeführt. Die Proben wurden einer Dichteseperation mit SPT bei einer Dichte von $1,9$ g/cm³ unterzogen. Die Effektivität der Methode war bereits zuvor bestätigt worden (20 Reifenpartikel in Sand dotiert, Wiederfindung 99 ± 2 %, 5 Replikate). Bei einer dotierten Konzentration von 60 mg TP_{mix}/g Sediment (Trockengewicht) führte die Zn-Bestimmung zu einer Wiederfindung von 100 ± 4 % wohingegen die Bewertung über andere Elemente zu Überbestimmung führte (160 – 21.000 %). Diese Überbestimmung lag in der geringen Konzentration der Elemente in Reifen und der hohen Konzentration im Sediment begründet. Zn wurde daher als geeignetes Markerelement zur Quantifizierung von Reifenmaterialien identifiziert. Ein Auslaugen von Zn aus TP_{mix} in die SPT Lösung während der Dichteseperation beeinträchtigte die Quantifizierung nicht maßgeblich, da nach 7 Tagen Exposition in SPT (pH=3) der Zn-Gehalt von TP_{mix} noch 92 % des ursprünglichen Gehalts betrug (Klößner et al. 2019).

In Versuchen zum Leachingverhalten in wässrigem Milieu betrug die freigesetzte Zn-Menge in Abhängigkeit von den hydrochemischen Bedingungen (pH-Wert, DOC-Konzentration) über einen Zeitraum von 7 Tagen $0,1$ – $2,2$ % des Zn-Gesamtgehalts im Reifenmaterial. In einem Zeitraum von 312 h (13 Tage) wurde aus reinen Reifenpartikeln ein Leaching von $0,5$ – $4,8$ % des in Reifen enthaltenen Zinkanteils beobachtet. Dieser Versuch wurde bei verschiedenen pH-Wertbedingungen durchgeführt und stellte neutrale (pH = $5,2$), leicht basische (pH = $8,0$) und saure (pH= $3,5$) aquatische Milieus nach. Unter den gegebenen Bedingungen kann ein negativer Einfluss des Zn-Leaching auf die Nachweismethode als gering eingeschätzt werden.

Tabelle 17: Elementgehalte von 21 gemahlene Reifenproben. Die Elementgehalte wurden nach Mikrowellensäureaufschluss mit ICP-OES und ICP-MS bestimmt

Element	Einheit	TP Mittelwert (n = 21)	TP Median (n = 21)	Kocher et al. (2010) Mittelwert (n = 65)	Kocher et al. (2010) Median (n = 65)	Kreider et al. (2010) Mischprobe aus 3 Reifen
As	mg/kg	$0,28 \pm 0,21$	0,20	2 ± 0	2	$< 64,5$
Bi	mg/kg	$1,1 \pm 1,9$	0,44	not reported	not reported	86,8
Cd	mg/kg	$0,35 \pm 0,30$	0,21	$1,66 \pm 1,16$	1,36	$< 4,99$
Co	mg/kg	$4,2 \pm 15$	0,20	not reported	not reported	< 164
Cr	mg/kg	$2,2 \pm 1,1$	2,1	$4,60 \pm 1,75$	4,16	< 245
Cu	mg/kg	$4,8 \pm 5,5$	3,1	$7,09 \pm 3,96$	6,35	21,5
Ni	mg/kg	$3,7 \pm 5,6$	1,7	$8,70 \pm 6,43$	6,79	not reported
Pb	mg/kg	14 ± 11	9,4	$18,2 \pm 17,2$	13,2	$< 13,9$
Sb	mg/kg	$0,039 \pm 0,047$	0,016	$3,76 \pm 12,4$	1	76,5
S	g/kg	$16 \pm 7,1$	14	not reported	not reported	12
Zn	g/kg	$8,7 \pm 2,0$	8,1	$11,3 \pm 3,92$	10,3	9

Die Quantifizierung von TRWP anhand des Zinkgehalts beruhte auf folgender Annahme: Die TRWP Heteroaggregate bestehen zu 50 % aus Gummi der Reifenlauffläche und zu 50 % aus straßenbürtigen Partikeln (Kreider et al. 2010, Panko et al. 2013, Unice et al. 2019). Der Zn-Gehalt in TP war 8,7 g/kg (Tabelle 17). Der Zn-Gehalt von TRWP wird deshalb mit ca. 4,35 mg Zn/g TRWP angenommen (ZnTRWP). Des Weiteren wurde angenommen, dass der durch Dichteseperation in der aufgeschwemmten Fraktion angereicherte Zn-Gehalt reifenbürtig ist. Diese TRWP-Zn-Fraktion ist in der nachfolgenden Beispielrechnung mit Zn_{sample} bezeichnet. Bei einem Zn-Gehalt der leichten Fraktion relativ zur Gesamtprobe von 0.613 mg Zn/g ergibt sich nach folgender Rechnung

$$TRWP_{sample} = \frac{0.613 \frac{mg_{Zn}}{g_{sample}}}{4.35 \frac{mg_{Zn}}{g_{TRWP}}} = \frac{0.613 mg_{Zn}}{g_{sample}} * \frac{g_{TRWP}}{4.35 mg_{Zn}} = 0.141 \frac{g_{TRWP}}{g_{sample}} \quad \text{Formel 4}$$

ein Gehalt von 0,141 g TRWP/g oder 141 mg TRWP/g. Die Übereinstimmung dieser Methode mit einer unabhängigen Methode (TED-GC/MS) wird in Abschnitt 5.3 weiter erläutert.

Der Arbeitsbereich der Methode wurde mit TP_{mix} Partikeln dotiert in Sediment aus dem Tegeler See geprüft. Der geprüfte Konzentrationsbereich reichte von 2–200 mg TP/g, dies entspricht 4–400 mg TRWP/g. Dies entspricht hohen Konzentrationen von Straßenoberflächen und straßennahen Böden (Wagner et al. 2018). Die Massenwiederfindung reichte von 85 % (200 mg TP/g) bis 123 % (2 mg TP/g) bei einem Mittelwert von 95 ± 17 % (Klößner et al. 2019). Im unteren Konzentrationsbereich (2–10 mg TP_{mix} /g) lag die Wiederfindung bei 112 ± 21 %. Limitierend für die Quantifizierung war nicht die Sensitivität der Elementanalytik, welche eine Quantifizierung von bis zu 0,002 mg TRWP/g erlauben würde, sondern der Anteil anderer Zn-Quellen in der angereicherten Fraktion. Der Zinkgehalt der aufgeschwemmten Fraktion in der undotierten Probe war 0,083 mg Zn/g. Dieser Zn-Anteil kann nicht eindeutig TRWP zugeordnet werden, zumal TED-GC/MS Analysen keine TRWP Marker im Sediment des Tegeler Sees fanden. Hintergrund-Zn wurde also im vorliegenden Beispiel nicht vollständig abgetrennt. Allerdings stellte das Tegeler See Sediment in mehrerer Hinsicht eine besonders herausfordernde Probe für die vorgestellte Methode dar: der Zn Gehalt der unseparierten Probe war mit 0,86 mg Zn/g deutlich höher als durchschnittliche europäische Sedimente (0,07–0,175 mg Zn/g; European Commission, 2010), der Anteil organischen Kohlenstoffs war hoch (16,5 % in Trockengewicht) und der Anteil von TRWP in der Gesamtprobe war im Vergleich zu anderen Zn-Quellen vernachlässigbar gering. Ein allgemein gültiger Konzentrationsbereich kann daher nicht angegeben werden, vielmehr ist die Eignung der Methode stark von der Probenmatrix abhängig. Dies wird besonders beim Vergleich zur TED-GC/MS Analytik deutlich. In jedem Falle ist die Methode für Proben mit hohen TRWP Gehalten (>20 mg TRWP/g) geeignet.

Für die Anreicherung von TRWP ist die Wahl der richtigen Dichte der SPT Lösung entscheidend. Da die Dichte von TRWP nicht bekannt ist und TRWP Referenzmaterialien nicht verfügbar sind, wurde eine Realprobe zur Bestimmung der idealen Dichte verwendet. Die erwartete Dichte von TRWP liegt zwischen der Dichte der Reifenlauffläche (1,2 g/cm³) und Quarz (2,6 g/cm³). Bei der Separation von Sediment aus dem Absetzbecken der Behandlungsanlage in Berlin Halensee mit Dichten der SPT-Lösung von 1,2, 1,5, 1,9 und 2,2 g/cm³ war ein deutlicher Anstieg der Zn Anreicherung bei einer Dichte von 1,9 g/cm³ festzustellen. Eine weitere Erhöhung der Dichte auf 2,2 g/cm³ brachte keine signifikant höhere Anreicherung (t-test, p = 0,058; a = 0,05). Die Anreicherung von TRWP in der aufgeschwemmten Fraktion bei einer Dichte von 1,9 g/cm³ wurde mit TED-GC/MS bestätigt.

Die Untersuchung von Feststoffen mit LA-ICP-MS wurde zunächst mit Messungen einzelner Reifenpartikel geprüft. Von den Proben der Reifenlaufflächen wurde hierfür cryo-gemahlene Material mit Nagellack auf einem Objektträger fixiert. Der Zn-Gehalt dieser Proben war zuvor mittels Elementanalytik nach Verdau bestimmt worden. Die Proben wurden so ausgewählt, dass ein möglichst breiter Konzentrationsbereich von Zn abgedeckt wurde. Von jeder Probe wurden 10 Partikel ablatiert und die mittlere Zn-Intensität wurde mit dem Zn-Gehalt der Partikel korreliert. Es konnte eine positive Korrelation aufgestellt werden, allerdings erlaubte diese keine präzise Quantifizierung der Zn-Konzentration ($R^2 = 0,58$). Die Messungen wurden erschwert durch heterogenes Ablationsverhalten der Partikel sowie schwankende Ablationseffizienz aufgrund von Fokusabweichungen oder heterogener Oberflächenbeschaffenheit der Partikel. Eine Quantifizierung von Reifenabrieb war deshalb nicht mittels der LA-ICP-MS möglich.

Neben LA-ICP-MS wurde auch die Eignung von LDI-TOF-MS zur Untersuchung von TRWP geprüft. Zn konnte mit LDI-TOF-MS nicht nachgewiesen werden. Bei der Messung von reinem ZnO konnten zwar Zinkcluster und deren Oxide ($[Zn]^+$, $[Zn]^{2+}$, $[Zn_2O]^+$) im Massenbereich von m/z 0–250 detektiert werden, diese wurden aber bei Realproben von anderen Signalen überlagert. Die Zugabe von ZnO zu Realproben zeigte kein verändertes Spektrum. Eine Konzentrationsreihe von dotiertem TP_{mix} in geglühtem Seesand (0, 10, 50, 100, 200 g/kg) zeigte eine lineare Zunahme der Peakintensitäten über einen Massenbereich von $m/z = 700–3600$. Zudem zeigte eine Zugabe von gemahlenem Polystyrol dieselben Signale wie die dotierten Reifenpartikel. Da Reifen zu wesentlichen Teilen aus Styrol-Butadien-Kautschuk bestehen, wäre eine Identifikation von TRWP anhand von Styrol-Monomeren denkbar. Allerdings entsprachen die gefundenen Cluster mit $m/z = 24$ und einer charakteristischen Peakform nicht den erwarteten Styrol-Clustern ($m/z = 104$), sondern Kohlenstoff-Sauerstoff-Clustern. Die Laserenergie fragmentierte das Polystyrol also vollständig, sodass keine Identifikation möglich war. Da kein charakteristisches Zersetzungsprodukt gefunden wurde, ist LDI-TOF-MS nicht für die Quantifizierung oder Charakterisierung von TRWP in Umweltproben geeignet.

4.6 Vergleichsversuche – Mikroplastikpartikel in flüssiger Matrix

4.6.1 Überblick

Mit den am Projekt MiWa beteiligten Partnern im Bereich Analytik wurden Vergleichsversuche durchgeführt, um Aufschluss über den Stand der verschiedenen Detektionsverfahren für MP zu erhalten. In zwei aufeinanderfolgenden Runden wurden dazu von der TUB jeweils drei Vergleichsproben hergestellt und versandt. Die Proben erhielten die Kürzel M, N, O bzw. P, Q, R und werden auch im Folgenden so bezeichnet. Tabelle 18 zeigt eine Übersicht der teilnehmenden Labore, der jeweils verwendeten Messmethoden sowie des Rücklaufes von Messergebnissen. Probe P konnte vom UFZ bedingt durch die Bildung von Bioflocken nicht mehr gemessen werden. Bei der Messung der Probe P mittels TED-GC/MS traten außerdem starke Abweichungen zwischen den einzelnen gemessenen Replikaten auf, weshalb sie ebenfalls nicht weiter berücksichtigt wird.

Tabelle 18: Teilnahme an Vergleichsversuch mit flüssiger Matrix (grün – gemessen, orange – nicht gemessen/Ergebnis unklar, grau – nicht versandt)

Partner	Kürzel	Methode	M	N	O	P	Q	R
BAM & UBA		TED-GC/MS	grün	grün	grün	orange	grün	grün
IPF Dresden	IPF	Raman-Spektr.	grau	grau	grau	grün	grün	grün
TU München	TUM	Raman-Spektr.	grün	grün	grün	grün	grün	grün
TZW Karlsruhe	TZW	Raman-Spektr.	grün	grün	grün	grün	grün	grün
HS Fresenius	HSF	FTIR-Spektr.	grün	grün	grün	grün	grün	grün
UFZ Leipzig	UFZ	FTIR-Spektr.	grün	grün	grün	orange	orange	orange

Thermoanalytische (TED-GC/MS) und spektroskopische Analyseverfahren (Raman-, FTIR-Spektroskopie) für MP unterscheiden sich in vielen Aspekten sehr grundlegend. Bei der Analyse einer Flüssigprobe mit TED-GC/MS wird beispielsweise der Feststoffanteil separiert, um anschließend die darin enthaltenen Gesamtmassen verschiedener identifizierbarer Polymere zu bestimmen. Da die Feststoffe dazu vollständig pyrolysiert werden, sind jedoch ohne vorgeschaltete Schritte der Probenaufbereitung und die separate Analyse verschiedener Größenfraktionen keine Aussagen über Partikelgrößen und Partikelanzahlen möglich.

Für die Anwendung spektroskopischer Methoden werden die Feststoffe einer Flüssigprobe für gewöhnlich mittels Filtration abgetrennt, um anschließend einzelne Polymerpartikel auf der Filteroberfläche zu identifizieren. Die räumliche Auflösung und somit die untere Größenbestimmungsgrenze variiert dabei zwischen den Methoden – ab 5 μm für Raman-Spektroskopie und in etwa 20 μm für FTIR-Spektroskopie. Eine Charakterisierung der Partikelgröße in zwei Dimensionen ist demnach grundsätzlich möglich. Im Gegenzug kann allerdings – bedingt durch Formenvielfalt der Partikel und die sehr hohe Abhängigkeit des Volumens vom Durchmesser (dritte Potenz) sowie die statistisch seltene Anwesenheit großer Partikel – nur sehr begrenzt auf die Partikelvolumina und damit den Massengehalt einer Probe geschlossen werden. Zudem ist die Analysezeit je Probe im Vergleich zu thermoanalytischen Verfahren zumeist wesentlich höher (Tage statt 3 h). Im Fall der FTIR-Spektroskopie konnten die Messzeiten in letzter Zeit jedoch ebenfalls erheblich reduziert werden. Weiterführende Erläuterungen zu den verschiedenen Messverfahren, ihren Vor- und Nachteilen sowie spezifischen Anwendungsfällen sind u.a. im Diskussionspapier zur MP-Analytik enthalten (Braun et al. 2018).

Eine Herausforderung bei der Erstellung der Vergleichsproben bestand darin, deren Zusammensetzung so zu wählen, dass das enthaltene MP prinzipiell mit den verschiedenen Analyseverfahren charakterisiert werden kann. Dazu muss die zugesetzte Gesamtmasse eines Polymers einerseits über der spezifischen Bestimmungsgrenze für die TED-GC/MS liegen, andererseits sollte die Gesamtpartikelzahl nicht zu hoch sein, um Überlagerungen einzelner Partikel auf den spektroskopisch analysierten Filteroberflächen zu vermeiden.

Es wurde sich dazu entschieden, flüssige Proben (Suspensionen) herzustellen, die ausschließlich MP-Zielpartikel enthalten. Auf den Zusatz von fremder Feststoffmatrix wurde zunächst verzichtet, da dies unter Umständen weitere individuelle Probenaufbereitungsschritte erfordern würde und damit die Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der Teilnehmenden weiter reduzieren könnte.

4.6.2 Herstellung der Vergleichsproben

Um MP-Partikel im relevanten Größenbereich zwischen 10 und 100 μm zu gewinnen, wurden zunächst jeweils handelsübliche Granulate der Polymere Polyethylen (PE), Polypropylen (PP) und Polystyrol (PS) kryogen vermahlen (siehe Eitzen et al. (2019)). Die entstehenden Partikel weisen sehr irreguläre Formen (siehe Abbildung 55) und eine breite Partikelgrößenverteilung auf. Sie wurden anschließend flüssigfraktioniert, um sowohl den Feinanteil (1 bis 20 μm) zu reduzieren – der wenig zur Gesamtmasse, aber in erheblichem Maße zur Gesamtpartikelzahl beiträgt – sowie größere Partikel auszuschließen. Es kamen Mikrosiebgewebe aus Polyamid (PA) mit nominellen Maschenweiten von 100 und 50 μm (Franz Eckert, Deutschland) zum Einsatz. Die Partikel wurden in der gleichen Flüssigmatrix suspendiert, mit der nachfolgend auch die Stammsuspensionen zur Erstellung der Proben angesetzt wurden. Der Filterrückstand auf dem 50 μm -Mikrosieb wurde resuspendiert, über eine Cellulosenitrat-Membran (0,45 μm) filtriert und bei 35 °C getrocknet um die gewünschte Zielfraktion an MP-Partikeln zu erhalten.

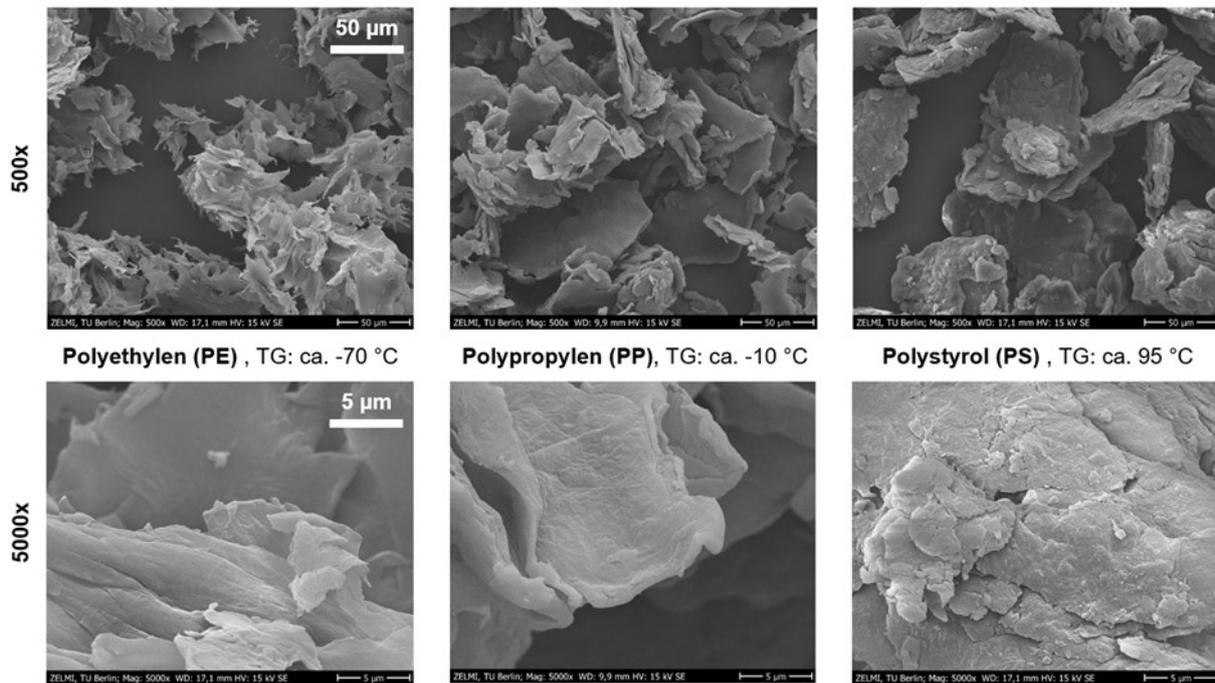


Abbildung 55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der kryogemahlenden MP-Partikel

Pro Runde wurden Sets aus drei verschiedenen flüssigen Proben mit einem jeweiligen Volumen von 10 mL erstellt. Die Proben N bzw. P enthielten als nicht deklarierte Blindproben keine MP-Partikel. Die übrigen Proben M und O bzw. Q und R wurden aus Stammsuspensionen der MP-Zielpartikel pipettiert. Die genaue Zusammensetzung der Proben ist in Tabelle 19 aufgeführt. Die Flüssigmatrix bestand dabei in der ersten Runde aus einem Gemisch aus Reinstwasser und 10 wt% Isopropanol bzw. in der zweiten Runde aus Reinstwasser und 0,05 wt% der Tensidmischung NovaChem SF100 (Postnova Analytics, Deutschland). Aufgrund der eher hydrophoben Oberflächen der MP-Partikel sind die Zusätze erforderlich, um die Partikelsuspensionen zu stabilisieren. Dies ist eine notwendige Bedingung für eine reproduzierbare Partikeldosierung aus Suspensionen, da so Aggregationen von Einzelpartikeln vermieden und eine homogene Verteilung der Partikel ermöglicht werden. Unmittelbar vor der Entnahme eines Teilvolumens zur Erstellung einer Vergleichsprobe wurde die jeweilige Stammsuspension durch Schütteln homogenisiert, da Sedimentations- oder Flotationsprozesse über die Zeit zu einer ungleichmäßigen Partikelverteilung innerhalb der Suspension führen. Außer den Proben wurden jeweils noch 500 mL der Flüssigmatrix an alle teilnehmenden Labore versandt, mit der Anweisung, diese u. a. zum sorgfältigen Ausspülen der Probengefäße zu verwenden, um alle Zielpartikel möglichst verlustfrei in die Analytik zu überführen.

Tabelle 19: Nominelle Zusammensetzung der Vergleichsproben

Probe	Flüssigmatrix	Stammsuspensionen	PE (µg)	PP (µg)	PS (µg)	Versand am
M	10 wt% Isopropanol	5 mL PP-St. + 5 mL PS-St.	-	50	50	06.03.19
N	10 wt% Isopropanol	10 mL Flüssigmatrix	-	-	-	06.03.19
O	10 wt% Isopropanol	10 mL PE-St.	200	-	-	06.03.19
P	0,05 wt% SF100	10 mL Flüssigmatrix	-	-	-	30.07.19
Q	0,05 wt% SF100	5 mL PP-St. + 5 mL PS-St.	-	46,7	25,8	30.07.19
R	0,05 wt% SF100	5 mL PE-St. + 5 mL PP-St.	97,2	46,7	-	30.07.19

Eines der offensichtlichsten derzeitigen Hindernisse bei der Durchführung eines Vergleichsversuchs im Bereich der MP-Analytik ist zugleich dessen größte Motivation: das Fehlen einer ausreichend erprobten Referenzmethode. Die Vergleichsproben konnten daher nur indirekt durch die TUB charakterisiert werden. Mithilfe eines optischen Partikelzählers (SVSS, Pamas, Deutschland) wurden die verwendeten Stammsuspensionen gemessen (28 Größenklassen zwischen 5 und 200 μm , Blindwertkorrektur durch Messung der Flüssigmatrix). Aus den gemessenen Partikelzahlen der Stammsuspensionen wurden anschließend für die spektroskopischen Methoden die Referenz-Partikelzahlen aller Vergleichsproben berechnet. Die Referenzmassen für die TED-GC/MS wurden aus der Einwaage bei Erstellung der Stammsuspensionen errechnet. Demnach unterliegen die im Folgenden angegebenen Referenzwerte ebenfalls Vorbehalten – insbesondere, da sie auf der Annahme einer verlustfreien Partikeldosierung aus komplett homogener Stammsuspension basieren.

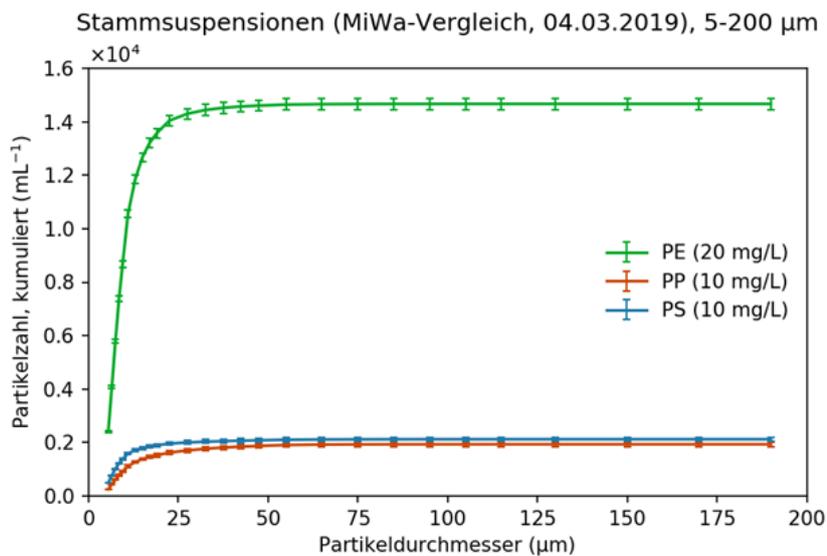


Abbildung 56: Kumulierte gemessene Partikelzahlen der Stammsuspensionen (erste Runde)

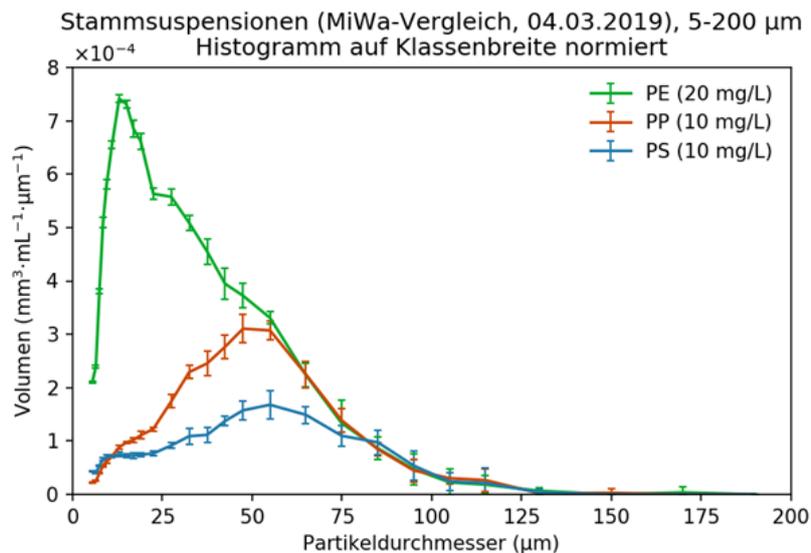


Abbildung 57: Aus gemessenen Partikelzahlen berechnete Volumina der Stammsuspensionen (erste Runde)

Abbildung 56 zeigt beispielhaft die kumulierten gemessenen Partikelzahlen der drei Stammsuspensionen, die zur Erstellung der Proben M und O verwendet wurden. Der Anteil der Partikel zwischen 5 und 50 μm ist im Fall der PE-Stammsuspension erheblich höher. Dies liegt vermutlich daran, dass für PE bei

der im Vorfeld durchgeführten Flüssigfraktionierung höherkonzentrierte Suspensionen fraktioniert wurden, um die erforderlichen Partikelmassen zu gewinnen. Dadurch erfolgte eine vermehrte Kuchenbildung auf dem 50 µm-Mikrosieb und damit einhergehend ein verstärkter Rückhalt von Partikeln unterhalb der nominellen Trenngrenze. Eine solche Unschärfe in der Fraktionierung zeigt sich in abgeschwächter Form auch für die PP- und PS-Stammsuspensionen. Sie ist insbesondere in Abbildung 57 gut zu erkennen, in der die aus den gemessenen Partikelzahlen – unter Annahme von Kugelform – berechneten Volumina für die verschiedenen Größenklassen aufgetragen wurden.

4.6.3 Ergebnisse

4.6.3.1 Thermoanalytische Methode (TED-GC/MS)

Die Analyseergebnisse der Vergleichsproben mittels TED-GC/MS durch BAM und UBA sind in Tabelle 20 und Abbildung 58 dargestellt. Es wurden jeweils drei Exemplare aller Vergleichsproben gemessen und Mittelwerte dieser Dreifachbestimmung mitsamt resultierenden Standardabweichungen angegeben. Bei der Blindprobe P wurde bei einer der Messungen ein stark abweichendes Ergebnis generiert, sodass hier keine Auswertung des Ergebnisses durchgeführt wurde. Die Identifikation der zugesetzten Polymersorten gelang für alle Proben (M, N, O und Q) einwandfrei. Es traten weder Fehlbefunde hinsichtlich anderer Polymersorten auf, noch Falschpositiv-Befunde in der Blindprobe N.

Im Vergleich zu den nominellen Referenzmassen für die zugesetzten Polymere traten abgesehen von einer höheren Wiederfindung für PS in Probe Q (136 %) ausnahmslos leichte Minderbefunde (zwischen 74 % und 85 %) auf. Diese systematisch erscheinende Abweichung kann nicht einwandfrei zugeordnet werden. So könnten sowohl die analytische Methode selbst, die zugehörige Probenvorbereitung – bspw. eine unvollständige Überführung der gelieferten Probe in den Messtiegel – als auch Abweichungen bei der Erstellung der Vergleichsproben, insbesondere bei der Dosierung aus Stammsuspension (siehe Abschnitt 4.6.2) durch die TUB, dazu beigetragen haben. Weiterhin auffällig sind die hohen absoluten Standardabweichungen bei der Bestimmung von PE. Diese sind eventuell auf eine geringere Sensitivität der TED-GC/MS bzgl. PE zurückzuführen. Zum Zeitpunkt der Messungen betrug die Bestimmungsgrenze für PE mit 4,4 µg das mehr als 15- bzw. 25-fache der Bestimmungsgrenzen von PP bzw. PS.

Tabelle 20: Thermoanalytische Ergebnisse des Vergleichsversuchs (Massengehalte)

Probe	Referenz			Gemessen mit TED-GC/MS					
	PE [µg]	PP [µg]	PS [µg]	PE [µg]	WF	PP [µg]	WF	PS [µg]	WF
M	-	50	50	-	-	41,7 ± 5.2	83 %	42,5 ± 5.3	85 %
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O	200	-	-	147 ± 47	74 %	-	-	-	-
P	-	-	-	nicht ausgewertet					
Q	-	46,7	25.8	-	-	40,7 ± 3.8	87 %	35,2 ± 3.2	136 %
R	97,2	46,7	-	71,8 ± 14.1	74 %	34,2 ± 6,2	73 %	-	-

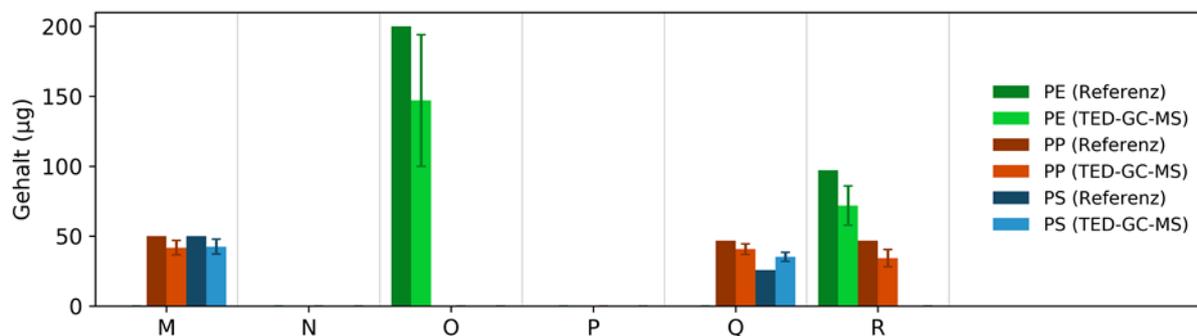


Abbildung 58: Thermoanalytische Ergebnisse des Vergleichsversuchs (Massengehalte)

4.6.3.2 Spektroskopische Methoden (Raman, FTIR)

Die durch die beteiligten Institute mithilfe spektroskopischer Methoden gemessenen absoluten Partikelzahlen für die Proben M, O, Q und R sind nachfolgend in Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 23 und Tabelle 24 zusammengefasst. Im Vorfeld der Betrachtung müssen gewisse grundsätzliche Einschränkungen getroffen werden: Zum einen weisen die beiden angewandten Methoden (Raman und FTIR), teilweise aber auch die individuellen Setups, in denen sie eingesetzt wurden, unterschiedliche Auflösungen und Größenbestimmungsgrenzen auf. Mit der vom FHI eingesetzten FTIR können beispielsweise Partikel kleiner 20 µm zumeist nicht identifiziert werden, wohingegen das UFZ durch die Kopplung mit einem Mikroskop auch für die FTIR-Methodik eine Auflösung von 5,5 µm/Pixel erreicht. Individuelle Formen der Probenhandhabung und -vorbereitung erhöhen die Komplexität zusätzlich, da sie immer mit Partikelverlusten, Kontaminationen oder Veränderungen der Partikelgrößenverteilung, bspw. durch Formation von größeren Agglomeraten aus kleineren Partikeln, verbunden sein können. Die spektroskopischen Messergebnisse der Vergleichsproben sind im Vergleich zu den TED-GC/MS-Messungen demnach wesentlich schwerer einzuordnen.

Darüber hinaus arbeiten alle Partner mit einer Klassierung der Messergebnisse, um die Darstellbarkeit zu erhöhen. Die einzelnen Größenklassen sind jedoch häufig recht breit und zwischen allen Beteiligten nicht immer einheitlich gewählt. Auch die oberste Größenklasse bzw. obersten Größenklassen sind für die verschiedenen Methoden unterschiedlich definiert: 5000 µm (TZW), 1000 µm (HSF), 500 µm und offen (TUM), offen (UFZ, IPF). Der nahezu logarithmische Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Partikelzahl – so werden zum Teil bis zu 100-mal mehr Partikel zwischen 5 und 10 µm als im Bereich zwischen 50 und 100 µm detektiert – erschwert dabei angesichts der groben Klasseneinteilung die Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen erheblich. Ein Auslesen der Größen der gemessenen Einzelpartikel, welches vielleicht eine detailliertere Datenanalyse ermöglicht hätte, war in fast allen Fällen leider nicht routinemäßig möglich.

Tabelle 21: Spektroskopische Ergebnisse der Vergleichsprobe M (absolute Partikelzahlen)

Größenklasse	Referenz		TUM (Raman)		TZW (Raman)		HSF (FTIR)		UFZ (FTIR)	
	PP	PS	PP	PS	PP	PS	PP	PS	PP	PS
5 µm - 10 µm	4552	6899	-	-	12223	6942	0	0	551	1664
10 µm - 20 µm	3046	2574	1065	3012	7142	3615	0	0	1041	1177
20 µm - 50 µm	1765	939			4154	1979	85	0	1421	619
50 µm - 100 µm	304	194	569	429	622	352	98	24	1077	285
> 100 µm	4	3	253	116	44	35	12	24	98	0

Tabelle 22: Spektroskopische Ergebnisse der Vergleichsprobe O (absolute Partikelzahlen)

	Referenz	TUM (Raman)	TZW (Raman)	HSF (FTIR)	UFZ (FTIR)
Größenklasse	PE	PE	PE	PE	PE
5 µm - 10 µm	86724	-	5159	12	63653
10 µm - 20 µm	48973	6362	2149		30096
20 µm - 50 µm	10342		463	4343	12234
50 µm - 100 µm	632	2865	42	2957	1541
> 100 µm	7	1597	177	429	252

Tabelle 23: Spektroskopische Ergebnisse der Vergleichsprobe R (absolute Partikelzahlen)

	Referenz		IPF (Raman)		TUM (Raman)		TZW (Raman)		HSF (FTIR)	
Größenklasse	PE	PP	PE	PP	PE	PP	PE	PP	PE	PP
5 µm - 10 µm	42360	2813	1265	65	-	-	14460	1881	0	0
10 µm - 20 µm	24821	790	4010	269	1351	119	9061	927	0	0
20 µm - 50 µm	6224	995	8922	481			3409	573	3435	147
50 µm - 100 µm	519	470	5159	508	351	46	279	148	2368	257
> 100 µm*	10	11	800	380	125	21	205	43	527	147

Bereits in Abschnitt 4.6.2 wurde darauf verwiesen, dass auch die angegebenen Referenzpartikelzahlen für die Vergleichsproben nur eingeschränkt belastbar sind, da sie aus einer MP-unspezifischen Partikelmessung der Stammsuspensionen errechnet wurden. So könnte es beispielsweise zwischen Erstellung und jeweiliger Analyse der Vergleichsproben trotz der Stabilisierung der MP-Zielpartikel durch Isopropanol bzw. die Tensidmischung SF100 zur Agglomeration von Partikeln gekommen sein. Diese kann als Überlagerung prinzipiell sogar erst unmittelbar auf dem spektroskopisch vermessenen Filtermaterial auftreten und die Detektion einzelner Partikel behindern.

Tabelle 24: Spektroskopische Ergebnisse der Vergleichsprobe Q (absolute Partikelzahlen)

	Referenz		IPF (Raman)		TUM (Raman)		TZW (Raman)		HSF (FTIR)	
Größenklasse	PP	PS	PP	PS	PP	PS	PP	PS	PP	PS
5 µm - 10 µm	2813	5879	70	70	-	-	1278	1686	0	0
10 µm - 20 µm	790	3740	280	1140	249	3194	687	728		
20 µm - 50 µm	995	1015	360	1200			327	198	331	110
50 µm - 100 µm	470	132	540	370	206	905	64	23	392	110
> 100 µm	11	8	500	120	266	206	53	23	159	49

Vieles deutet daraufhin, dass die beschriebenen Agglomerationseffekte bei den Messungen aller beteiligten Gruppen auftraten und hauptverantwortlich für die beobachteten Messabweichungen sind.

Es wurden in aller Regel wesentlich mehr Partikel größer 100 μm detektiert, als die Referenzmessungen mittels Partikelzähler nahelegten, meist gekoppelt mit Minderbefunden bzgl. kleinerer Partikelfraktionen. Dieser Trend zeigt sich einheitlich in den Messungen aller Partner und lässt sich in Abbildung 59 exemplarisch für Probe Q nachvollziehen. Desweiteren auffällig sind einige starke Überbefunde über mehrere Größenklassen hinweg, die sich vermutlich nicht allein durch Agglomeration der Zielpartikel erklären lassen.

Trotz bereits diskutierter Beschränkungen soll hervorgehoben werden, dass die Identifizierung der zugesetzten Polymersorten in allen Fällen recht robust funktionierte. Die zugesetzten MP-Partikel wurden zumeist untereinander proportional wiedergefunden. In begrenztem Umfang traten Falschpositivbefunde bzgl. anderer Polymersorten auf – auch bei der Messung der Blindproben N und P. Diese könnten jedoch zum Teil bereits von Kontaminationen während Herstellung und Handhabung der Proben herrühren. In den Blindproben wurden bspw. vereinzelt PP, PA, Teflon (PTFE) und Cellulose identifiziert, welche jeweils aus Pipettenspitzen/Deckeln der Stammsuspensionen, den Mikrosiebgeweben zur Flüssigfraktionierung, den Deckeln der Vergleichsproben bzw. Cellulosenitratmembranen stammen könnten. Außerdem wurden wenige Partikel als PVC und PET identifiziert.

Die Identifizierung potentieller Kontaminationen unterstreicht die analytischen Potentiale, die der Einzelpartikelbestimmung der spektroskopischen Verfahren innewohnen. Nichtsdestotrotz erstaunen im Hinblick auf die MP-Zielpartikel (PE, PP und PS) nicht nur die bereits diskutierten Abweichungen der Messergebnisse der Teilnehmenden von den Referenzmessungen, sondern die teilweise großen Diskrepanzen der Messergebnisse untereinander – selbst zwischen den verschiedenen Messungen mit Raman-Spektroskopie lassen sich vereinzelt Unterschiede von mehr als einer Größenordnung finden. Auf Basis der vorliegenden Daten kann nicht geklärt werden, an welcher Stelle oder welchen Stellen in der Kette zwischen Probenherstellung und Analyse die Probleme hauptsächlich zu verorten sind. Dazu bedarf es weiterer Untersuchungen. Es erscheint vielversprechend, dabei ein Augenmerk auf die Agglomeration der Zielpartikel zu legen. So könnte der Einfluss verschiedener Varianten der Filtration auf das Ergebnis einer nachfolgenden Messung näher betrachtet werden.

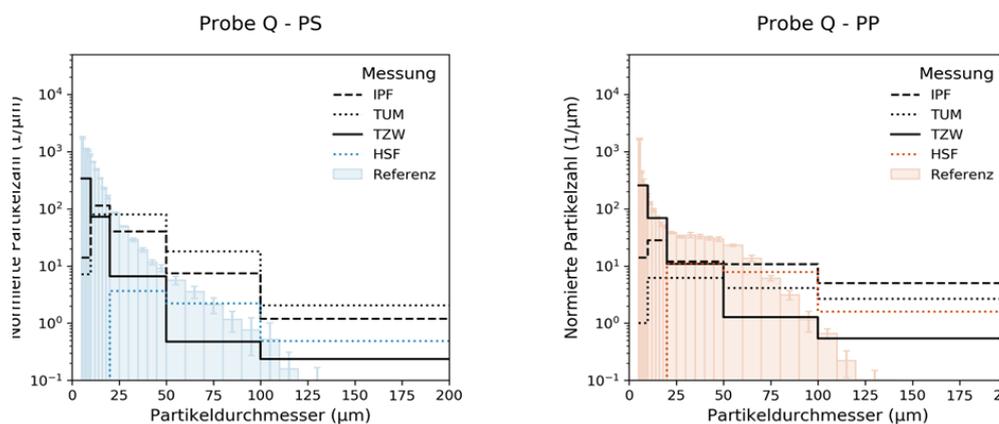


Abbildung 59: Spektroskopische Ergebnisse der Vergleichsprobe Q (PS – links, PP – rechts)

4.6.4 Fazit und Ausblick

Für die im Rahmen des MiWa-Projektes durchgeführten Vergleichsversuche mit flüssiger Matrix (Suspension in Wasser mit Zusätzen) wurden die Zusammensetzungen sämtlicher Einzelproben so gewählt, dass alle Methoden des Verbundvorhabens in der Lage waren, die zugesetzten Polymere (PE, PP, PS) zu identifizieren sowie Partikelkonzentrationen bzw. Gesamtmassengehalte zu bestimmen. Die Identifikation der Polymere verlief gut, auch wenn vereinzelt geringe Polymergehalte als Blindwerte bestimmt und interpretiert wurden. Die detaillierte Aufklärung möglicher Fehlerquellen gestaltet sich

dabei schwierig, da Einträge von Fremdpartikeln über den gesamten Weg von der Probenherstellung bis hin zur finalen Messung nicht vollständig zu verhindern oder zu kontrollieren sind.

Die Messung der Polymermassengehalte mit TED-GC/MS lieferte gute bis zufriedenstellende Ergebnisse, jedoch ist mit gewissen Minderbefunden von bis zu 25 % zu rechnen, wofür verschiedene Gründe ausschlaggebend sein können. Eine abschließende Bewertung der Leistungsfähigkeit der Methode wäre anhand dieser Vergleichsversuche verfrüht. So waren den Proben abgesehen von den MP-Zielpartikeln keine weiteren, potentiell störenden Feststoffe zugesetzt. Außerdem ist kein methodeninterner Vergleich möglich, da nur ein Labor mit TED-GC/MS an den Vergleichsmessungen teilnahm. Bestimmungen von Partikelzahlen und -größen mithilfe der beiden mikrospektroskopischen Verfahren FTIR und Raman sind schwerer einzuordnen, u.a. da die Ermittlung zuverlässiger Referenzwerte nicht einwandfrei möglich ist. Darüber hinaus wichen jedoch auch die Ergebnisse der einzelnen beteiligten Gruppen teilweise erheblich voneinander ab. Generell zeigte sich, dass die Agglomeration von Partikeln im Rahmen der Probenbehandlung – insbesondere während der für die Messung unabdingbaren Filtration – von entscheidender Bedeutung zu sind. Diese sollte daher im Hinblick auf methodische Weiterentwicklungen und Standardisierungen zukünftig noch stärker berücksichtigt werden. Da es zudem nicht möglich ist, eine identische Partikelzahl und Größenverteilung in Proben sicherzustellen, erscheint es als sinnvoll, zukünftig die Angabe und Interpretation von spektroskopischen Ergebnissen basierend auf Größenordnungen statt absoluten Partikelzahlen durchzuführen.

In Anbetracht wesentlich komplexerer Matrices als denen der vorgestellten Vergleichsproben, scheint der Weg zur routinemäßigen Analyse von MP in Umweltproben noch weit – insbesondere hin zu einer verlässlichen Charakterisierung von Partikelgrößen und -volumina. Allerdings ist die Komplexität auch stark abhängig von der geforderten Präzision. Daher wäre es hilfreich, die Anforderungen und methodischen Entwicklungen im Bezug auf MP-Probenahme und -Analytik noch enger mit damit verknüpften Aspekten der MP-Thematik abzustimmen – bspw. mit Fragestellungen aus den Bereichen Ökotoxikologie und Modellierung. Weitere Vergleichs- oder Ringversuche sind im Hinblick auf eine Etablierung und Optimierung der momentan diskutierten analytischen Methoden jedoch unabdingbar. Die Planung und Durchführung solcher Versuche ist dabei sehr sorgfältig vorzunehmen. Sie erfordern zwischen allen Beteiligten sowohl präzisere Absprachen im Vorfeld als auch eine intensive Nachbereitung, um eventuelle Fehlerquellen oder Ursachen für starke Abweichungen der Ergebnisse zu identifizieren und in Folge zu vermeiden.

Bereits im Vorfeld zu den hier vorgestellten Vergleichsuntersuchungen wurde durch das TZW im Auftrag der Global Water Research Coalition ein Mikroplastik-Ringversuch auf internationaler Ebene durchgeführt (Müller et al. 2020). An diesem Ringversuch nahmen 17 Labore aus acht verschiedenen Ländern teil. Die Proben umfassten Referenzpartikel aus fünf verschiedenen Polymersorten mit Durchmesser im Bereich zwischen 8 μm und 140 μm in Reinstwasser. Verglichen wurden u.a. Ergebnisse zur identifizierten Polymerart, Massenbestimmung und Partikelanzahlbestimmung der Methoden Mikroskopie, μ -FTIR, μ -Raman, pyr-GC/MS, TED-GC/MS, Rasterelektronenmikroskopie und Partikelzählgerät. Auch hier zeigte sich eine große Varianz der Ergebnisse zwischen den Methoden sowie innerhalb der Methoden, was u.a. auf Unterschiede in der Proben- und Blindwerthandhabung zurückgeführt wurde. Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass verschiedene Methoden unterschiedliche Stärken und Schwächen aufweisen und darum der komplementäre Einsatz für die Untersuchung von Umweltproben sinnvoll erscheint. Sowohl die Vergleichsuntersuchungen aus MiWa als auch der GWRC-Ringversuch machen deutlich, dass eine isolierte Betrachtung einzelner Aspekte und Varianten der Herstellung, Handhabung und Aufbereitung von Proben für die Durchführung und anschließende Interpretation von Vergleichsuntersuchungen hilfreich wäre. Neben der MP-Analytik, sollte auch die Umweltprobenahme selbst als vorgelagerter Schritt zukünftig verstärkt in den Fokus gerückt werden – einschließlich der Entwicklung repräsentativer Methoden und Strategien.

5 Befunde im urbanen Wasserhaushalt

Es existieren bislang (Stand Frühjahr 2020) keine standardisierten Methoden für die Beprobung von MP im Klärwerkswasser. Daher muss bei dem Vergleich und der Bewertung von Ergebnissen stets betrachtet werden, wie die Probenahme durchgeführt wurde und welches Analyseverfahren für die Detektion der MP-Partikel zum Einsatz kam. Ebenfalls von Bedeutung ist das durchgesetzte Probenvolumen und die Dauer der Probenahme. Grundsätzlich und für jede Art der Beprobung gilt: Je höher das durchgesetzte Volumen einer Probe, desto höher ist die Reproduzierbarkeit der später ermittelten Werte, weil Zufallsereignisse an Bedeutung verlieren. Auch die Dauer der Beprobung hat hier einen Einfluss. Stichproben von wenigen Stunden sind aufgrund von tagesgangabhängigen Schwankungen nicht so aussagekräftig wie Mischproben über längere Zeiträume.

Eine in der Literatur häufig genannte Art der Probenahme ist die Konstruktion einer Siebkaskade (vergleiche Abschnitte 2.2.1 und 2.2.4) aus Sieben verschiedener Maschenweiten (meist aus Edelstahl). Die Siebe werden vom Klärwerkswasser nacheinander von grob nach fein durchlaufen. Während der Beprobung findet demnach eine in situ-Fraktionierung der Probe statt, die abhängig von der Anzahl und Feinheit der verwendeten Siebe ist. Ein zusätzlich positiver Effekt dieses Konzeptes ist, dass im Vergleich zu Einzelsieben größere Probevolumina über eine Siebkaskade gegeben werden können. Durch die Anordnung der Siebe werden größere Partikel bereits zu Beginn auf den grobmaschigen Sieben zurückgehalten. Das führt dazu, dass sich die nachfolgenden feineren Siebe nicht so schnell zusetzen und insgesamt ein größeres Probevolumen durchgesetzt werden kann. Der Durchmesser der verwendeten Siebe, der zum Quadrat in die zur Verfügung stehende Filtrationsfläche eingeht, und natürlich auch die Qualität des Abwassers, besonders der Anteil der Organik, beeinflussen zusätzlich das maximal durchzusetzende Probenvolumen (Carr et al. 2016, Michielssen et al. 2016, Ziajahromi et al. 2017).

Alle diese Studien haben gemein, dass der während der Beprobung anfallende Siebrückstand aufgefangen wird und dieser anschließend in weiteren Aufbereitungsschritten für die Detektion von MP vorbereitet wird. Als Detektionsverfahren für MP kommen dabei meist spektro-analytische Bildgebungsverfahren wie die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) oder Raman-Spektroskopie zum Einsatz (Elert et al. 2017, Mintenig et al. 2014, Talvitie et al. 2017a, Talvitie et al. 2017b). Sie erlauben eine exakte Bestimmung der Partikelgröße und zerstören die zu analysierenden Partikel während der Analyse nicht. Die Probenaufbereitung für die Analyse mittels FTIR oder Raman ist aufwendig. Ein großes Problem ist es dabei, störende natürliche Materialien aus dem Siebrückstand zu entfernen, ohne dabei die Plastikpartikel in ihrer Form und Zusammensetzung zu verändern. Außerdem kann, zumindest mittels Raman-Spektroskopie, in einem praktikablen zeitlichen Rahmen oft nur ein Teil des Siebrückstands gemessen werden. Eine anschließende Hochrechnung auf die gesamte Probe ist fehleranfällig, da nicht sichergestellt werden kann, dass der gemessene Anteil repräsentativ für die gesamte Probe ist.

Eine mögliche Alternative zu den bildgebenden Analyseverfahren ist die neu entwickelte thermo-analytische Methode TED-GC/MS. Dabei werden anhand von stoffspezifischen Abbauprodukten der Polymere Aussagen über den Plastikgehalt der Probe getroffen. Diese Analyseverfahren kommt in der Projektarbeit zum Einsatz.

5.1 Anlagen zur weitergehenden Abwasserreinigung (BWB)

In diesem Kapitel sollen die im Rahmen des Vorhabens MiWa betrachteten Anlagen zur weitergehenden Abwasserreinigung kurz vorgestellt werden. Da der Partikelrückhalt der einzelnen Verfahrensvarianten im Fokus steht, werden vor allem die zugrundeliegenden Abscheideprinzipien erläutert.

5.1.1 Polstofffiltertuch

Bei der Polstofffiltration handelt es sich um eine modifizierte Art der Tuchfiltrationstechnik. Das Filtermedium besteht aus vielen einzelnen textilen Polfasern, die während der Filtrationsphase flach übereinanderliegen und so eine abscheidewirksame Faserschicht bilden. Diese dreidimensionale Faserschicht wirkt wie ein Tiefenfilter und hält Feststoffe des Abwassers zurück. Zum Reinigen der Fasern werden diese durch eine Absaugeinrichtung kurzzeitig aufgerichtet, zurückgehaltene Feststoffe werden abgesaugt und auf diesem Weg aus dem System ausgetragen. Der Filtrationsprozess muss dafür nicht unterbrochen werden und die Filtration läuft kontinuierlich weiter. Abbildung 60 veranschaulicht das Funktionsprinzip des MECANA Polstofffilters aus Polyacrylamid (Grabbe 1998, MECANA 2017b).

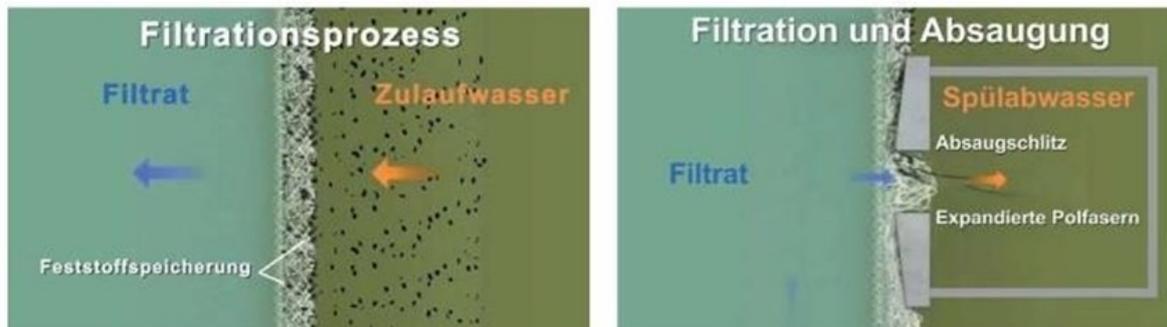


Abbildung 60: Funktionsprinzip des MECANA Polstofffilters (MECANA Umwelttechnik GmbH)

Rohwasser strömt von außen nach innen durch das Filtertuch. Während die Feststoffe im Tuch verbleiben, gelangt das filtrierte Wasser durch ein Zentralrohr in den Steigschacht und von dort aus in den Ablauf der Anlage. Mit der Zeit steigt der hydraulische Widerstand der Filteranlage durch den Anstieg der Feststoffablagerungen im Filtertuch. Das führt dazu, dass bei einem konstant gehaltenen Zulauf die Wasserspiegeldifferenz zwischen Roh- und Reinwasser ansteigt. Ist der Unterschied der beiden Wasserspiegel ausreichend groß, wird durch einen im Becken installierten Höhenstandsmesser der Reinigungsprozess ausgelöst.

Das Filtertuch wird dann langsam an der Absaugvorrichtung vorbeigeführt, wodurch sich die einzelnen Fasern des Filtertuchs temporär aufrichten. Feststoffpartikel, die im Inneren des Filtermediums zurückgehalten wurden, können auf diese Weise aus dem System ausgetragen werden. Das abgesaugte Schlammwasser wird dann zum Beispiel einem vorausgehenden Verfahrensschritt wie der Vorklärung zugeführt. Bereits im Filterbehälter sedimentierte Feststoffe können außerdem über eine Bodenschlammpumpe abgesaugt werden.

Die für die Untersuchungen verwendete Versuchsanlage auf der Kläranlage Ruhleben ist in der Ausführung eines Trommelfilters installiert (siehe Abbildung 61). Für eine großtechnische Installation als Anlage zur weitergehenden Abwasserreinigung auf Kläranlagen werden in der Regel Scheibenfilter verwendet. Durch die Anordnung mehrerer Scheibenfilter in einer Reihe wird im Vergleich zu einem Trommelfilter eine größere Filtrationsfläche zur Verfügung gestellt. Das spart teuren Bauplatz und ist somit gerade für innerstädtische Kläranlagen interessant. Das zuvor beschriebene Abscheideprinzip ist aber von der Art der Filterausführung unabhängig. Somit können die Ergebnisse der Versuchsanlage auch auf den potentiellen Einsatz einer großtechnischen Scheibenfilteranlage projiziert werden (MECANA 2017a).

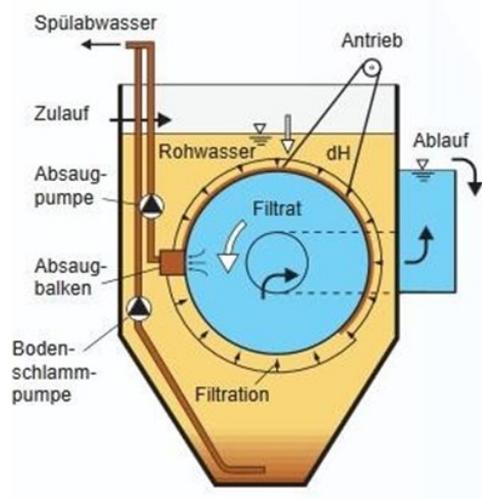


Abbildung 61: Prinzip-Skizze des MECANA Trommelfilters (MECANA Umwelttechnik GmbH)

Eine definierte Porengröße besitzt das verwendete Fasertuch nicht. Die Länge und der Durchmesser der Fasern beeinflussen die Porenstruktur der filterwirksamen Schicht. Laut Herstellerangaben haben die Fasern des verwendeten Tuchs einen Durchmesser von $3,7 \mu\text{m}$. Die Porosität des Filtertuchs wird mit 80–90 % angegeben. Insgesamt soll die Porengröße des Polstofffilters in der Versuchsanlage damit bei ca. $20 \mu\text{m}$ liegen. Während des Versuchszeitraums wurde die Anlage durchgehend mit einem Zufluss von ca. $10 \text{ m}^3/\text{h}$ beschickt.

5.1.2 Scheibenfilteranlagen

Das Filtermedium besteht hier aus einem Tressengewebe aus Edelstahl, dass auf Filtrerrahmen gespannt ist. Diese Filtrerrahmen sind beidseitig auf ein Filtrerrad im Inneren der Anlage montiert. Das Filtrerrad dreht sich kontinuierlich und wird von innen mit dem Zulauf beschickt. Die Filtration erfolgt also von innen nach außen. Es handelt sich im Gegensatz zur Polstofffiltration um eine Oberflächenfiltration, bei der die Partikel nicht im Inneren des Filtermediums, sondern an seiner Oberfläche abgetrennt werden. Sind die Poren des Filtergewebes verstopft, steigt der Wasserstand innerhalb des Filtrerrads an. Durch eine Höhenstandsmessung wird ab einem bestimmten Wasserstand die automatische Reinigung ausgelöst. Bei der Reinigung wird Wasser aus dem Filtratbecken der Anlage gepumpt und über Düsen mit hohem Druck von außen auf das Filtermedium gesprüht. Die Poren des Gewebes werden so wieder freigespült. Das durch die Reinigung anfallende Spülwasser mitsamt Feststoffen wird über einen Trichter, der ins Innere des Filtrerrads ragt, über eine Spülwasserleitung ausgetragen.



Abbildung 62: INVENT-Anlage in der Versuchshalle Ruhleben: Filtratleitung unten links, Notüberlauf unten rechts und Spülwasserleitung in der Mitte (grüner Schlauch)

Das in der Versuchsanlage verbaute Tressengewebe wird von der Firma GKD Gebr. Kufferath AG hergestellt. Dabei haben der Durchmesser des Drahtes und die verwendete Webart einen Einfluss auf die spätere Porosität des Filtermediums. Das hier verbaute Gewebe hat laut Herstellerangaben eine Porengröße von 20 μm . Der angestrebte Durchsatz der Anlage (Abbildung 62) betrug während des Versuchszeitraums 60 m^3/h (Dietrich 2017).

Bei der HYDROTECH-Anlage (Abbildung 63) handelt es sich um ein vergleichbares Abscheideprinzip wie bei der INVENT-Anlage. Auch hier wird ein Filtrerrad mit einzelnen Filtersegmenten aus einem Tressengewebe bestückt. Es gibt ein Zulauf- und ein Filtratbecken, welche durch das Filtrerrad voneinander getrennt werden. Das Wasser strömt aufgrund des steigenden hydrostatischen Drucks auf der Zulaufseite durch das Filtermedium und wird am Boden des Filtratbeckens abgeführt. Steigt das Wasser auf der Zulaufseite zu stark an, wird mithilfe von Düsen auf der Filtratseite das Gewebe unter hohem Druck zurückgespült. Das Spülwasser wird über eine Rinne aufgefangen und ausgetragen. Die HYDROTECH-Anlage wird manuell betrieben und kommt nur temporär für gezielte Untersuchungen zum Einsatz. Die Anlage ist nicht, wie die beiden anderen Versuchsanlagen, im Dauerbetrieb.



Abbildung 63: HYDROTECH-Anlage mit abgenommenem Deckel, links vom Filtrerrad: Zulaufseite, rechts vom Filtrerrad: Filtratseite mit Rückspüldüsen

Auch bei dieser Anlage ist ein Gewebe der Firma GKD verbaut. Hier wird die Porengröße des Filtermediums vom Hersteller mit 6 μm angegeben. Es handelt sich um eine Anlage im kleintechnischen Maßstab mit einem maximalen Durchsatz von 2,5 m^3/h . Der Durchfluss kann manuell über Ventile eingestellt werden.

5.1.3 Beprobung der Anlagen

Im Rahmen des Projektes wurde außerdem die Abscheideleistung von verschiedenen Anlagen zur weitergehenden Abwasserreinigung untersucht. Dafür ist es notwendig den Zu- und Ablauf dieser Verfahrensvarianten zu beproben und auf bestimmte Abwasserparameter hin zu analysieren. Da der Rückhalt von Plastikpartikeln im Mittelpunkt der Untersuchungen steht, muss bei allen Versuchen darauf geachtet werden, dass in sämtlichen Arbeitsschritten möglichst kein Plastikmaterial verwendet wird und offenstehende Probebehälter stets abgedeckt werden. So soll eine Kontamination mit Fremdpartikeln möglichst vermieden werden. Der Ablauf der Beprobungen für die einzelnen Anlagen zur weitergehen-

den Abwasserreinigung soll im Folgenden kurz erläutert werden. Die Probenahme und Probenaufbereitung sowohl für die Analyse auf die Indikatorparameter als auch für die Quantifizierung der MP-Partikel werden nun im Einzelnen vorgestellt. Untersuchungsstandort des Verbundprojektes ist die Kläranlage in Ruhleben, die bis dato über keine Stufe zur weitergehenden Abwasserreinigung verfügt. Auf dem Betriebsgelände der Kläranlage steht in unmittelbarer Nähe des Klarwassereinleiters in die Spree eine Versuchshalle, in der die im Projekt untersuchten Versuchsanlagen betrieben werden.

5.1.3.1 Indikatorparameter

Neben der eigentlichen Analyse auf MP werden außerdem folgende zuvor ausgewählte Indikatorparameter an den Versuchsanlagen gemessen:

- AFS-Fracht [mg/L]
- Trübung [NTU]
- Fraktionierte Partikelanzahl [-]

Die Analyse auf MP ist sehr zeit- und kostenintensiv. Durch die Mitbestimmung der Indikatorparameter und einem anschließenden Vergleich mit den Ergebnissen der MP-Analyse hofft man, eine Korrelation zwischen den Parametern und den Plastikpartikeln ausfindig zu machen. Das könnte für die Zukunft Zeit und Geld für aufwendige Plastikanalysen einsparen.

Aus einem Klarwasserschacht der Kläranlage Ruhleben und den Abläufen der Versuchsanlagen werden in unregelmäßigen Abständen 24-Stunden-Mischproben (24 h-MP) von voll automatischen Probenehmern gezogen und in 100 L Edelstahlfässer gefüllt. Die Probenehmer sind dabei so eingestellt, dass alle zwei Minuten ein Probevolumen von 130 mL angesaugt wird. Das ergibt nach Ablauf der 24 Stunden ein Gesamtvolumen von 93,6 L. Anschließend werden aus jedem der Edelstahlfässer drei Stichproben genommen. Mit diesen Stichproben werden in einem dafür eingerichteten Laborcontainer Messungen zur Bestimmung der Indikatorparameter durchgeführt. Da einige Laborgeräte nicht über den gesamten Versuchszeitraum zur Verfügung standen, wurde die Bestimmung der AFS-Fracht teilweise vom akkreditierten Labor der Berliner Wasserbetriebe in Ruhleben übernommen. Eine Mehrfachbestimmung ist notwendig, um möglichst genaue Mittelwerte für die gesamten 24 h-Mischproben zu ermitteln.

Vor der Entnahme der Stichproben werden die 24 h-MP in den Fässern mit einem Handrührer, bestehend aus einer Bohrmaschine mit Rühraufsatz, für zwei Minuten auf möglichst langsamer Stufe homogenisiert. Anschließend werden 2 L-Bechergläser zweimal mit der homogenisierten Probe vorgespült. Vor jeder einzelnen Stichprobenentnahme mit den vorgespülten Bechergläsern erfolgt eine weitere kurze Homogenisierung (20 Sekunden) der Mischprobe mit dem Handrührer. Für die Untersuchungen stehen also jeweils drei Stichproben einer 24 h-Mischprobe vom Klarwasser der Kläranlage (Zulauf der Versuchsanlagen) und den Abläufen der Versuchsanlagen zur Verfügung. Während der Probennahme werden alle verwendeten Gerätschaften vor und nach der Benutzung mit VE-Wasser gespült um eine Kontamination der Proben mit Fremdpartikeln zu verhindern. Offenstehende und mit Probe befüllte Bechergläser werden mit Alufolie oder Pappe abgedeckt, um den Eintrag von Fremdpartikeln zu vermeiden. Die benutzten Fässer werden abschließend mit VE-Wasser gereinigt und für die nächste Probenahme vorbereitet.

5.1.3.2 Entwicklung einer MP-Probenahme

Bei der Entwicklung der MP-Probenahme wird sich an aktuellen Studien orientiert, die das zu untersuchende Abwasser über Siebstapel mit immer feiner werdenden Maschenweiten leiten und anschließend die auf den Sieben verbleibende Probe auffangen und auf MP-Bestandteile hin untersuchen.

5.1.3.3 Erste MP-Probenahme

Im Zeitraum vom 10.05.2017 bis zum 28.06.2017 wurden die im Zuge der Indikatorparameter-Bestimmung anfallenden Probenreste nicht wie üblich entsorgt, sondern in drei dafür aufgestellten IBC-Containern (Eng: Intermediate Bulk Container) separat für das Klarwasser Ruhleben, das Filtrat der ME-CANA-Anlage und das Filtrat der INVENT-Anlage aufgefangen. Am 29.06.2017 wurde dann eine MP-Probenahme durchgeführt. Der Aufbau der Probenahme ist in Abbildung 64 abgebildet.

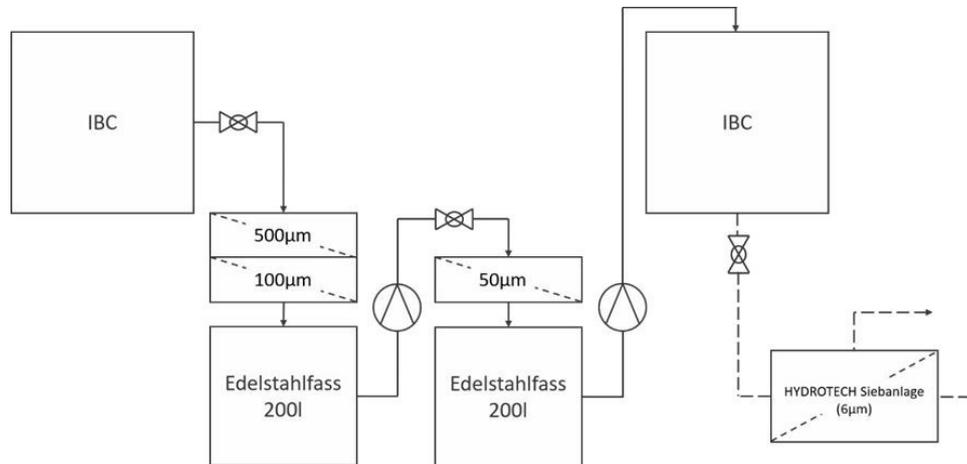


Abbildung 64: Versuchsaufbau MP-Beprobung mit den Siebfraktionen $> 500 \mu\text{m}$, $100\text{--}500 \mu\text{m}$, $50\text{--}100 \mu\text{m}$ und abschließender Filtration über die HYDROTECH-Anlage ($6 \mu\text{m}$). Siebdurchmesser $\varnothing S = 20 \text{ cm}$

Die in den IBC-Containern gesammelte Probe wurde zunächst über gestapelte $500 \mu\text{m}$ und $100 \mu\text{m}$ -Siebe in ein 200 L -Edelstahlfass filtrierte und von dort mithilfe einer Tauchpumpe über ein $50 \mu\text{m}$ -Sieb in ein weiteres 200 L -Edelstahlfass gepumpt. Die Trennung der Siebe ermöglicht die Beobachtung des $50 \mu\text{m}$ -Siebes. So konnte die Filtration bei drohender Verstopfung des Siebes unterbrochen werden. Nach der Filtration mit dem $50 \mu\text{m}$ -Sieb wurde die Probe wieder in einen IBC-Container gepumpt und dort für eine weitergehende Filtration durch die HYDROTECH-Anlage zwischengespeichert.

Die verwendeten Siebe wurden mit Leitungswasser und Spritzflaschen gereinigt und das Spülwasser mitsamt dem Siebrückstand in Glasflaschen aufgefangen. Die auf diese Weise gewonnenen Proben wurden im Anschluss autoklaviert und gefriergetrocknet.

Ein Kritikpunkt an dieser Probenahme ist, dass die Proben über lange Zeiträume in den IBC-Containern verbleiben, ehe sie fraktioniert und anschließend auf MP analysiert werden. Da es sich um gereinigtes Abwasser handelt, ist davon auszugehen, dass sich die im Wasser befindlichen organischen Stoffe mit der Zeit verändert. Außerdem kann es zur Flockenbildung und dem Zusammenschluss von Einzelpartikeln zu Partikelverbunden kommen. In wieweit das dazu führt, dass MP-Partikel bei der Filtration fälschlicherweise auf größeren Siebstufen liegen bleiben, kann nicht exakt geklärt werden. Es ist aber in einer Bewertung der Ergebnisse mit zu berücksichtigen. Um das Verhalten von Partikeln über den Probenahme-Zeitraum einschätzen zu können, wurden in einem weitergehenden Versuch die Partikelgehalte von Filtrat-Stichproben der Versuchsanlagen unmittelbar nach der Probenahme, nach 24 Stunden und nach 9 Tagen gemessen.

5.1.3.4 Weiterentwickelte MP-Probenahme

Ziel war es, eine 24 h -Mischprobe zu realisieren und dabei zu verhindern, dass es zu langen Standzeiten der Proben kommt. Zu diesem Zweck wurden drei Schlauchpumpen mit einem Frequenzumrichter ausgestattet. Die Schlauchpumpen wurden durch Auslitern so eingestellt, dass in 24 h das gewünschte Probenvolumen von 1 m^3 für das Klarwasser und 2 m^3 für die Filtrate der Versuchsanlagen über eine Siebkaskade in einen IBC-Container (Eng: Intermediate Bulk Container) gefördert wird. Bei der parallelen Beprobung der Anlagen werden drei Siebkaskaden mit jeweils drei Sieben (500 , 100 und $50 \mu\text{m}$)

benötigt, deren Durchmesser im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen von $\varnothing S = 20$ cm auf $\varnothing S = 60$ cm erhöht wurden. Da für die Filtrate 2 m^3 Probe benötigt werden, mussten jeweils zwei IBC-Container durch einen Silikonschlauch und ein T-Ventil miteinander verbunden werden. Nach Ablauf der 24 Stunden befinden sich die einzelnen Proben der Fraktion $< 50 \mu\text{m}$ demnach in separaten IBC-Containern.

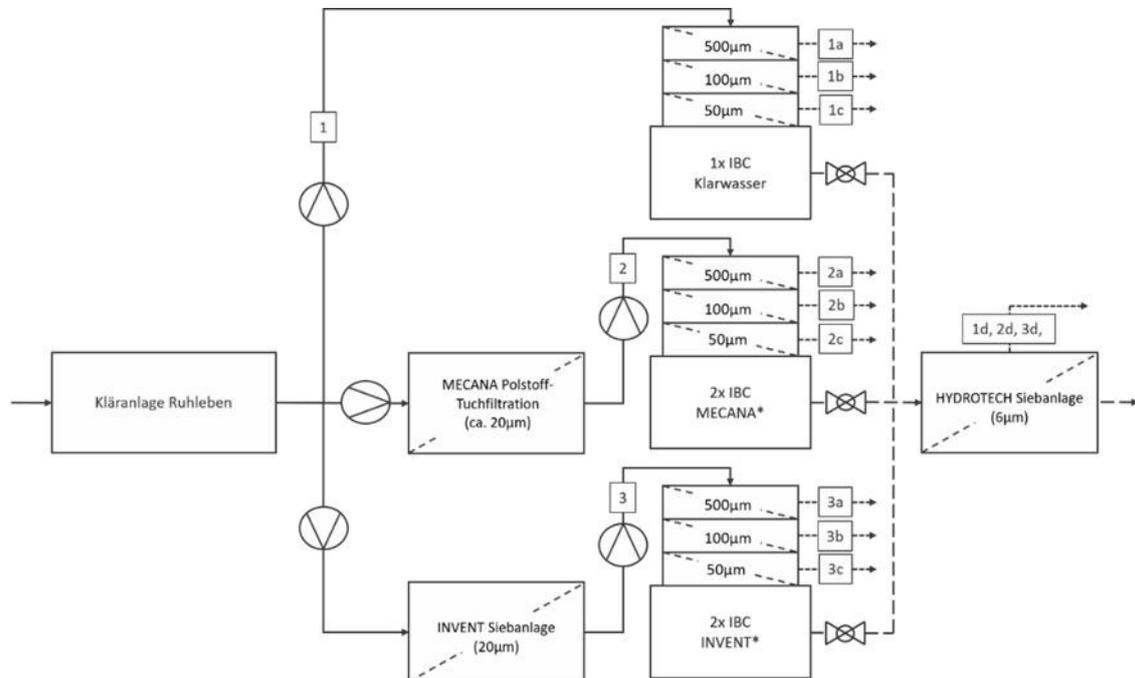


Abbildung 65: Versuchsaufbau der 24 h MP-Beprobung mit den Probenahmestellen 1) Zulauf, 2) Filtrat MECANA und 3) Filtrat IN-VENT jeweils mit den fraktionierten Siebrückständen a) $> 500 \mu\text{m}$, b) $100\text{--}500 \mu\text{m}$, c) $50\text{--}100 \mu\text{m}$ und d) $6\text{--}50 \mu\text{m}$. *) Filtrate der Versuchsanlagen werden in zwei durch einen Silikonschlauch miteinander verbundenen IBC-Containern aufgefangen. Siebdurchmesser $\varnothing S = 60$ cm

Im Anschluss an die Filtration über die Siebkaskaden, wurden die IBC-Container nacheinander an die HYDROTECH-Anlage angeschlossen und über das $6 \mu\text{m}$ -Tressengewebe der Anlage filtriert. Das dabei anfallende Spülwasser wurde aufgefangen, sodass neben den Siebrückständen eine weitere Partikelfraktion von $6\text{--}50 \mu\text{m}$ entsteht. Zwischen den Filtrationszyklen der einzelnen IBC-Container wurde die HYDROTECH-Anlage geleert und gereinigt. Die einzelnen Siebe wurden mit Leitungswasser zurückgespült. Dabei wurde der Siebrückstand zusammen mit dem Leitungswasser durch einen großen Trichter in Glasflaschen abgefüllt. Zusammen mit dem in Edelstahlfässern gesammelten Spülwasser der HYDROTECH-Anlage entstehen auf diese Weise 12 fraktionierte Einzelproben, die in weiteren Aufbereitungsschritten autoklaviert und gefriergetrocknet werden. Parallel zur 24 h-Beprobung wurde an den Probenahmestellen 1–3 (Abbildung 65) mithilfe von automatischen Probenehmern zusätzlich eine Mischprobe gezogen. Diese Mischproben wurden wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben auf die ausgewählten Indikatorparameter hin analysiert, um sie mit den MP-Ergebnissen dieses Versuchs vergleichen zu können.

Da die Nutzung der HYDROTECH-Anlage aufgrund hoher Spülwassermengen von ca. 50 L nicht optimal für die Probenaufbereitung ist, wird weiter nach einer alternativen Möglichkeit gesucht, trotz der großen Probenvolumen Partikelfraktionen $< 50 \mu\text{m}$ zu erhalten.

5.1.3.5 Siebtest mit 10 und $6 \mu\text{m}$ -Tressengewebe

Eine betrachtete Alternative zur Filtration über die HYDROTECH-Anlage ist die Erweiterung der Siebkaskade mit feineren Sieben. Dafür wurden Siebe mit einer Porenweite von 20, 10 und $6 \mu\text{m}$ angefertigt. Der Durchmesser der Siebe beträgt $\varnothing S = 60$ cm. Die Idee dabei ist, das Zusetzen der Siebe durch

die erhöhte Filtrationsfläche und die kleinstufigere Fraktionierung zu verhindern. Eine solche Siebkaskade würde zudem das Zwischenspeichern in IBC-Containern vermeiden. In ersten Tests konnte gezeigt werden, dass eine Kaskade bestehend aus 500, 100, 50 und 20 μm -Sieben das benötigte Probenvolumen von 1 m^3 Zulauf und 2 m^3 Filtrat ohne Zusetzen durchsetzen kann. In einem weiteren Versuch wurden nun das 10- und 6 μm -Sieb getestet (siehe Abbildung 66). Zur Vorbereitung des Tests, wurde 1 m^3 Klarwasser der Kläranlage Ruhleben über einen Siebstapel (500, 100, 50 und 20 μm) in einen IBC gepumpt. Anschließend wurden das 10- und 6 μm -Sieb so aufgebaut, dass die Probe im IBC im freien Gefälle über die Siebe filtriert werden kann. Beide Siebe wurden dabei durchgehend beobachtet, um die Filtration beim Blockieren der Siebe durch Schließen des IBC-Ventils stoppen zu können.

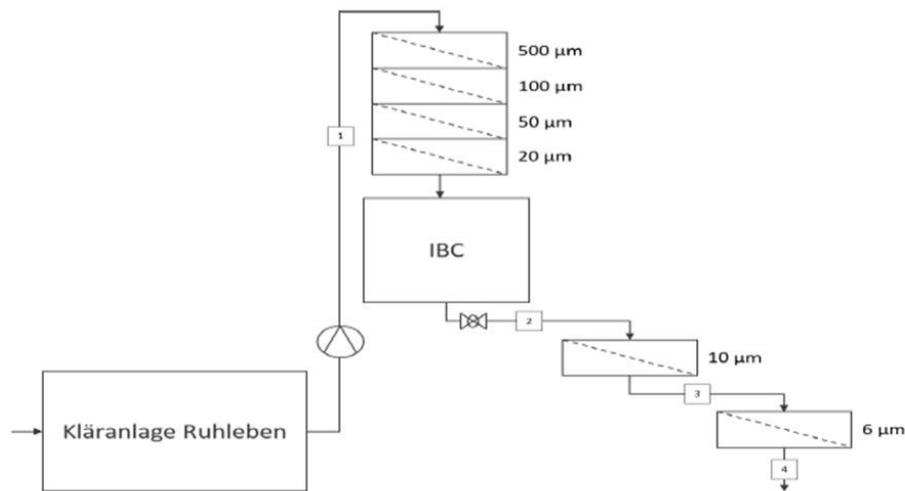


Abbildung 66: Versuchsaufbau des Siebtests mit den Probenahmestellen 1) Zulauf, 2) $< 20 \mu\text{m}$, 3) $< 10 \mu\text{m}$, 4) $< 6 \mu\text{m}$ bei einem Siebdurchmesser von $\varnothing S = 60 \text{ cm}$

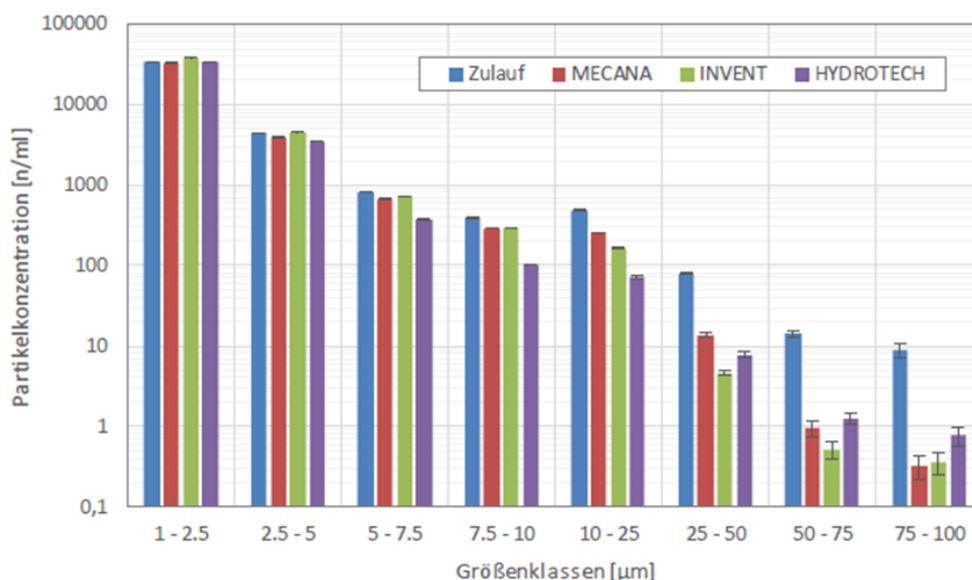


Abbildung 67: Absolute Partikelkonzentrationen der während des Siebtests gezogenen Stichproben

Nach ungefähr 300 Litern war zum ersten Mal ein Aufstau der Probe auf dem 10 μm -Sieb zu beobachten und die Filtration musste unterbrochen werden. Um das zugesetzte Sieb temporär zu reinigen, wurde Leitungswasser mithilfe einer Brause in das aufgestaute Wasser gespritzt um Turbulenzen zu

erzeugen. Auf dem Siebgewebe sedimentierte Partikel kommen so wieder in Bewegung und machen die Poren des Siebes frei. Im Anschluss an dieses Vorgehen war ein direktes Abfließen der aufgestauten Probe zu beobachten und die Filtration konnte fortgesetzt werden. Kurz danach setzte sich nun das 6 µm-Sieb zu, sodass auch hier das aufgestaute Wasser mithilfe der Brause aufgewühlt werden musste. In regelmäßigen Abständen wurde dieses Vorgehen für beide Siebe wiederholt, um eine durchgehende Filtration zu ermöglichen.

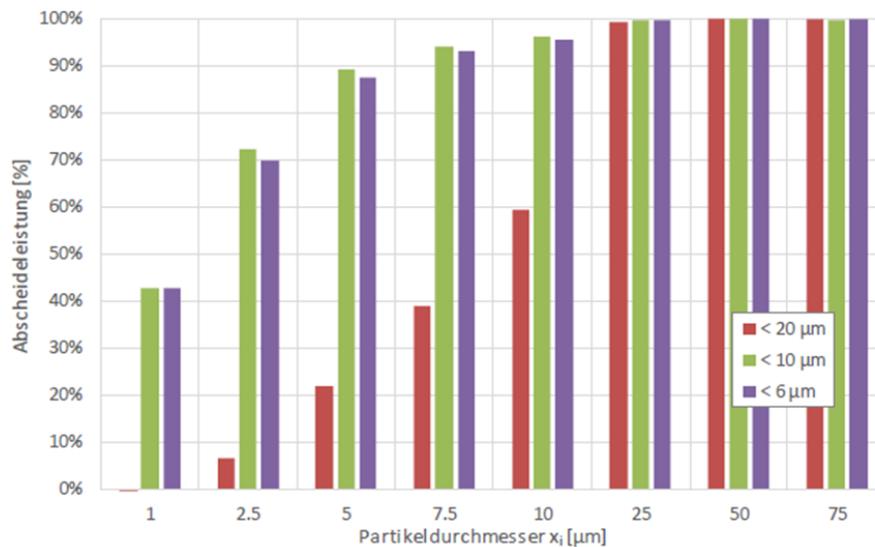


Abbildung 68: Abscheideleistungen der einzelnen Siebe bezogen auf die Zulaufwerte

Den Einfluss der zusätzlichen Siebe auf die Partikelzahlen ist deutlich zu erkennen. Auffallend ist, dass das 20 µm-Sieb noch eine recht scharfe Trennung von Partikeln größer und kleiner 20 µm aufweist. So springt die Abscheideleistung bei Partikeln > 10 µm von ca. 60 % auf über 90 % bei Partikeln > 25 µm. Ein solch scharfer Schnitt bei der eigenen Maschenweite ist bei dem 10 und 6 µm-Sieb nicht zu erkennen. Hier wird bereits bei Partikeln > 1 µm eine Abscheideleistung von 40 % überschritten. Diese steigt dann mit den Größenklassen auf nahezu 100 % Abscheidung bei Partikeln > 25 µm. Es ist außerdem zu sehen, dass das 6 µm-Sieb im Vergleich zum 10 µm-Sieb in diesem Versuch keine weitere Partikelreduktion bewirkt hat. Die Ursachen dafür müssen in weiterführenden Versuchen untersucht werden. Sollten sich die gemessenen Partikelzahlen bestätigen, ist die Verwendung dieses 6 µm Siebes als weitere Fraktionierungsstufe bei der MP-Beprobung fragwürdig.

Grundsätzlich zeigt dieser Siebttest, dass das Filtrieren von großen Probenvolumen über ein 10 oder 6 µm-Sieb möglich ist. Der manuelle Betrieb der Brause, der das Sedimentieren der Partikel auf dem Siebgewebe verhindert, ist dabei zu optimieren, zumal nicht gesichert ist, dass durch dieses Verfahren ein gewisser Teil der Partikel durch das Sieb gedrückt wird. Über alternative Möglichkeiten, das Wasser auf den Sieben in Bewegung zu halten und somit die Sedimentation zu verhindern, sollte nachgedacht werden. Rüttelplatten oder Magnetrührer könnten hier eine Option sein. Versuche diesbezüglich konnten in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen leider nicht weiterverfolgt werden.

5.2 Befunde in Kläranlagen (BAM)

Im Ablauf des Klärwerks Ruhleben wurden je 1000 L des Klarlaufs durch das UBA an 8 Tagen beprobt, wovon allerdings vier Probenahme-Tage im Rahmen BMBF-Projekts „Optimierte Materialien und Verfahren zur Entfernung von Mikroplastik aus dem Wasserkreislauf“ (OEMP) erfolgten. Die Ergebnisse der TED-GC/MS Ergebnisse aller acht Tage werden im vorliegenden Bericht gemeinsam dargestellt, um

so einen größeren Datensatz zu erhalten. Aufgrund des gewählten Probenahme-Verfahrens (fraktionierte Filtration) wurden pro Probenahme Fraktionen von 500 µm, 100 µm und 50 µm erhalten. Wenn ausreichend Probenmaterial verfügbar war, wurden Doppelbestimmungen mit der TED-GC/MS durchgeführt.

Abbildung 69 zeigt die mittels TED-GC/MS ermittelten Peakflächen der polymerspezifischen Markersubstanzen an allen Probenahmetagen sowie in den verschiedenen Fraktionen. Als Markersubstanzen wurden verschiedene Alkadiene für PE, Propylenoligomere für PP und ein Styroldimer für PS verwendet. Im Sommer wurden die Polymere PE, PS und PP in den Proben detektiert, im Winter konnten lediglich PE und PS detektiert werden. Weitere Polymere konnten in keiner Probe nachgewiesen werden.

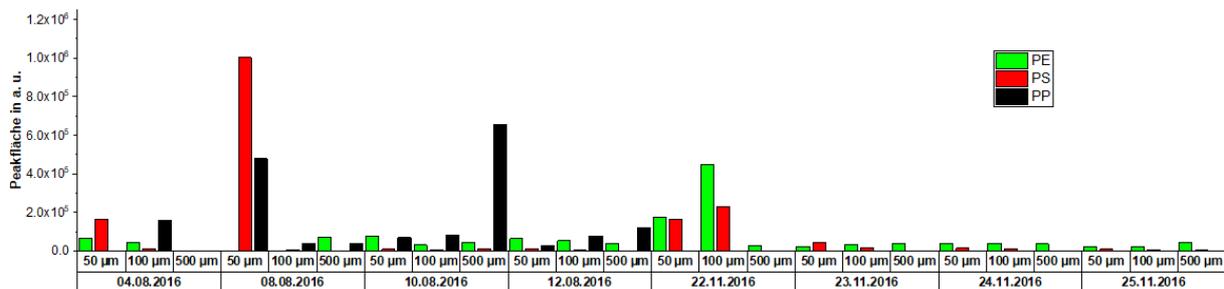


Abbildung 69: Peakflächen der detektierten Polymeren in einem mg Trockenmasse des Klarlaufs

Um die Massen an Polymeren in der Trockenmasse zu bestimmen, wurden die oben beschriebenen externen Kalibrierungen eingesetzt.

Die Massen an Polymeren in 1.000 L Klarlauf variieren zwischen 0–367 mg für PE, 0–39 mg für PS und 0–23 mg für PP (nur Werte im Sommer wurden berücksichtigt). Die durchschnittlichen Werte (gemittelt über alle Tage und Fraktionen) im Klarlauf liegen bei 59,3 mg für PE, 2,5 mg für PS und 4,3 mg für PP.

Während des Projektfortschrittes stellte sich heraus, dass die Alkadiene, die als PE-spezifische Marker verwendet werden, durch Koelution mit Ketonen im Chromatogramm überlagert sind. Diese Ketone sind ersten Untersuchungen zufolge Oxidationsprodukte von PE. Es wurden deshalb erneute TED-GC/MS Messungen unter Verwendung einer HP-5 Säule durchgeführt, die zur chromatographischen Trennung von Keton und Alkadien führten. Dies ermöglichte die störungsfreie Quantifizierung von PE in diesen Proben.

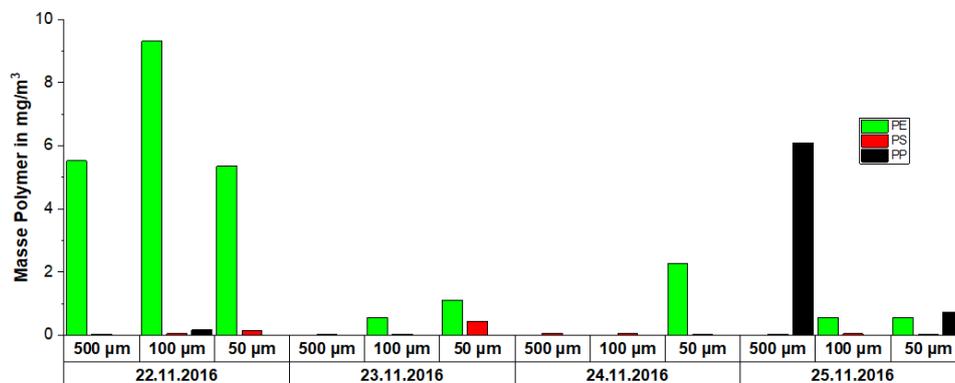


Abbildung 70: Überblick über die detektierten Polymere in 1000 L Klarlauf

Abbildung 70 zeigt die detektierten Massen an Polymeren in 1000 L Klarlauf nach erneuter Messung der Proben unter Verwendung der TED-GC/MS, die mit einer HP-5-Säule bestückt ist. Es konnten wiederum die Polymere PE und PS detektiert werden. Zusätzlich wurde PP gefunden, was vermutlich auf die höhere Empfindlichkeit des nun verwendeten GC-MS Systems zurückzuführen ist. Die detektierten Massen an PE sind nun deutlich geringer. Nach wie vor sind, im Vergleich zu den anderen Tagen, die Polymermassen pro 1000 L Klarlauf am 22.11.2016 am höchsten.

5.3 Befunde in Oberflächenwasserbehandlung (BAM)

Von einer Retentionsbodenfilteranlage in Berlin, die zur Behandlung von Straßenablauf dient, wurden durch die TUB Proben genommen. Der Straßenablauf wird zunächst in ein Sedimentationsbecken geleitet und weiter auf den Bodenfilter gepumpt. Der Ablauf des Filters wird schließlich in einen See geleitet. Vom Straßenablauf wurden in Größenfraktionen geteilte Proben gewonnen sowie aus den Feststoffen des abgelassenen Sedimentationsbeckens und am Anfang und Ende des weitläufigen, bepflanzen Bodenfilters. Neben PP und PS wurden große Mengen von Zersetzungsprodukten von NR und SBR nachgewiesen. Da SBR u.a. aus Styrolmonomeren aufgebaut ist und in großen Mengen vorlag, ist ein falschpositiver Befund für PS nicht auszuschließen. Die Zersetzungsprodukte für NR wiederum könnten auch durch pflanzliches Material verursacht worden sein. Die Fraktionen des Straßenablaufs enthielten bis zu 0,8 % SBR (Eisentraut et al. 2018) und der Feststoff des Sedimentationsbeckens 0,9 % SBR, jeweils in Trockenmasse. Unter der Annahme, dass Reifenlaufflächen zu 11,3 % aus SBR bestehen, ergeben sich Werte von 7,1 % und 8,2 % Reifenmaterial in den Proben. Abbildung 71 zeigt ausgewählte Ionenspuren der Chromatogramme der Feststoffprobe aus dem Sedimentationsbecken mit und ohne Dotierung.

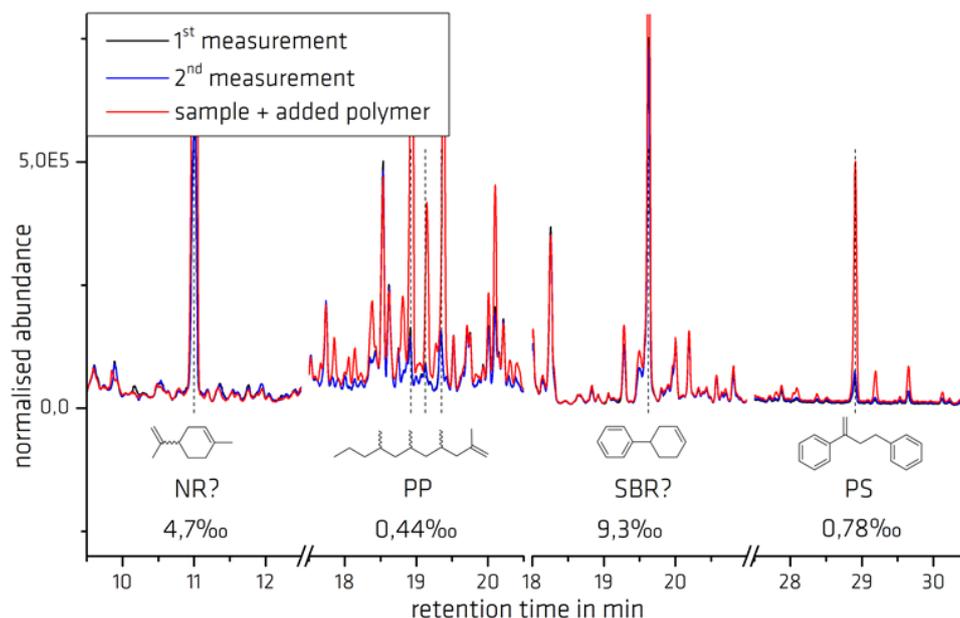


Abbildung 71: Ausgewählte Ionenspuren von TED-Chromatogrammen von Proben des Sedimentationsbeckens in Halensee mit ausgewählten Zersetzungsprodukten

Im Rahmen des BMBF-Projekts „Optimierte Materialien und Verfahren zur Entfernung von Mikroplastik aus dem Wasserkreislauf“ (OEMP) wurden durch den Fachbereich Siedlungswasserwirtschaft der TU-Berlin zahlreiche Straßenablaufproben auf einer Teststrecke in der Clayallee genommen. Dieses umfangreiche Probenset wurde im Rahmen des MiWa-Projekts durch das UBA aufbereitet und an der BAM mit Hilfe der TED-GC/MS auf Reifenabrieb und MP untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 72 zusammengefasst.

Es konnten in allen Proben Polymere, darunter PMMA, PP, PS, PE, NR und SBR detektiert werden. Die Quantifizierung wurde auf Grundlage einer externen Kalibrierung oder durch Spike-Experimente durchgeführt. Ausgehend von den SBR-Ergebnissen wurde die enthaltene Menge an Reifenabrieb kalkuliert. Grundlage hierfür ist der durchschnittliche SBR-Gehalt ($\approx 11,3\%$) in Reifenmaterialien.

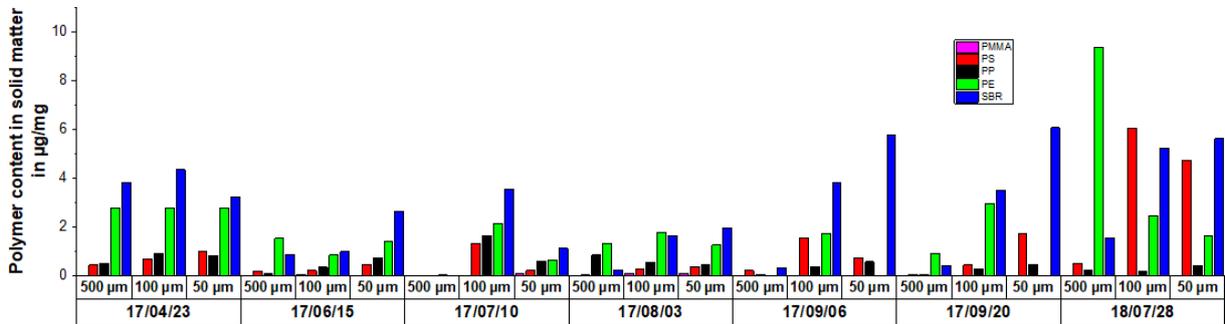


Abbildung 72: Zusammenfassung der TED-GC/MS Ergebnisse in Straßenablauf-Proben von der Teststrecke in der Clayallee (Projekt OEMP), dargestellt ist der Polymergehalt an den verschiedenen Probenahmetagen (jeweils Fraktionen 500 µm, 100 µm, 50 µm)

Ein besonderer Schwerpunkt stellte die Identifikation von spezifischen Polymermarkern von Reifenabrieb dar. Diese Untersuchungen erfolgen in enger Zusammenarbeit mit dem Projektpartner UFZ, da hier anhand von chemischen Elementen Reifenpartikel identifiziert werden sollten; Abbildung 73 (links) zeigt Zink- und Schwefelgehalt sowie Pyrolyserückstände einiger Reifenproben. Anhand von Referenzproben konnten in der TED-GC/MS Marker von verschiedenen Komponenten identifiziert (u.a. Vulkanisationsmittel, SBR, NR, dargestellt in Abbildung 73 (rechts)) und diese auch in realen Straßenabläufen nachgewiesen werden. Zum Vergleich der Analysemethoden, die durch die unterschiedlichen Ansätze (Detektion anhand geeigneter chemischer Elemente nach Dichteseperation und Detektion anhand der Kautschukkomponente SBR) gänzlich unabhängige Verfahren darstellen, wurden identische Probensätze gemessen. Die Ergebnisse der beiden Verfahren passen gut zueinander; einzige Ausnahme ist ein Probensatz, der vom UFZ an einem Behandlungssystem für den Ablauf der Autobahn A38 gewonnen wurde. Hier ist mutmaßlich das hohe Alter der gewonnenen Reifenpartikel für die Diskrepanz in den Analyseergebnissen verantwortlich.

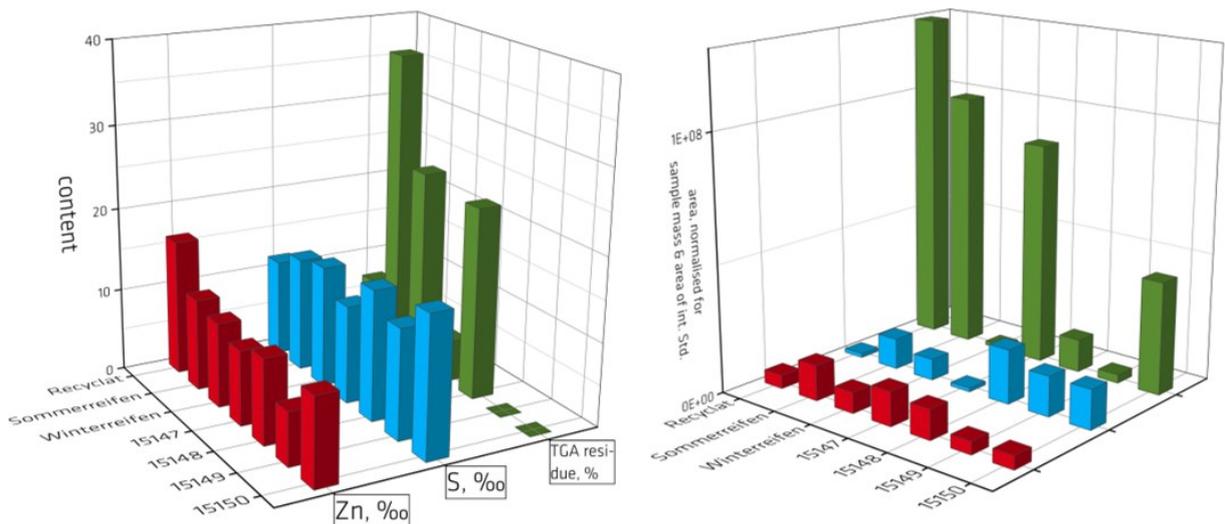


Abbildung 73: Spezifische Elemente von Reifenmischungen (links: Zink (rot), Schwefel (blau) anorganischer Rückstand (grün), Daten vom UFZ) und spezifische Marker von Reifenmischungen (rechts: Vulkanisationshilfsstoff (rot), SBR (blau) und NR (grün))

5.3.1 TRWP-Konzentrationen in Niederschlagswasseraufbereitungsanlagen (UFZ)

Zunächst wurden Proben aus Berlin Halensee (Probenahme November 2017) sowie von der A38 (Probenahme März 2018) untersucht (Klößner et al. 2019). Diese wurden mit der schwerkraftbasierten Separation im Messkolben angereichert. Hierbei wurden TRWP-Konzentrationen von $0,38 \pm 0,04$ mg/g bis hin zu 150 ± 30 mg/g gemessen ($n=3$). Die höchsten Konzentrationen wurden in HAL_SED (130 ± 15 mg/g) und in HAL_RBF kurz nach der Verteilerrinne, welche das vorgeklärte Wasser im RBF verteilt, gemessen (HAL_RBF1, 150 ± 30 mg/g). Die Konzentration im RBF auf der gegenüberliegenden Seite der Verteilerrinne (HAL_RBF2, ca. 35 m entfernt) nahm stark ab ($16 \pm 1,4$ mg/g). Obwohl die TRWP Konzentration stark abnahm, war der relative Massenanteil von TRWP an der leichten Fraktion konstant (34–36 %). Die Zusammensetzung der aufgeschwemmten Fraktion änderte sich also nicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Sedimentationsbecken die TRWP nicht vollständig zurückgehalten werden und dass die Konzentration auf dem Bodenfilter nicht gleichmäßig ist, sondern während der Beschickung auf der Filterfläche Sedimentationsprozesse stattfinden. Der Anteil anderer Zn-Quellen (sedimentierte Fraktion) nahm mit abnehmendem TRWP-Gehalt zu (von 17 % in HAL_SED bis zu 78 % in HAL_RBF2). Die Analyse von Gesamt-Zn ohne Dichteseperation würde entsprechend den TRWP Gehalt stark überschätzen. Die Konzentrationen im Behandlungssystem der A38 waren deutlich geringer. Zum einen waren die bestimmten TRWP-Konzentrationen geringer ($2,0 \pm 0,3$ mg/g in LE_S1 und $0,38 \pm 0,04$ mg/g in LE_S2), zum anderen war der Anteil von TRWP-Zn am Gesamt-Zn sehr klein (2–3 %).

Die Unterschiede zwischen den Behandlungssystemen können mit den unterschiedlichen Umweltbedingungen, der Verkehrsdichte und dem Fahrverhalten erklärt werden. In Berlin Halensee ist das Verkehrsaufkommen mit ca. 160.000 PKW und 8.000 LKW pro Tag deutlich höher als in Leipzig (40.000 PKW, 7.000 LKW pro Tag). Zudem führen häufige Staus zu verstärkten Anfahr-, Beschleunigungs- und Bremsvorgängen, was zu höheren Abriebemissionen führen könnte. Zudem ist die Umgebung in Leipzig von Landwirtschaft geprägt, wodurch eine höhere Ablagerung von Bodenpartikeln auf der Fahrbahnoberfläche vermutet wird, welche die TRWP verdünnen. Der Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Zusammensetzung wurde in der Literatur bereits gezeigt (Gunawardana et al. 2012). Die Unterschiede in der partikulären Zusammensetzung der beiden Systeme könnte aber auch mit einer veränderten Partikeldynamik aufgrund von Alterung, z. B. durch Aggregation und Abbauprozesse, begründet sein. Das Absetzbecken HAL_SED wird in regelmäßigen Abständen gereinigt, wohingegen das System bei Leipzig seit der Errichtung vor ca. 12 Jahren nicht beräumt wurde. Während dieses Zeitraums könnte eine Erhöhung der TRWP Dichte durch Heteroaggregation mit anderen Partikeln stattgefunden haben. Das würde die geringen Massenanteile der aufgeschwemmten Fraktion erklären. Ein Auslaugen des Zn und Adsorption an die Sedimentmatrix würde die geringen TRWP-Konzentrationen nicht erklären, da auch TRWP ohne Zn in der aufgeschwemmten Fraktion aufzufinden wäre, die Massenanteile dieser Fraktion aber gering waren (1,3–2,5 %). Neben einer Veränderung der TRWP-Dichte könnten auch mikrobielle Abbauprozesse stattgefunden haben. Auch wenn die Partikeldynamik noch nicht aufgeklärt werden konnte, zeigte die Methode eine hohe Präzision mit einer relativen Standardabweichung von 9–20 %. Außerdem wurde deutlich gezeigt, dass die Untersuchung von Gesamt-Zn zu einer fehlerbehafteten TRWP-Bestimmung führen würde und eine Anreicherung bzw. Separation von TRWP-Zn notwendig ist.

Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, wurde die Dichteseperation optimiert. Die optimierte Zentrifugationsmethode wurde auf Straßenkehrproben (SK_North, SK_South, SK_West, Probenahme April 2019) der Leipziger Straßenreinigung, Sedimente der Behandlungsanlage A38 (S1In, S1Out, S2In, S2Out, Probenahme Oktober 2018), Sediment aus dem Tegeler See (TGL, Probenahme Juni 2016 durch TUB) sowie Proben aus dem Absetzbecken der Behandlungsanlage Berlin Halensee (18HAL, Proben-

ahme Dezember 2018 und 19HAL, Probenahme März 2019) angewandt. Die bestimmten TRWP Konzentrationen reichten von 3,7 mg/g bis 480 mg/g. Wie bei den vorangegangenen Messungen, waren die geringsten Konzentrationen in den Sedimenten der A38 Anlage zu finden, allerdings war dies vom Ort der Probenahme im Becken abhängig. So ist bei beiden Teichen (S1, S2) die Konzentration nahe der Einlassstelle deutlich geringer als am jeweiligen Auslass, wo die Konzentrationen wiederum höher als in Straßenkehricht waren. Verglichen mit dem RBF in Halensee (siehe oben) zeigt sich hier also eine gegenteilige Verteilung der Partikel im System. Dies kann mit der Beschickung von HAL_RBF und LE_S1 bzw. LE_S2 erklärt werden. Während beim HAL_RBF der Verteilprozess auf dem Filter kontrolliert stattfindet und geringe Fließgeschwindigkeiten vorherrschen, ist beim System in Leipzig der Partikeltransport von den jeweiligen Abflussmengen abhängig. Somit wird erwartet, dass die Partikel vor allem bei starken Regenereignissen in die Becken transportiert werden. Bei einer hohen Fließgeschwindigkeit sedimentieren die Partikel nicht unmittelbar nach dem Einlass, sondern werden bis zur gegenüberliegenden Seite transportiert. Zudem ist die Konzentration an schnell sedimentierenden Partikeln (z. B. Sand) am Einlass höher, wodurch eine Verdünnung der TRWP Konzentration stattfinden kann. Sämtliche Konzentrationen der A38 Proben waren deutlich höher als in der vorhergehenden Untersuchung, was auf Unterschiede in der Probenahmetechnik (Ekman-Greifer vs. Schöpfbecher) zurückzuführen sein könnte. Die TRWP Konzentrationen in den Straßenkehrichtproben waren mit 6,7–9,4 mg/g in allen drei Proben ähnlich. Auch die Korngrößenverteilung dieser Proben (nicht gezeigt) dieser Proben zeigte eine fast identische Zusammensetzung der Proben. Es scheint also, als wäre der gesammelte Straßenkehricht in den behandelten Stadtteilen bezüglich der TRWP Konzentration und stofflichen Zusammensetzung vergleichbar und relativ homogen (geringe Standardabweichungen). Die Konzentrationen im HAL_SED waren mit Abstand am höchsten (360–480 mg/g). Obwohl die Probe 18HAL nach einem Zeitraum von sechs Monaten, in welchen keine Reinigung des Beckens stattfand, entnommen wurde ist die TRWP Konzentration nur geringfügig höher als die 19HAL Probe, welche 2 Wochen nach Reinigung des Beckens genommen wurde. Daraus lässt sich ableiten, dass sich über den Zeitraum von sechs Monaten die Partikeleigenschaften im Sedimentationsbecken noch nicht maßgeblich verändert haben und die TRWP Konzentration im Becken relativ konstant ist. Besonders auffällig war die Probe aus dem Tegeler See, welche neben den HAL Proben die höchsten über Zn bestimmten TRWP Gehalte aufwies, obwohl hier keine TRWP erwartet wurden.

5.3.2 Gegenüberstellung von zwei Methoden zur TRWP Quantifizierung

Wie bereits in Abschnitt 4.5 beschrieben, kann die Quantifizierung von TRWP anhand des Zn-Gehalts der angereicherten Fraktion unter folgenden Umständen eingeschränkt sein: 1) andere partikuläre Zn-Quellen werden in der aufgeschwemmten Fraktion angereichert, 2) der Zn-Gehalt von TRWP ist aufgrund von Leaching reduziert und 3) die Dichte von TRWP hat sich in Folge von Alterungsprozessen erhöht. Für eine bessere Bewertung der Ergebnisse wurden die Proben daher auch an der BAM mittels TED-GC/MS untersucht. Die mit beiden Methoden bestimmten TRWP-Gehalte stimmten gut überein, der Korrelationskoeffizient über alle Proben war $r = 0,986$ (Pearson-Korrelationskoeffizient, $p = 2,0 \times 10^{-7}$). Die Straßenkehrichtproben (SKNorth, SKSouth, SKWest) stimmten am besten überein. Diese Proben enthielten vermutlich die jüngsten TRWP, da sie direkt von der Straßenoberfläche gesammelt wurden. Auch die TED-GC/MS Messungen bestätigen die geringen Schwankungen der TRWP Konzentrationen in Straßenkehricht aus den unterschiedlichen Stadtgebieten. Die Konzentrationen in den Sedimenten aus Halensee wichen um Faktor 2 voneinander ab. Im Vergleich zur vorangegangenen Untersuchung war der über Zn bestimmte TRWP Gehalt deutlich höher als per TED-GC/MS ermittelt (vergleiche TED-GC/MS 2017: 330 mg/g, 2018: 190 mg/g und 2019: 170 mg/g gegen TRWP-Zn 2017: 150 mg/g, 2018: 480 mg/g, 2019: 360 mg/g). Die Unterschiede zwischen den beiden HAL Proben fallen hier noch geringer aus und die oben gezogenen Schlüsse werden bestätigt. Einige Unterschiede können jedoch in den Proben der A38 erkannt werden. Proben aus diesen Becken zeigten bereits in der

vorherigen Untersuchung Anzeichen für Alterungsprozesse. Zudem zeigte die Probe aus dem Tegeler See (TGL) deutliche Unterschiede zwischen den zwei Methoden. Hier wurde über den SBR Gehalt fast kein TRWP bestimmt, wohingegen die Quantifizierung anhand der angereicherten Zn-Gehalte einen TRWP-Gehalt von 40 mg/g ergab. Das TGL Sediment weist einen hohen Zn-Gehalt, einen hohen Gehalt organischen Kohlenstoffs und einen geringen Einfluss von Straßenemissionen auf. Die TRWP Quantifizierung ist in dieser Probe stark durch interferierende Zn-Quellen beeinträchtigt.

Neben den Gesamtproben wurden auch die angereicherten Fraktionen mit TED-GC/MS untersucht. So konnte der SBR Gehalt der angereicherten Fraktion mit dem SBR Gehalt der Gesamtprobe verglichen werden. Für die TGL Probe betrug die berechnete Anreicherung 200 %, allerdings war der Messwert in der nicht separierten Probe nahe der Nachweisgrenze, wodurch die Sensitivität beeinträchtigt gewesen sein könnte. Bei den SK Proben betrug die SBR Anreicherung in der aufgeschwemmten Fraktion 73–98 %, wohingegen in den HAL Proben 120–140 % angereichert wurden. Die Anreicherung in den Proben der A38 war stark variabel und lag bei 34 % (S2In), 44 % (S1Out), 52 % (S1In) und 81 % (S2Out).

5.3.3 Partikelgrößenverteilung von TRWP

Da die Größenverteilung von TRWP nicht vollständig bekannt ist (Unice et al. 2019, Wagner et al. 2018) und nur selten TRWP > 10 µm untersucht wurden (Sommer et al. 2018), wurden vier der Proben (Halsee Sediment und Straßenkehricht) zudem durch Nasssiebung fraktioniert. In den gewonnenen Größenfraktionen wurde der TRWP-Gehalt über Zn in der angereicherten Fraktion untersucht. Grundsätzlich wurden in den Sedimenten die höchsten TRWP Konzentrationen in den Fraktionen 0–20 µm bzw. 20–50 µm und in den Straßenkehrichtproben in der Fraktion 100–250 µm bestimmt. Da die Partikelgrößenverteilung zum Beispiel von der Fahrweise oder vom Straßenbelag abhängig sein kann (Lee et al. 2013), könnten die vorliegenden Ergebnisse anhand der Entstehungsbedingungen erklärt werden. Aber auch ein selektiver Transport kleinerer Partikel in die Sedimentationsanlage, bei welchem grobe Partikel schon früher sedimentierten oder mit dem Autobahnabwasser nicht transportiert wurden, könnte Ursache für die gefundenen Ergebnisse sein. Folgende Schlussfolgerungen können hieraus abgeleitet werden: Der größte Massenanteil an TRWP entsteht in der Größenklasse 100–250 µm. Der in der Umwelt mobile, aber bezogen auf die Partikelmasse weniger relevante Anteil an TRWP hat eine Partikelgröße < 50 µm. Um diese Massenanteile zu beziffern und von den jährlichen TRWP Emissionen eine umweltrelevante Emissionsmenge abzuleiten, sind weitere Untersuchungen notwendig. Auch Alterungsprozesse von TRWP in der Umwelt und ihre Folgen für die Partikelgrößen und Marker-Gehalte müssen besser untersucht werden.

5.3.4 Untersuchung von Alterungsprozessen in Umweltproben

Um mögliche Alterungsprozesse festzustellen, konnten die bestimmten TRWP Gehalte der beiden Methoden mit der SBR Anreicherung verglichen werden. In S1In wurde der TRWP Gehalt mittels Zn geringfügig überbestimmt, wohingegen die Anreicherung von SBR in der aufgeschwemmten Fraktion nur 52 % betrug. Dies deutet auf eine erhöhte Dichte eines Teils der TRWP hin sowie auf die Anwesenheit von störenden partikulären Zinkquellen in der angereicherten Fraktion. Bei der Probe S1Out stimmen die gefundenen Werte zwar sehr gut miteinander überein, die SBR Anreicherung betrug aber nur 44 %. Auch hier war die TRWP Dichte zum Teil höher als erwartet und andere Zn Quellen waren vorhanden. In S2In wurde die niedrigste Anreicherung gefunden. Dies spiegelt sich deutlich in der Unterbestimmung der Zn-Methode nieder. Die TRWP Dichte schien also auch hier höher als erwartet gewesen zu sein, was durch Alterungsprozesse, wie zum Beispiel Aggregation, begründet sein könnte. Eine weitere Ursache könnte eine geringe Partikelgröße der TRWP < 1 µm sein, wodurch eine Anreicherung während der Zentrifugation nicht garantiert ist. Für S2Out betrug die Anreicherung 81 % und die Methoden stimmten um den Faktor 2 überein. Die Bestimmung anhand des Zn-Gehalts wies eine große Streuung

auf. Angesichts der hohen Präzision (geringe Standardabweichung) der Methode bei den anderen Proben könnte eine hohe Heterogenität bei dieser Probe diese Streuung verursacht haben. In keiner der Proben schien ein Auslaugen von Zn die TRWP Quantifizierung zu beeinträchtigen. Dies hätte sich in einer hohen SBR Anreicherung zusammen mit einer Unterbestimmung von TRWP anhand des Zn-Gehalts niedergeschlagen. Es sei denn, andere partikuläre Zn-Quellen hätten die ausgelaugte Zn Menge ausgeglichen.

5.4 Befunde in Oberflächengewässern

5.4.1 Zürichsee (TZW)

Die Untersuchung auf MP-Partikel im Zürichsee 2015 in den Tiefen 0,5 m, 9 m, 20 m und 30 m zeigte, dass MP-Partikel nicht nur an der Wasseroberfläche zu finden sind, sondern über die Wassersäule verteilt sind. Über alle untersuchten Tiefen hinweg lag die durchschnittliche Anzahl der MP-Partikeln (Durchmesser > 5 µm) bei $2 \cdot 10^6$ pro m^3 (siehe Abbildung 74). Die höchste MP-Partikel-Belastung wurde in 0,5 m Tiefe festgestellt ($3 \cdot 10^6$ MP-Partikel pro m^3) und die niedrigste in 30 m Tiefe ($6 \cdot 10^5$ MP Partikel pro m^3). Es war ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Anzahl und der Größe der detektierten MP-Partikel zu erkennen. Fast alle MP-Partikel gehörten der Größenfraktion < 20 µm (99,6 % der MP-Partikel) an. Die am häufigsten gefundenen Polymerarten waren PE (56,9 %), PP (26,1 %), PVC (9,3 %), PA (5,9 %) und PS (1,3 %) (Witzig 2017). Auffällig war, dass MP-Partikel der Polymerarten PE und PP, die aufgrund geringerer Dichte als Wasser eher an der Wasseroberfläche erwartet wurden, auch in tieferen Schichten vorgefunden wurden. Gleichmaßen wurden MP-Partikel mit höherer Dichte als Wasser (PVC, PA, PS) auch in der Nähe der Wasseroberfläche nachgewiesen.

In der MP-Forschung beschränken sich Probenahmen in Oberflächengewässern oft nur auf die Gewässeroberfläche. Die Untersuchung von MP-Partikeln in verschiedenen Tiefen des Zürichsees hat gezeigt, dass die MP-Partikel-Konzentration mit der Tiefe variieren kann. Um die Gesamtbelastung eines Oberflächengewässers mit MP-Partikeln korrekt einordnen zu können, muss das Tiefenprofil der MP-Partikel-Konzentration berücksichtigt werden.

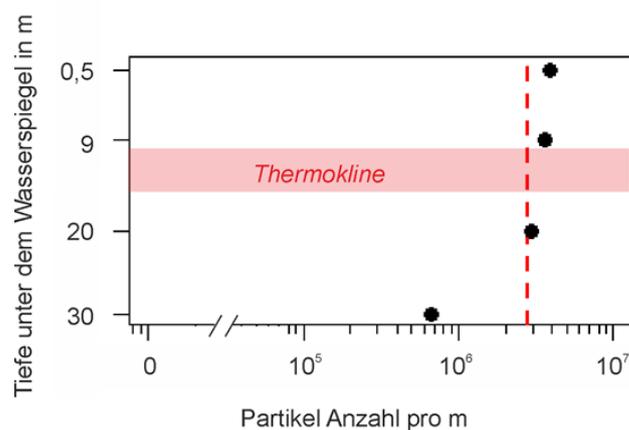


Abbildung 74: Tiefenprofil des MP-Partikel-Vorkommens im Zürichsee für Partikel > 5 µm. Die rote, gestrichelte Linie gibt die MP-Partikel-Anzahl gemittelt über die vier untersuchten Tiefen an

5.4.2 Elbe

5.4.2.1 Raman-Spektroskopie (TZW)

Die erstmalige Untersuchung der Elbe entlang ihres Längsgradienten im Jahr 2017 ergab eine MP-Partikel-Konzentration von $1 \cdot 10^5$ bis $9 \cdot 10^5$ MP-Partikeln pro m^3 Flusswasser (siehe Tabelle 25). Dabei wurden alle Partikel > 5 µm untersucht. Die am häufigsten gefundenen Polymerarten waren PE (96,5 %),

PS (1,8 %), PP (0,7 %) und PA (0,5 %). Auffällig war der sehr hohe Anteil kleiner MP-Partikel < 20 µm (96 % der MP-Partikel). Aufgrund der großen Algenbelastung konnte nur ein geringes Extraktvolumen erfolgreich aufbereitet und analysiert werden. Dadurch sind die vorliegenden Ergebnisse mit einem großen Hochrechnungsfaktor behaftet. Es konnten anhand der Daten keine generellen Trends über den Flussverlauf festgestellt werden, weder eine Zunahme der MP-Partikel-Konzentration noch der Fracht (abgeschätzt aus Polymerdichte, Partikelanzahl und Partikeldurchmesser). Zudem konnten Städte nicht als Punktquellen bestätigt werden. Für eine detailliertere Aussage sind engmaschigere Monitorings notwendig, mit deren Hilfe sich auch mögliche Sedimentations- oder Transportprozesse besser abbilden lassen (Müller 2018).

Tabelle 25: Konzentration an MP-Partikeln im Längsprofil der Elbe, in Klammern das Datum der Probenahme (aus Müller 2018).

	MP in 1/m ³	MP in µg/l	Fracht in g/d	Abfluss in m ³ /s	Abfluss in m ³ /d
Pirna (24-06-2017)	4·10 ⁵	0,49	5·10 ³	110	1·10 ⁷
Dommitzsch (25-06-2017)	3·10 ⁵	2,64	3·10 ⁴	125	1·10 ⁷
Magdeburg (26-06-2017)	1·10 ⁵	0,24	4·10 ³	210	2·10 ⁷
Hinzdorf (13-07-2017)	9·10 ⁵	0,41	1·10 ⁴	350	3·10 ⁷
Hitzacker (11-07-2017)	4·10 ⁵	0,32	1·10 ⁴	410	4·10 ⁷
Bleckede (12-07-2017)	1·10 ⁵	0,10	4·10 ³	410	4·10 ⁷

5.4.2.2 TED-GC/MS (BAM)

Im Rahmen des Wissenschaftsjahres wurde die Elbschwimmstaffel durchgeführt. Um auf den Zustand der deutschen Gewässer hinzuweisen, wurde der deutsche Teil der Elbe öffentlichkeitswirksam abgeschwommen. Auf den Begleitbooten wurden u.a. durch die TUB Proben genommen. Ein Parameter, der untersucht werden sollte, war MP. Dafür wurde an verschiedenen Orten Elbwasser über Filterkaskaden mit unterschiedlichen Maschenweiten filtriert, die zurückgehaltenen Feststoffe auf Filter übertragen und getrocknet. Die beladenen Filter wurden komplett homogenisiert und ein Aliquot per TED-GC/MS analysiert. Die verwendeten Filtersysteme bestanden zunächst aus Cellulose-Acetat. Diese rein organischen Materialien zersetzen sich in der TGA komplett und die große Menge (im Vergleich zu evtl. enthaltenem Kunststoff) an organischen Zersetzungsprodukten wirkte sich auf die Messungen aus, u.a. wurde der Großteil des PDMS-Absorbers belegt. Abbildung 75 zeigt die Ergebnisse der im Rahmen der Elbschwimmstaffel genommenen Proben. In den Proben konnte PS und zusätzlich in je einer Probe PE und PP detektiert werden. Aufgrund des seltenen Auftretens wurden PE und PP in der Grafik vernachlässigt.

Bei den schwarz markierten Proben liegen die ermittelten Werte unter der Bestimmungsgrenze. Ab den Proben in Riesa (blauer Pfeil in Abbildung 75) erfolgte eine Umstellung der Filter, die zur Probenahme verwendet wurden, von Cellulose-Acetat zu Glasfaser. Auffällig ist, dass ab diesem Zeitpunkt Polystyrol in allen Proben gefunden wurde. TGA-Messungen zeigten, dass die Glasfaserfilter selbst bereits einen Massenverlust von ca. 6 % aufweisen. In den folgenden TED-GC/MS-Messungen an unbeladenen Glasfaserfiltern konnte eindeutig Polystyrol nachgewiesen werden, was vermutlich auf die Schlichte zurückzuführen ist, die unmittelbar nach der Herstellung auf die Glasfasern aufgetragen wird. Es wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht, um das PS vor der Anwendung aus den Filtern zu

entfernen. Das Tempern bei 900 °C für 5 h führte zu einer nahezu vollständigen Entfernung des PS. Zusätzlich wurden die Filter der verschiedenen Projektpartner/verschiedener Hersteller untersucht.

Dies zeigte, dass der Blindwert an Polymeren aus den Filtern stark variiert und dieser Fakt individuell berücksichtigt werden muss. Für die Proben der Elbstaffel bedeutet dies, dass die Polystyrolwerte von Riesa bis Bleckede nicht weiter betrachtet werden sollten.

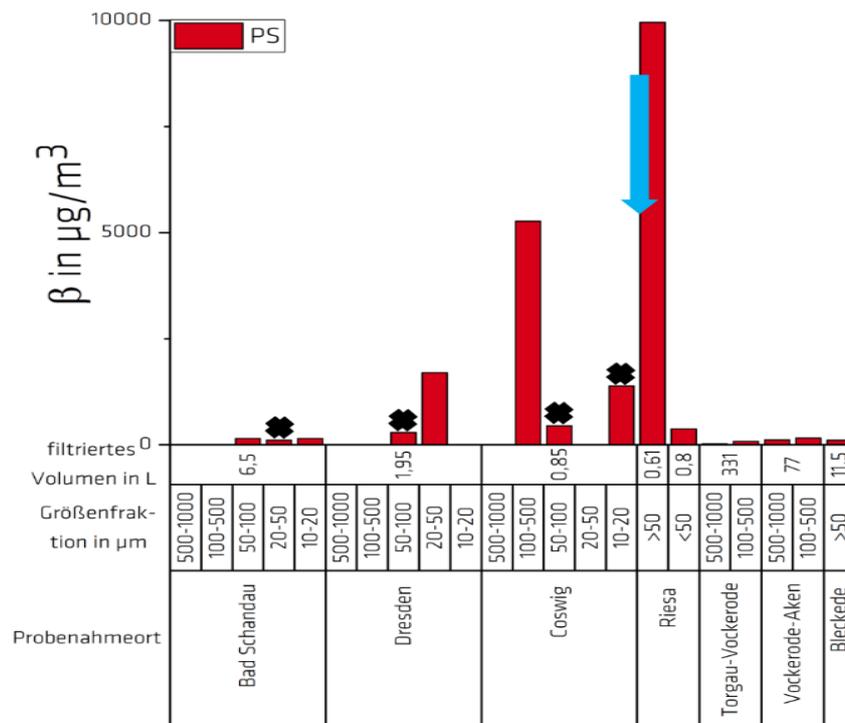


Abbildung 75: Detektierte Polymere in den Proben der Elbschwimmstaffel, Teil 1

Die im Bereich Sandau und Hitzacker detektierten Polymere sind in Abbildung 76 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass an beiden Standorten große Mengen an PE detektiert wurden. Zusätzlich konnte PP zwischen 5 und 10 µg/Filter sowie PMMA mit ca. 5 µg/Filter nachgewiesen werden. Die Befunde für PMMA könnten auch durch andere Substanzen wie z. B. Acrylatfarben verursacht worden sein. Zusätzlich könnte es zu einer Kontamination während der Probenahme gekommen sein, da für die Probenahme ein Aufbau aus PMMA verwendet wurde. In Hitzacker wurde zusätzlich PA gefunden, welches jedoch unter der Bestimmungsgrenze lag.

5.4.3 Teltowkanal (BAM)

Der Teltowkanal wurde an drei verschiedenen Tagen (20.07.2017, 14.11.2017, 25.04.2018) durch das UBA beprobt. Nach der Probenaufbereitung durch das UBA wurden die Proben an der BAM analysiert.

Die Ergebnisse der TED-GC/MS-Messungen sind in Abbildung 77 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Polymere in allen Größenklassen detektiert werden konnten, darunter PE, PP, SBR, NR, PS, PET und PA. Im Vergleich zu den gefundenen Polymeren im Klärwerksablauf (siehe Abschnitt 5.2, Identifikation von PE, PP, PS) oder im Straßenablauf (siehe Abbildung 72), konnten in den Teltowkanal-Proben auch bisher nicht gefundene Polymere, wie z. B. PET oder PA detektiert werden. Sie treten jedoch sehr unspezifisch auf.

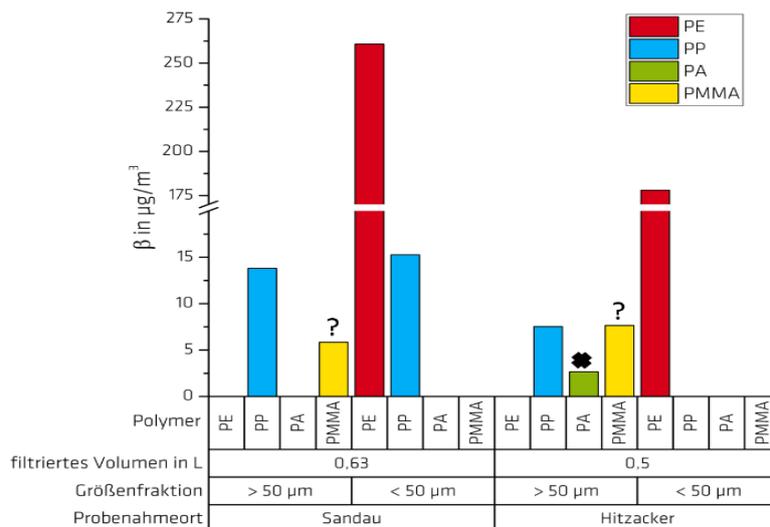


Abbildung 76: Detektierte Polymere in den Proben der Elbschwimmstaffel, Teil 2

Mit Ausnahme einzelner Fraktionen und Polymersorten werden relative Gehalte von wenigen $\mu\text{g}/\text{mg}$ bis ca. $20 \mu\text{g}/\text{mg}$ pro Partikelgrößenfraktion bestimmt. Wird der SBR-Gehalt der Proben in einen Gehalt an Reifenpartikel abschätzungsweise umgerechnet, ändert sich das Bild jedoch. PE und PP sind die Polymere, die am häufigsten auftreten. In Summe ist das „Reifensignal“ jedoch am intensivsten. Es zeichnen sich keine Tendenzen bezüglich des MP-Gehaltes in den unterschiedlichen Partikelgrößenfraktionen ab.

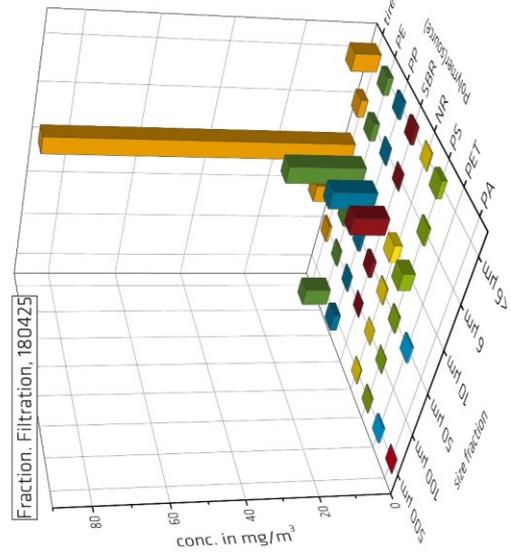
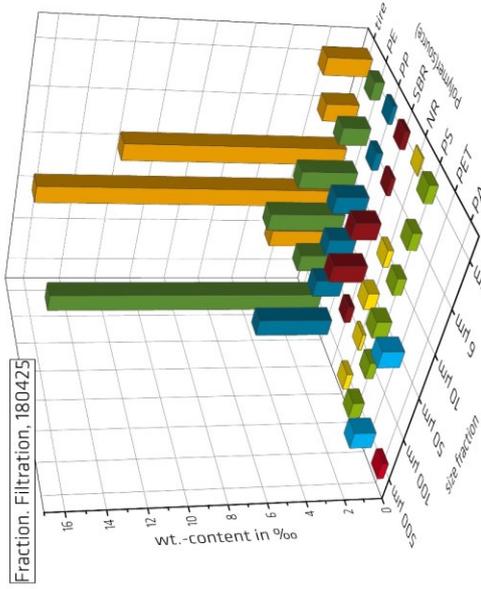
Eine Umrechnung der Gehalte auf das filtrierte Wasservolumen führt zu Werten von wenigen mg/m^3 bis ca. $30\text{--}40 \text{mg}/\text{m}^3$. Es zeichnen sich keine Tendenzen bezüglich des MP-Gehaltes in den unterschiedlichen Partikelgrößenfraktionen ab.

Zusätzlich wurden durch das UBA an zwei aufeinander folgenden Tagen Proben mit einer Durchflusszentrifuge genommen (Abbildung 78). Es konnten die Polymere PE, PP, SBR, NR, PS, PET und PA gefunden werden. Die detektierten Polymermengen sind an beiden Tagen in einem vergleichbaren Gehaltsbereich.

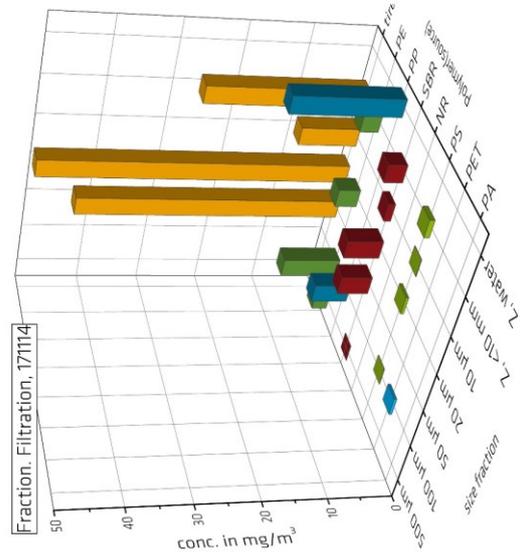
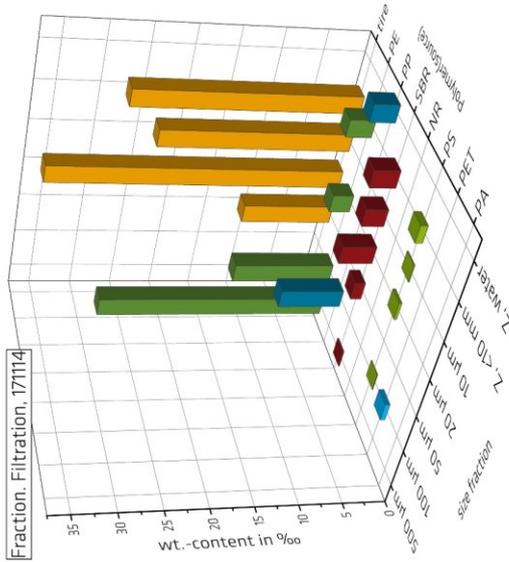
Die abfließende Wassermenge aus der Durchflusszentrifuge wurde am ersten Probenahmetag zusätzlich mittels fraktionierter Filtration beprobt. Der relative MP-Gehalt ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockenmasse) der Zentrifugen-Feststoffprobe war niedrig im Vergleich zum Gehalt der fraktionierten Zentrifugen-Eluatprobe (Abbildung 78 oben links und oben Mitte). Werden die Daten dagegen bezogen auf das gefilterte Wasservolumen ausgewertet, zeigen sich Gehalte von wenigen mg/m^3 im Eluat der Zentrifuge (Abbildung 78 unten links und unten Mitte).

Am zweiten Probenahmetag wurde parallel zur Probenahme mittels Durchflusszentrifuge eine fraktionierte Filtration durchgeführt. Die relativen Gehalte waren vergleichbar, jedoch zeigte sich, dass die absoluten MP-Gehalte bei der Probenahme mittels Durchflusszentrifuge nur bei ca. 30 % (im Vergleich zu den Ergebnissen der fraktionierten Filtration) lagen. Diese über alle Polymerarten sehr systematische Abweichung legt nahe, dass es sich hierbei um einen systematischen Fehler handelt.

2018-04-25 (neu TED-GC-MS)



2017-11-14 (alt TED-GC-MS)



2017-07-20 (alt TED-GC-MS)

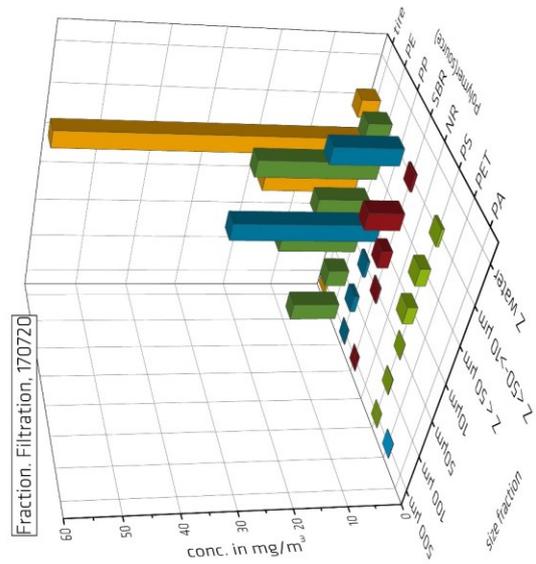
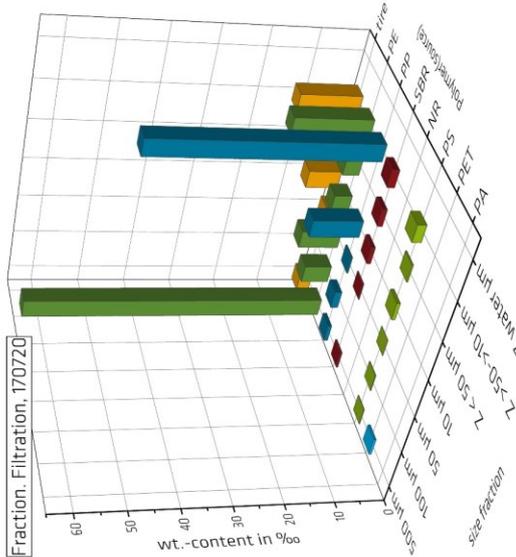


Abbildung 77: Zusammenfassung der Ergebnisse der TED-GC/MS-Messungen der Teltowkanal-Proben mittels fraktionierter Filtration

Außerdem wurden Proben des Teltowkanals durch das UBA mit Hilfe eines Sedimentationskastens genommen. Zum einen erfolgte die Probenahme mit einem Sedimentationskasten, der passiv durchströmt wurde, zum anderen wurde aktiv Wasser mittels Pumpen durchgeleitet. In diesen Proben konnte PE, PP, SBR, NR und PS detektiert werden. Beide Probenahme-Verfahren lieferten vergleichbare relative Polymergehalte ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockenmasse), siehe Abbildung 79.

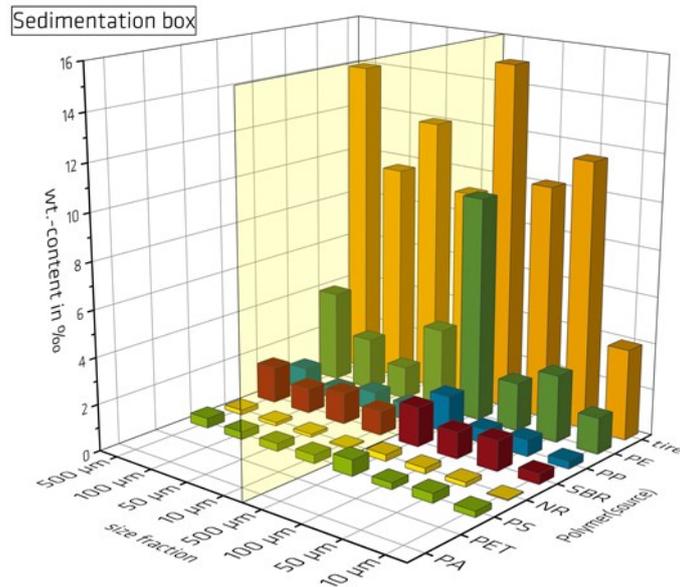


Abbildung 79: Zusammenfassung der Ergebnisse der TED-GC/MS-Messungen der Teltowkanal-Proben mittels Sedimentationskasten mit passiver Durchströmung (links) und aktiven Pumpen (rechts)

5.4.4 Fluss Parthe (UFZ)

Für den Fluss Parthe in Leipzig wurden Konzentrations-Abfluss-Beziehungen für Plastikpartikel in einem ländlich und einem urban geprägten Teileinzugsgebiet aufgestellt (Wagner et al. 2019). Die Konzentration von Plastikpartikeln ($>500 \mu\text{m}$ bis $>10 \text{ mm}$) nahm vom ländlich geprägten Probenahme-punkt P1 zum urban geprägten Punkt P2 um $0,8 \text{ mg}/\text{m}^3$ (Massenkonzentration) bzw. $79 \text{ n}/1000 \text{ m}^3$ (Anzahlkonzentration) zu. Diese Konzentrationszunahme war jedoch aufgrund einer hohen Variabilität nicht statistisch signifikant. Die Variabilität ist auf die hohe Dynamik von Plastikpartikeln in der Umwelt zurückzuführen, da bei Wiederfindungsversuchen eine hohe Präzision ermittelt wurde (73–100 %, PP und PS Partikel mit Größe $800 \mu\text{m}$ bis 3 mm). Bei beiden Probenahme-Punkten war die Häufigkeit großer Partikel geringer als die von kleinen Partikeln. Obwohl die kleinste Fraktion ($0,5\text{--}1 \text{ mm}$) ca. 50 % der Anzahlkonzentration ausmachte, stellte sie eine vernachlässigbar kleine Masse dar. Die Massenkonzentration wurde demzufolge von Partikeln $>1 \text{ mm}$ dominiert. Bei kleineren Fraktionen als den hier untersuchten könnte die Anzahlkonzentration weiter steigen aber die Massenkonzentration nicht wesentlich weiter zunehmen. Die Konzentrationen entsprachen in etwa den Konzentrationen anderer Flüsse ähnlicher Größe ($<10 \text{ m}^3/\text{s}$). Auffällig war neben PE und PP ein hohes Aufkommen von PS Partikeln, welche auf Emissionen aus dem Bausektor zurückgeführt wurden.

Im ländlich geprägten Raum nahm die Konzentration von Plastikpartikeln nicht mit zunehmendem Abfluss zu. Dies traf auch auf die abfiltrierbaren Feststoffe zu, welche keine Konzentrationsänderung mit steigendem Abfluss zeigten. Im städtischen Raum war die Zunahme der Plastikkonzentration mit dem Abfluss jedoch statistisch signifikant ($p = 0.00003$). Dies suggerierte eine präferentielle Mobilisierung und/oder Emission von Partikeln mit der Größe $0.5\text{--}5 \text{ mm}$ mit zunehmendem Abfluss. Das Verhältnis von Plastikpartikeln zu abfiltrierbaren Feststoffen war relativ konstant. Während hoher Abflussbedingungen trugen Mischwasserkanal-Entlastungen vermutlich zu einem Anstieg der Plastikkonzentration

bei. Diese Vermutung wurde durch den Nachweis von Koffein im Wasser bestätigt. Koffein wird in Kläranlagen üblicherweise gut abgebaut und kann das Einleiten von unbehandeltem Abwasser anzeigen. Da eine positive Konzentrations-Abfluss-Beziehung aufgestellt werden konnte, wurde abgeschätzt, dass 90 % der Plastikmengen während 20 % der Zeit in die Parthe eingetragen werden. Für das Jahr 2016 betrug die im untersuchten Einzugsgebiet exportierte Plastikmenge $3,0 \times 10^6$ n/Jahr bzw. $2,6 \times 10^4$ n/(km² Jahr) und 15 n/(Einwohner Jahr).

5.5 Befunde in Grund- und Trinkwasserproben (TZW)

Bei Grund- und Trinkwasserproben ist mit deutlich weniger Störstoffen im Vergleich zu Oberflächen-gewässern zu rechnen. Dies erleichtert die Probenahme und vor allem die spätere Probenaufbereitung und Analytik. Bei vereinzelt Proben zeigten sich Störstoffe wie Eisen- oder Manganausfällungen, kleinere Algenpartikel oder aquatische Biota (siehe Abbildung 80). Hinweise auf mögliche Störstoffe liefern bereits die Kenntnis der Rohwasserquelle sowie deren Beschaffenheit (Kalk-, Eisen- und Mangan-gehalt).

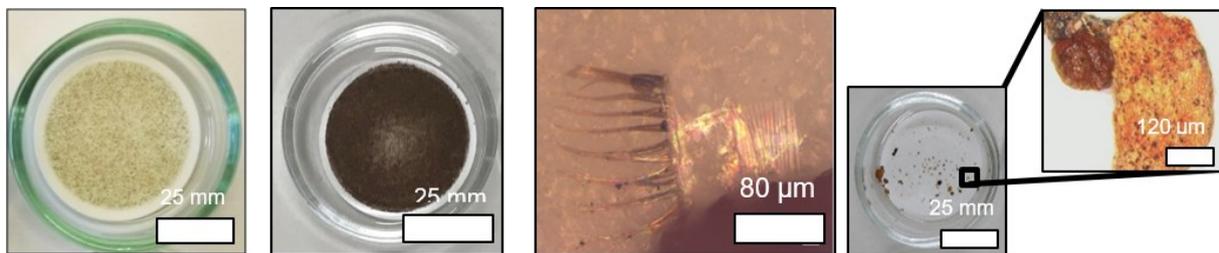


Abbildung 80: Im Rahmen der Trinkwasseruntersuchungen beobachtete Algen (links), Kohlenstoff (2. von links), Biota (Mitte) sowie Eisenausfällungen (rechts)

Die MP-Partikel-Konzentrationen in den untersuchten Trinkwässern lagen zwischen 70 und 2321 MP-Partikeln pro m³. Die am häufigsten detektierten Polymersorten waren PE und POM. Da POM Bestandteil der Filterkerze ist und zu nichtreproduzierbaren Blindwerten führt, muss POM von einer Bewertung ausgeschlossen werden. Weitere detektierte Polymersorten waren PP, PS, PVC, PET, PA und Trogamid. In Abbildung 81 sind die MP-Partikel-Konzentrationen der einzelnen Trinkwässer sowie der Mittelwert über alle Prozessblindwerte dargestellt. Als Bestimmungsgrenze wird der Mittelwert aller Prozessblindwerte zuzüglich der dreifachen Standardabweichung definiert. Trotz individueller Unterschiede zwischen den Probenahmestellen lagen alle untersuchten Trinkwässer unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die MP-Partikelkonzentration nach der Sandfiltration lag ebenfalls unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Die Partikelgrößenverteilung (siehe Abbildung 82) zeigt eine Zunahme in der Partikelhäufigkeit unterhalb von 50 µm Durchmesser, die meisten MP-Partikel hatten einen Durchmesser von < 20 µm. Dies ließ sich sowohl für die Proben als auch für die Blindwerte beobachten. Es ist zu erwarten, dass die Anzahl der MP-Partikeln nochmals deutlich zunimmt für Partikel kleiner 5 µm (Oßmann et al. 2018, Schymanski et al. 2018).

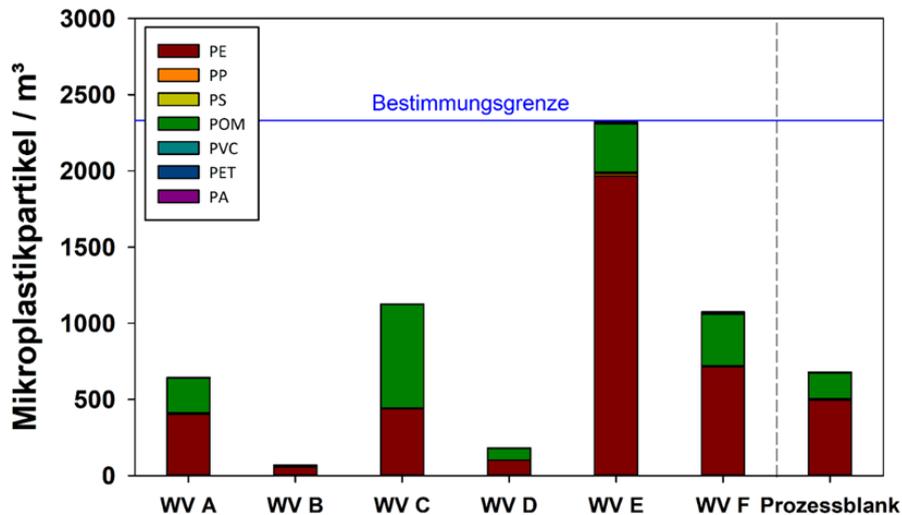


Abbildung 81: MP-Partikel-Konzentrationen der einzelnen Trinkwässer (optimierte Filterkaskade) sowie der Mittelwert über alle Prozessblindwerte (Prozessblank). Bestimmungsgrenze=Mittelwert aller Prozessblindwerte + dreifachen Standardabweichung

Insgesamt waren die gefundenen MP-Partikel-Konzentrationen in den Trinkwässern und Blindwerten sehr gering, insbesondere im Vergleich zu natürlich im Trinkwasser vorkommenden Partikeln. Diese liegen bei einer Anzahl zwischen 10^5 und 10^6 Partikel/ m^3 ($>5 \mu m$).

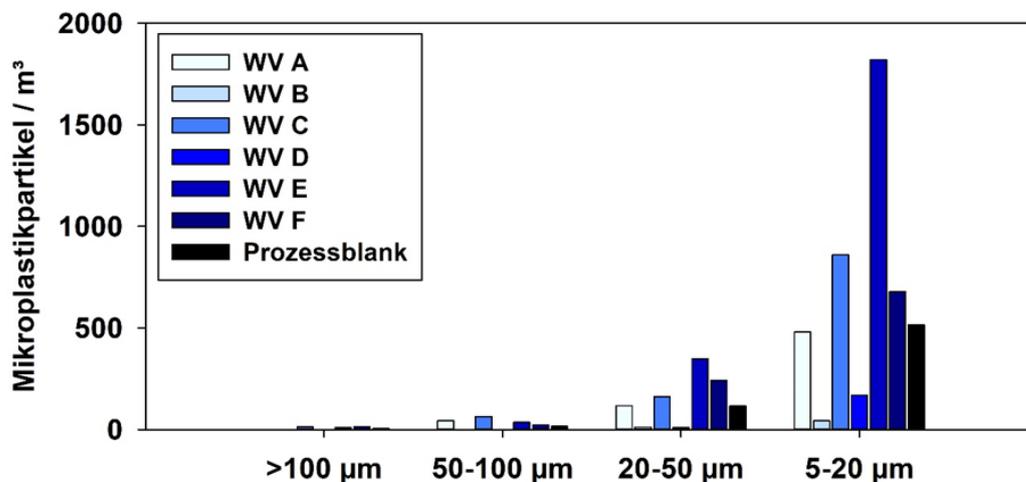


Abbildung 82: Partikelgrößenverteilung der in Trinkwasserproben gefundenen MP-Partikel inklusive Prozessblindwert-Mittelwert (schwarz)

6 Sorptionsuntersuchungen (HSF)

Es wurden Analysemethoden etabliert, um die Sorption der ausgewählten Modellsubstanzen (u. a. Galaxolid und Ethinylestradiol) untersuchen zu können. Die Methoden umfassen sowohl die Probenaufbereitung als auch die Analyse mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und/oder Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Mit diesen Methoden wurden für die Modellsubstanzen die Sorption an verschiedenen MP-Typen und auch Reifenmaterial bestimmt und Sorptionsisothermen mittels gängiger Modelle ausgewertet. Für die Analyse der Modellsubstanzen wurde eine Extraktion aus der wässrigen Phase mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion durch n-Hexan etabliert. Dabei wird die n-Hexanphase von der wässrigen Phase abgetrennt, zur Trockne abgeblasen und abhängig von der verwendeten Analysemethode (GC-MS oder LC-MS/MS) in (einem) passenden

Lösungsmittel(n) aufgenommen. Die Methode zeigt Wiederfindungen von 84,0–94,5 % kombiniert mit einer guten Reproduzierbarkeit (RSD 1,8 %, n=3). Zudem wurde gezeigt, dass diese Methode auch für Sorptionsexperimente eingesetzt werden kann, bei denen den Sorptionslösungen Huminstoffe zugesetzt werden. Zur Extraktion der sorbierten Analyte von den Polymerpartikeln wurde außerdem eine Methode mittels Lösen der Partikel in Tetrahydrofuran und Abtrennung der Polymer-Fraktion über Gelpermeationschromatographie (GPC) durchgeführt. Auch hier konnte für alle Analyten eine gute Wiederfindung (92,0–115,1 %) und Reproduzierbarkeit (RSD 3,3 %, n=3) bestätigt werden.

6.1.1 Ergebnisse der Sorptionsuntersuchungen

Die Untersuchung des Einflusses der Huminstoffe auf die Sorption von Galaxolid zeigte, dass die Huminstoffe einige Polymerpartikel maskieren und sich damit deren Sorptionseigenschaften signifikant verändern. Unterschiedliche Polymermaterialien, wie PVC, PMMA und Reifenabrieb waren nicht mehr signifikant unterscheidbar (Abbildung 83). PS und PC weisen dagegen andere Sorptionsmechanismen auf.

In weiteren Studien sollte gezeigt werden, inwiefern die Affinität der ausgewählten Schadstoffe sowie von in Realwässern vorkommenden organischen Spurenstoffen an die verschiedenen MP-Partikel sich zur Affinität an Sedimente unterscheidet. Da die Modellverbindung Galaxolid in einer Konkurrenzreaktion vollständig an die Sedimente sorbiert, ist in Gegenwart von Sedimenten eine signifikante Sorption an die Polymerphase im Moment nicht nachweisbar.

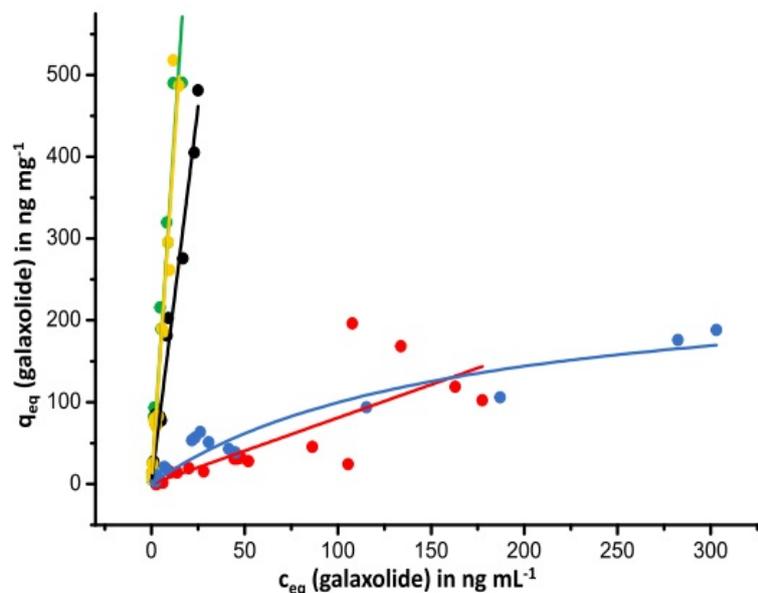


Abbildung 83: Sorptionsisothermen für Galaxolid in Gegenwart von Huminstoffen. Die unterschiedlichen Farben codieren die einzelnen Polymermaterialien: PS (rot), PC (blau), PMMA (grün), PVC (gelb) und Reifen (schwarz)

Weitere Sorptionsversuche wurden durchgeführt, um den Transport von anthropogenen Schadstoffen mittels Sorption und Desorption an MP im Vergleich zu natürlich vorkommenden Partikeln beurteilen zu können. Dazu wurde ein Mix aus den Spurenstoffen Atrazin, Phenanthren und Galaxolid für einen Tag bzw. sieben Tage mit einer simulierten Umweltmatrix inkubiert. Die verschiedenen simulierten Matrices setzten sich aus Mischungen aus Grundwasser, Boden, Huminstoffen und MP zusammen. Dabei zeigte Atrazin kein relevantes Sorptionsverhalten. Für Phenanthren und Galaxolid konnten Sorptionen bis zu 90 % festgestellt werden, allerdings unterschieden sich die Matrices Boden und Boden mit MP nicht signifikant voneinander (Abbildung 84).

Für die Projektpartner (UHEI, UTUE) wurden weiterhin verschiedene Messkampagnen für Thiacloprid, Benzo(k)fluoranthen und Methiocarb durchgeführt. Die Untersuchungen zum Einfluss von Biofilmen auf die Sorption konnten nicht nach Plan durchgeführt werden, da sich keine reproduzierbaren Biofilme unter Realbedingungen auf MP-Partikeln anzüchten ließen.

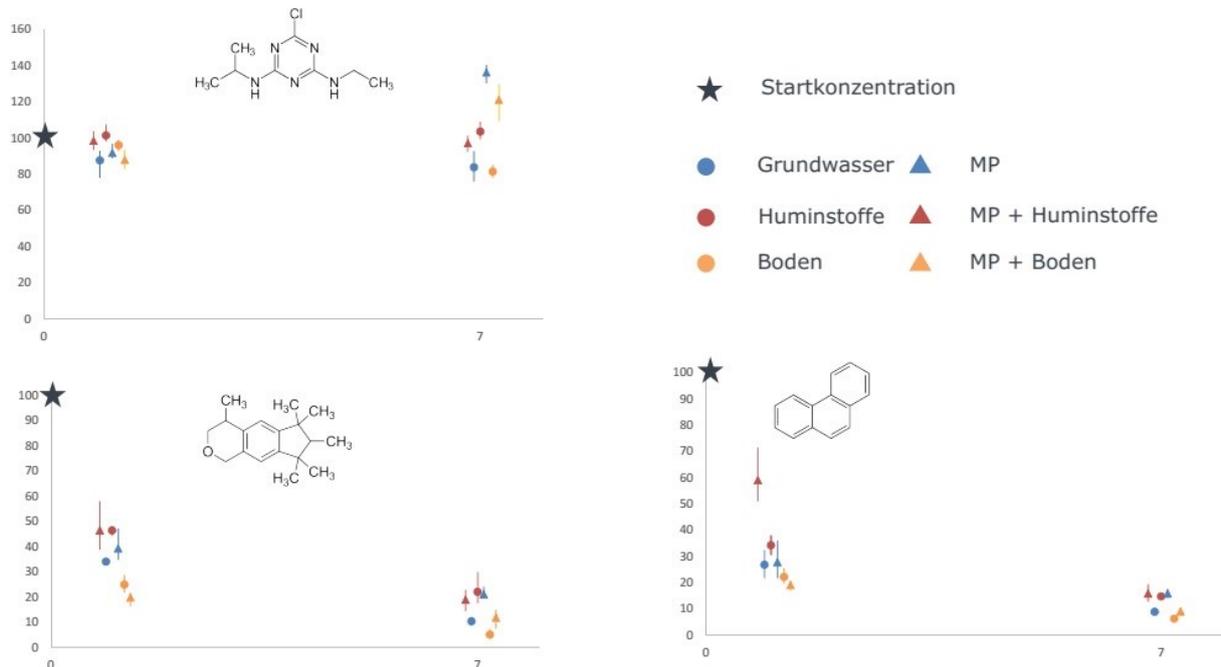


Abbildung 84: Sorptionsverhalten von Galaxolid, Atrazin und Phenanthren unter simulierten realitätsnahen Bedingungen. Die Konzentrationen der Substanzen in der wässrigen Phase wurde in als Dreifachbestimmung nach einem und sieben Tagen gemessen. Die einzelnen Farben zeigen die simulierten Bedingungen. Blau steht für Inkubation in Grundwasser, rot für Grundwasser mit Huminstoffen ($\beta = 2 \text{ mg/L}$), hellblau Boden (1 g). Die jeweiligen Bedingungen mit MP sind als Dreiecke dargestellt

Zusätzlich wurden Sorptionsexperimente unter Realbedingungen gestartet. Dazu wurde schadstoffbelastetes Wasser (Schwarzbach in Hessen) mit und ohne Sedimente mit verschiedenem MP inkubiert. Es wurde das Sorptionsverhalten von ca. 70 verschiedenen Substanzen untersucht. Es wurde während der Messkampagne nur eine sehr geringe Anzahl an relevanten Schadstoffen gefunden, was eine Auswertung im Hinblick auf das Sorptionsverhalten enorm erschwerte. Die Auswertung des Sorptionsverhaltens mit und ohne Sediment sowie exponiertem MP stehen noch aus.

6.1.2 Sorptionsverhalten

Mit den von TU Berlin zur Verfügung gestellten PS-Partikeln wurden verschiedene Sorptionsexperimente durchgeführt. Für Bromuconazol, Flutamid und Galaxolid wurden Sorptionsisothermen aufgezeichnet. Für jede Modellschubstanz wurden zehn unterschiedliche Konzentrationen zwischen 5–800 ng/mL (Galaxolid 5–400 ng/mL) in synthetischem Süßwasser (MilliQ-Wasser und Salze) angesetzt. Zu allen Versuchsansätzen, mit Ausnahme der Blindproben, wurden PS-Partikel zugegeben. Die Versuche wurden in einer Doppelbestimmung über einen Zeitraum von 30 Tagen durchgeführt. Eine Auswertung mit dem Langmuir-Model ergab die beste Korrelation mit den experimentellen Ergebnissen. Die Extraktion der PS-Partikel bestätigte eine gute Übereinstimmung zwischen der Sorptionsbestimmung über die wässrige Phase und der Konzentration an den PS-Partikeln selbst. Um den Einfluss von Huminsäuren auf die Sorption der Modellschubstanz an die PS-Partikel zu untersuchen, wurden die Experimente unter Zugabe von 2 mg/L Huminsäuren zum synthetischen Süßwasser wiederholt. Hier zeigte sich ein verändertes Sorptionsverhalten der organischen Schadstoffe an die PS-Partikel, was zum einen auf die Belegung der Polymeroberfläche als auch auf die löslichkeitsvermittelnde Wirkung der Huminsäuren zurückzuführen ist.

6.1.3 Wirkungen von organischen Kontaminanten mit MP (Organismenebene)

Unterschiedliche Testorganismen (Bachforellen (Embryonen und adulte Tiere), Paradiesschnecke, Zuckmückenlarven, Daphnien, Zebraäbrlinge) werden eingesetzt, um eventuelle ökotoxische Effekte zu überprüfen. Bislang konnten keine Verhaltensänderungen oder adverse Effekte durch MP-Partikel beobachtet werden.

Auch konnten keine adversen Effekte durch MP in Gegenwart gelöst vorliegender Schadstoffe beobachtet werden. Die Sorption von unpolaren Schadstoffen an MP scheint eher die Schadstofffracht in der wässrigen Phase zu verringern, allerdings muss noch das Desorptionsverhalten der Schadstoffe innerhalb des gastrointestinalen Trakts der Versuchstiere untersucht werden. Diese Vermutung wurde dadurch unterstützt, dass gezeigt werden konnte, dass fluoreszierende Substanzen von Modellpartikeln auch außerhalb von Testorganismen eluieren können, so dass Fluoreszenz keine zuverlässige Ortung von Partikeln erlaubt. Für die humantoxikologische Bewertung wurden Zellkulturen etabliert und zunächst mit nano-skaligen Partikeln beaufschlagt. Dabei konnten Entzündungsreaktionen, die für die natürliche Zellregulation wichtig sind und vermutlich auch bei anderen Partikeln auftreten, beobachtet werden.

6.1.4 Planung Realproben (HSF und UHEI)

Als Ziel der Untersuchung sollte die Relevanz von MP als Vektor für Schadstoffe zu bewertet werden. Dazu wurde untersucht, inwiefern sich MP-Partikel in einem schadstoffbelasteten Oberflächengewässer im Vergleich zu natürlichen Schwebstoffen hinsichtlich der Sorption und Desorption von anthropogenen Schadstoffen verhalten. Es wurde eine Target-Analytik auf ca. 90 bekannte organische Spurenstoffe durchgeführt. Deren Vorkommen wurde sowohl in der wässrigen Phase als auch in den partikulären Phasen (ausgebrachtes MP und gesammelte Schwebstoffe) quantifiziert. Ein Teil der gesammelten partikulären Phasen wurde in schadstoffreies Wasser gegeben und die Desorption über 14 Tage beobachtet. Dadurch sollen Aussagen (bzw. eine Bewertung) hinsichtlich des Transportpotenzials von MP im Vergleich zu natürlich vorkommenden Partikeln möglich werden.

Zeitgleich wurden für alle drei Kompartimente (Schwebstoffe, MP-Partikel und Wasser) toxikologische Untersuchungen durchgeführt, inwieweit sich die natürlichen Partikel in ihren toxikologischen Effekten von MP-Partikel oder den frei verfügbaren Schadstoffen (gelöst) unterscheiden und mögliche Effekte auf die Vertebraten-Fauna im Schwarzbach auswirken können. Die im Untersuchungsgewässer auftretenden anthropogenen Schadstoffe legen Untersuchungen hinsichtlich akuter Toxikologie (Fischembryotest, Acetylcholinesterase Hemmung, Ethoxyresorufin-O-deethylase Induktion) und Beeinflussung des Verhaltens (Lichtzyklus-Test) nahe. Alle Versuche werden mit tierversuchsfreien Embryonalstadien des Zebraäbrlings (*Danio rerio*) durchgeführt und sollen die mögliche Vektorwirkung von MP in einem realen Gewässer besser abbilden.

7 Biologische Wirkung

7.1 Untersuchte Fragestellungen

7.1.1 Goethe Universität

Im Rahmen des MiWa-Projektes untersuchte die Goethe-Universität im Teilprojekt B3 die Exposition und Toxizität von MP in aquatischen Invertebraten. Hierbei wurde – im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten – hauptsächlich selbst hergestelltes, irreguläres MP verwendet, das dem in der Umwelt gefundenen MP ähnlicher ist.

Im Arbeitspaket B3.1 wurde der Gewebetransfer von MP untersucht und folgende Hypothese getestet: Sehr kleines MP ($< 10 \mu\text{m}$) passiert Epithelien und kann in das Gewebe aquatischer Invertebraten übergehen. Hierzu wurden umfangreiche Studien mit dem Großen Wasserfloh *Daphnia magna* durchgeführt, in denen Partikel verschiedener Größen nach Exposition mittels Laserscan-Mikroskopie lokalisiert wurden. Zusätzliche Experimente mit Passivsammlern dienten dazu, das Phänomen des Auslaugens des Fluoreszenzfarbstoffes, der üblicherweise zur Markierung von MP verwendet wird, zu untersuchen.

Im Arbeitspaket B3.2 wurde untersucht, ob eine MP-Exposition zu Inflammation und Stressreaktion führt. Die betrachtete Hypothese lautete: Eine Exposition gegenüber MP induziert Entzündungs- und Stressreaktionen in aquatischen Invertebraten. Hierzu wurden Transkriptom-Untersuchungen mit der Süßwasserschnecke *Radix balthica* durchgeführt, die gegenüber irregulärem MP und natürlichen Referenzpartikeln exponiert wurde. Da sich die RNA-Sequenzierung aufgrund technischer Schwierigkeiten verzögerte, wurden zusätzliche Experimente mit *D. magna* durchgeführt, um populationsrelevante Effekte von MP und natürlichen Referenzpartikeln zu charakterisieren.

Im Arbeitspaket B3.3 sollten die Effekte von gealtertem MP untersucht werden. Hierbei sollte durch oxidative Verfahren (Ozon, UV) bei der Wasseraufbereitung gealtertes MP verwendet werden. Diese Arbeiten konnten nicht durchgeführt werden, da kein geeignetes Testmaterial zur Verfügung stand. Stattdessen wurden umfangreiche Studien zur generationsübergreifenden Toxizität von MP durchgeführt (siehe unten).

Im Arbeitspaket B3.4 wurde die gemeinsame Toxizität von Mikroschadstoffen und MP untersucht. Die getestete Hypothese lautete: Die chronische Toxizität von schadstoffbelastetem MP ist höher als die von reinem MP. Hierzu wurden zwei Multigenerationsstudien durchgeführt, in denen *D. magna* über vier Generationen hinweg gegenüber MP, natürlichen Referenzpartikeln und in Abwasser inkubiertem MP exponiert wurden.

7.1.2 Gewebetransfer

In der Literatur herrscht eine semantische Unschärfe hinsichtlich der Aufnahme und dem Übertritt von MP-Partikeln in Organismen und Geweben. Biologisch betrachtet ist die Ingestion und die sich daraus ergebende Präsenz von MP im Verdauungstrakt keine Aufnahme in den Körper, da keine Epithelien überwunden werden und die Partikel somit außerhalb des Körpers verbleiben. Ein potentieller Übertritt von Partikeln in Organe und Gewebe (Gewebetransfer) hat toxikologische Relevanz, da er zu einer internen Exposition führen kann, die wiederum mechanische Verletzungen und Entzündungsprozesse bewirken und möglicherweise assoziierte Schadstoffe im Organismus freisetzen könnte.

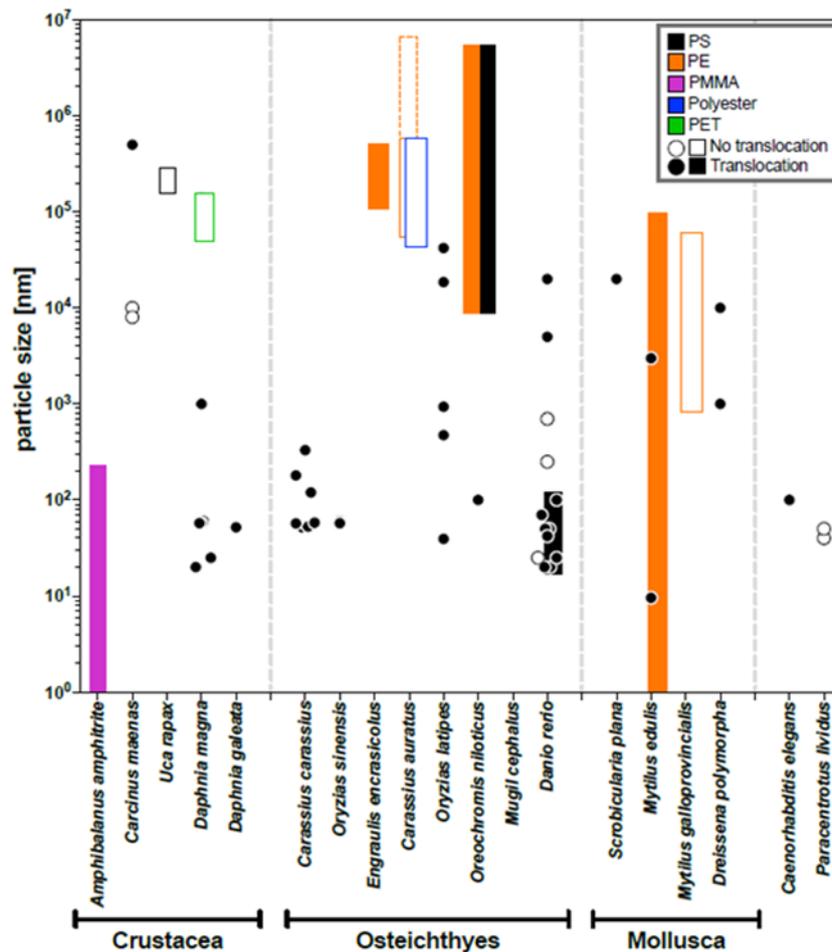


Abbildung 85: Literaturdaten zum Gewebetrasfer von MP (Triebskorn et al. 2019)

Um einen Überblick über den aktuellen Wissenstand zu gewinnen, rezensierten wir in Triebskorn et al. (2019) 31 Studien, in denen Gewebetrasfer in aquatischen Invertebraten und Fischen untersucht wurde. Von den 62 dabei untersuchten Materialien und Größenfraktionen wurde ein Gewebetrasfer in 49 Fällen berichtet (Abbildung 85). Hierbei wurden vor allem Polystyrol-MP $\leq 1 \mu\text{m}$ verwendet und Fische, Krebstiere und Muscheln untersucht. Eine Schlüsselstudie zum Gewebetrasfer ist die von (Rosenkranz et al. 2009). Hierin wird für Polystyrol-MP die Aufnahme und Translokation in Fettspeichergewebe im großen Wasserfloh *Daphnia magna* beschrieben. Für die Befunde gibt es jedoch – zumindest für das verwendete $1 \mu\text{m}$ große MP – keine biologisch plausible Erklärung, da Daphnien über morphologische Anpassungen (peritrophische Membran) verfügen, die den Übertritt von Partikeln $> 0,3 \mu\text{m}$ verhindern. Deshalb wurde als Teil des Arbeitspakets B3.1 versucht, diese Studie zu replizieren, um Erkenntnisse über mögliche Mechanismen zu erlangen.

7.1.2.1 Methodischer Ansatz und Ergebnisse

Die Untersuchung erfolgte in vier Schritten: Ein erster Replikationsversuch unter zur Originalstudie identischen Bedingungen (Details in Schür et al. (2019)) bestätigte die Befunde nicht, da keinerlei Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte. Darauf folgte ein Replikationsversuch unter identischen Bedingungen zur Originalstudie mit verbesserter Sichtbarkeit innerhalb der Proben (Verwendung der Methode nach Ke et al. (2013)). Trotz verbesserter Sichtbarkeit innerhalb der fixierten Organismen konnten die Befunde nicht wiederholt werden. Der dritte Versuch war ein analoger Versuchsansatz mit 1000× höherer Partikelkonzentration. Daraufhin konnte Fluoreszenz sowohl im Verdauungstrakt als auch in den Fettspeichergeweben beobachtet werden (Abbildung 86). Sie erschien allerdings partikel-

unabhängig zu sein. Daraus erwuchs die Hypothese, dass der Fluoreszenzfarbstoff sich unter Versuchsbedingungen vom MP löst und nur der lipophile Farbstoff sich in den Fettspeichern akkumuliert. Um diese Hypothese zu prüfen und um zu untersuchen, ob die Trennung von Partikel und Farbstoff durch Bedingungen im Darm des Wasserfloh hervorgerufen wird, wurde ein Silikon-Streifen als Passivsammler in einer Partikel-Suspension exponiert. Nach 24 h zeigte sich deutliche Fluoreszenz im Partikel-exponierten Material, nicht aber im Kontrollstreifen (Abbildung 87).

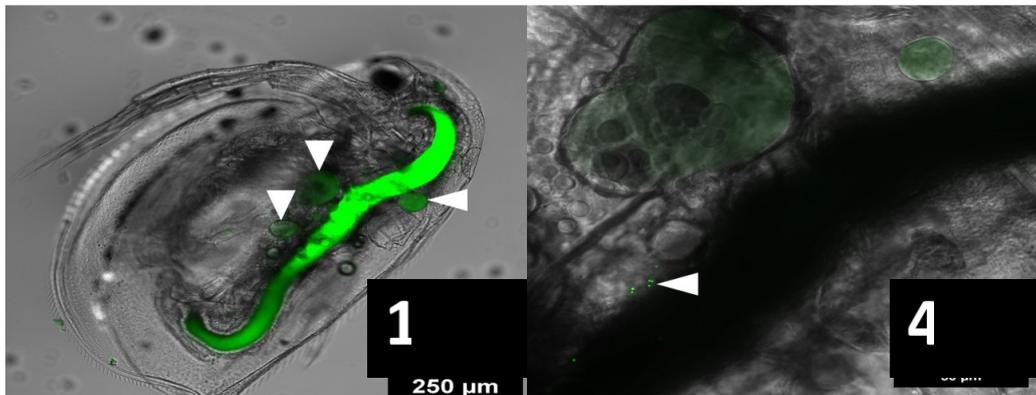


Abbildung 86: Mikroskopische Aufnahmen einer Daphnie nach Exposition gegenüber fluoreszenz-markiertem MP bei zwei Vergrößerungen (10x, links und 40x, rechts) (Schür et al. 2019)

7.1.2.2 Diskussion

Aus den durchgeführten Experimenten kann geschlossen werden, dass kommerziell erhältliche fluoreszierende Partikel zu mikroskopischen Artefakten führen können, wenn der Farbstoff nicht kovalent an den Kunststoff gebunden ist. Fluoreszenz ist die bevorzugte Methode zur Visualisierung von MP (Triebskorn et al. 2019), sollte aber nicht die einzige Methode zur Untersuchung des Gewebetransfers sein. Zusätzlich sollte sichergestellt werden, dass tatsächlich die Partikel übergetreten sind und nicht nur der Farbstoff. Ähnliche Erkenntnisse wurden kürzlich von Catarino et al. (2019) veröffentlicht, die den Fluoreszenzfarbstoff durch Dialyse von den Partikeln abgetrennt haben, bevor sie zur Exposition von Fischlarven verwendet wurden. Ohne Dialyse zeigte sich Fluoreszenz im Dottersack der Larven, nach der Dialyse nicht, was ebenfalls auf eine Akkumulation des Farbstoffes anstatt der Partikel selbst hindeutet. Diese Erkenntnisse haben weitreichende Implikationen für die MP-Forschung, da nach wie vor die Nutzung von kommerziellen, fluoreszenzmarkierten Partikeln weit verbreitet ist, ohne dass adäquate Kontrollen benutzt werden. Entsprechend sollten die Erkenntnisse diverser Studien im Licht der MiWa-Befunde neu evaluiert werden.

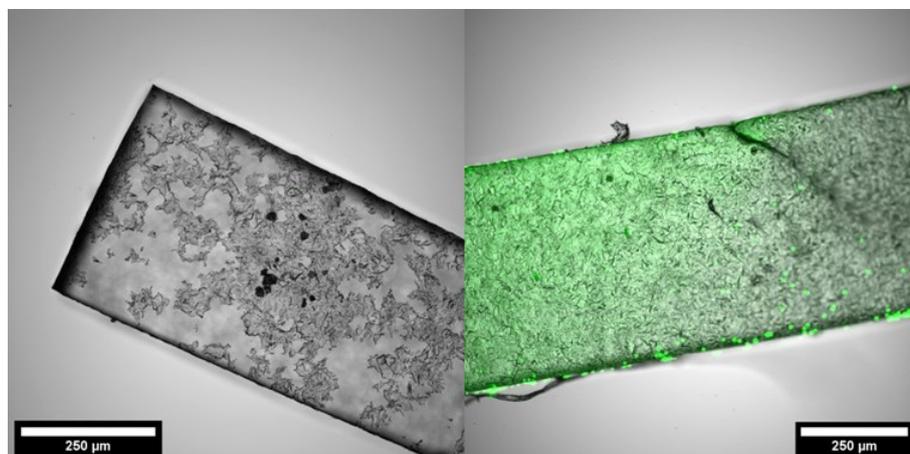


Abbildung 87: Mikroskopische Aufnahmen von Silikonstreifen, die als Passivsammler genutzt wurden. Links: Kontrollstreifen, Inkubation über 24 h in Ultrareinstwasser. Rechts: Streifen exponiert über 24 h in einer Suspension von fluoreszenzmarkierten MP (Schür et al. 2019)

7.1.3 Universität Heidelberg

Im Rahmen des MiWa-Verbundprojektes wurde an der Universität Heidelberg im Teilprojekt B4 die Bioverfügbarkeit, Aufnahme und Bioakkumulation von MP-Partikeln und MP-assoziierten Schadstoffen sowie deren Transfer in einfachen experimentellen limnischen Nahrungsketten untersucht. Um potentiell adverse Effekte eindeutig zuordnen zu können, wurden in verschiedenen Arbeitspaketen relevante Teilaspekte wie die toxischen Wirkungen von nativen MP-Partikeln untersucht und neue Methoden zu Nachweis und Quantifizierung des Transfers von Schadstoffen auf MP-Partikel und aquatische Organismen entwickelt. Darüber hinaus wurden Langzeitversuche zum partikelassoziierten Schadstofftransfer durchgeführt und die potenzielle Aufnahme von MP-Partikeln in Zellkulturen eingehend untersucht.

Als Untersuchungsmodelle dienten ausgewählte Vertreter des limnischen Zooplanktons (*Daphnia magna*, *Chironomus riparius*) und der Zebraquärling (*Danio rerio*) als Endkonsument. Bislang lassen sich nicht alle Versuchsansätze auf tierversuchsfreie Stadien des Zebraquärling (< 120 h) herunterskalieren, daher wurden neben embryonalen Entwicklungsstadien auch adulte Zebraquärlinge eingesetzt. Alle Versuche mit adulten Fischen wurden vom zuständigen Regierungspräsidium Karlsruhe unter AZ 35-9185.81/G-122/15 genehmigt.

Die Auswahl der Modellschadstoffe wurde in Absprache mit dem TP A3 (Hochschule Fresenius, Idstein) auf der Basis ihrer Lipophilie (Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient $\log K_{ow}$) und der damit einhergehenden Affinität zu MP-Partikel getroffen. Weitere Kriterien für die Auswahl waren die Umweltrelevanz der Substanzen sowie die Möglichkeit, spezifische biologische Effekte und Wirkmechanismen unter anderem optisch via Fluoreszenzmikroskopie detektieren zu können, um unter anderem den partikelassoziierten Schadstofftransfer nachzuvollziehen.

Folgende Schadstoffe wurden als Testsubstanzen ausgewählt: Aufgrund der planaren Struktur und einem $\log K_{ow}$ von 6,11 ist der polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff Benz(k)fluoranthren (BkF) ein geeigneter Induktor für das Biotransformationsenzym CYP1A im EROD-Assay (*in vivo* und *in vitro*), sowohl in Embryonen als auch adulten Zebraquärlingen (*Danio rerio* (Whyte et al. 2000)). Zusätzlich ist BkF via Fluoreszenzanregung bei 405 nm mikroskopisch nachweisbar (Rivera-Figueroa et al. 2004). Durch Vorarbeiten von Batel et al. (2016) und Batel et al. (2018) im Rahmen des JPI Oceans Projekt EPHEMARE (Ecotoxicological Effects of Microplastics in Marine Ecosystems) konnte bereits mit der Modellschadstoff Benz(a)pyren ein Methodenspektrum für PAKs und MP an der Universität Heidelberg etabliert werden.

Das Estrogen 17 α -Ethinylestradiol (EE2) ist ein synthetisches Derivat des natürlichen vorkommenden 17 β -Estradiol mit verstärkter östrogenen Wirkung und tritt aufgrund der weiten Verwendung in der Antibabypille ubiquitär in Gewässern auf ($\log K_{ow}$ 3,67). Der Einfluss auf die Geschlechtsentwicklung im Zebraquärling ist bereits eingehend untersucht (Andersen et al. 2003, Larsen et al. 2008, Örn et al. 2003). Als erweiterter biologischer Endpunkt wurde daher im weiteren Verlauf die Induktion von Vitellogenin in adulten Zebraquärlingen mittels ELISA nach Holbech et al. (2001) untersucht.

Zusätzlich wurden die Insektizide Cypermethrin und Chlorpyrifos (CPF) ausgewählt. Cypermethrin ist ein Typ II-Pyrethroid mit α -Cyano-Gruppe; der $\log K_{ow}$ beträgt 6,6. Eine gute Adsorption an MP-Partikel ist auf Grund der physikalisch-chemischen Eigenschaften gewährleistet.

Chlorpyrifos ist ebenfalls ein Pflanzenschutzmittel (Thiophosphorsäureester, $\log K_{ow}$ 5,3) mit bekanntem Wirkmechanismus. Die irreversible, dosisabhängige Hemmung der AChE-Aktivität erfolgt durch die Inaktivierung des Enzyms Acetylcholinesterase an der post-synaptischen Membran und führt zu einer Überstimulation des peripheren Nervensystems (Barron and Woodburn 1995). Der biologische

Endpunkt für beide Insektizide ist die Messung der Änderung der Acetylcholinesterase-Aktivität (Kais et al. 2015, Stengel et al. 2017).

Die Auswahl und Bereitstellung der MP-Partikel in den benötigten Korngrößen erfolgten durch den Partner TU Berlin. Erste Versuche, die MP-Partikel homogen in Wasser zu dispergieren, um sie sowohl für die Fischembryotests als auch für die Nahrungsnetzmodelle einsetzen zu können, zeigten, dass sich insbesondere Polymethylmethacrylat (PMMA, \varnothing 48 μm , Dichte 1.19 g/cm^3) und Polystyrol (PS \leq 50 μm , Dichte 1.19 g/cm^3) gut in der Wassersäule verteilen und nur geringfügig sedimentieren. Somit war eine Verfügbarkeit sowohl für den Zebraquarienfisch als auch für frei in der Wassersäule schwimmende Wirbellose wie Nauplien von *Artemia spec.* und Wasserflöhe (*Daphnia magna*) gewährleistet. Beide Kunststoffarten, PMMA und PS, sind chemisch stabiler als beispielweise Polyamid. Darüber hinaus ist mit Polystyrol die größte Gruppe an Plastikpartikeln in der Umwelt (Verpackungsmaterial) vertreten. PMMA wird überwiegend in der Automobilindustrie eingesetzt und tritt ebenfalls vermehrt in der Umwelt auf. Des Weiteren bieten diese teilweise kryogen vermahlene Partikel unterschiedliche Oberflächenstrukturen (Abbildung 88).

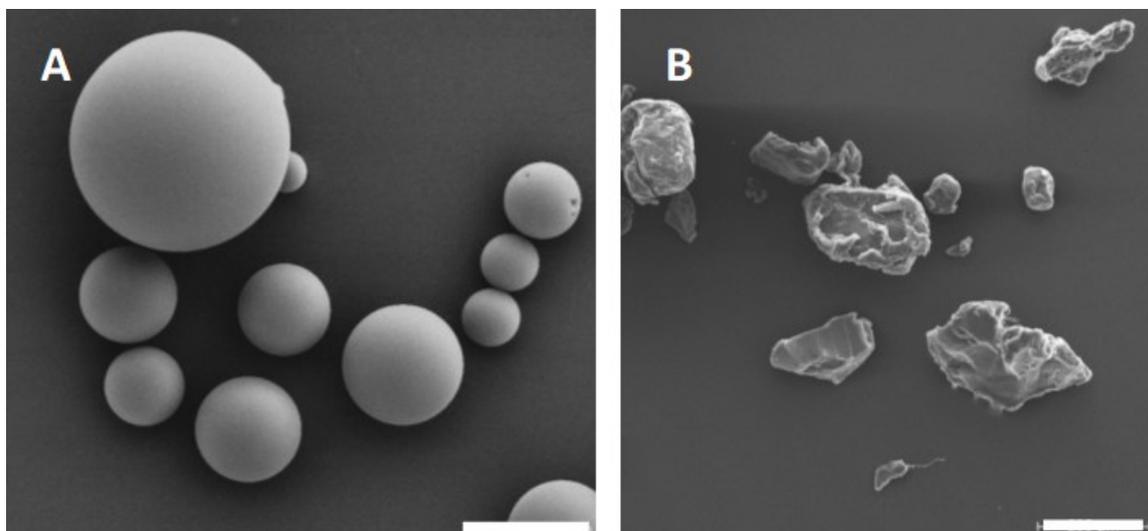


Abbildung 88: A) Polymethylmethacrylat (PMMA), Maßstab 50 μm ; B) Polystyrol (PS)-MP, Maßstab 200 μm ; Aufnahmen mit Genehmigung der TU Berlin

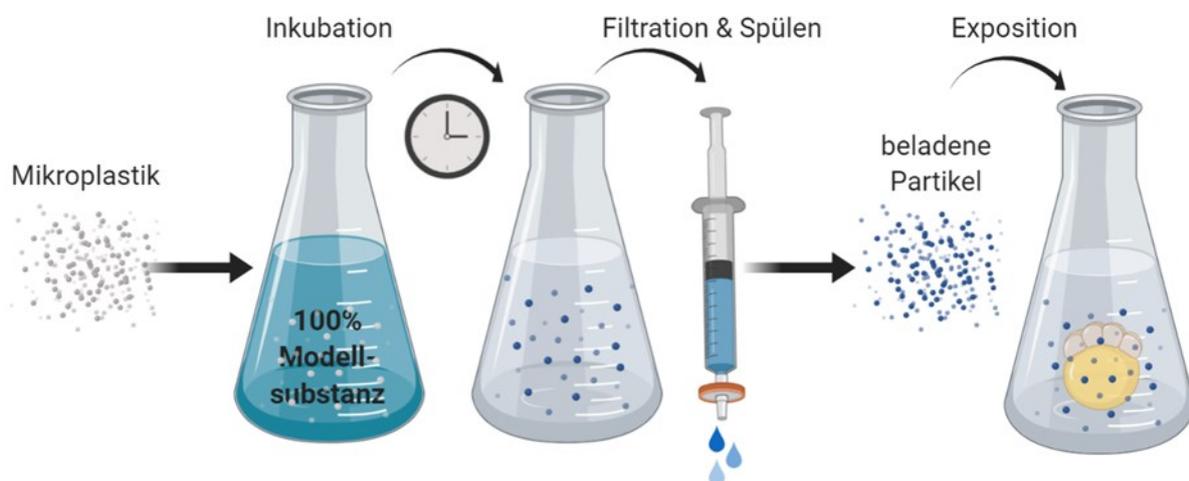


Abbildung 89: Beladen von MP-Partikeln mit Modellsubstanzen: Inkubation des MP erfolgt auf einem Schüttler über Nacht in gelöster Modellsubstanz. Anschließend wird das MP über einen Spritzenfilter (Maschenweite 0,22 μm) filtriert, mehrfach mit destilliertem Wasser gespült und in Kunstwasser (nach OECD TG 236) eluiert. Abschließend erfolgt die Exposition des Organismus (hier Zebraquarienfische) gegenüber dem Eluat

Für die Versuche im Teilprojekt B4 wurde daher mit PMMA (nativ und kryogen vermahlen) und kryogen vermahlenem PS_{≤50} µm sowie den 4 verschiedenen Modellsubstanzen gearbeitet. Für beide MP-Sorten wurde eine definierte Partikelkonzentration von 1x10⁶ Partikel/Liter festgelegt. Das Beladen der MP-Partikel mit den entsprechenden Modellsubstanzen ist in Abbildung 89 schematisch dargestellt.

7.1.4 Eberhard-Karls-Universität Tübingen

An der Eberhard-Karls-Universität Tübingen wurde im Teilprojekt B2 die Fragestellung untersucht, ob MP-Partikel alleine oder in Kombination mit ausgewählten organischen Schadstoffen Effekte bei Testorganismen unterschiedlicher Tiergruppen und Entwicklungsstadien hervorrufen. Dazu wurden in vier Arbeitspaketen folgende Aspekte untersucht: In Arbeitspaket 1 wurde die Hypothese überprüft, ob sich unterschiedliche MP-Partikel negativ auf die Embryonalentwicklung der Paradiesschnecke (*Marisa cornuarietis*) und der Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*) auswirken. Um festzustellen, ob MP-Partikel durch das Chorion in das Ei gelangen können, wurden REM-Aufnahmen der Eioberflächen erstellt. In Arbeitspaket 2 wurde die Fragestellung untersucht, ob MP zu vermehrtem oxidativem Stress bei Tieren führt. Hierfür wurden bei Forellenlarven nach Exposition gegenüber PS-Partikeln die Lipidperoxidgehalte (LPO) mittels FOX-Assay und das Stoffwechsellenzym Superoxiddismutase (SOD) gemessen.

In Arbeitspaket 3 wurden Chironomidenlarven (*Chironomus riparius*), adulte Paradiesschnecken und juvenile Bachforellen gegenüber PS-Partikeln und den Pestiziden Thiacloprid, Cypermethrin, Methiocarb sowie dem Antidepressivum Amitriptylin exponiert. Nachfolgend wurde der Gesundheitszustand der Tiere mittels histopathologischer Untersuchungen der Stoffwechselorgane, Stressproteinnachweis (Hsp70), Nachweis von Neurotoxizität (Aktivität der Acetylcholinesterase (AChE) und zweier protektiv wirkenden Carboxylesterasen (CbE)) und von oxidativem Stress (Aktivität der SOD und LPO Gehalt) überprüft. Zusätzlich wurde das Verhalten von Paradiesschnecken und Bachforellen beobachtet. Durch diese Untersuchungen sollte die Hypothese überprüft werden, ob - und in welcher Weise - MP in Kombination mit organischen Schadstoffen die Toxizität der Chemikalien modulieren kann.

In Arbeitspaket 4 wurden Stressantworten für komplexe Umweltproben untersucht. Hierfür wurden Halenseesediment (zur Verfügung gestellt vom Projektpartner UFZ) und eine daraus dichteseparierete Fraktion auf akute Toxizität für Zuckmückenlarven getestet.

7.2 Effekte von Mikroplastik als alleiniger Stressor auf aquatische Organismen

7.2.1 Transkriptom-Studie mit *Radix balthica* (PS vs. Kaolin) (GU)

Die Untersuchung von Genexpression ist mittlerweile auch in der Ökotoxikologie ein vielfach angewandtes Mittel zur Identifizierung von Effekten und den ihnen zugrundeliegenden Mechanismen (Brinke and Buchinger 2016). Der breite Zugang und die relativ geringen Kosten des next generation sequencing (NGS) ermöglichen auch eine Anwendung in der MP-Forschung (Détrée and Gallardo-Escárate 2017, LeMoine et al. 2018). Die Untersuchung der Transkriptomebene kann dabei helfen, die Wirkmechanismen von MP zu identifizieren.

Ein Arbeitspaket unseres Teilprojekts zielte daher auf die Untersuchung von MP-induzierten Genexpressionsänderungen ab. Zu diesem Zweck wurden Individuen der gemeinen Schlammschnecke (*Radix balthica*) über sieben Tage gegenüber zwei MP-Konzentrationen (100 und 50.000 Polystyrolpartikel mL⁻¹) und Kaolin (50.000 Partikel mL⁻¹) als natürlichem Referenzpartikel exponiert. Anschließend wurde RNA aus der Mitteldarmdrüse der Tiere isoliert und per Illumina-Technologie sequenziert. Es folgte ein *de novo* Assembly des Transkriptoms von je sechs Tieren pro Behandlungsgruppe. Zentrale Vergleiche in der Genexpression wurden zwischen den Partikelbehandlungen und der partikelfreien Kontrollgruppe (C), der MP-Behandlungsgruppe mit hoher Konzentration (MH) und der natürlichen Partikelkontrolle bei gleicher Konzentration (N) gezogen.

In allen Behandlungsgruppen wurden mindestens 15 Contigs signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe exprimiert (Tabelle 26). Zwischen der hohen MP-Konzentration und der Kontrolle unterscheiden sich 15 Transkripte, zwischen der niedrigen MP-Konzentration und der Kontrolle 50. Die Behandlungsgruppe mit natürlichen Partikeln zeigte ebenfalls signifikant unterschiedliche Genexpression in 153 Fällen, von denen 86 % hochreguliert wurden.

Abbildung 90 visualisiert Überschneidungen in den jeweiligen Transkriptionsänderungen: In allen drei Partikel-Behandlungen wurden 5 überschneidende Transkripte signifikant verändert exprimiert. Die Hälfte der Transkripte, die in ML und MH verändert waren, wurde ebenfalls in der natürlichen Partikelbehandlung (N) reguliert. Das legt nahe, dass die Genexpressionsänderungen hauptsächlich durch die physische Präsenz von Partikeln selbst induziert wurden und unabhängig von materialspezifischen Eigenschaften (z. B. chemische Zusammensetzung) sind. Eine derzeit laufende Analyse von gene ontology-Termen wird weiterführende Informationen zur Funktionalität der differenziell exprimierten Gene liefern. Diese Herangehensweise ermöglicht das Ableiten von Effektmechanismen, die sich in Transkriptom-Änderungen manifestieren (Abbildung 91).

Tabelle 26: Anzahl der signifikant unterschiedlich regulierten Transkripte in verschiedenen Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Behandlungen umfassten eine niedrige (100 mL^{-1}) sowie, eine hohe MP-Konzentration (50.000 mL^{-1}) und eine natürliche Partikelkontrolle (50.000 mL^{-1})

Vergleich	signifikant hochreguliert	signifikant herabreguliert	Gesamtzahl
Natürliche Partikel gegen Kontrolle	21	132	153
Hohe MP-Konzentration gegen Kontrolle	9	6	15
Niedrige MP-Konzentration gegen Kontrolle	9	41	50
Hohe gegen niedrige MP-Konzentration	46	9	55
Hohe MP-Konzentration gegen natürliche Partikel	127	23	150

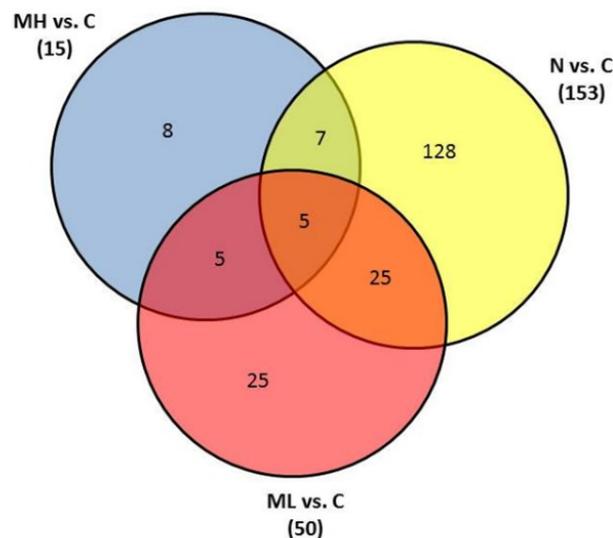


Abbildung 90: Venndiagramm zu den differenziell regulierten Transkripten von Partikel-exponierten (MH – hohe MP-Konzentration, ML niedrige MP-Konzentration, N natürlicher Partikel) Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (C)

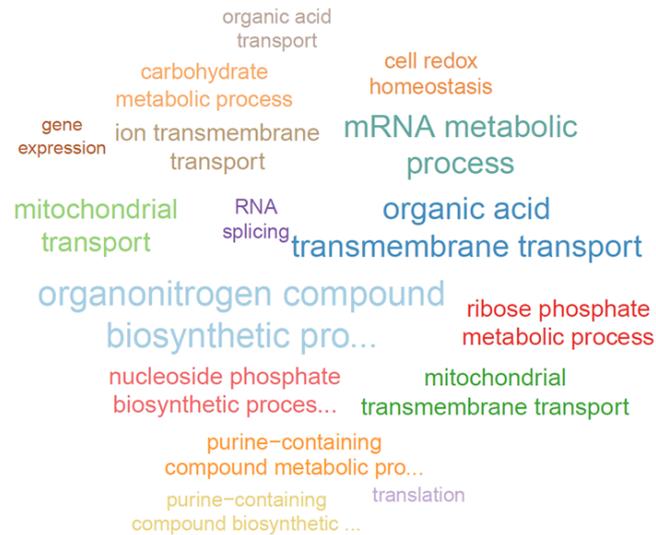
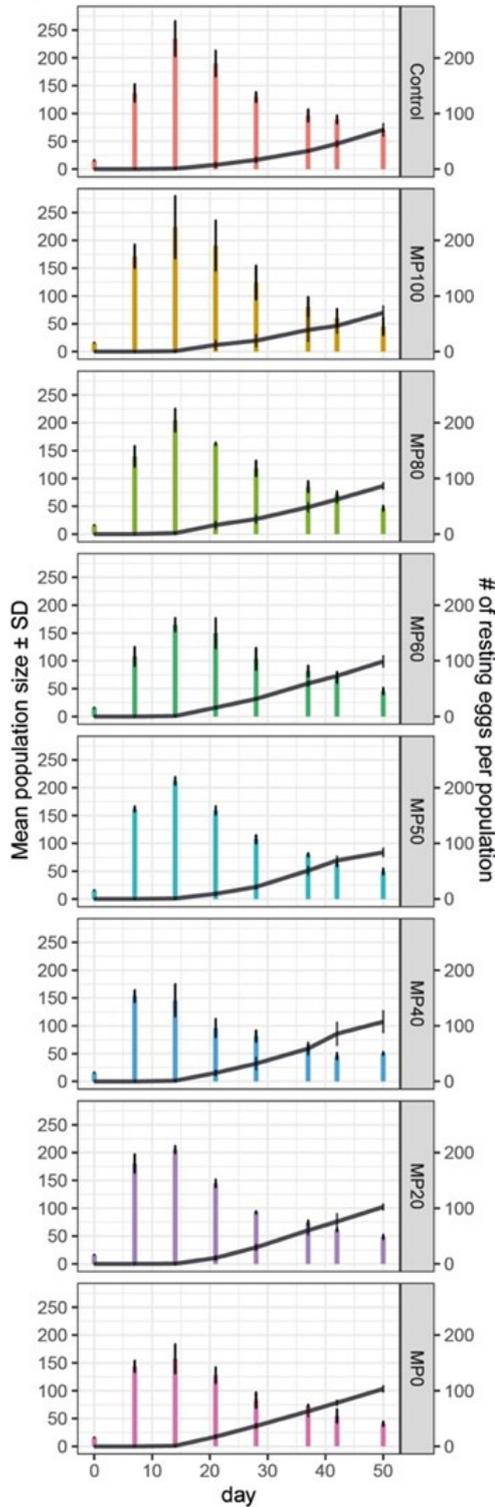


Abbildung 91: Tag cloud der Metabolischen Prozesse, die in der natürlichen Partikelkontrolle im Vergleich zur unexponierten Kontrollgruppe signifikant reguliert waren (N vs. C): Analyse mit TopGO auf basis von DESeq2

7.2.2 Populationsexperiment mit *Daphnia magna* (PS vs. Kieselgur) (GU)

MP-Partikel sind nicht die einzigen suspendierten Nicht-Futter-Partikel, mit denen Organismen in der Umwelt interagieren und von denen sie beeinflusst werden können (Bilotta and Brazier 2008). Organismen werden also zeitgleich mit natürlichen Partikeln und MP konfrontiert. Die Datenlage zur Populationsentwicklung von Zooplankton in Gegenwart von MP ist sehr limitiert, obwohl schon lange diskutiert wird, dass individuelle Reproduktion (wie sie im Daphnien Reproduktionstest nach OECD 211 (OECD 2012) als Endpunkt betrachtet wird) nicht zwingend auf die Populationsebene übertragbar ist (Hammers-Wirtz and Ratte 2000). In dieser Studie ging es daher darum, die Entwicklung mehrerer Partikel-exponierter Daphnien-Populationen über 50 Tage hinweg zu beobachten. Dabei wurden die Startpopulationen konstant gegenüber 50.000 Partikeln mL⁻¹ exponiert. Die Gesamtpartikelzahl setzte sich allerdings zu verschiedenen Verhältnissen aus Polystyrol MP (< 63 µm) und aus dem natürlichen Partikel Kieselgur (< 63 µm) zusammen (0:100, 20:80, 40:60, 50:50, 60:40, 80:20, 100:0). Die Populationen wurden unter nahrungslimitierenden Bedingungen (0,1 mg Kohlenstoff Tag⁻¹) gehältert. Die Startpopulation bestand aus drei Altersklassen: 2 Wochen, 1 Woche und < 3 Tage mit je 3, 5 und 8 Individuen. Die gesamte Population wurde beim wöchentlichen Wasserwechsel fotografiert und anschließend digital gezählt und vermessen. Die Individuen wurden nach ihrer Größe in vier Größenkategorien eingeteilt: ≤ 1599 µm, 1600–2699 µm, 2700–3799 µm, und ≥ 3800 µm Körperlänge. Neben der Individuen-Größenverteilung und der absoluten Populationsgröße wurde auch die Zahl der Dauereier aufgenommen (Abbildung 92).

Populationsgröße & Dauereier



Populationszusammensetzung

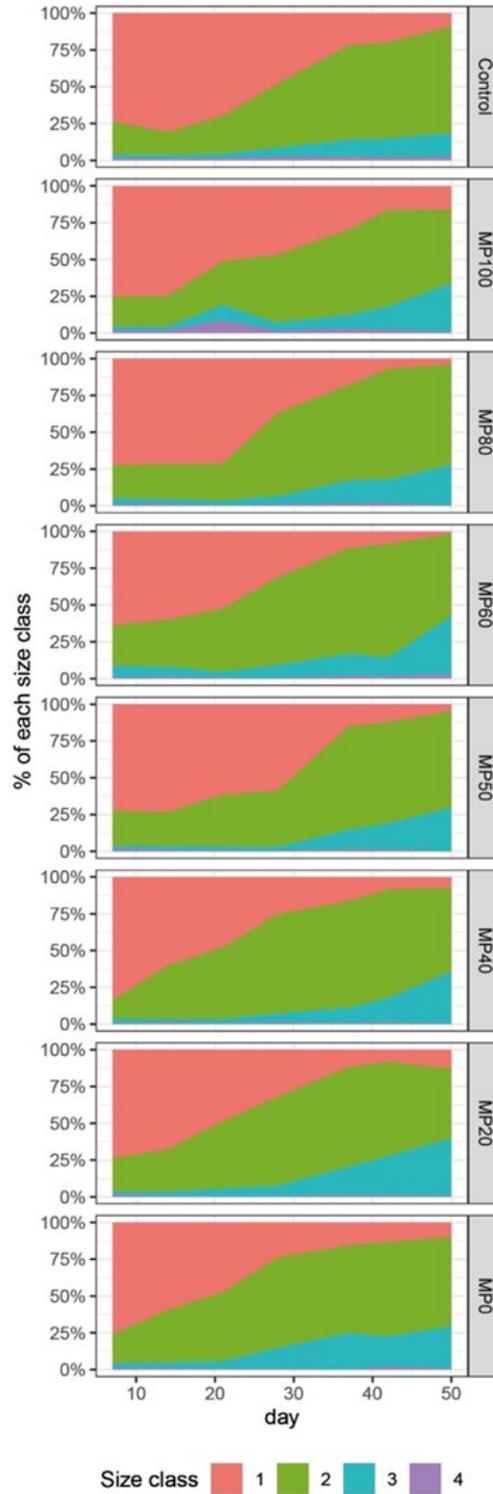


Abbildung 92: Ergebnisse der Populationsstudie mit MP und Kieselgur. Die linke Spalte beschreibt mit den Balken den mittleren Populationsgrößenverlauf (Anzahl lebender Daphnien am jeweiligen Tag) der Behandlungen ($n = 3$). Die schwarze Linie indiziert die Menge an Dauereiern in den Gefäßen der einzelnen Behandlungsgruppen. Die rechte Spalte stellt die Größenzusammensetzung der jeweiligen Behandlungsgruppen in Prozent dar. Größenklasse 1 (rot, $\leq 1599 \mu\text{m}$ Körperlänge), Größenklasse 2 (grün, $1600\text{--}2699 \mu\text{m}$ Körperlänge), Größenklasse 3 (blau, $2700\text{--}3799 \mu\text{m}$), Größenklasse 4 (violett, $\geq 3800 \mu\text{m}$)

Die Entwicklung aller Populationen verlief nach einem sehr ähnlichen Muster: Durch das Einsetzen bereits reproduktionsfähiger Individuen stieg vom Testbeginn bis zum ersten Messzeitpunkt die Populationsgröße stark an und erreichte bei allen Gruppen am Tag 14 den Höhepunkt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wirkte sich spätestens ab diesem Zeitpunkt die Nahrungslimitation auf die Tiere aus, und die Energiereserven der Tiere konnten diese Limitation nicht weiter kompensieren. Ebenfalls nach diesem Zeitpunkt wurden die ersten Dauereier gezählt, deren Menge eine inverse Korrelation mit dem Größenverlauf der Population zeigen. Dauereier stellen eine Ausnahme im Daphnien-Reproduktionszyklus dar und sind eine Reaktion auf Stressbedingungen, wie Nahrungsmangel, Temperaturveränderungen und hohe Dichte. Die Populationsgrößen scheinen einem Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhang zu folgen, der sich allerdings auf die Kieselgur-Konzentration zu beziehen scheint. Die Populationsgrößen werden mit sinkender MP-Konzentration (und damit höherer Kieselgur-Konzentration) ebenfalls kleiner. Dieser Trend ist zeitgleich sichtbar in der Zahl der produzierten Dauereier, die in den Behandlungsgruppen mit höherem MP-Anteil im Bereich der Kontrolle liegt, während sie in Gruppen, die gegenüber höheren Kieselgur-Konzentrationen exponiert waren, höher liegen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Nahrungslimitation in Gegenwart von hohen Kieselgur-Konzentrationen einen größeren Effekt hat als bei Behandlungsgruppen, die vornehmlich gegenüber MP exponiert waren. Die Populationszusammensetzungen anhand der vier gewählten Größenklassen zeigen kaum Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Anzumerken ist allerdings, dass in der Kontrollgruppe und in den drei Gruppen mit den höchsten MP-Konzentrationen Tiere in der größten Größenklasse $\geq 3800 \mu\text{m}$ auftreten, in den anderen Gruppen allerdings nicht. Insgesamt beeinflussen suspendierte Partikel also die Populationsgröße unter nahrungslimitierten Bedingungen. Dieser Effekt wird durch Exposition gegenüber natürlichen Kieselgurpartikeln verstärkt, nicht aber durch MP.

7.2.3 Multigenerationsstudie mit *Daphnia magna* I (PS vs. Kaolin) (GU)

Die momentan verfügbare Literatur zu MP-Effekten (speziell auf Zooplankton, wie den großen Wasserfloh *Daphnia magna*) besteht zum überwiegenden Teil aus Studien mit sphärischen Partikeln, kurzer Expositionsdauer und hohen Nahrungskonzentration. Gleichzeitig bleibt die Frage offen, ob MP-induzierte Effekte in erster Linie mechanischer Natur sind oder ob die chemische Komposition ebenfalls einen Beitrag leistet (Backhaus and Wagner 2019, Ogonowski et al. 2018). Um einige dieser Lücken zu beleuchten, haben wir eine Multigenerationsstudie durchgeführt (Abbildung 93), bei der vier aufeinander folgende Daphnienreproduktionstests durchgeführt wurden. Somit waren nach der ersten Generation (F0) alle Versuchstiere Nachkommen von Elterntieren, die bereits ihr Leben lang gegenüber Partikeln exponiert waren (400, 2.000 und 10.000 Partikel mL^{-1} von je Polystyrol-MP und dem natürlichen Tonmineral Kaolin).

In den beiden Kontrollgruppen (HFC und LFC) überleben über alle Generationen hinweg immer mehr als 80 % der Tiere (Abbildung 94). Die mit niedriger Futtermenge gefütterte Gruppe (LFC) produzierte weniger Nachkommen als die mit hoher Futtermenge gefütterte (HFC). Somit beobachten wir einen Effekt der Futtermenge auf die Reproduktionsleistung, aber nicht auf das Überleben. Tiere in der Behandlungsgruppe, die gegenüber der höchsten Plastikkonzentration exponiert war, starben innerhalb der ersten Generation aus, woraufhin die korrespondierende Kaolin-Behandlung nicht weitergeführt wurde. Die Überlebensrate der Daphnien in der PS2000-Gruppe sank kontinuierlich über die Generationen und endete im Aussterben der Daphnien in Generation F3. Das Überleben der Tiere in der PS400-Behandlungsgruppe blieb durchgängig unbeeinflusst, es war allerdings eine Reduktion in der Reproduktionsleistung zu beobachten. Die Kaolin-behandelten Tiere reproduzierten sich unabhängig von der eingesetzten Konzentration auf ähnlichem Niveau wie die LFC-Gruppe und zeigten auch keine Auffälligkeiten hinsichtlich des Überlebens. Die negativen Effekte in PS-exponierten Tieren, die in den Kaolin-behandelten Tieren nicht beobachtet wurden, zeigte sich ebenfalls in anderen Endpunkten, wie

z. B. der relativen mittleren Reproduktionsleistung und dem Größenwachstum, nicht aber dem Zeitpunkt der ersten Reproduktion.

Insgesamt zeigt die Studie, dass eine Exposition gegenüber PS-MP unter nahrungslimitierten Bedingungen zu deutlichen multigenerationalen Effekten führt. Hohe Konzentrationen induzieren akute Effekte, die zum Aussterben von *D. magna* führen, niedrigere Konzentrationen reduzieren die Reproduktionsleistung. Eine Exposition gegenüber Kaolin als natürlichem Referenzpartikel verursacht keine negativen Effekte. Es bleibt allerdings unklar, ob das Ausbleiben von Kaolin-induzierten Effekten nicht auch das Resultat einer geringeren Bioverfügbarkeit sein kann, die sich aus unterschieden in der Materialdichte ergibt.

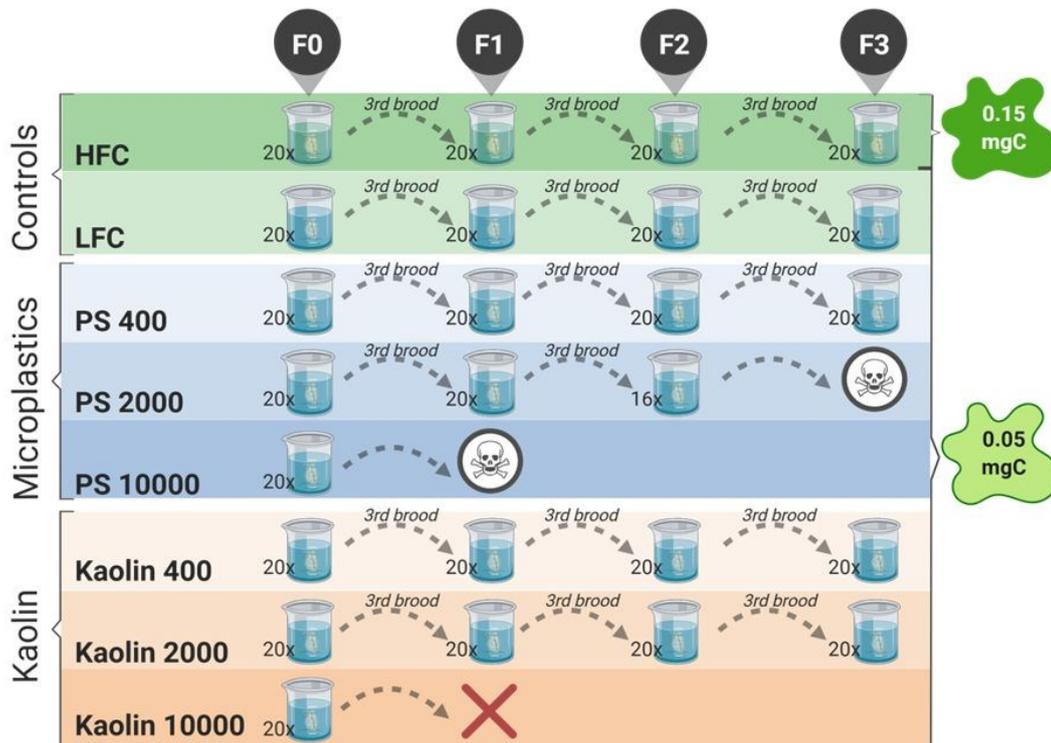


Abbildung 93: Experimentelles Design der Multigenerationsstudie I mit *Daphnia magna*: Neben zwei Kontrollgruppen mit unterschiedlichen Futtermengen (HFC, high food control und LFC, low food control) wurden Tiere gegenüber je drei Konzentrationen (400, 2.000 und 10.000 Partikel mL^{-1}) von Polystyrol-MP (PS) und dem natürlichen Tonmineral Kaolin über vier Generationen exponiert (F0–F3). Die jeweils dritte Brut einer Behandlungsgruppe wurde verwendet, um die nächste Generation zu etablieren

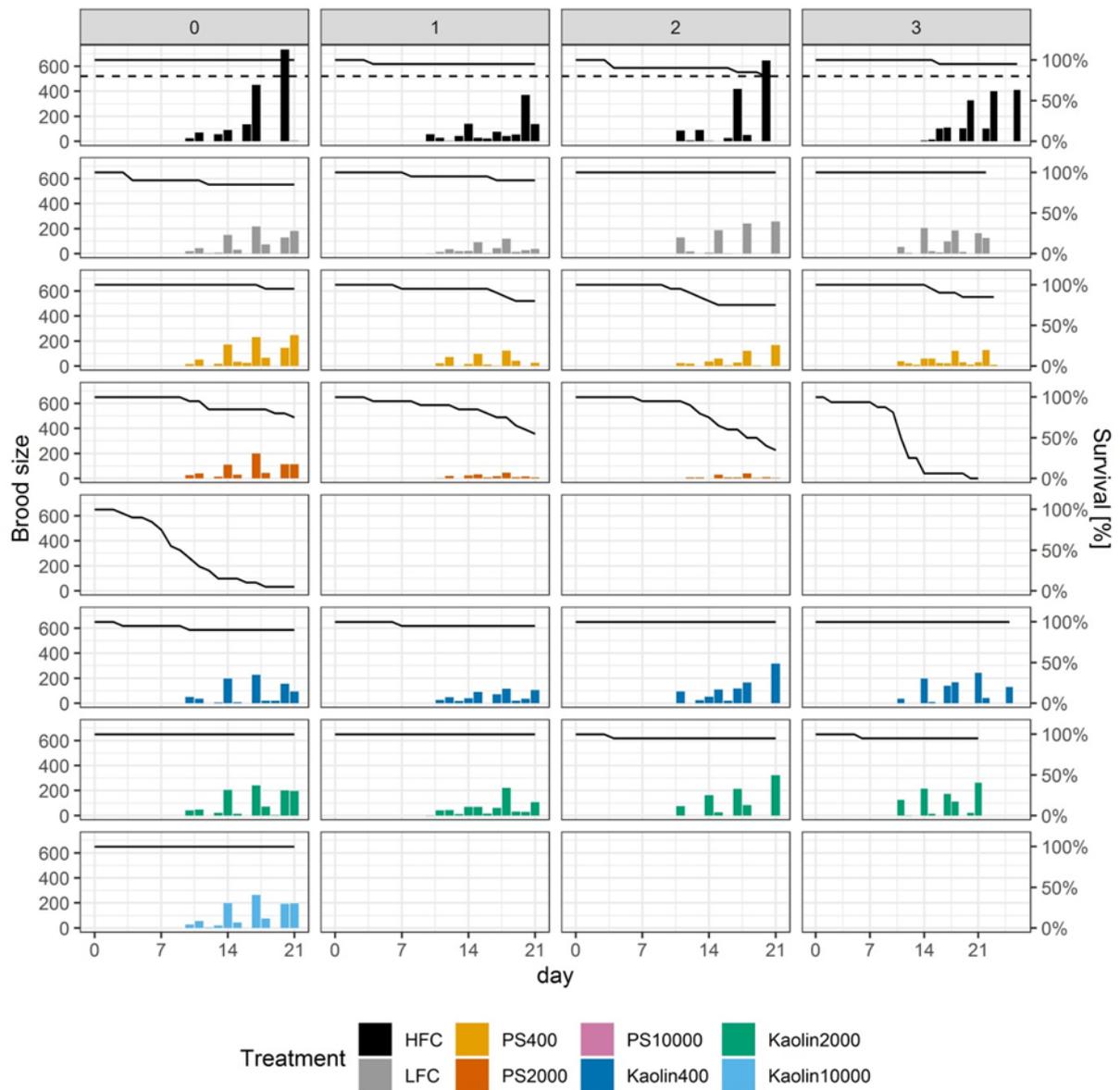


Abbildung 94: Ergebnisse der Multigenerationsstudie I mit *Daphnia magna* bezüglich Reproduktion und Überleben in den zwei Kontrollgruppen (hohe Futtermenge: HFC, niedrige Futtermenge: LFC) und je drei Behandlungsgruppen, die über vier Generationen (Spalten 0–3) hinweg gegenüber 400, 2.000 und 10.000 Partikel mL^{-1} Polystyrol-MP (PS) oder Kaolin exponiert waren

7.2.4 Akuter Toxizitätstest mit *Chironomus riparius* (PS) (UTUE)

Zuckmücken der Art *Chironomus riparius* gelten in der Ökotoxikologie als gut etablierte Standardtestorganismen zur Untersuchung von Gewässer- und Sedimentbelastungen. Chironomiden sind ubiquitär in europäischen Fließgewässern verbreitet. Die vier Phasen ihrer Entwicklung finden in verschiedenen Umweltkompartimenten statt: Das Eistadium im Wasser, die vier Larvalstadien zu Beginn im Wasser, dann eingegraben im Sediment, das Puppenstadium im Wasser und geschlüpfte Adulte in der Luft. Die durchgeführten akuten Toxizitätstests mit einer Expositionsdauer von 96 Stunden wurden in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 235 (OECD 2011) durchgeführt.

Alle Versuche mit Chironomiden wurden bei 20 °C und einem 12 Stunden hell/dunkel Rhythmus durchgeführt. Um gleichaltrige Tiere einzusetzen, wurden aus der Haltung Eigelege (jünger als 24 Stunden) entnommen und diese in belüfteten Eimern mit Sediment, gefiltertem Leitungswasser und Flockenfutter für Fische über drei Wochen herangezogen. Zu Versuchsbeginn wurden pro Treatment jeweils fünf Larven im dritten bis vierten Larvalstadium in 30 g Quarzsand und 100 mL Testlösung in zuvor für einige Tage abgesättigten Glasgefäßen für die Dauer von 96 Stunden exponiert. Pro Versuchsgruppe wurden 9–48 Replikate/Glasgefäße angesetzt. Die Mortalität wurde alle 24 Stunden überprüft und dokumentiert, tote Tiere wurden dabei entnommen. Für zusätzliche Biomarkertests wurden die nach 96 h überlebenden Tiere in Pools (5–10 Larven) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Chironomidenlarven wurden gegenüber PS-Partikeln < 50 µm (Dichte 1,05 g/cm³, kryo-gemahlene Fragmente) exponiert, die von Projektpartnern der TU Berlin zur Verfügung gestellt wurden. In allen acht Versuchsdurchgängen wurden jeweils eine Kontrollgruppe und MP-Suspensionen in den Konzentrationen 150.000 und/oder 1.000.000 Partikel/L getestet.

7.2.4.1 Mortalität

Da sich die Mortalitätsraten nach 96 h in den Kontrollgruppen der Einzelversuche statistisch nicht unterschieden, konnten die Ergebnisse zusammengefasst werden. Wie in Tabelle 27 und Abbildung 95 dargestellt, wurde die Mortalität von *Chironomus riparius*-Larven nicht durch PS-Partikel in den Konzentrationen 150.000 Partikel/L und 1.000.000 Partikel/L beeinflusst.

Tabelle 27: Übersicht über Ergebnisse der einzelnen Versuchsdurchläufe: Dargestellt ist die Mortalität nach 96 h in den einzelnen Versuchsgruppen in Prozent

Versuchsansatz	Kontrolle	PS 150.000 (150.000 P./L)	PS 1.000.000 (1.000.000 P./L)
Test 1	8,20 %	6,56 %	-
Test 2	8,33 %	6,56 %	-
Test 3	8,33 %	1,67 %	3,33 %
Test 4	8,33 %	5,00 %	-
Test 5	2,83 %	2,44 %	-
Test 6	0,00 %	0,00 %	1,96 %
Test 7	2,00 %	-	0,00 %
Test 8	6,67 %	0,00 %	4,26 %

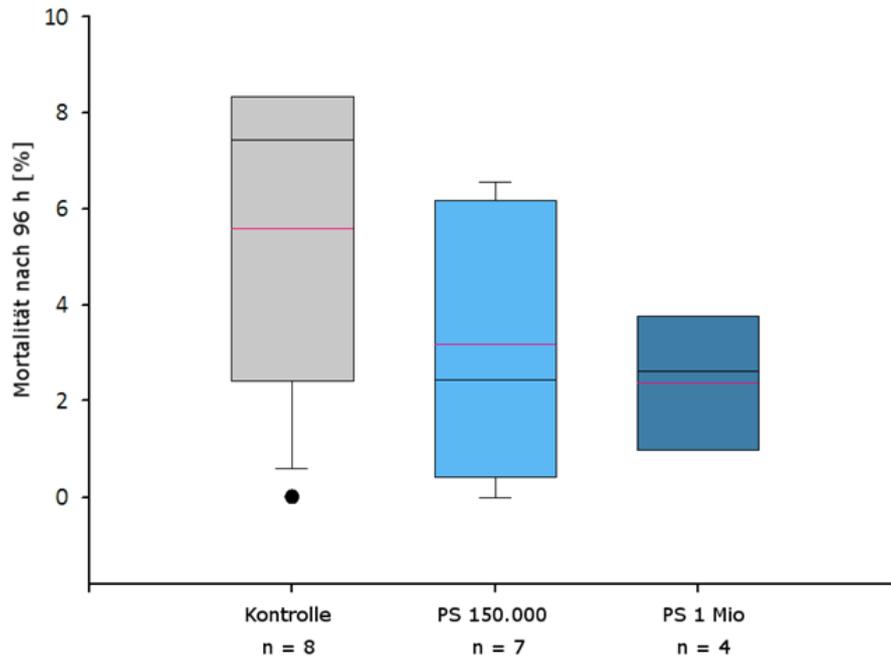


Abbildung 95: Mortalität der Chironomidenlarven nach 96 h in Prozent (Daten Test 1–8): Bei Exposition gegenüber 150.000 Partikel/L (PS 150.000) und 1.000.000 Partikel/L (PS 1 Mio.) trat keine signifikante Änderung der Mortalität im Vergleich zur Kontrolle auf

7.2.4.2 Biomarker

Die zuvor in Pools eingefrorenen Biomarkerproben wurden homogenisiert und mittels verschiedener Assays auf Neurotoxizität (Hemmung der AChE/CbE) oder oxidativen Stress (Superoxiddismutase) untersucht. Die Untersuchungen zeigten keine neurotoxischen Effekte und keine Hinweise auf oxidativen Stress durch PS-Partikel.

7.2.5 Akuter Toxizitätstest mit *Chironomus riparius* (PE) (UTUE)

Untersucht wurden eine Kontrollgruppe, gealterte PE-Partikel und nicht gealterte PE-Partikel in Suspensionen mit je 150.000 Partikeln/L ($>1 \mu\text{m}$; d_{50} : 20–40 μm , Dichte 0,93–0,96 g/cm^3). Die Partikel wurden von der BAM zur Verfügung gestellt. Methodische Probleme ergaben sich durch die geringe Dichte der Partikel, was zum Aufschwimmen im Testmedium führte und somit das Herstellen der benötigten Testkonzentration von 150.000 Partikeln/L durch Verdünnung einer Stammsuspension erschwerte.

7.2.5.1 Mortalität

Die Mortalität wurde durch die PE-Partikel nicht beeinflusst.

7.2.6 Embryotest mit *Marisa cornuarietis* (PA, PMMA, PS) (UTUE)

Als weiterer Modellorganismus für aquatische Invertebraten wurde die subtropische Süßwasserschnecke *Marisa cornuarietis* (Linnaeus 1758) eingesetzt. Sie gilt als gut erforscht und wird als sensitiv gegenüber endokrin wirksamen Substanzen (Oehlmann et al. 2000) und Metallen (Osterauer et al. 2009, Schirling et al. 2006) beschrieben. Als Weidegänger nimmt sie ihre Nahrung hauptsächlich von Oberflächen und nicht aus der Wassersäule auf.

Embryonen der Paradiesschnecke *Marisa cornuarietis* wurden gegenüber PS ($< 50 \mu\text{m}$, kryo-gemahlene Fragmente, bereitgestellt durch die TU Berlin), PMMA (48 μm , sphärisch, Goodfellow Cambridge Limited, Huntingdon PE29 6WR England) und PA (25–30 μm , Fragmente, Goodfellow Cambridge Limited, Huntingdon PE29 6WR England) exponiert.

Die MP-Konzentrationen waren hierbei 10^4 , 10^5 und 10^6 Partikel/L PS sowie 68,9 mg/L PMMA und 15,9 mg/L PA (entspricht jeweils ungefähr 10^6 Partikel/L). Die PMMA und PA Suspensionen wurden entsprechend verdünnt um Suspensionen mit ca. 10^5 und 10^4 Partikel/L zu erhalten. Zusätzlich wurden Tiere als Kontrollen gegenüber gefiltertem Leitungswasser exponiert. Die Embryotests wurden in Anlehnung an (Schirling et al. 2006) durchgeführt. Keines der Polymere hatte bei den getesteten Partikelgrößen und Konzentrationen einen Einfluss auf die Embryonalentwicklung der Paradiesschnecke.

7.2.7 Exposition adulter *Marisa cornuarietis* (PS) (UTUE)

Adulte Schnecken wurden gegenüber kryo-gemahlene PS-Partikel mit einer Dichte von $1,05 \text{ g/cm}^3$ und einer Größe $< 100 \mu\text{m}$ exponiert. Die Partikel wurden von der TU Berlin zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden bei 24°C (hell/dunkel Rhythmus 12/12 h) in zuvor mit den entsprechenden Konzentrationen abgesättigten Glasaquarien (Volumen 5 Liter) exponiert.

Die Fütterung erfolgte mit abgewogenen Karottenscheiben, Futterreste wurden am nächsten Tag entnommen und erneut gewogen. Beim Teilwasserwechsel wurden 50 % (Test 1) bzw. 33 % (Test 2) des Beckeninhalts entfernt und durch temperiertes, gefiltertes Leitungswasser ersetzt, wobei entnommene PS-Partikel ergänzt wurden.

In Test 1 wurden jeweils 10 Tiere gegenüber gefiltertem Leitungswasser (Kontroll-Ansatz) und PS-Partikeln in der Konzentration 10.000 Partikel/L exponiert. In Test 2 erfolgte die Exposition gegenüber 1.000.000 Partikel/L und einer Leitungswasserkontrolle.

Tabelle 28: Übersicht über Ergebnisse von Test 1 und Test 2. Dargestellt sind MW \pm SD, mit Ausnahme der Mortalität, welche in Prozent angegeben ist

Endpunkt	Test 1		Test 2		Effekt durch MP?
	Kontrolle (n = 10)	PS-Ansatz (10 000 P./L) (n = 10)	Kontrolle (mit DMSO) (n = 30)	PS-Ansatz (1 000 000 P./L) (n = 30)	
Verhalten	Abbildung 109a		Abbildung 109b		Nein
Gewebeintegrität Mitteldarmdrüse (semiquantitative Auswertung)	-	-	2,69 $\pm 0,73$	2,62 $\pm 0,78$	Nein
Acetylcholinesteraseaktivität [mU/mg Protein]	24,1 $\pm 5,5$	20,8 $\pm 4,2$	21,4 $\pm 7,9$	18,6 $\pm 4,6$	Nein
Carboxylesterasenaktivität (Substrat p-NPA) [mU/mg Protein]	146 ± 37	174 ± 65	184 ± 102	190 ± 94	Nein
Carboxylesterasenaktivität (Substrat p-NPV) [mU/mg Protein]	24,4 $\pm 7,4$	28,1 $\pm 11,1$	30,3 $\pm 14,7$	32,0 $\pm 15,4$	Nein
Lipidperoxide [CHP-Äquivalente]	16,2 $\pm 3,0$	16,5 $\pm 2,9$	-	-	Nein
Aktivität der Superoxiddismutase [U/mL]	-	-	225 ± 73	247 ± 72	Nein
Hsp70 Level	1,41 $\pm 0,63$	1,33 $\pm 0,67$	-	-	Nein
Mortalität	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	Nein

7.2.7.1 Mortalität

In beiden Versuchen trat keine Mortalität in den getesteten Ansätzen auf (Tabelle 30).

7.2.7.2 Verhalten

Das Verhalten der Tiere wurde in beiden Versuchen nicht durch die PS-Partikel beeinflusst (Tabelle 30, Abbildung 113a und Abbildung 113b).

7.2.7.3 Histologie

Auch die semi-quantitative Bewertung der Gewebeintegrität der Mitteldarmdrüsen in Test 2 zeigte keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe mit 1.000.000 PS-Partikeln/L (Tabelle 30, Abbildung 115).

7.2.7.4 Biomarker

Die Untersuchungen verschiedener Biomarker zeigten keine neurotoxischen (AChE- und CbE-Aktivitäten) und proteotoxischen Effekte (Hsp70 Level) durch die PS-Partikel und auch keine Hinweise auf oxidativen Stress (Lipidperoxidnachweis und Superoxiddismutase-Aktivität) (Tabelle 28).

7.2.8 Embryotest und anschließende Exposition der Larven der Bachforelle (PS) (UTUE)

Bachforellen sind eine in Deutschland einheimische Tierart und sowohl von ökologischer als auch von ökonomischer Bedeutung (Dußling and Berg 2001, Klemetsen et al. 2003). In vorangegangenen Experimenten wurde deutlich, dass auch die Lebensphase der Tiere einen starken Einfluss auf die Effekte von Stoffen auf Bachforellen haben kann (Schwarz et al. 2017). Daher wurden Experimente mit Tieren in unterschiedlichen Lebensstadien (Ei, Larve, Juvenile) durchgeführt. Alle Versuche fanden in einer auf 7°C eingestellten Klimakammer mit einem Licht-/Dunkelrhythmus von 10/14 Stunden statt. Die Aquarien/Petrischalen wurden abgedeckt, um eine direkte Lichteinstrahlung von oben zu verhindern. Alle Versuche wurden in Triplikaten in einem Blockdesign durchgeführt. Das verwendete MP war jeweils PS (< 50 µm, kryo-gemahlene Fragmente, bereitgestellt und portioniert durch die TU Berlin). Es fanden zwei Versuche zur Auswirkung von MP auf die Embryonalentwicklung und frühe Entwicklungsstadien der Bachforelle in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 212 (OECD 1998) statt. Pro Petrischale wurden je 30 Tiere exponiert (3x30 Tiere pro Versuchsgruppe). Nach Aufzehrung des Dottersacks wurden die Tiere täglich gefüttert (0,5 mm; Biomar; Brande; Dänemark).

Der erste Versuch dauerte sechs Monate (07.12.2016 bis 06.06.2017). Die Versuchsgruppen waren neben einer Kontrollgruppe 100, 10.000 und 100.000 Partikel/L. Zur Aufrechterhaltung der Wasserqualität wurden regelmäßige Wasserwechsel (in Glaspetrischalen jeden zweiten Tag, in Aquarien zweimal pro Woche) durchgeführt (Versuchsende: pH 8,57 ± 0,06; Temperatur 5,98 ± 0,25 °C; Leitfähigkeit 499 ± 5 µS/cm; Sauerstoffgehalt 12,7 ± 0,22 mg/L; Sauerstoffsättigung 108 ± 2 %, Nitrat 1,46 ± 0,05). Bei diesem Versuch wurde das Augenmerk insbesondere auf die erste Entwicklungsphase (1 Tag nach Fertilisation bis zum Erreichen des Augenpunktstadiums) gelegt. Die Eier sind in diesem Stadium besonders empfindlich und wurden daher bis zur Aufzehrung ihres Dottersacks in Glaspetrischalen (200 mL) in Kunstwasser (294 mg/L CaCl₂ x 2 H₂O; 123,25 mg/L MgSO₄ x 7 H₂O; 64,75 mg/L NaHCO₃; 5,75 mg/L KCl) gehalten. In Petrischalen kann ein Wasserwechsel durchgeführt werden, ohne dass die Eier beschädigt werden. Bei Aufzehrung des Dottersacks wurde ein Teil der Tiere (10 pro Aquarium) beprobt und die restlichen Fische in Aquarien (5 L Testsuspension) umgesetzt. Dadurch war es möglich, die Auswirkung des MPs nach Beginn der Nahrungsaufnahme durch die Larven zu beobachten. Tabelle 29 fasst die Ergebnisse aus dem Versuch zusammen. Bei keinem der untersuchten Endpunkte wurde ein Effekt durch MP im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

Tabelle 29: Übersicht über Ergebnisse des 1. Embryotests mit anschließender Exposition der Larven. Dargestellt sind MW \pm SD, mit Ausnahme der Mortalität, welche in Prozent angegeben ist

Endpunkt	Kontrolle	100 Partikel/L	10.000 Partikel/L	100.000 Partikel/L	Effekt durch MP?
Erreichen des Augenpunktstadiums [d]	39,4 \pm 1,4	39,4 \pm 1,1	39,6 \pm 2,7	39,6 \pm 1,5	Nein
Schlupf [d]	74,6 \pm 3,2	72,6 \pm 2,7	73,4 \pm 2,3	72,6 \pm 3,8	Nein
Herzschlag [bpm]	51,2 \pm 1,7	55,8 \pm 3,3	52,4 \pm 2,2	53,2 \pm 3,0	Nein
Mortalität [%]	1,15 \pm 1,63	1,15 \pm 1,63	1,15 \pm 1,63	1,19 \pm 1,68	Nein
Gewicht [g] 2. Probenahme	0,20 \pm 0,02	0,17 \pm 0,04	0,20 \pm 0,04	0,19 \pm 0,04	Nein
Länge [cm] 2. Probenahme	3,00 \pm 0,13	2,85 \pm 0,20	2,95 \pm 0,21	2,94 \pm 0,20	Nein
LPO [CHP-Äquivalente] 1. Probenahme	57,9 \pm 10,2	60,1 \pm 13,7	62,4 \pm 12,2	61,2 \pm 13,0	Nein
LPO [CHP-Äquivalente] 2. Probenahme	58,2 \pm 15,5	65,5 \pm 22,1	52,3 \pm 18,8	58,6 \pm 15,5	Nein
Aktivität der SOD [U/mL] 2. Probenahme	95,4 \pm 28,5	106 \pm 43	96,2 \pm 31,9	98,6 \pm 30,6	Nein

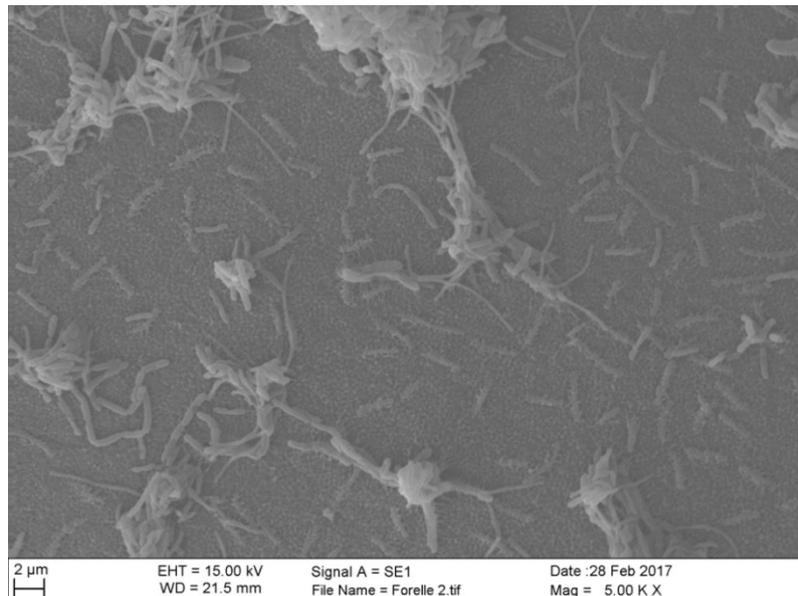


Abbildung 96: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der obersten Schicht des Chorions einer Bachforelle nach dem Schlupf. Es sind keine Poren oder Ähnliches im Mikrometer Bereich zu erkennen

Es ergaben sich keine Anhaltspunkte dafür, dass Bachforellenembryonen in einer Konzentration bis zu 100.0000 Partikeln/L PS-MP in ihrer Entwicklung beeinträchtigt werden. Bis zum Schlupf sind die Embryonen durch das Chorion geschützt. Das Chorion besitzt keine Poren im mikroskopisch sichtbaren Bereich (Abbildung 96). Es ist daher unwahrscheinlich, dass Partikel $> 1 \mu\text{m}$ in das Chorion gelangen können. Trotzdem wäre eine Beeinträchtigung der Fischeembryonen bereits im Ei denkbar, wenn sich beispielsweise durch starke Anlagerungen von Partikeln der Sauerstoffaustausch verringert. Es erscheint jedoch wahrscheinlicher, dass Effekte erst nach dem Schlupf der Tiere auftreten, wenn sie direkt mit dem MP in Kontakt kommen.

Im zweiten Experiment wurden die Tiere daher erst ab dem Augenpunktstadium exponiert. Dies erlaubte von Anfang an eine Exposition in Aquarien. Der Versuch dauerte insgesamt 2 Monate (29.12.2017–27.02.2018). Die Probenahme fand ca. eine Woche nach Aufzehrung des Dottersacks statt. Neben der Kontrollgruppe wurden in diesem Versuch Auswirkungen von 100.000 und 1.000.000 Partikel/L alleine und in Kombination mit dem Antidepressivum Amitriptylin untersucht (die detaillierten Ergebnisse finden sich in Tabelle 38 unter dem Unterpunkt 7.3.10). Die Wasserwerte wurden kontrolliert (Versuchsende: pH $8,24 \pm 0,13$; Temperatur $7,01 \pm 0,22$ °C; Leitfähigkeit 422 ± 4 $\mu\text{S}/\text{cm}$; Sauerstoffgehalt $10,9 \pm 0,1$ mg/L; Sauerstoffsättigung $94,6 \pm 0,5$ %; Nitrit $0,05 \pm 0,00$ mg/L). Eine Messung mittels TED-GC/MS durchgeführt von der BAM ergab für ein Volumen von ca. 7,5 L bei 1.000.000 Partikel/L 134 ± 15 μg PS (ca. 17 $\mu\text{g}/\text{L}$) und bei 1.000.000 Partikel/L 1459 ± 46 μg PS (ca. 195 $\mu\text{g}/\text{L}$). In der Kontrollgruppe wurde bei einer Messung kein PS gefunden, während eine zweite Messung einen Wert knapp über der Nachweisgrenze mit 53 ± 30 μg PS (max. 7 $\mu\text{g}/\text{L}$) ergab.

Insgesamt entwickelten sich die Tiere, welche gegenüber MP exponiert waren, vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Nach dem Schlupf der Tiere fiel auf, dass die Tiere bei einer Exposition mit 1.000.000 Partikel/L ein leicht verändertes Ruheverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten (Abbildung 97). Direkt nach dem Schlupf lagen die Tiere (auch auf Grund des noch relativ großen Dottersacks) auf der Seite. Nach einiger Zeit begannen sie länger am Stück zu schwimmen („swim up“) und ruhten sich zwischendurch, wie adulte Fische, in Bauchlage aus. Bei den Tieren, die gegenüber 1.000.000 Partikel/L exponiert waren, lagen zum beobachteten Zeitpunkt (07.02.2018) mit nur 1,11 % signifikant weniger Tiere auf der Seite als bei der Kontrollgruppe mit 10 % (Likelihood-Verhältnis: $X^2 = 613,75$; d.f. = 5; $p < 0,001$; Einzelvergleich mit Fisher`s exact tests und anschließender Bonferroni-Holm Korrektur. Kontrolle- 1.000.000 Partikel/L: alpha-Level= 0,0083; $p = 0,0032$). Mit 5,56 % lag der Wert für die Tiere, die gegenüber der niedrigeren MP Konzentration exponiert waren zwischen diesen Werten. Die biologische Relevanz des Effekts von MP auf das Ruheverhalten der Bachforellen ist aufgrund der geringen Ausprägung des Effekts und der starken Schwankung zwischen den Replikaten fraglich.

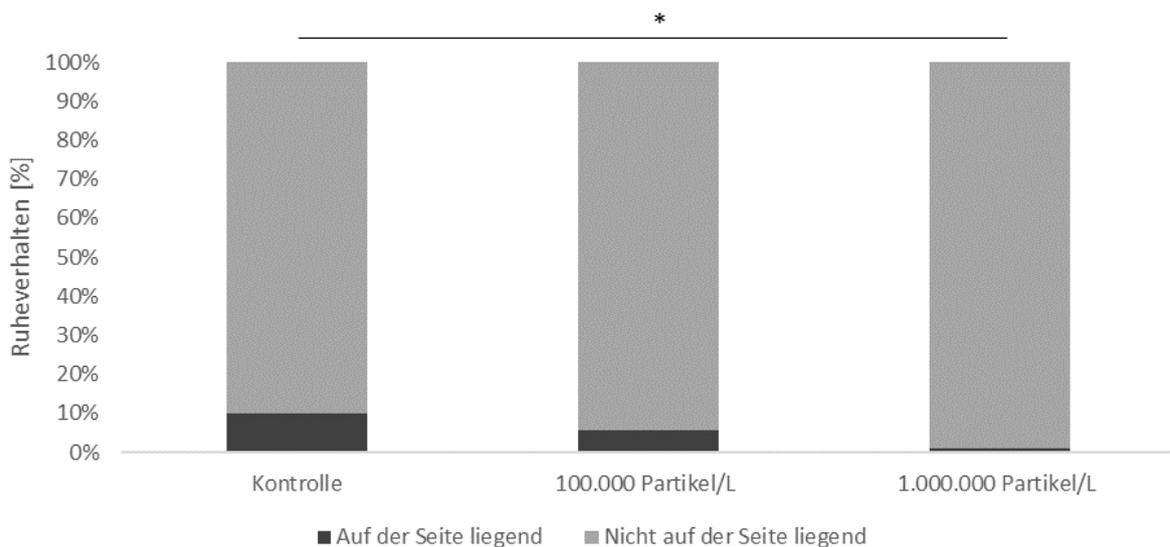


Abbildung 97: Ruheverhalten der Fischlarven in Prozent. Bei Exposition gegenüber 1.000.000 Partikel/L lagen signifikant weniger Tiere auf der Seite als in der Kontrollgruppe (Likelihood-Verhältnis: $X^2 = 613,75$; d.f. = 5; $p < 0,001$; Einzelvergleich mit Fisher`s exact tests und anschließender Bonferroni-Holm Korrektur. Kontrolle- 1.000.000 Partikel/L: alpha-Level= 0,0083; $p = 0,0032$). Das Sternchen markiert den signifikanten Unterschied

Abgesehen von diesem Einfluss auf das Verhalten der Tiere wurde bei keinem der untersuchten Parameter ein Effekt durch PS-Partikel in einer Konzentration bis zu 1.000.000 Partikeln/L beobachtet.

7.2.9 Experimente mit juvenilen Bachforellen (PS) (UTUE)

Mit juvenilen Bachforellen wurden zwei Experimente durchgeführt. Die Tiere wurden jeweils in 15 L Wasser gehalten. Pro Aquarium wurden je 10 Tiere eingesetzt, so dass pro Versuchsgruppe 30 Tiere (3 x 10) exponiert wurden. Die Tiere wurden täglich gefüttert (0,8 mm, Biomar, Brande, Dänemark). Neben der normalen Kontrollgruppe wurden bei den Versuchen mit juvenilen Tieren jeweils auch Hälterungskontrollen mit untersucht. Diese Tiere wurden in 200 L Becken (normale Hälterung) in der gleichen Klimakammer gehalten. Ein Vergleich zwischen der Hälterungskontrolle und den Tieren im Versuch ermöglichte es, Effekte durch die Versuchsbedingungen an sich zu erkennen. Während beider Versuche trat keine Mortalität auf.

Das erste Experiment war ein akuter Test über 96 Stunden (18.10.2017 bis 23.10.2017). Die Tiere waren zum Zeitpunkt des Experiments ca. 11 Monate alt. Um die Wasserqualität aufrecht zu erhalten, wurden nach 48 h und 72 h Fäkalien und Futterreste entfernt (Versuchsende: pH $7,15 \pm 0,13$; Temperatur $6,67 \pm 0,11$ °C; Leitfähigkeit 514 ± 4 $\mu\text{S/cm}$; Sauerstoffgehalt $11,2 \pm 0,1$ mg/L; Sauerstoffsättigung $96,5 \pm 1,8$ %; Nitrit $0,077 \pm 0,04$ mg/L). Die Bachforellen wurden gegenüber 10.000 Partikel/L exponiert. Es traten keine Unterschiede in den untersuchten Endpunkten (Gewicht und Größe, Stressproteine (Hsp70), Grad der Lipidperoxidation (FOX), Aktivität der Acetylcholinesterase, zweier Carboxylesterasen sowie der Superoxiddismutase, Histopathologie von Leber und Kieme) im Vergleich zur Kontrolle auf (Tabelle 37).

In einem zweiten Versuch wurden juvenile Bachforellen (ca. 10 Monate) für einen subakuten Zeitraum von drei Wochen exponiert. Neben der Kontrollgruppe wurden die Tiere hier gegenüber 10.000 und 100.000 Partikel/L exponiert (die Ergebnisse zu den übrigen Versuchsgruppen finden sich unter Unterpunkt 8.3.11). Um die Wasserqualität aufrecht zu erhalten, wurde zweimal pro Woche ein Wasserwechsel durchgeführt (Versuchsende: pH $7,51 \pm 0,06$; Temperatur $6,22 \pm 0,13$ °C; Leitfähigkeit 485 ± 2 $\mu\text{S/cm}$; Sauerstoffgehalt $11,5 \pm 0,05$ mg/L; Sauerstoffsättigung $96,7 \pm 0,5$ %; Nitrit $0,1 \pm 0,0$ mg/L; Gesamthärte $15,1 \pm 0,5$ °dH). Auch bei diesem Versuch ließen sich keine Effekte auf die Tiere durch die Polystyrol-Partikel beobachten. Tabelle 39 fasst die untersuchten Endpunkte zusammen.

7.3 Kombinationseffekte mit Chemikalien auf aquatische Organismen

7.3.1 Multigenerationsstudie mit *Daphnia magna* II (PS & Rohabwasser) (GU)

Der sogenannte Trojan horse effect bezeichnet die Hypothese, dass MP sowohl hydrophobe organische Chemikalien aus dem aquatischen Milieu akkumulieren kann, als auch selbst bestimmte Substanzen (u.a. Kunststoffadditive) enthält. Nach der Aufnahme durch Organismen kann die Bioverfügbarkeit dieser Substanzen gesteigert werden, da MP diese freisetzt und so die toxische Last erhöht. Bis dato ist die Datenlage dazu unzureichend und teilweise widersprüchlich (Burns and Boxall 2018). Der „Trojan horse effect“ hätte beispielsweise im Kontext vom Eintrag von MP über Kläranlagen Relevanz, da die im Kläranlagenablauf befindlichen Partikel vorher im Abwasser exponiert waren und daher potentiell mit einem komplexen Gemisch organischer Schadstoffe akkumulieren.

Um dieses Szenario nachzubilden, wurde ein Folgeexperiment zur Multigenerationsstudie I mit *Daphnia magna* durchgeführt. Dabei wurden Wasserflöhe erneut über vier Generationen hinweg gegenüber dem gleichen Polystyrol-MP exponiert wie im ersten Experiment (Abbildung 98). Allerdings wurden diese Behandlungsgruppen verglichen mit Individuen, die gegenüber den gleichen Partikeln nach einer simulierten Kläranlagenpassage exponiert wurden. Zu diesem Zweck wurden das MP 38 h in gefiltertem Rohabwasser (24 h Mischprobe, Kläranlage Bad Homburg, Hessen, 1 g MP L⁻¹ Rohabwasser) inkubiert. Die Partikel wurden anschließend durch Filtration wieder vom Abwasser abgeschieden und gefriergetrocknet, bevor sie im Test eingesetzt wurden. Die unbelasteten Partikel wurden analog

in Ultrareinstwasser inkubiert. Um einen breiteren Konzentrationsbereich abzudecken, aber gleichzeitig die Vergleichbarkeit zum ersten Experiment zu gewährleisten, wurden die Konzentrationen übernommen, aber um eine niedrige Konzentration (80 Partikel mL⁻¹) erweitert (Abbildung 98). Die Arbeitshypothese war, dass in Abwasser inkubiertes MP durch die Akkumulation von Schadstoffen toxischer ist als „reines“ MP.

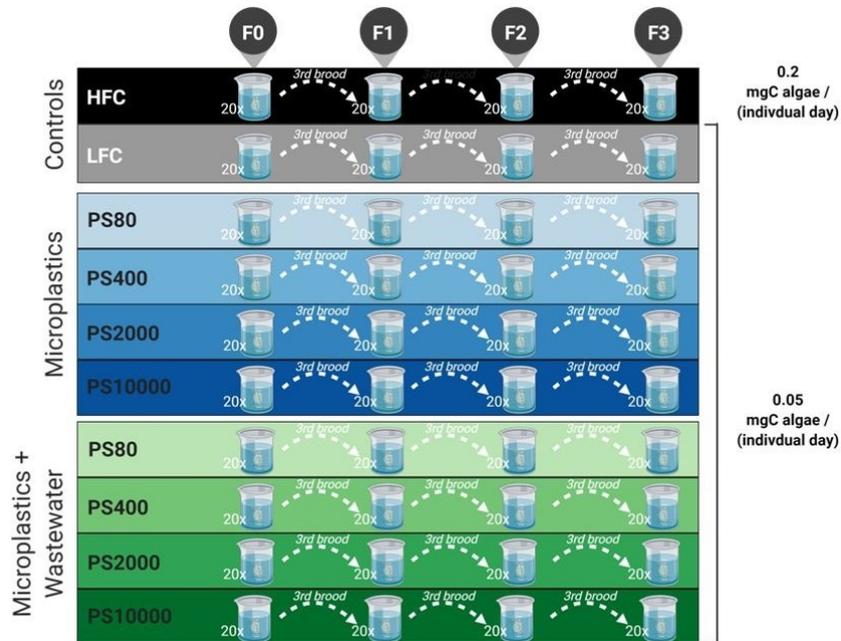


Abbildung 98: Experimentelles Design zur Multigenerationsstudie II mit *Daphnia magna*: Neben zwei Kontrollgruppen mit unterschiedlich hohen Futtermengen (HFC, high food control und LFC, low food control) wurden Tiere in je vier Konzentrationen (80, 400, 2.000 und 10.000 Partikel mL⁻¹) gegenüber Polystyrol-MP (PS) mit und ohne vorangegangener Inkubation in Rohabwasser über vier Generationen exponiert (F0–F3). Die jeweils dritte Brut einer Behandlungsgruppe wurde verwendet, um die nächste Generation zu etablieren

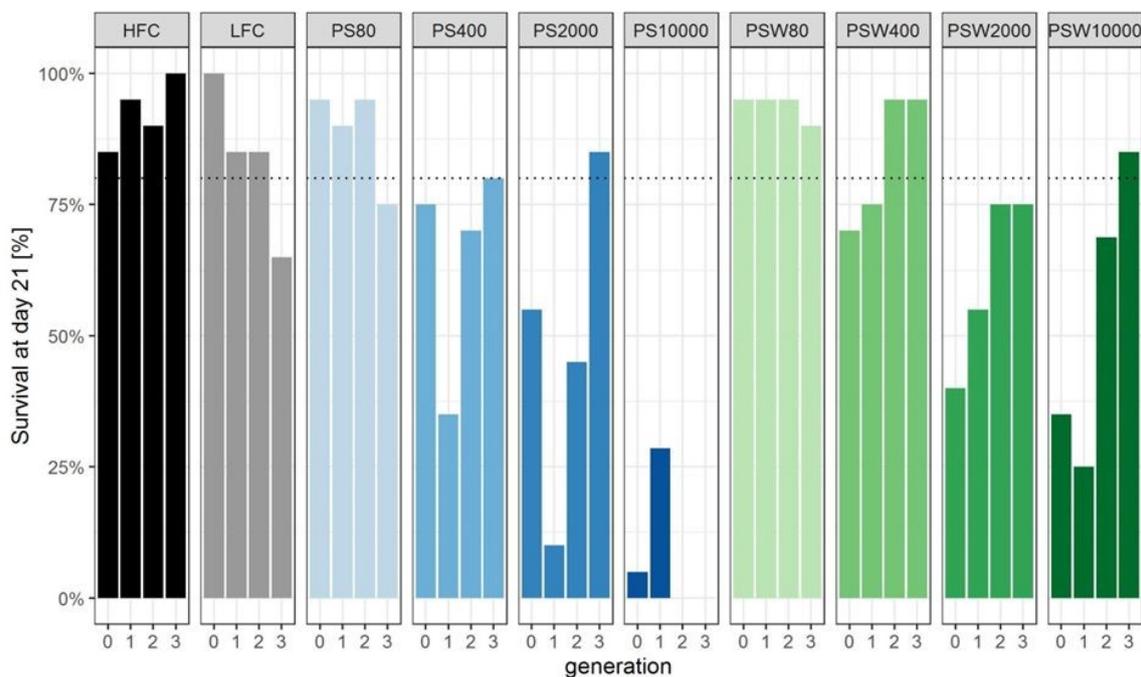


Abbildung 99: Überleben der *Daphnien* in Multigenerationsstudie II über vier Generationen. Verglichen wurden je vier Konzentrationen von Polystyrol-MP, die vor Anwendung im Test mit filtriertem Rohabwasser (PSW) oder Ultrareinstwasser (PS) behandelt wurden

Konsistent mit der ersten Multigenerationsstudie zeigte sich kein deutlicher Einfluss der Futtermenge auf die Mortalität. Lediglich die letzte Generation der niedrigen Futter-Kontrolle erreichte nicht die 80 % Überlebensgrenze (Abbildung 99). Beide Plastikbehandlungen induzierten eine konzentrationsabhängig erhöhte Mortalität, die allerdings über die Generationen geringer wurde. Nur die Gruppe, die gegenüber unbelasteten Partikeln in einer Konzentration von 10.000 L⁻¹ exponiert war, starb im Versuchsverlauf aus. Im Gegensatz zum Versuch I erfolgte dies aber erst in der 3. Generation. Insgesamt zeigte sich eine höhere Mortalität in den Behandlungsgruppen, die gegenüber unbelastetem MP exponiert waren. Die Auswertung weiterer Endpunkte (Wachstum, Reproduktion) ist zum Berichtszeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

Das Experiment lässt hinsichtlich der Mortalität die Schlussfolgerung zu, dass mit Abwasser inkubiertes MP weniger toxisch ist als „reines“ MP. Das bedeutet, dass in unserem Expositionsszenario der „Trojan horse effect“ entweder nicht aufgetreten ist (keine Sorption von relevanten Mengen an Schadstoffen) oder dass die Inkubation mit Rohabwasser negative Partikeleigenschaften verändert hat. So könnte zum Beispiel die Sorption von suspendiertem organischem Material zur Bildung einer sogenannten Biokorona führen, die die Kunststoffoberfläche abschirmt und so negative Effekte reduziert. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen deuten jedoch nicht auf das Vorhandensein einer solchen Korona hin (Abbildung 100). Alternativ könnte die Inkubation die Bildung eines Biofilmes begünstigt haben, der als zusätzliche Nährstoffquelle die Toxizität des MPs verringert. Neuste Studien zeigen, dass künstlich oder durch biologischen Bewuchs verursachte Oberflächenmodifikationen von Nanoplastik die Toxizität gegenüber Zooplankton modulieren kann (Lin et al. 2019, Saavedra et al. 2019). Auch könnte die Inkubation mit Rohabwasser die Hydrophobizität der Partikel verändert haben, sodass diese weniger bioverfügbar sind.

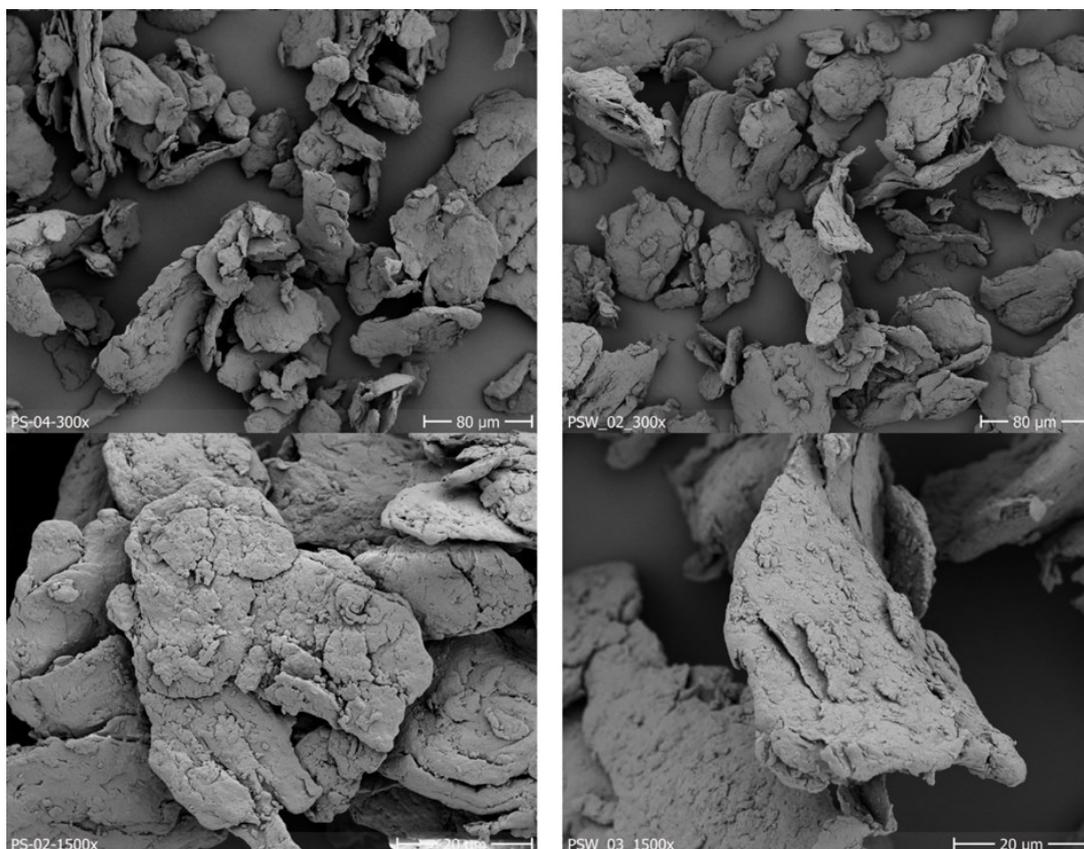


Abbildung 100: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der in Multigenerationsexperiment II verwendeten MP-Partikel nach Inkubation in Rohabwasser (rechts) und Ultrareinstwasser (links) bei zwei Vergrößerungen (oben 300×, unten 1500×)

7.3.2 Transfer von MP-Partikeln entlang Nahrungsketten (UHEI)

Bereits im Rahmen des JPI Oceans-Projekt EPHEMARE konnte durch Batel et al. (2016) eine Modellnahrungskette mit Nauplien von *Artemia spec.* bzw. *Paramecium spec.* auf den Zebraabräbling (*Danio rerio*; adult, Larven) etabliert werden. In den Teilprojekten TP B2 (UTUE) und B3 (GUF) wurden unter anderem Daphnien und Chironomiden mit MP-Partikeln belastet, die in Ergänzung als weitere Trophiestufe an der Uni Heidelberg an Zebraabräblinge verfüttert werden sollten. Der Nachweis der Partikel sollte mittels Epifluoreszenzmikroskopie bzw. konfokaler Laserscanningmikroskopie erfolgen; daher wurde die fluoreszierende Modellschubstanz Benz(k)fluoranthen und die sphärischen PMMA Partikel für diesen Projektteil ausgewählt. Für eine Quantifizierung wurde das BkF-Signal des Darmgewebes in einer konfokalen Ebene bei 10-facher Vergrößerung erfasst. Die Quantifizierung des Signals erfolgte mittels der Open Source-Software Fiji (Schindelin et al. 2012).

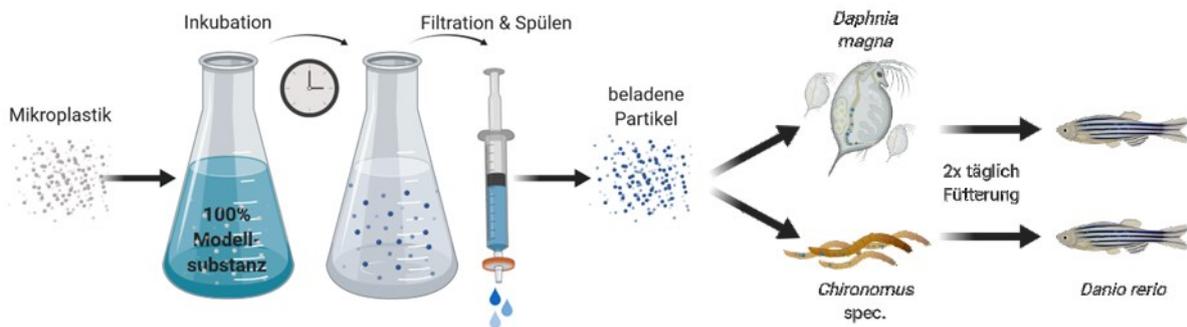


Abbildung 101: Aufbau der Nahrungskettenexperimente über Wasserflöhe (*Daphnia magna*) und rote Zuckmückenlarven (*Chironomus riparius*) sowie zum Zebraabräbling (*Danio rerio*) als Endkonsument

Zu diesem Zweck wurden Wasserflöhe (*Daphnia magna*) und roten Zuckmückenlarven (*Chironomus riparius*) von der Goethe-Universität Frankfurt bezogen und in verschiedenen Ansätzen mit BkF-beladenen PMMA Partikeln (700 000 Partikel/L) über jeweils 6 h inkubiert. Neben der Negativkontrolle (bestehend aus dem Hälterungsmedium der Invertebraten) wurden gegenüber einer Plastikkontrolle (bestehend aus PMMA und Medium) sowie einer Positivkontrolle (100 µg/L in Wasser gelöstes BkF) und einer mit 100 µg/L BkF beladenen PMMA-Probe exponiert. Nach erfolgreicher Aufnahme der Partikel wurden die Organismen gespült, anhaftende MP entfernt und über 48 Stunden sukzessive zweimal täglich an jeweils 5 Zebraabräblinge pro Expositionsgruppe verfüttert (Abbildung 101). Die Expositionsgruppen von *Danio rerio* sind Tabelle 30 zusammengestellt.

Tabelle 30: Expositionsgruppen mit *Danio rerio* für Nahrungskettenexperiment

Negativkontrolle A	Negativkontrolle B	Plastikkontrolle	Positivkontrolle A	Positivkontrolle B	Nahrungsketten
Trockenfutter	Unbelastete Zuckmücken/Wasserflöhe	Mit PMMA belastete Zuckmückenlarven/Wasserflöhe	Mit 100 µg/L BkF (Wasser) belastete Zuckmücken/Wasserflöhe	100 µg/L BkF über Wasser	Mit BkF-beladenem PMMA belastete Zuckmücken/Wasserflöhe

Bereits bei der Inkubation der Invertebraten wurden mikroskopische Kontrollen zur Aufnahme der MP-Partikel und zum Transfer von BkF auf die Organismen durchgeführt. Die Zebraabräblinge wurden nach dem 2-tägigen Fütterungsexperiment tierschutzkonform nach der OECD-Richtlinie 203 (OECD 2019) getötet. Anschließend erfolgte die Präparation und Konservierung des gesamten Magen-Darm-Traktes

für die Kryoschnitte. Zusätzlich wurden Leberproben für eine Untersuchung auf CYP450-Induktion mittels In vitro-EROD entnommen, um den Transfer und die Metabolisierung von BkF im Zielorganismus besser abschätzen zu können.

Akkumuliertes Benz(k)fluoranthren (BkF) in Daphnien und Chironomiden konnte durch ein deutliches Fluoreszenzsignal identifiziert werden (Abbildung 102 C, F). BkF-belastete Partikel konnten eindeutig als fluoreszierende Elemente im Darm der Organismen identifiziert werden (Abbildung 102 D, H, J).

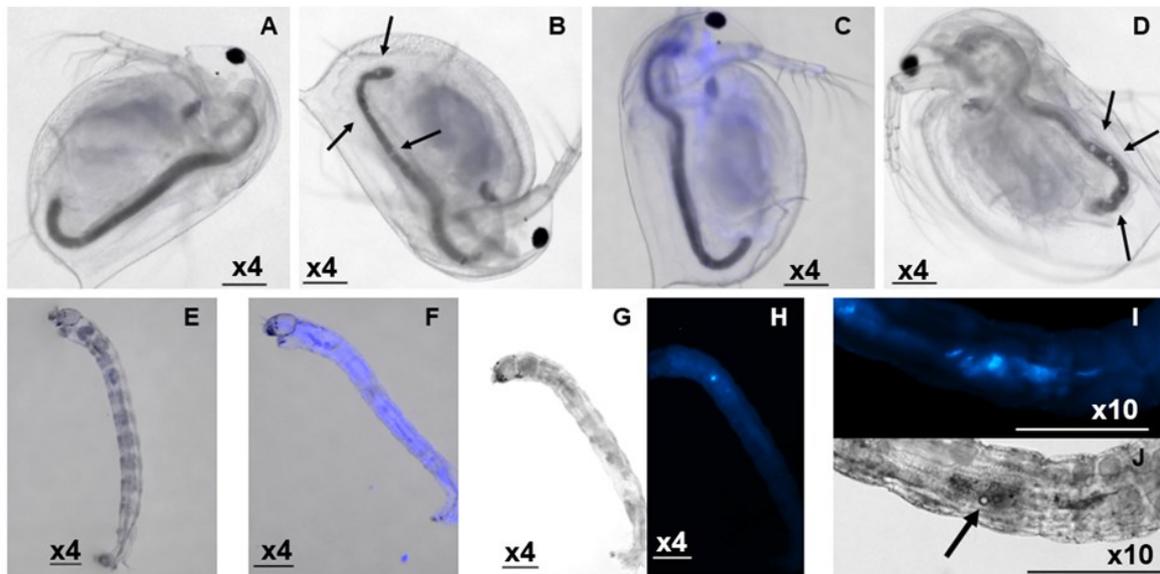
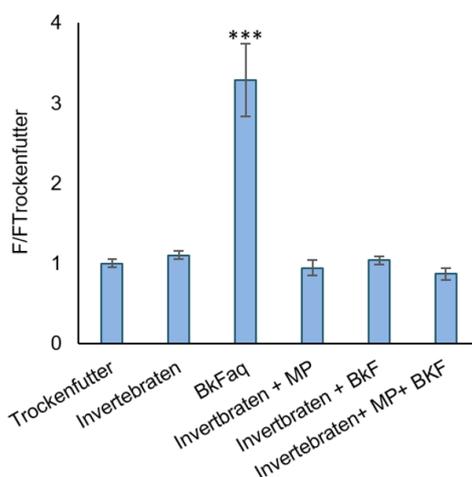


Abbildung 102: Vergleich der Fluoreszenz von Benz(k)fluoranthren in *D. magna* und *C. riparius* nach 24 h Inkubation unter verschiedenen Expositionsbedingungen: A/E Negativkontrolle; B Unbelastetes PMMA; C/F BkF in der Wasserphase; D/G/H-J PMMA-assoziiertes BkF. Epifluoreszenz-Aufnahmen ($\lambda_{ex} = 420 \text{ nm}$), Maßstab = 250 μm

A Fluoreszenzsignal im Magen-Darm-Trakt



B EROD-Induktion

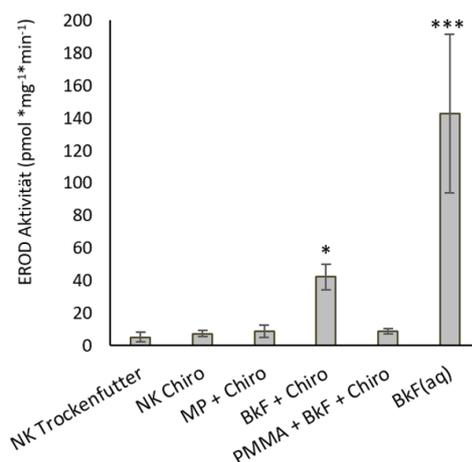


Abbildung 103: Ergebnisse der 2tägigen Nahrungskettenversuche mit BkF-beladenen *D. magna* bzw. *C. riparius* und *D. rerio*. A Fluoreszenzsignal von BkF im Magen-Darm-Trakt von *D. rerio* nach Fütterung mit Invertebraten (*D. magna* und *C. riparius* gemittelt). B In-vitro-EROD Aktivität in der Leber von *D. rerio* nach Fütterung mit *C. riparius*

Für die Fluoreszenzmessungen des BkF-Signals in den Kryoschnitten des Darms wurde ein blauer Laser mit einer Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ im konfokalen Laserscanningmikroskop verwendet. Das Signal wurde in einer konfokalen Ebene des Darmgewebes erfasst (Abbildung 103A). Lediglich die Belastung von *D. rerio* mit wassergelöstem BkF führte zu

einem deutlichen Fluoreszenzsignal im Darm der Fische. Alle weiteren Expositionsszenarien ergaben keinen signifikanten Transfer von BkF mittels Invertebraten.

Das gleiche Bild spiegelt sich in der CYP450-Aktivität wider: Lediglich die Exposition gegenüber BkF in der Wasserphase führte zu einer signifikant erhöhten Aktivität. Weitere Behandlungsgruppen zeigten lediglich eine basale Aktivität im Bereich der Kontrollen (Abbildung 103B). Eine Ausnahme war die Verfütterung von Chironomiden, die direkt in Wasser gelöstem BkF exponiert worden waren. Die Fütterung von *D. rerio* mit belasteten Chironomiden führte zu einer leicht erhöhten CYP450-Induktion.

Die Etablierung einer weiteren einfachen Nahrungskette mit *D. magna* und *C. riparius* und dem Zebrafisch als Endkonsument konnte erfolgreich nach dem Vorbild von Batel et al. (2016) etabliert werden. Ebenso konnte eine erfolgreiche Partikelaufnahme durch die Modell-Invertebraten und der Transfer über eine Trophiestufe hinweg nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine Akkumulation von Benz(k)fluoranthren weder über die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals von BkF noch über die In vitro-EROD-Aktivität belegt werden. Eine Bioakkumulation kann daher in diesem Versuchsrahmen nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Studien von Santana et al. (2017), Tosetto et al. (2017) sowie Batel et al. (2016). Jedoch kann eine Aufnahme und Weitergabe von MP-Partikeln durch das gewählte Expositionsszenario, Partikelanzahl und -größe, sowie der Versuchsdauer variieren, wie durch eine Metadatenanalyse aktueller MP-Studien mit aquatischen Organismen von Foley et al. (2018) belegt wurde. Für weitere Untersuchungen wären realistischere Szenarien mit natürlichen Referenzpartikeln und alternativen Nahrungspartikeln (Algen, Detritus, Sediment) sinnvoll. Allerdings wurde vielfach gezeigt, dass eine MP-Aufnahme dadurch verringert werden kann (Scherer et al. 2017, Ugolini et al. 2013). Die biologische Bedeutung eines MP-Transfers entlang trophischer Nahrungsketten bleibt somit weiterhin unklar (Au et al. 2017, Burns and Boxall 2018).

7.3.3 Akuter Toxizitätstest mit *Chironomus riparius* (PS und Thiaclopid) (UTUE)

Die Interaktion von MP-Partikeln mit Pestiziden wurde mit dem akuten Toxizitätstest angelehnt an die OECD-Richtlinie 235 an Larven der Zuckmücke *Chironomus riparius* untersucht. Als Endpunkte wurden die Mortalität sowie oxidativer Stress oder neurotoxische Effekte bestimmt.

Das Insektizid Thiaclopid (CAS: 111988-49-9) gehört zur zweiten Generation der Neonicotinoide. Seine Wirkung beruht auf der Bindung an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) in Nervenzellen, wodurch dieser blockiert wird und es zur Nervenüberreizung kommt. Bei *Chironomus riparius*, wie auch bei anderen aquatischen Invertebraten zeigt Thiaclopid eine stark toxische Wirkung, wohingegen die Toxizität der Metabolite geringer ist (BVL 2011). Aufgrund der potenziell endokrin wirksamen Eigenschaften wurde Thiaclopid von der EU auf die Substitutionsliste gesetzt (EC 2015). Im Januar 2020 wurde die Genehmigung für den Wirkstoff Thiaclopid nicht erneuert.

In den Versuchen wurden kryo-gemahlene PS-Partikel (< 50 µm, Dichte 1,05 g/cm³), verwendet. Die Larven wurden in insgesamt sieben Versuchsansätzen gegenüber PS-Partikelkonzentrationen von 150.000 Partikeln/L und/oder 1.000 000 P./L alleine (PS 150.000; PS 1.000.000), 1 µg/L Thiaclopid (THIA), den daraus resultierenden Kombinationen (Mix 150.000; Mix 1.000.000), sowie einer Leitungswasserkontrolle exponiert.

Die chemische Analytik der einzelnen Versuchsgruppen wurde durch Kooperationspartner der Hochschule Fresenius durchgeführt.

7.3.3.1 Mortalität

Die Ergebnisse der Mortalitätsuntersuchungen (Tabelle 31) zeigten ein sich wiederholendes Muster: Larven, die gegenüber der Kombination aus 150.000 PS-Partikeln und 1 µg/L Thiacloprid exponiert wurden (Mix 150.000), wiesen im Vergleich zur reinen THIA-Gruppe in sechs der sieben Versuchsdurchläufe eine geringere Mortalität nach 96 h auf. Da die Kontrollgruppen aller Versuchsdurchläufe (n = 7) statistisch gleich waren, wurden die Ergebnisse der einzelnen Durchläufe zusammengefasst (Abbildung 104). Die signifikant geringere Mortalität in der Mix 150.000-Gruppe im Vergleich zu THIA, spricht für eine Modulation der Toxizität von Thiacloprid durch die zugesetzten PS-Partikel.

Tabelle 31: Übersicht über Ergebnisse der einzelnen Versuchsdurchläufe (Test 1–7): Dargestellt ist die Mortalität nach 96 h in den einzelnen Versuchsgruppen in Prozent.

Versuchs- ansatz	Kontrolle	PS 150.000 (150.000 P./L)	PS 1.000.000 (1.000.000 P./L)	Mix 150.000 P./L + 1 µg/L Thia	Mix 1.000.000 P./L + 1 µg/L Thia	THIA (1 µg/L)
Test 1	8,2 %	6,6 %	-	28,3 %	-	45,2 %
Test 2	8,3 %	6,6 %	-	31,7 %	-	33,9 %
Test 3	8,3 %	1,7 %	3,3 %	41,0 %	55,0 %	52,5 %
Test 4	8,3 %	5,0 %	-	32,8 %	-	43,9 %
Test 5	2,8 %	2,4 %	-	45,1 %	-	57,6 %
Test 6	0,0 %	0,0 %	2,0 %	8,0 %	28,0 %	42,0 %
Test 7	0,0 %	-	0,0 %	28,9 %	35,3 %	22,0 %

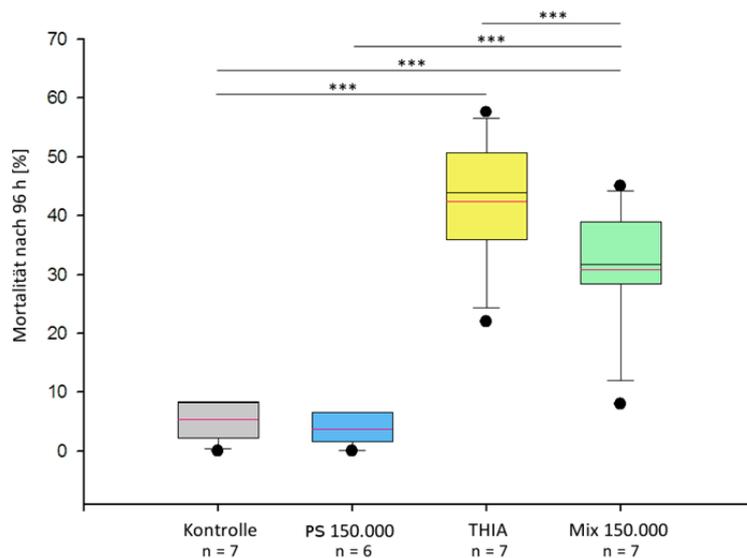


Abbildung 104: Mortalität der Chironomidenlarven nach 96 h in Prozent (Zusammenfassung der Daten Test 1–7): Bei Exposition gegenüber Mix 150.000 Partikel/L trat eine signifikant geringere Mortalität als im reinen Thiaclopridansatz (THIA) auf. (Likelihood-Verhältnis: $\chi^2 = 496,89$; d.f. = 3; $p < 0.001$; Einzelvergleich mit Fisher's exact tests und anschließender Bonferroni-Holm Korrektur. Kontrolle - THIA: alpha-Level= 0,001; $p = 0,0001$; Kontrolle - Mix 150.000: alpha-Level= 0,001; $p = 0,0001$; PS 150.000 - Mix 150.000: alpha-Level= 0,001; $p = 0,0001$; THIA - Mix 150.000: alpha-Level= 0,001; $p = 0,0001$)

Um zu überprüfen, ob höhere Partikelkonzentrationen zu einer stärkeren Modulation der Toxizität führen, wurden in drei der Versuchsdurchläufe die Konzentration von 1.000.000 Partikel/L alleine und in Kombination mit 1 µg/L Thiacloprid (Mix 1 Mio.) eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten keine Abhängigkeit zwischen Partikelkonzentration und Wirkung (Abbildung 105).

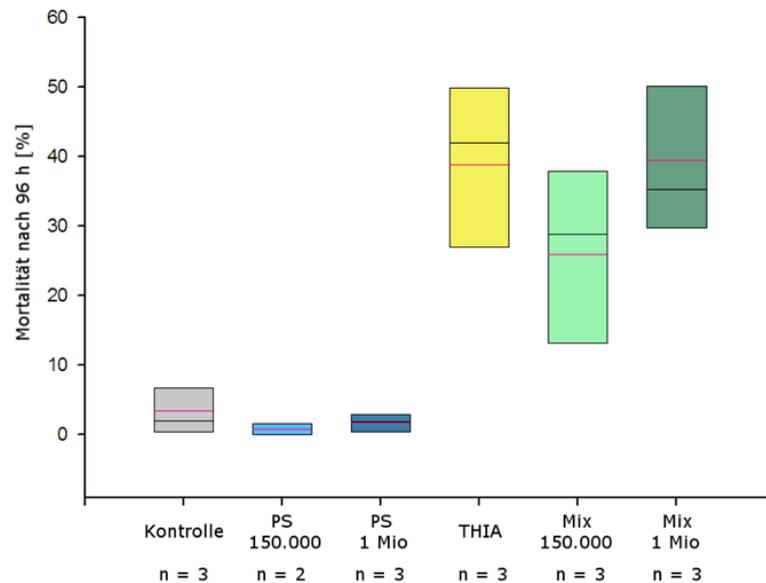


Abbildung 105: Mortalität der Chironomidenlarven nach 96 h in Prozent (Zusammenfassung Test 3, 6, 7): Es traten keine Unterschiede in der Mortalität zwischen den Versuchsgruppen THIA und Mix 1 Mio auf. Signifikante Unterschiede: (Likelihood-Verhältnis: $\chi^2 = 200,09$; d.f. = 5; $p < 0,001$; Einzelvergleich mit Fisher's exact tests und anschließender Bonferroni-Holm Korrektur. Kontrolle - THIA: alpha-Level= 0,001; $p = 0,0001$; Kontrolle - Mix 150.000: alpha-Level= 0,001; $p = 0,0001$; Kontrolle - Mix 1.000.000: alpha-Level= 0,001; $p = 0,0001$; PS 150.000 - Mix 150.000: alpha-Level= 0,001; $p = 0,0001$; PS 1 Mio - Mix 1 Mio: alpha-Level= 0,001; $p = 0,0001$)

7.3.3.2 Chemische Analytik (HSF)

Wie in Kapitel 7.1.1 beschrieben, kann die Modulation der Toxizität des Thiacloprids nicht durch Sorption der Chemikalie an PS-Partikeln erklärt werden. Dies wird auch durch die Ergebnisse der chemischen Analytik (Abbildung 32) unterstützt, welche keine deutlichen Konzentrationsunterschiede zwischen den Ansätzen THIA und Mix 150.000 ergab.

Eine mögliche Erklärung für die verminderte Mortalität in der Versuchsgruppe Mix 150.000 könnte sein, dass sich die Partikel an der peritrophischen Membran im Darm anlagern, und dadurch die Aufnahme des Pestizids einschränken. Eine ähnliche Erklärung liefern Ben-Dov et al. (2003) für die Interaktion von δ -Endotoxinen (produziert von *Bacillus thuringiensis*) mit Neutralrot-Partikeln und Lorenz et al. (2017) für die Interaktion von Thiacloprid mit Al_2O_3 -Nanopartikeln. Nicht zu erklären ist hierdurch allerdings, weshalb die Mortalität bei steigender Partikelkonzentration wieder ansteigt. Ein Erklärungsansatz könnte eine geringere Partikelverfügbarkeit bei höheren Partikelkonzentrationen durch Agglomeration oder andere physikalische Effekte sein.

7.3.3.3 Biomarker

Die aus jeweils 5–10 Tieren bestehenden, in Stickstoff eingefrorenen Proben wurden homogenisiert und mittels verschiedener Biomarkerassays auf Neurotoxizität (Hemmung der AChE/CbE-Aktivität) oder oxidativen Stress (Superoxiddismutase) untersucht. Die Untersuchungen zeigten keine neurotoxischen Effekte und keine Anzeichen auf oxidativen Stress.

Grundsätzlich war eine statistische Auswertung dieser Biomarkertests häufig, vor allem in Ansätzen mit hoher Mortalität, aufgrund zu geringer n-Zahlen und dem daraus zu geringen Probenvolumen nicht möglich.

Tabelle 32: Ergebnisse der chemischen Analytik (Test 1–7) in [$\mu\text{g/L}$]: Dargestellt ist die Realkonzentration Thiacloprid (Nominalkonzentration in Mix und THIA: 1 $\mu\text{g/L}$) in den einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn (obere Zeile) und Versuchsende (untere Zeile). Analytikproben am Versuchsende sind Mischproben der jeweiligen Versuchsgruppe.

Versuchsansatz	Kontrolle	PS 150k (150.000 P./L)	PS 1.000k (1.000.000 P./L)	Mix150k P./L + 1 $\mu\text{g/L}$ THIA	Mix 1.000k P./L + 1 $\mu\text{g/L}$ THIA	THIA (1 $\mu\text{g/L}$)
Test 1	-	-	-	-	-	-
Test 2	- < 0,02	< 0,02 < 0,02	-	- 0,30	-	- 0,24
Test 3	- < 0,02	< 0,02 < 0,02	-	- 0,50	-	- 0,53
Test 4	< 0,02 < 0,02	< 0,02 < 0,02	-	0,29 0,64	-	0,54 0,54
Test 5	< 0,02 < 0,02	< 0,02 < 0,02	-	0,24 0,55	-	0,48 0,23
Test 6	< 0,02 < 0,02	< 0,02 < 0,02	< 0,02 < 0,02	0,74 0,57	0,58 0,70	0,89 0,93
Test 7	< 0,02 < 0,02	-	< 0,02 < 0,02	0,75 0,79	0,53 0,55	0,79 0,53

7.3.4 Akuter Toxizitätstest mit *Chironomus riparius* (PS und Methiocarb) (UTUE)

Methiocarb (CAS: 2032-65-7) ist ein Pestizid aus der Gruppe der Carbamate und steht auf der Beobachtungsliste für ein EU-weites Monitoring (European Commission 2015, Loos et al. 2018). Die Wirkung von Methiocarb basiert auf der reversiblen Hemmung der Acetylcholinesterase durch Bindung des Carbamats an das Serin der Acetylcholinesterase (Fent 2013). Es wird als Akarizid, Insektizid und als Vogelrepellent eingesetzt. Die Verwendung als Molluskizid ist in der EU seit 2014 verboten, im September 2019 wurde die Zulassung für den Wirkstoff insgesamt nicht erneuert (European Commission 2014, 2019, Loos et al. 2018). Der Abbau von Methiocarb und seinen Metaboliten im Boden erfolgt unter Laborbedingung im Zeitraum von unter einem Monat und wird bei hohen pH-Werten noch beschleunigt (BVL 2010). Im Rahmen des EU-weiten Monitorings wurde im Mittel eine Oberflächenkonzentration von 6 ng/L gefunden (Loos et al. 2018).

PS-Partikel (< 50 μm , Dichte 1,05 g/cm^3 , kryo-gemahlen) wurden in den Konzentrationen 150.000 und 1.000.000 Partikel/L jeweils alleine (PS 150.000, PS 1 Mio.) und in Kombination mit den Methiocarb-Konzentrationen 300, 600 und 1.200 $\mu\text{g/L}$ angesetzt (MET 300 + 150.000, MET 300 + 1 Mio., MET 600 + 150.000, MET 600 + 1 Mio., MET 1.200 + 150.000, MET 1.200 + 1 Mio.), ergänzt durch eine Kontrollgruppe, eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) und eine Versuchsgruppe mit 300 $\mu\text{g/L}$ Methiocarb (MET 300) (Test 1). Die Stammlösung wurde auf Grund der schlechten Wasserlöslichkeit von Methiocarb mit

DMSO angesetzt und die DMSO-Konzentration in allen MET-Ansätzen und der Lösungsmittelkontrolle auf 480 µl/L angeglichen. In einen zweiten Versuchsdurchlauf (Test 2) wurde der Versuch mit den MET-Ansätzen 600 µg/L (MET 600) und 1.200 µg/L (MET 1.200) ergänzt.

7.3.4.1 Mortalität

Beim Vergleich beider Testdurchläufe fallen die deutlichen Unterschiede in den Mortalitätsraten zwischen den beiden Tests auf (Abbildung 106). In beiden Experimenten stieg die Mortalitätsrate nach 96 h mit steigender Methiocarb-Konzentration an.

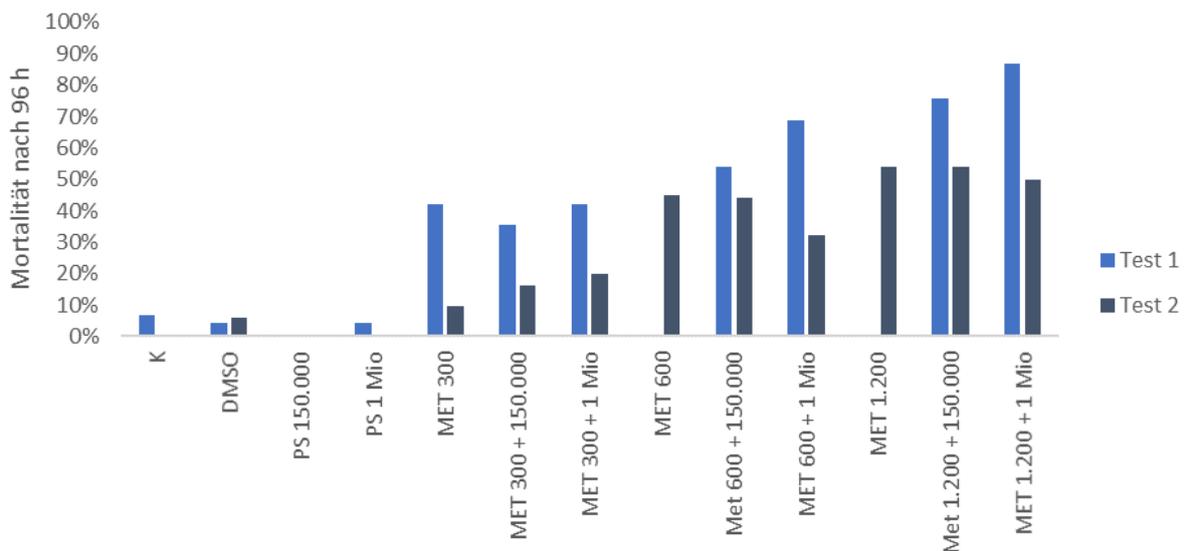


Abbildung 106: Mortalität von *C. riparius*-Larven (L3–4) nach 96 h Exposition mit Methiocarb und PS-Partikeln in Prozent

7.3.4.2 Chemische Analytik (HSF)

Die Resultate der chemischen Analytik zeigten ebenfalls starke Unterschiede zwischen den Realkonzentrationen in den beiden Versuchsansätzen sowie einen starken Konzentrationsrückgang über die Expositionsdauer in beiden Versuchen (Tabelle 33). Da es beim Ansetzen der Methiocarb-Stammlösungen keine methodischen Unterschiede gab, gibt es bisher keine Erklärungen für die Diskrepanzen zwischen den Anfangskonzentrationen. Gründe für die Unterschiede zwischen Nominal- und Realkonzentration in den Stammlösungen könnten die schlechte Löslichkeit der Substanz und Adsorptionsprozesse an den Wänden der Glasflasche sein. Der Abbau von Methiocarb während der 96-stündigen Expositionsdauer könnte durch pH-abhängige Hydrolyse, Metabolisierung durch die Organismen und mikrobiellen Abbau verursacht worden sein (BVL 2010).

7.3.4.3 Biomarker

In beiden Versuchen zeigte sich bei den untersuchten Carboxylesterasen (AChE, CbE (p-NPA) und CbE (p-NPV)) eine Aktivitätsabnahme bei steigenden Methiocarb-Konzentrationen. Eine Modulation der Toxizität durch die PS-Partikel konnte nicht gezeigt werden. Auf Grund geringer n-Zahlen konnte eine statistische Datenanalyse nicht durchgeführt werden.

Tabelle 33: Ergebnisse der chemischen Analytik (Test 1 und Test 2) in [$\mu\text{g/L}$]: Dargestellt ist die Realkonzentration des Methiocarbs in den einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn (obere Zeile) und Versuchsende (untere Zeile). Analytikproben am Versuchsende sind Mischproben des jeweiligen Versuchsansatzes

Versuchsgruppe	Test 1	Test 2
Kontrolle	< 0,02 < 0,02	-
DMSO	< 0,02 < 0,02	< 0,02 < 0,02
PS 150.000	< 0,02 < 0,02	-
PS 1.000.000	< 0,02 < 0,02	-
MET 300 $\mu\text{g/L}$	188 39,8	35,7 5,4
MET 300 $\mu\text{g/L}$ + 150.000 P./L	159 47,6	31,5 4,9
MET 300 $\mu\text{g/L}$ + 1.000.000 P./L	80,4 31,4	38,5 5,1
MET 600 $\mu\text{g/L}$	-	69,8 11,2
MET 600 $\mu\text{g/L}$ + 150.000 P./L	239 112	72,9 8,5
MET 600 $\mu\text{g/L}$ + 1.000.000 P./L	198 136	69,2 9,4
MET 1200 $\mu\text{g/L}$	-	150 31,0
MET 1200 $\mu\text{g/L}$ + 150.000 P./L	498 324	223 17,8
MET 1200 $\mu\text{g/L}$ + 1.000.000 P./L	367 254	219 16,1

7.3.5 Akuter Toxizitätstest mit *Chironomus riparius* (UTUE)

Neben einer Kontrollgruppe wurden 0,5 und 1 g Halensee-Sediment (HS 0,5 und HS 1,0) und 0,5 g der isolierten Fraktion (1,7–1,9 g/cm³; F 0,5) in 100 mL gefiltertem Leitungswasser dispergiert und auf 30 g Quarzsand gegeben. Das Sediment wurde durch das UFZ zur Verfügung gestellt. Pro Versuchsgruppe wurden 12 Replikate angesetzt und pro Glas fünf Chironomidenlarven eingesetzt. Betrachtet wurde die Mortalität nach 96 h.

7.3.5.1 Mortalität

Die Ergebnisse zeigen nach 96 h eine vergleichsweise hohe Mortalität in der Fraktion (F 0,5) des Halensee-Sediments (Abbildung 107). Ob dieser Effekt durch das Sediment oder durch Rückstände des Separationsmediums Natriumpolywolframat verursacht wurde, ließ sich im Rahmen dieses Projekts nicht mehr ermitteln.

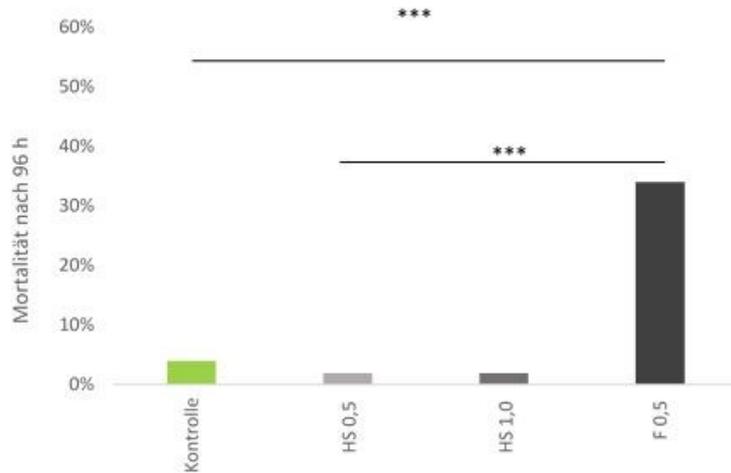


Abbildung 107: Mortalität von *C. riparius*-Larven (L3–4) nach 96 h Exposition gegenüber 0,5 und 1 g Halensee-Sediment (HS 0,5; HS 1) und 0,5 g der Fraktion 1,7–1,9 g/cm³ (F 0,5) in Prozent (Likelihood-Verhältnis: $X^2 = 34,228$ d.f. = 3; $p < 0,001$; Einzelvergleich mit Fisher's exact tests und anschließender Bonferroni-Holm Korrektur: Kontrolle – F 0,5: alpha-Level = 0,001; $p = 0,0002$; HS 0,5 – FS 0,5: alpha-Level = 0,001; $p < 0,0001$)

Um zu überprüfen, ob Reifeninhaltsstoffe in den Chironomiden nachzuweisen sind, wurden exponierte Larven in Technovit 7100® (Kunstharz) eingebettet, Dünnschnitte angefertigt und diese zur Elementanalytik an das UFZ Leipzig gegeben.

7.3.6 Exposition adulter *Marisa cornuarietis* (PS und Cypermethrin) (UTUE)

Um die Wechselwirkung von MP-Partikeln mit organischen Verbindungen zu untersuchen, wurden – neben zahlreichen Tests zur Findung geeigneter Testsubstanzen – Versuche mit adulten *Marisa cornuarietis* durchgeführt. Für Angaben zum Versuchsorganismus und zu Material und Methoden siehe Kapitel 7.2.6. Das Insektizid Cypermethrin (CAS 52315-07-8) gehört zur Gruppe der Typ-II Pyrethroide. Seine neurotoxische Wirkung beruht auf der Öffnung der Na⁺-Kanäle der Nervenzellen, was zu Krämpfen und Lähmung des Zielorganismus führt. Cypermethrin gilt als sehr toxisch für aquatische Invertebraten und Fische, und zusätzlich ist mit starker Bioakkumulation zu rechnen. Aufgrund der starken Sorption an Partikel kommt es in Gewässern zu einer Verlagerung des Wirkstoffs in die Sedimentphase, wo die Halbwertszeit unter 14 Tagen liegt (BVL 2012). Bei Untersuchungen von Singh and Singh (2009) wurde Cypermethrin als Molluskizid gegen die Süßwasserschnecke *Lymnaea acuminata* eingesetzt und LC₅₀-Werte zwischen 10,39–65,84 mg/L, abhängig von Wassertemperatur und Sauerstoffgehalt, ermittelt.

Es wurden jeweils 10 Tiere gegenüber gefiltertem Leitungswasser (Kontrolle), Polystyrol-Partikeln (10.000 Partikel/L; PS) und Cypermethrin (5; 12,5; 25; 50; 50 mg/L + 10.000 PS-Partikel/L; CYP) exponiert. Auf Grund der schlechten Löslichkeit des Reinstoffs ($\log K_{OW} = 6,6$), wurde für die Cypermethrin-Ansätze die Formulierung „Cyperkill Forst“ eingesetzt. Die Fütterung erfolgte nach drei Tagen, am vierten Tag wurde ein Wasserwechsel durchgeführt. Verhalten und Mortalität wurden zweimal täglich bonitiert, verstorbene Tiere wurden dabei entnommen. Aufgrund erhöhter Mortalität in den Cypermethrin-Ansätzen wurde der Versuch nach 9 Tagen beendet.

7.3.6.1 Verhalten

In Vorversuchen zeigten Paradiesschnecken, welche gegenüber ansteigenden Pestizidkonzentrationen exponiert wurden, unterschiedliche Verhaltensweisen. In hohen Konzentrationen krochen die Tiere zunächst an die Wasseroberfläche bzw. hefteten sich oberhalb der Wasseroberfläche an der Scheibe des Aquariums an. Nach ca. 1–2 Tagen zogen sich diese Tiere häufig tief in ihr Gehäuse zurück, verschlossen die Öffnung mit dem Operculum und verblieben regungslos am Boden des Beckens.

Um dieses Verhalten zu untersuchen, wurden die einzelnen Schnecken mit farbigen Kautschukbändern markiert und jedes Individuum zweimal täglich, an insgesamt 17 Zeitpunkten in folgende Kategorien eingeordnet:

- [K1] Aktiv, an, bzw. oberhalb der Wasseroberfläche
- [K2] Aktiv, am Boden oder an der Aquarienwand
- [K3] Inaktiv, aber nicht vollständig ins Gehäuse eingezogen
- [K4] Inaktiv, vollständig eingezogen und mit Operculum verschlossen

Zu jedem Zeitpunkt wurde nur die Anzahl der lebenden Schnecken berücksichtigt. Abbildung 108 zeigt den prozentualen Anteil der Tiere in den verschiedenen Verhaltenskategorien über den gesamten Versuchszeitraum hinweg gemittelt.

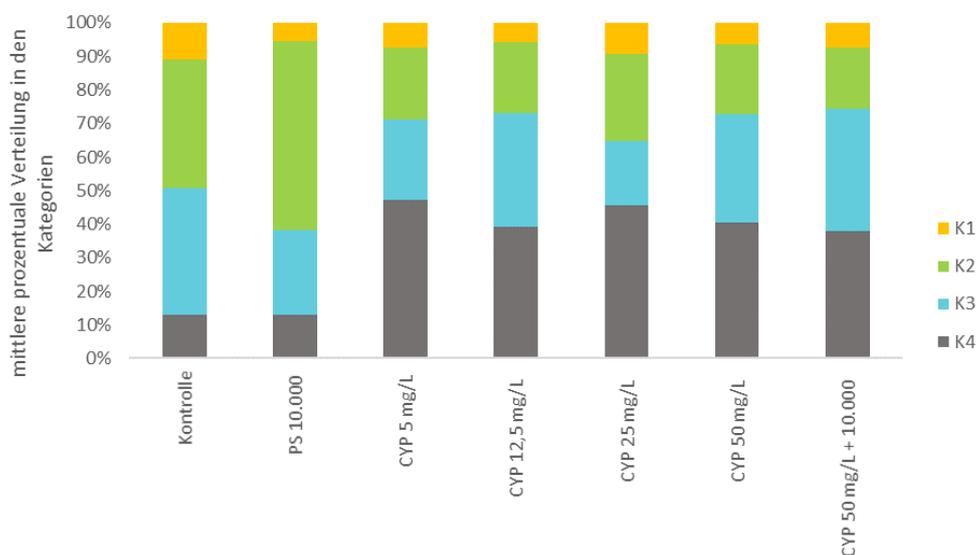


Abbildung 108: Verhalten von *M. cornuarietis* bei Exposition gegenüber Cypermethrin: Kategorie 1 [K1], gelb: Aktiv, oberhalb der Wasseroberfläche, Kategorie 2 [K2], grün: Aktiv, am Boden oder an der Aquarienwand, Kategorie 3 [K3], blau: Inaktiv, aber nicht vollständig ins Gehäuse eingezogen, Kategorie 4 [K4], grau: Inaktiv, vollständig eingezogen und mit Operculum verschlossen. Dargestellt ist der prozentuale Mittelwert der Verteilung der lebenden Tiere in den jeweiligen Verhaltenskategorien über den gesamten Testzeitraum (9 d)

Das in den Vorversuchen beobachtete Verhalten zeigte sich auch im Hauptversuch in allen CYP-Ansätzen: Die Tiere der CYP-Versuchsgruppen (CYP 5 mg/L, CYP 12,5 mg/L, CYP 25 mg/L, CYP 50 mg/L, CYP 50 mg/L + 10.000 Partikel/L) waren in den ersten beiden Tagen nach Versuchsbeginn noch aktiv (K1 und K2), zogen sie aber ab Tag 3 zurück und verhielten sich bis zum Versuchsende inaktiv (K3 und K4). Bei der Fütterung nahmen diese Tiere keine Nahrung auf. Die Tiere in der Kontrolle und im PS-Ansatz waren während der gesamten Versuchsdauer aktiv, nur unterbrochen von kurzen inaktiven Phasen. Alle Tiere dieser Versuchsgruppen nahmen Futter auf. Obgleich dieses zeitliche Verhalten in Abbildung 112 nicht wiedergegeben wird, zeigt die Abbildung deutlich, dass sich auch im Durchschnitt die CYP-exponierten Tiere deutlich von den beiden anderen Gruppen unterscheiden.

7.3.6.2 Mortalität

Auch die Mortalität von bis zu 30 % in den CYP-Ansätzen (12,5; 25; 50 und 50 mg/L + 10.000 Partikel/L), zeigte den deutlichen Effekt des Pestizids auf *M. cornuarietis*. In der Kontrolle und in PS 10.000 trat keine Mortalität auf (Tabelle 34).

7.3.6.3 Biomarker

Bei allen untersuchten Endpunkten traten durch PS-MP-Partikel (10.000 P./L) keine neurotoxischen (Carboxylesterasen-Aktivität) oder proteotoxischen Effekte (Hsp70-Level) bei *Marisa cornuarietis* auf und es zeigten sich keine Anzeichen für oxidativen Stress. Die Carboxylesteraseaktivität (p-NPA) war im Ansatz CYP 50 mg/L + 10.000 Partikel/L im Vergleich zum Versuchsansatz PS 10.000 Partikel/L signifikant gehemmt (Tabelle 34).

Tabelle 34: Ergebnisse der Biomarkeruntersuchungen und Mortalität. (AChE: Acetylcholinesterase, CbE: Carboxylesterase, p-NPA: 4-Nitrophenylacetat (Substrat), p-NPV: 4-Nitrophenylvalerat (Substrat)). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, statistische Signifikanzen sind durch Indexbuchstaben gekennzeichnet (CbE (p-NPA): Tukey-Kramer HSD: PS 10.000 – CYP 50 mg/L + 10.000 P./L: $p = 0,0071$).

Versuchsgruppe	AChE-Aktivität [mU/mg Protein]	CbE-Aktivität (p-NPA) [mU/mg Protein]	CbE-Aktivität (p-NPV) [mU/mg Protein]	Hsp70-Level	Lipidperoxide [CHP-Äquivalente]	Mortalität
Kontrolle (n = 10)	24,1 \pm 5,5	146 ^{a,b} \pm 37	24,4 \pm 7,4	1,41 \pm 0,63	16,2 \pm 3,0	0 %
PS 10.000 P./L (n = 10)	20,8 \pm 4,3	173 ^a \pm 64	28,1 \pm 11,1	1,33 \pm 0,67	16,5 \pm 2,9	0 %
CYP 5 mg/L (n = 10)	20,9 \pm 8,5	125 ^{a,b} \pm 40	21,2 \pm 7,9	1,35 \pm 0,17	18,0 \pm 2,8	0 %
CYP 12,5 mg/L (n = 7)	18,6 \pm 7,8	90,5 ^{a,b} \pm 20,4	15,7 \pm 5,8	1,36 \pm 0,44	17,4 \pm 3,4	30 %
CYP 25 mg/L (n = 9)	19,6 \pm 8,5	112 ^{a,b} \pm 63	20,5 \pm 11,1	1,34 \pm 0,35	15,8 \pm 2,1	10 %
CYP 50 mg/L (n = 8)	16,8 \pm 8,0	93,6 ^{a,b} \pm 21,9	15,0 \pm 5,2	1,33 \pm 0,16	15,3 \pm 2,5	20 %
CYP 50 mg/L + 10.000 P./L (n = 7)	15,0 \pm 4,1	87,0 ^b \pm 23,7	14,7 \pm 4,7	1,22 \pm 0,43	17,1 \pm 2,0	30 %
Effekte?	Nein	durch Cypermethrin	nein	nein	Nein	durch Cypermethrin

7.3.7 Exposition adulter *Marisa cornuarietis* (PS und Methiocarb) (UTUE)

In Test 1 wurden je 10 Tiere gegenüber Leitungswasser, einem PS-Partikelansatz (10.000 Partikel/L), Methiocarb (MET, vgl. 7.3.4) in den Konzentrationen 5 μ g/L und 10 μ g/L und der Kombination von 10 μ g/L MET + 10.000 Partikel/L für 9 Tage exponiert. Ein Wasserwechsel (50 %) erfolgte an Tag 4.

In Test 2 wurden 30 Tiere (3 x 10) im Blockdesign jeweils gegenüber 1 mg/L und 10 mg/L Methiocarb (MET 1 und MET 10), der Kombination von 1 mg/L Methiocarb mit 10.000, 100.000 und 1.000.000 PS-Partikeln/L (Mix 10.000, Mix 100.000, Mix 1 Mio.) sowie einer Lösungsmittelkontrolle mit 0,6 mL/L DMSO exponiert. Der Zusatz von DMSO zur MET-Stammlösung war aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit in der erhöhten Konzentration notwendig. Alle MET-Versuchsansätze wurden auf die DMSO-Konzentration 0,6 mL/L eingestellt. Wasserwechsel erfolgten alle 2–3 Tage, dabei wurden 33 % des Beckeninhalts ausgetauscht und Partikel und/oder Methiocarb in den entsprechenden Konzentrationen nachdotiert. Der Versuch wurde nach 16 Tagen beendet.

7.3.7.1 Chemische Analytik (HSF)

Wie bereits in Kapitel 7.3.4 beschrieben, zeigte die Analytik der Wasserproben von Test 2 auch hier einen starken Unterschied von über 80 % zwischen den Nominal- und Realkonzentrationen der MET-Ansätze bei Versuchsbeginn. Obwohl bei jedem Wasserwechsel das entnommene Volumen durch frisch angesetzte Lösungen in der entsprechenden Konzentration ersetzt wurde, nahm die Methiocarb-Konzentration auf Grund des starken Abbaus über die Gesamtdauer der Exposition um weitere 70–80 % ab.

7.3.7.2 Verhalten

In beiden Tests wurde das Verhalten der Tiere beobachtet und kategorisiert (zur Vorgehensweise siehe Kapitel 7.3.6.1). In Test 1 waren die Tiere aktiv und es traten keine Verhaltensunterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen auf. Im Vergleich zur Kontrolle hatten die geringen Methiocarb-Konzentrationen (5 µg/L, 10 µg/L) keinen Einfluss auf die Tiere und auch zwischen den Ansätzen PS 10.000 und MET 10 µg/L + 10.000 Partikel/L zeigten sich keine Unterschiede.

In Test 2 waren die Tiere über die gesamte Versuchsdauer aktiv. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die Versuchsgruppen mit 1 mg/L Methiocarb (MET 1, Mix 10.000, Mix 100.000, Mix 1 Mio.) keine Unterschiede zur Kontrollgruppe oder dem PS 1 Mio.-Ansatz. Auffälliges Verhalten trat in der Versuchsgruppe MET 10 mg/L auf. Die Tiere waren wenige Stunden nach Versuchsbeginn inaktiv und nahmen bei der Fütterung keine Nahrung auf. Ab dem dritten Tag trat Mortalität auf. In Abbildung 109 wird der prozentuale Anteil der Tiere in den verschiedenen Verhaltenskategorien von Test 1 (a.) und 2 (b.) über den gesamten Versuchszeitraum gemittelt dargestellt.

7.3.7.3 Mortalität

Während in Test 1 keine Mortalität in den Ansätzen auftrat, zeigte sich in Test 2 eine erhöhte Mortalität von 40 % im Versuchsansatz MET 10 (Tabelle 36). Um noch Vergleichsproben für die Untersuchung der Gewebeintegrität der Mitteldarmdrüse und für Biomarkerassays zu generieren, wurden die überlebenden Tiere in MET 10 bereits an Tag 5 beprobt.

7.3.7.4 Histopathologie

Für histopathologische Untersuchungen wurden Teile der Mitteldarmdrüsen der überlebenden Schnecken aus Test 2 beprobt und in mit PBS gepuffertem, 2 %igem Glutaraldehyd fixiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden die Proben geschnitten (4 µm) und mit Hämatoxylin/Eosin und PAS-Färbung (Periodsäure/Alcianblau/Schiffs Reagenz) gefärbt.

Die randomisierte Auswertung erfolgte semi-quantitativ in die Kategorien 1–5, wobei 1 den Kontrollstatus, 3 den Reaktionszustand und 5 den Destruktionszustand bezeichnet (Abbildung 110); Kategorien 2 und 4 bezeichnen die jeweiligen Übergangsstadien (Osterauer et al. 2010) (Tabelle 35).

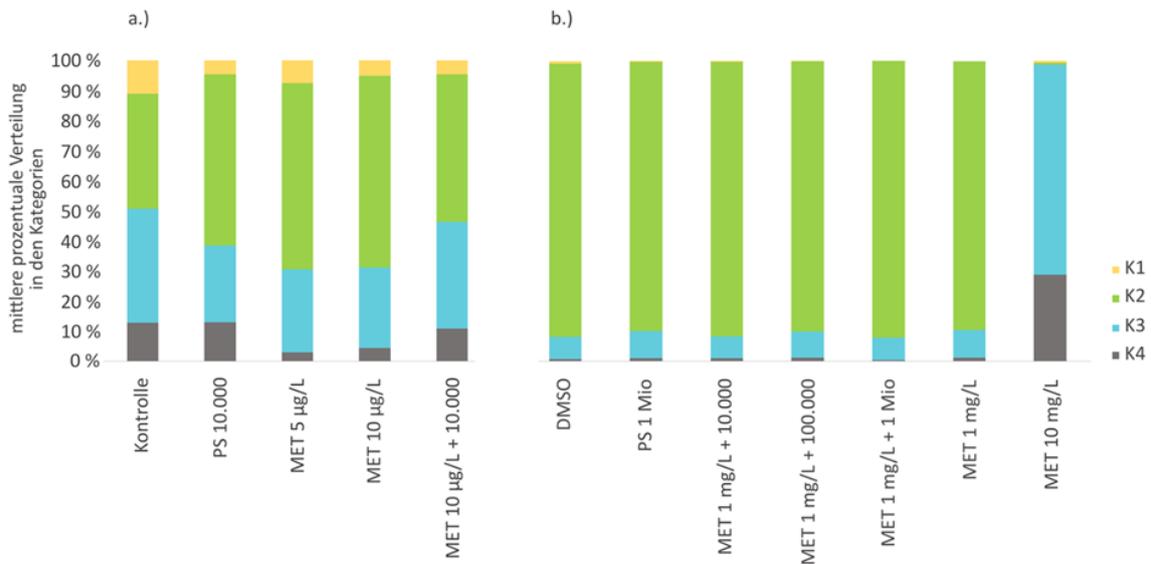


Abbildung 109: Verhalten von *M. cornuarietis* bei Exposition gegenüber Methiocarb, Test 1 (a.) und Test 2 (b.); Kategorie 1 [K1], gelb: Aktiv, oberhalb der Wasseroberfläche, Kategorie 2 [K2], grün: Aktiv, am Boden oder an der Aquarienwand, Kategorie 3 [K3], blau: Inaktiv, aber nicht vollständig ins Gehäuse eingezogen, Kategorie 4 [K4], grau: Inaktiv, vollständig eingezogen und mit Operculum verschlossen. Dargestellt ist der prozentuale Mittelwert der Verteilung der lebenden Tiere in den jeweiligen Verhaltenskategorien über den gesamten Testzeitraum (Test 1: 2 d, Test 2: 16 d)

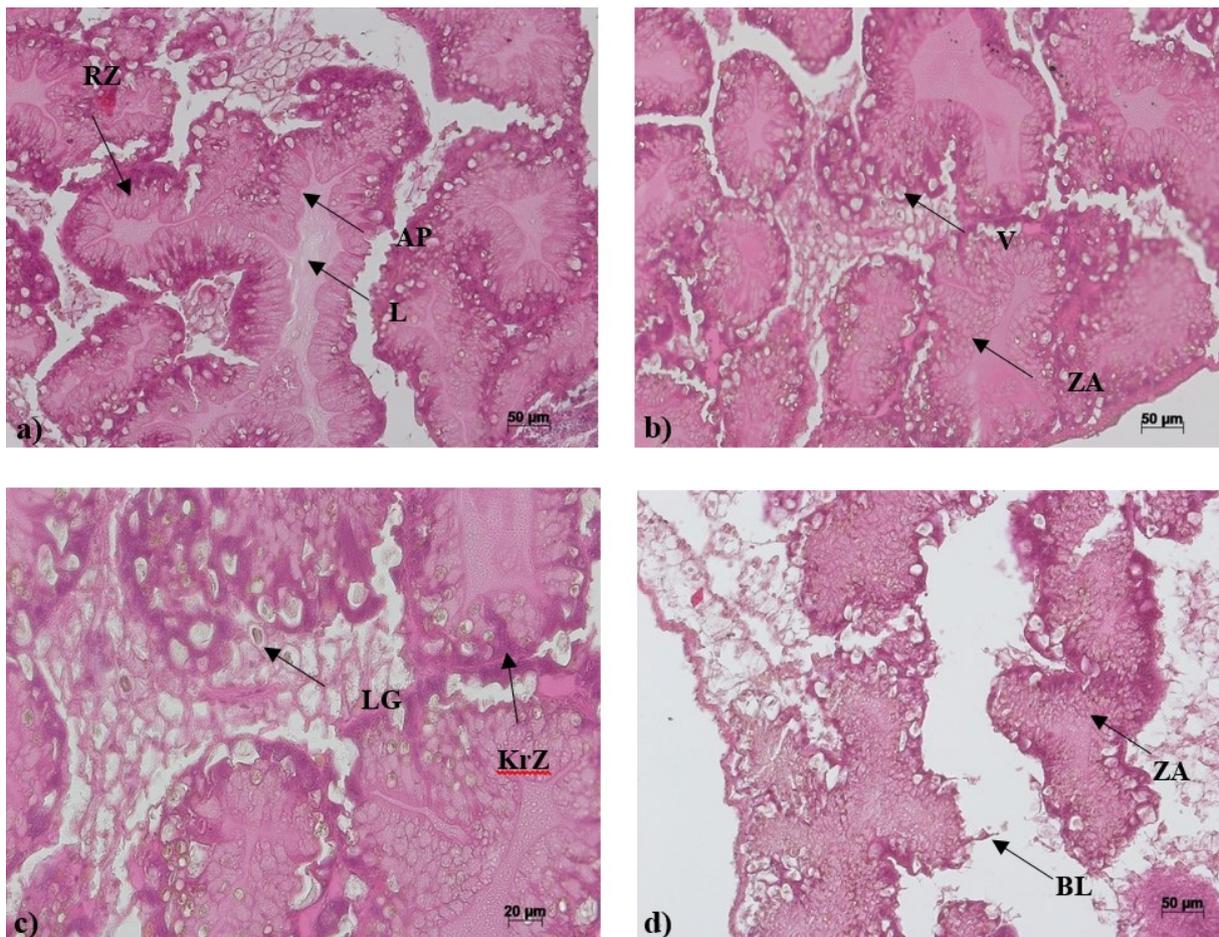


Abbildung 110: Histopathologische Schnitte der Mitteldarmdrüse von *Marisa cornuarietis*: a) Kontrollzustand (Kategorie 1; 20fache Vergrößerung; HE-Färbung), b) Reaktionszustand (Kategorie 3; 20fache Vergrößerung, HE-Färbung), c) Reaktionszustand (Kategorie 3; 40fache Vergrößerung, HE-Färbung), d) Destruktionszustand (Kategorie 5; 20fache Vergrößerung, HE-Färbung). Zeichenerklärung: RZ=Resorptionszellen; AP=Apex; L=Lumen; V=Vakuole; ZA=Zellabgabe; LG=Lipofuszingranula; KrZ=Kryptenzelle; BL=Basallamina.

Tabelle 35: Histopathologische Merkmale der Mitteldarmdrüse von *M. cornuarietis*: semi-quantitative Kategorisierung 1–5.

Kat. 1: Kontrollzustand	Kat. 3: Reaktionszustand	Kat. 5: Destruktionszustand
Sehr enges Lumen der Tubuli	Lumen stark vergrößert	Starke apikale Abgabe von Zellen ins Lumen, Tubuli teilweise zerstört
Glatte Apex, Mikrovilli gleichmäßig	Apex unruhig, vereinzelt Zellabgabe in das Lumen, flaches Epithel	Apex zerstört
Deutliche Kompartimentierung der Resorptionszellen mit von apikal nach basal zunehmender Größe der Vakuolen	Größere Vakuolen überall in den Resorptionszellen	Zerstörung der Kompartimentierung
Kryptenzellen unauffällig	Vermehrtes Auftreten von großen Kryptenzellen mit großen Zellkernen	Destruktion der Kryptenzellen mit zerstörten Zellkernen
Basallamina intakt	Leichte Ablösung der Basallamina; unregelmäßige Zellbasis	Ablösung der Basallamina
Regelmäßige Zellform	Unregelmäßige Zellform	Lyse der Zellen; Zellnekrosen
Sehr kleine oder fehlende Interzellularen	Erweiterte Interzellularräume	Große Interzellularräume

7.3.7.4.1 Qualitative Beschreibung

In der Kontrollgruppe (DMSO) besaßen die Mitteldarmdrüsentubuli leicht erweiterte Lumina, die zum Teil von unregelmäßigen Apices der Epithelzellen begrenzt wurden. Es waren Kryptenzellen und Exkretzellen mit Vakuolen erkennbar. In den Versuchsansätzen mit 1 mg/L Methiocarb (MET 1, Mix 10.000, Mix 100.000, Mix 1 Mio.) waren die Lumina im Vergleich zur Kontrolle erweitert, die Apices unregelmäßiger geformt, und es kam vereinzelt zu apikaler Zellabgabe ins Lumen. Die Mitteldarmdrüsen der Schnecken aus der Exposition MET 10 zeigten stark geweitete Lumina, welche häufig mit Konglomeraten abgelöster Zellen gefüllt waren. Es trat eine erhöhte Anzahl an Kryptenzellen und Exkretvakuolen auf. Die Gewebestrukturen lösten sich teilweise auf, die Kompartimentierung der Zellen sowie die Zellgrenzen und die Apices der Epithelzellen waren häufig nicht mehr zu erkennen.

7.3.7.4.2 Semi-quantitative Bewertung

Die semi-quantitative Auswertung verdeutlichte, dass die Gewebeintegrität der Mitteldarmdrüsen aller gegenüber Methiocarb exponierter Tiere (MET 1, Mix 10.000, Mix 100.000, Mix 1 Mio., MET 10) schlechter war als in der Kontrollgruppe. Bei MET 10 war dieser Unterschied signifikant. Der Zustand der Mitteldarmdrüsen der Versuchsgruppe PS 1 Mio. war vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe. Zudem unterschied sich die Gewebeintegrität der Tiere in den Versuchsgruppen Mix 10.000, Mix 100.000, Mix 1 Mio. nicht zu der in der Versuchsgruppe MET 1. Folglich trat keine Modulation des Effektes durch MP auf (Abbildung 111, Tabelle 36).

7.3.7.5 Biomarker

Bei allen untersuchten Endpunkten traten keine durch PS-Partikel hervorgerufenen Effekte auf und auch eine Modulation der Toxizität von Methiocarb durch die Partikel konnte nicht nachgewiesen werden. Alle aufgetretenen Effekte wurden durch Methiocarb verursacht (Tabelle 36).

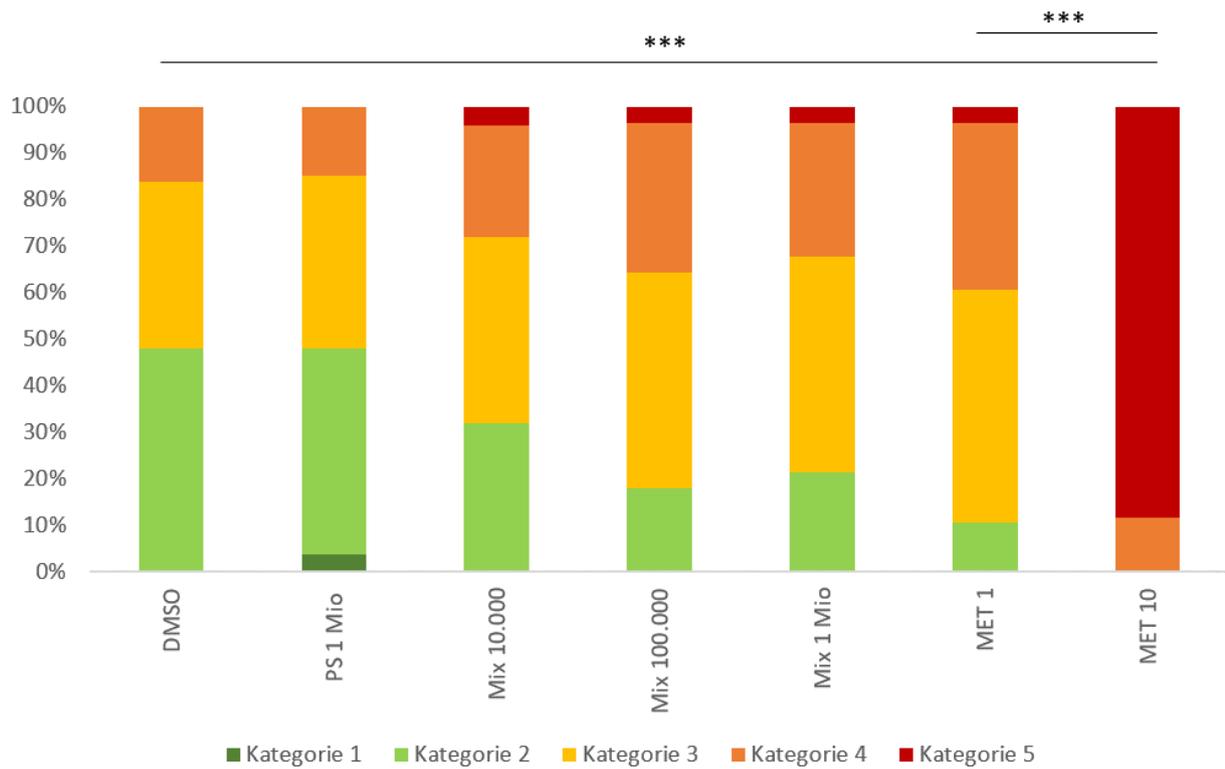


Abbildung 111: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der Mitteldarmdrüse von *M. cornuarietis*, Test 2; dargestellt in prozentualer Verteilung der Proben in den Kategorien 1–5 (Kategorie 1: Kontrollzustand, Kategorie 2: leichte Reaktion, Klasse 3: Reaktionszustand, Kategorie 4: beginnende Destruktion, Kategorie 5: Destruktionszustand) in den einzelnen Treatments DMSO (0,6 mL/L), PS 1 Mio. (1.000.000 P./L), Mix 10.000 P./L + 1 mg/l Methiocarb, Mix 100.000 P./L + 1 mg/L Methiocarb, Mix 1.000.000 P./L + 1 mg/L Methiocarb. Signifikante Unterschiede: *** = $p \leq 0,001$; Likelihood Ratio χ^2 Test: DMSO-MET 10: $\chi^2 = 49,053$, $df = 3$, $n = 42$, $p \leq 0,0001$; MET 1–MET 10: $\chi^2 = 41,372$, $df = 3$, $n = 45$, $p \leq 0,0001$)

Tabelle 36: Biomarkeruntersuchungen, Mittelwerte der semi-quantitativen Bewertung der Gewebsintegrität der Mitteldarmdrüse in Kategorien 1–5 und Mortalität. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD und die Mortalität in Prozent. Abkürzungen: AChE: Acetylcholinesterase, CbE: Carboxylesterase, p-NPA: 4-Nitrophenylacetat (Substrat), p-NPV: 4-Nitrophenylvalerat (Substrat), SOD: Superoxiddismutase. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Indexbuchstaben gekennzeichnet. (AChE: nested ANOVA: $df = 6, 27$; $F = 7,26$, $p < 0,0001$; (DMSO - MET 10: $p < ,0001$; DMSO - MET 1: $p = 0,0015$; DMSO - Mix 100 000: $p = 0,0133$; DMSO - Mix 1 Mio: $p = 0,0232$) ; CbE (p-NPV): nested ANOVA: $df = 6, 27$; $F = 3,62$, $p = 0,0021$; (DMSO - MET 10: $p = 0,0249$); Gewebeintegrität: Likelihood Ratio χ^2 Test: DMSO - MET 10: $\chi^2 = 49,053$, $df = 3$, $n = 42$, $p \leq 0,0001$; MET 1 - MET 10: $\chi^2 = 41,372$, $df = 3$, $n = 45$, $p \leq 0,0001$; SOD: Die Statistik zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen allen Versuchsgruppen auf (nested ANOVA , $df = 6, 177$; $F = 3,2076$, $p = 0,0052$), allerdings ist es nicht möglich, durch Posthoc Test zwischen den einzelnen Gruppen zu differenzieren).

Versuchsgruppe	AChE-Aktivität	CbE-Aktivität (p-NPA)	CbE-Aktivität (p-NPV)	SOD-Aktivität	Gewebsintegrität Mitteldarmdrüse (MW, Kat.1–5)	Mortalität
DMSO (-Kontrolle) (n = 30)	21,4 ^a $\pm 7,9$	184 ± 102	30,3 ^a $\pm 14,7$	225 ± 73	2,69 ^a $\pm 0,73$	0 %
PS 1 Mio P./L (n = 30)	19,0 ^{a,b} $\pm 5,0$	190 ± 94	32,0 ^a $\pm 15,4$	247 ± 72	2,62 ^{a,b} $\pm 0,78$	0 %
MET 1 (n = 30)	14,3 ^{b,c} $\pm 4,8$	174 ± 57	27,5 ^{a,b} $\pm 8,1$	281 ± 79	3,32 ^a $\pm 0,71$	0 %
Mix 10.000 (n = 30)	19,0 ^{a,b,c} $\pm 22,5$	178 ± 76	27,9 ^{a,b} $\pm 13,6$	281 ± 70	2,95 ^{a,b} $\pm 0,85$	0 %
Mix 100.000 (n = 30)	15,1 ^b $\pm 6,2$	165 ± 59	26,3 ^{a,b} $\pm 8,6$	268 ± 74	3,21 ^{a,b} $\pm 0,77$	0 %
Mix 1 Mio (n = 30)	15,4 ^{b,c} $\pm 4,4$	212 ± 80	29,7 ^a $\pm 11,9$	268 ± 75	3,15 ^{a,b} $\pm 0,79$	0 %
MET 10* (n = 18)	9,2 ^c $\pm 4,5$	151 ± 51	18,8 ^b $\pm 5,9$	214 ± 50	4,87 ^b $\pm 3,71$	40 %*
Effekte?	durch Methiocarb	Nein	durch Methiocarb	Nein	durch Methiocarb	durch Methiocarb

*Proben der Gruppe MET 10 wurden aufgrund erhöhter Mortalität bereits nach 5 Tagen entnommen.

7.3.8 Exposition adulter *Marisa cornuarietis* (PS und Amitriptylin) (UTUE)

Amitriptylin ist ein trizyklisches Antidepressivum und gehört zu den nichtselektiven Monoamin-Rückaufnahme-Inhibitoren (NSMRI). Diese Gruppe zeigt ein in Deutschland weitgehend konstantes Verordnungsvolumen und wird außer gegen Depressionen auch bei chronischen Schmerzzuständen verschrieben (Lohse and Müller-Oerlinghausen 2018). In Oberflächengewässern wird Amitriptylin regelmäßig in Konzentrationen im einstelligen Nanogramm-Bereich nachgewiesen, vereinzelt wurden auch Werte bis zu 71 ng/L gefunden (Aminot et al. 2015, Baker and Kasprzyk-Hordern 2013, Ferrey et al. 2015).

Es wurden je 10 Tiere gegenüber Leitungswasser (Kontrolle), 1 mg/L Amitriptylin (AM 1) und der Kombination aus 1 mg/L Amitriptylin + 1.000.000 PS-Partikel/L (AM 1 + 1 Mio.) exponiert. Auch in diesem Versuch wurden kryo-gemahlte PS-Partikel (< 100 µm, Dichte 1,05 g/cm³) verwendet. Es wurden regelmäßige Wasserwechsel durchgeführt und die Tiere mehrmals während des Versuchs mit Karotten gefüttert. Diese wurden vor dem Einsetzen gewogen und die Reste, falls vorhanden, wurden nach 24 h entnommen und erneut gewogen. Der Versuch wurde nach 16 Tagen beendet.

7.3.8.1 Verhalten

Die Tiere in den Amitriptylin-Ansätzen zeigten ab dem vierten Tag ein auffälliges Verhalten: Ab diesem Zeitpunkt befand sich immer die Mehrzahl der Tiere direkt an der Wasseroberfläche („Kletterverhalten“) (Abbildung 112). Auch die Nahrungsaufnahme war in diesen Gruppen im Vergleich zur Kontrolle geringer.

Mit und ohne 1.000.000 PS-Partikel/L führte das Antidepressivum Amitriptylin zu diesem „Kletterverhalten“. Die von Fong and Molnar (2013) beschriebenen Anhaftungsprobleme bei verschiedenen marinen Schnecken nach Exposition gegenüber unterschiedlichen Antidepressiva konnten in diesem Versuch für Amitriptylin und *Marisa cornuarietis* nicht gezeigt werden. Auch ein zu geringer Sauerstoffgehalt in den Becken kann als Grund für dieses Verhalten ausgeschlossen werden, da für ausreichende Belüftung gesorgt wurde.

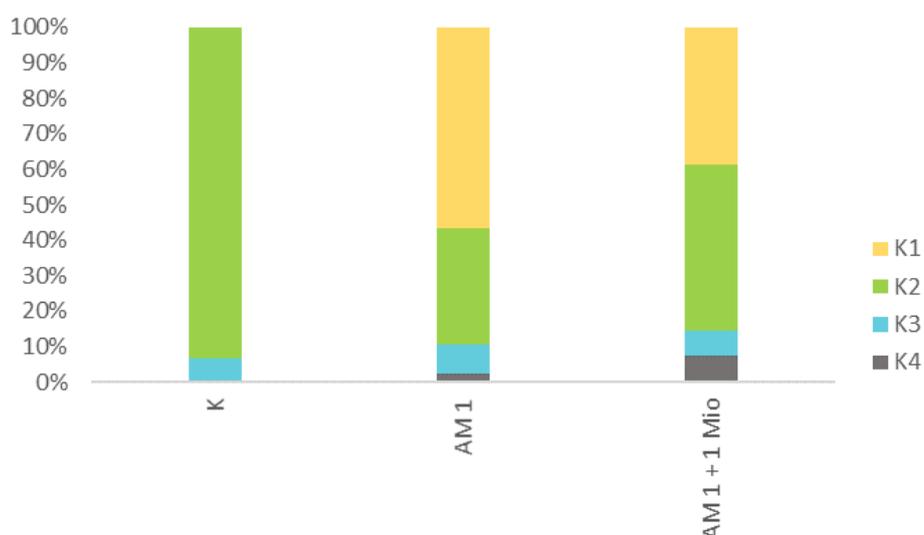


Abbildung 112: Verhalten von *M. cornuarietis* bei Exposition gegenüber Amitriptylin; Kategorie 1 [K1], gelb: Aktiv, oberhalb der Wasseroberfläche, Kategorie 2 [K2], grün: Aktiv, am Boden oder an der Aquarienwand, Kategorie 3 [K3], blau: Inaktiv, aber nicht vollständig ins Gehäuse eingezogen, Kategorie 4 [K4], grau: Inaktiv, vollständig eingezogen und mit Operculum verschlossen. Dargestellt ist der prozentuale Mittelwert der Verteilung der lebenden Tiere in den jeweiligen Verhaltenskategorien über den gesamten Testzeitraum (16 d)

7.3.8.2 Mortalität

In den Versuchsgruppen trat keine Mortalität auf.

7.3.8.3 Biomarker

Die untersuchten Endpunkte zeigten in allen untersuchten Versuchsgruppen keine Hinweise auf neurotoxische Wirkungen oder oxidativen Stress.

7.3.9 Exposition von juvenilen Bachforellen (PS und Methiocarb) (UTUE)

Die Auswirkungen des Pestizids Methiocarb in Kombination mit MP wurde an juvenilen Bachforellen (akuter Test) untersucht (für weitere Angaben zu Methiocarb siehe 7.3.4). Die Versuchsbedingungen sind in Kapitel 7.2.8 und 7.2.9 beschrieben.

Da Methiocarb nur schwer wasserlöslich ist, wurde in dem Versuch Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsvermittler eingesetzt (0,01 %). Die getesteten Versuchsgruppen waren: Kontrolle, Lösungsmittelkontrolle, 10.000 Partikel/L PS, 1 mg/L Methiocarb und die Mischung aus 1 mg/L Methiocarb + 10.000 Partikel/L PS. Bei den übrigen Versuchsgruppen (mit Ausnahme der Kontrolle und der Hälterungskontrolle) wurde die DMSO-Konzentration entsprechend zu dotiert, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Methiocarb-Konzentration wurde auf 1 mg/L angesetzt, eine Messung der Hochschule Fresenius mittels HPLC-ESI-MS/MS System ergab eine Realkonzentration von ca. 470 µg/L zu Versuchsbeginn und 237–308 µg/L bei Versuchsende.

Tabelle 37 fasst die Ergebnisse des Versuchs zusammen. Methiocarb verursachte eine starke Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) sowie der zwei gemessenen Carboxylesterasen (CbE). Darüber hinaus wurde bei den Tieren, welche Methiocarb ausgesetzt waren (Methiocarb und Methiocarb + 10.000 Partikel/L), ein deutlich schlechterer histologischer Zustand der Leber und der Kieme beobachtet. Eine Modulation dieser Effekte durch MP trat nicht auf.

7.3.10 Exposition von frühen Entwicklungsstadien der Bachforelle (UTUE)

Die Versuchsgruppen im Embryotest waren: Kontrolle, 100.000 Partikel/L PS, 1.000.000 Partikel/L PS, Amitriptylin, Amitriptylin + 100.000 Partikel/L PS und Amitriptylin + 1.000.000 Partikel/L PS. Im Embryotest wurde eine jeweils Konzentration von 300 µg/L Amitriptylin eingesetzt. Für weitere Angaben zu Amitriptylin siehe Kapitel 7.3.8.

7.3.10.1 Chemische Analytik

Die chemische Analytik der Wasserproben zeigte einen sehr schnellen Abbau des Wirkstoffs (60–70 % innerhalb 20 Tagen trotz regelmäßiger Wasserwechsel mit frisch angesetzter Amitriptylinlösung), so dass die tatsächliche Konzentration deutlich geringer war.

7.3.10.2 Resultate

In keiner der untersuchten Versuchsgruppen trat während der gesamten Versuchszeit eine Mortalitätsrate über 5 % auf. Die Exposition gegenüber dem Antidepressivum führte zu einem früheren Schlupf, verringerter Größe und Gewicht der Tiere sowie zu einer Erhöhung der Acetylcholinesterase-Aktivität (AChE) und einer Reduktion der Aktivität zweier Carboxylesterasen (Tabelle 38). Zudem fiel ein im Vergleich zur Kontrollgruppe verändertes Ruheverhalten auf: Nahezu alle gegenüber Amitriptylin exponierten Tiere lagen auf der Seite, während die Fische in der Kontrollgruppe in Bauchlage ruhten. Nicht verändert im Vergleich zur Kontrollgruppe waren der Herzschlag der Tiere, der Grad der Lipidperoxidation (LPO) und die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD). Die durch Amitriptylin hervorgerufenen Effekte wurden durch die getesteten MP-Konzentrationen weder verstärkt noch reduziert. Es trat keine Modulation durch die MP-Partikel auf.

Tabelle 37: Zusammenfassung der Ergebnisse zu MP als alleiniger Stressor sowie der Kombination mit Methiocarb nach 96 h Exposition. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung

Endpunkt	Hälterungs- kontrolle	Kontrolle	Lösungs- mittel Kontrolle	10.000 Partikel/L	Methi- ocarb	Methio- carb+ 10.000 Par- tikel/L	Effekt?
Gewicht [g]	4,02 \pm 1,09	2,49 \pm 0,66	2,89 \pm 0,87	3,21 \pm 0,91	2,95 \pm 1,27	3,30 \pm 1,06	Nein
Länge [cm]	7,06 \pm 0,68	6,15 \pm 0,54	6,50 \pm 0,65	6,69 \pm 0,70	6,33 \pm 0,87	6,64 \pm 0,75	Nein
Aktivität der SOD [U/mL]	92,7 \pm 26,1	105 \pm 29	107 \pm 24	107 \pm 30	100 \pm 32	99 \pm 35	Nein
LPO [CHP-Äquiv.]	2,17 \pm 1,26	2,56 \pm 1,09	1,97 \pm 1,17	1,69 \pm 1,21	1,83 \pm 1,52	1,60 \pm 1,39	Nein
Hsp70 – Level [relativer Grau- wert]	1,71 \pm 0,29	1,84 \pm 0,29	1,78 \pm 0,29	1,71 \pm 0,26	1,72 \pm 0,30	1,77 \pm 0,27	Nein
Aktivität der AChE [mU/mg Pro- tein]	69,3 \pm 11,5	88,4 \pm 25,0	77,4 \pm 18,4	73,9 \pm 20,3	31,5 \pm 11,4	32,4 \pm 11,7	Effekt durch Methio- carb
Aktivität CbE (Substrat pNPV) [mU/mg Pro- tein]	60,6 \pm 11,1	53,9 \pm 12,4	54,0 \pm 12,9	49,6 \pm 10,5	9,10 \pm 3,24	9,05 \pm 1,91	Effekt durch Methio- carb
Aktivität der CbE (Substrat pNPA) [mU/mg Pro- tein]	82,20 \pm 9,16	79,13 \pm 10,83	79,10 \pm 11,38	76,68 \pm 7,90	45,52 \pm 5,74	44,48 \pm 5,01	Effekt durch Methio- carb

Tabelle 38: Übersicht über die Ergebnisse des zweiten Embryotests. In diesem Experiment wurden Forellenembryonen gegenüber Polystyrol-MP sowie Amitriptylin (AM) exponiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung mit Ausnahme von Mortalität und Verhalten, welche in Prozent angegeben sind.

Endpunkt	Kontrolle	10 ⁵ Partikel/L	10 ⁶ Partikel/L	AM	AM + 10 ⁵ Partikel/L	AM + 10 ⁶ Partikel/L	Effekt?
Schlupf [d]	11,5 \pm 2,1	11,5 \pm 1,3	11,3 \pm 1,9	10,2 \pm 1,8	10,1 \pm 2,2	9,94 \pm 2,24	Effekt durch AM
Herzschlag [bpm]	55,6 \pm 3,6	55,2 \pm 2,4	55,8 \pm 2,4	56,0 \pm 1,4	54,0 \pm 4,4	55,2 \pm 2,4	Kein Effekt
Ruheverhalten [% auf der Seite liegend]	10,0	5,56	1,11	97,8	98,9	100,0	Effekt bei 1.000.000 Partikel/L und durch AM
Mortalität [%]	0,00	1,11	0,00	3,33	2,22	4,44	Kein Effekt
Größe [cm]	2,67 \pm 0,13	2,64 \pm 0,12	2,67 \pm 0,12	2,41 \pm 0,11	2,44 \pm 0,10	2,44 \pm 0,10	Effekt durch AM
Gewicht [g]	0,14 \pm 0,03	0,14 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02	Effekt durch AM
LPO [CHP-Äquiv.]	18,6 \pm 2,6	19,6 \pm 4,0	18,0 \pm 2,5	19,1 \pm 2,4	19,2 \pm 3,7	19,3 \pm 2,5	Kein Effekt
Aktivität der SOD[U/mL]	118 \pm 29	123 \pm 28	122 \pm 25	138 \pm 34	134 \pm 29	129 \pm 31	Kein Effekt
Aktivität der AChE [mU/mg Protein]	52,5 \pm 12,9	54,5 \pm 13,3	53,7 \pm 12,6	68,3 \pm 13,8	68,5 \pm 15,0	67,4 \pm 16,9	Erhöht durch AM
Aktivität der CbE (Substrat pNPV) [mU/mg Protein]	79,5 \pm 15,1	72,7 \pm 12,5	72,4 \pm 17,0	55,5 \pm 11,8	57,6 \pm 13,1	49,5 \pm 8,6	Reduziert durch AM
Aktivität der CbE (Substrat pNPA) [mU/mg Protein]	69,2 \pm 23,2	70,3 \pm 18,3	70,2 \pm 17,8	59,2 \pm 14,3	62,1 \pm 14,5	60,6 \pm 13,8	Reduziert durch AM

7.3.11 Exposition juveniler Bachforellen (PS und Amitriptylin) (UTUE)

Um eine Amitriptylin-Konzentration zu finden, welche subletale Effekte bei juvenilen Forellen verursacht, wurde zunächst ein Experiment mit einer Reihe verschiedener Amitriptylin-Konzentrationen durchgeführt (1; 10; 100; 300; 1000 µg/L). Anschließend wurde entschieden, den Versuch zur Kombinationswirkung von Amitriptylin und MP mit 100 µg/L Amitriptylin durchzuführen.

Während des dreiwöchigen Versuchs mit MP und Amitriptylin trat keine Mortalität auf. Auf Größe und Gewicht der Tiere sowie den Grad der Lipidperoxidation hatte Amitriptylin keinen Einfluss (Tabelle 39). Es wurde keine Modulation durch MP beobachtet.

Tabelle 39: Zusammenfassung der Ergebnisse des Experiments mit juvenilen Bachforellen, welche gegenüber MP-Partikeln und Amitriptylin (100 µg/L) exponiert waren. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung mit Ausnahme der Mortalität, welche in Prozent angegeben ist

Endpunkt	Hälterungs-kontrolle	Kontrolle	10.000 P./L	100.000 P./L	AM	AM + 10.000 P./L	AM + 100.000 P./L	Ef-fekt?
Gewicht [g]	4,88 ± 1,30	3,09 ± 0,75	3,02 ± 0,81	3,39 ± 0,87	3,14 ± 1,43	2,88 ± 0,78	3,31 ± 1,00	Kein Effekt
Länge [cm]	7,84 ± 0,84	6,98 ± 0,63	6,90 ± 0,65	7,19 ± 0,62	6,94 ± 0,61	6,84 ± 0,65	7,15 ± 0,82	Kein Effekt
Aktivität der SOD[U/mL]	129 ± 49	110 ± 37,4	110 ± 35	108 ± 37	109 ± 37	112 ± 43	109 ± 41	Kein Effekt
LPO [CHP-Äquiv.]	21,3 ± 9,8	23,4 ± 8,78	27,3 ± 7,5	25,1 ± 9,2	23,9 ± 9,2	26,2 ± 10,2	22,5 ± 8,8	Kein Effekt
Aktivität der AChE [mU/mg Protein]	79,9 ± 25,5	119 ± 34	123 ± 33	123 ± 26	131 ± 43	132 ± 38	122 ± 41	Kein Effekt
Aktivität CbE (Substrat pNPV) [mU/mg Protein]	50,1 ± 14,8	50,7 ± 12,1	56,1 ± 18,1	50,8 ± 11,3	42,8 ± 11,6	54,5 ± 17,3	44,5 ± 13,3	Kein Effekt
Aktivität CbE (Substrat pNPA) [mU/mg Protein]	82,4 ± 18,1	87,6 ± 14,9	89,6 ± 21,7	84,7 ± 15,0	79,3 ± 16,1	84,7 ± 14,0	76,9 ± 10,6	Kein Effekt
Cortisolgehalt [ng/mL]	Nicht getestet	40,6 ± 31,3	Nicht getestet	34,2 ± 35,8	41,4 ± 29,2	Nicht getestet	50,9 ± 31,6	Kein Effekt

7.3.11.1 Histologie

Auf den histologischen Zustand der Leber hatte weder die Exposition gegenüber PS-MP noch Amitriptylin einen Effekt. Bei der histologischen Untersuchung der Kiemen fiel sowohl in den zwei Versuchsgruppen mit MP als alleiniger Stressor (10.000 Partikel/L und 100.000 Partikel/L) als auch in den drei Versuchsgruppen mit Amitriptylin (Amitriptylin; Amitriptylin + 10.000 Partikel/L und Amitriptylin + 100.000 Partikel/L) ein gehäuftes Epithellifting auf. Zudem waren in den drei Versuchsgruppen mit Amitriptylin die Zellen vermehrt hypertroph. In der semi-quantitativen Auswertung zeigte sich, dass der Zustand der Kiemen in den drei gegenüber Amitriptylin exponierten Versuchsgruppen signifikant

schlechter war als derjenige der Kontrolltiere. Es wurde keine Modulation durch MP bei diesem Effekt beobachtet.

7.3.11.2 Verhalten

Während des Versuchs wurde das Verhalten der Forellen durch tägliches Fotografieren dokumentiert. Am Ende des Versuchs wurde für jedes Aquarium an jedem Tag bestimmt, wie viele Tiere sich jeweils in der unteren Aquarienhälfte und wie viele sich in der oberen Aquarienhälfte aufhielten (Abbildung 113).

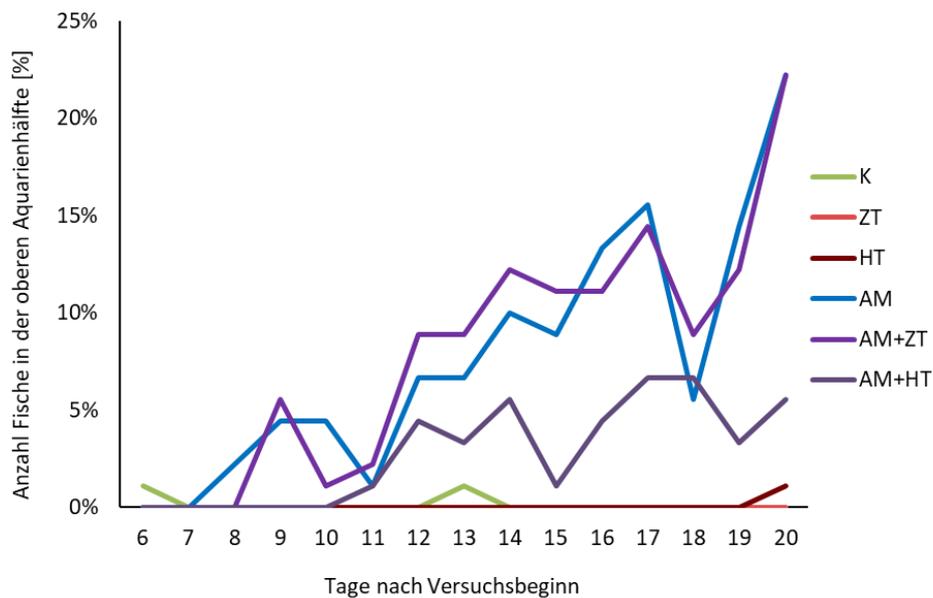


Abbildung 113: Prozentualer Anteil der Fische, die in der oberen Aquarienhälfte schwimmen während der Versuchsdauer. Die Versuchsgruppen mit MP als alleiniger Stressor (10.000 (ZT) und 100.000 Partikel/L (HT)) unterscheiden sich nicht signifikant zur Kontrolle (K). Bei der Versuchsgruppe in der die Tiere gegenüber Amitriptylin (AM; GLM: Std. Error = 1,410e+00; z value = 2,905; p = 0,00367) sowie Amitriptylin + 10.000 Partikel/L (AM + ZT; GLM: Std. error = 1,394e+00; z value = 2,691; p = 0,00711) ausgesetzt waren, ist der Anteil der Fische in der oberen Aquarienhälfte signifikant höher. Dieser Effekt tritt in der Versuchsgruppe Amitriptylin + 100.000 Partikel/L (AM + HT) nicht mehr auf (GLM: Std. error = 1,463e+00; z value = 1,397; p = 0,16229)

Diese Daten wurden mit einem GLM (generalized linear model) analysiert. Während sich die Tiere aus der Kontrollgruppe und den zwei Versuchsgruppen mit MP als alleinigen Stressor (10.000 Partikel/L und 100.000 Partikel/L) fast ausschließlich in der unteren Aquarienhälfte aufhielten, schwammen die Tiere welche gegenüber Amitriptylin (GLM: Std. Error = 1,410e+00; z Value = 2,905; p = 0,00367) sowie Amitriptylin + 10.000 Partikel/L (GLM: Std. Error = 1,394e+00; z Value = 2,691; p = 0,00711) exponiert waren, signifikant häufiger in der oberen Aquarienhälfte. Dieser Effekt trat nicht bei den Fischen auf, welche gegenüber Amitriptylin + 100.000 Partikel/L exponiert waren (GLM: Std. Error = 1,463e+00; z Value = 1,397; p = 0,16229). Der durch Amitriptylin hervorgerufene Effekt wurde demnach durch die höhere Partikelkonzentration moduliert. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Amitriptylin teilweise an die Partikel sorbiert (log D Amitriptylin ~2,8 bei pH 7,6) oder indirekte Effekte (höhere Schleimabgabe nach Reizung der Kieme durch Partikel) zu einer verringerten Aufnahme des Stoffes führen.

7.3.12 Zebrabärblingsembryonen (UHEI)

Da sowohl kleine Partikel per se als auch partikelassoziierte Schadstoffe theoretisch zu adversen Wirkungen führen könnten, sollten diese sowohl isoliert als auch in Kombinationen getestet werden. Als Grundlage für alle Untersuchungen diene der klassische Fischembryotests (FET) nach OECD-Richtlinie 236 (OECD 2013) für die Ermittlung der toxischen Wirkung von MP sowie der MP-assoziierten Schadstoffe (3 Replikate). Zusätzlich zu den in der OECD-Richtlinie 236 vorgeschriebenen Kontrollen wurde in jedem Versuchsdurchlauf eine zusätzliche MP-Kontrolle aus Kunstwasser und dem jeweiligen MP mit 20 Zebrabärblingsembryonen mitgeführt. Die Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen und daraus resultierenden LC0- und LC10-Werte sind maßgebend für die zu untersuchenden Konzentrationsbereiche der anschließenden chronischen Langzeitexpositionen und Nahrungsnetzversuche.

Die unterschiedlichen Kombinationen von MP-Sorten und getesteten Modellsubstanzen sind in Tabelle 40 zusammengestellt. Es zeigte sich, dass die verwendeten nativen MP-Proben allein keine negativen Auswirkungen auf die Embryonen des Zebrabärblings aufweisen: Über den Expositionszeitraum von 96 Stunden zeigten die Embryonen eine normale, unauffällige Entwicklung.

Tabelle 40: In TP B4 getestete Kombinationen aus MP und Modellsubstanzen.

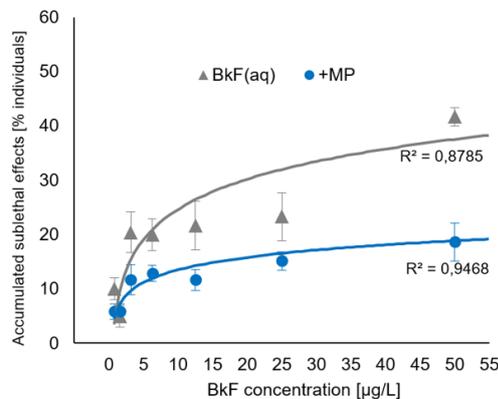
Modellsubstanzen	MP				
	TUB				GUF
	PS < 50 µm	PS > 250 µm	PMMA Ø = 48 µm	PS fluo < 100 µm	PS < 60 µm
Cypermethrin	✓	✓	✓		
Benz(k)fluoranthen	✓		✓		✓
Chlorpyrifos			✓	✓	
17α-Ethinylestradiol			✓		

Bespiehhaft sind in Abbildung 114 die Ergebnisse für Benz(k)fluoranthen und Cypermethrin aus dem FET Test dargestellt. In Abbildung 114A ist der Effekt der verminderten akuten Toxizität bei dem Einsatz von beladenem PMMA mit Benz(k)fluoranthen im Vergleich zu BkF in der Wasserphase zu sehen. Die Anzahl der akkumulierten subletalen Effekte bei der Verwendung von PMMA Partikeln beladen mit BkF ist um Faktor 10 geringer als bei Exposition von BkF direkt über die Wasserphase. In Abbildung 114B ist eine tabellarische Darstellung für Cypermethrin in Kombination mit PMMA und PS zu sehen. Die ermittelten EC10- und EC50-Werte zeigen ebenfalls eine bis zu 10-fach reduzierte akute Toxizität, wenn partikelgebundenes Cypermethrin eingesetzt wurde. Alle Daten wurden mit jeweils 3 unabhängigen Replikaten ermittelt.

Für alle unbelasteten nativen MP-Sorten konnte im FET nach OECD TG 236 kein Unterschied zur Negativkontrolle und nachgewiesen werden: Die Embryonen des Zebrabärblings entwickelten sich über einen Zeitraum von 96 Stunden identisch im Vergleich zur Kunstwasserkontrolle. Es konnten auch keine entwicklungsphysiologischen Beeinträchtigungen durch anhaftende Partikel beobachtet werden. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu einigen aktuellen MP-Studien (Cole et al. 2013, Ogonowski et al. 2016, Rochman et al. 2013b, Setälä et al. 2014, Trifuoggi et al. 2019), jedoch steigt die Zahl an Untersuchungen, die für native MP einen nur sehr geringen oder gar keinen Einfluss MP auf Organismen beleuchten (Burns and Boxall 2018, Karami 2017, Triebkorn et al. 2019).

Die Exposition von Zebraabälblingsembryonen im Fischembryotest gegenüber partikelassoziierten Schadstoffen führte zu einer deutlichen Reduktion der akut-toxischen (subletalen) Effekte der Schadstoffe nach Exposition über die Wasserphase.

A FET-Test mit BkF



B FET-Test mit Cypermethrin

[µg/L]	Cypermethrin	Cypermethrin + PMMA	Cypermethrin + PS
96h - EC ₁₀	6,8 ± 0,5	24,2 ± 4,9	40,1 ± 6,6
96h - EC ₅₀	14,4 ± 3,2	56,5 ± 5,1	129,3 ± 3,2

Abbildung 114: Toxizität von Benz(k)fluoranthen und Cypermethrin im Fischembryotest (FET) mit dem Zebraabälbling (*Danio rerio*) nach OECD TG 236 nach Inkubation mit unterschiedlichen MP-Sorten. A Akute subletale Effekte von BkF, appliziert über die Wasserphase (grau) und als partikelgebundene Substanz mit PMMA (blau). B EC₁₀- und EC₅₀-Werte aus dem FET für Cypermethrin und als partikel-assoziiertes Schadstoff mit PMMA und PS

Die erfolgreiche Sorption der Modellsubstanzen an die MP-Partikel wurde in Kooperation mit dem Partner der Hochschule Fresenius (TP A3) überprüft. Das an der Universität Heidelberg etablierte Verfahren (Abbildung 89) ermöglicht eine maximale Bindung der Substanzen mit nur minimalen Verlusten von bis zu 10 %. Somit ist sichergestellt, dass stets eine vergleichbare Menge an Schadstoff via MP im FET eingesetzt wird. Die 10-fach reduzierte Effektstärke im Vergleich zur Exposition über die Wasserphase ist somit nicht auf einen Verlust durch das Beladungsverfahren zurückzuführen. Wahrscheinlicher ist, dass die partikelgebundenen Substanzen nur geringfügig desorbieren und somit die Menge an frei verfügbarer Substanz geringer ist.

7.3.13 Nachweis des Transfers von Schadstoffen auf Mikroplastik (UHEI)

Der Transfer von ausgewählten MP-assoziierten Schadstoffen kann sowohl über optische Methoden (z. B. das Fluoreszenzsignal von BkF in Organismen) als auch über biologische Effekte als Endpunkte z. B. den In vivo-EROD-Assay nach Kais et al. (2017) oder die Hemmung der Acetylcholinesterase nach Kais et al. (2015) nachgewiesen werden. Dazu wurden nach dem an der Uni Heidelberg etablierten Verfahren MP-Partikel mit Chlorpyrifos (AChE-Hemmer) und BkF (CYP 450-Induktor) beladen und Embryonen des Zebraabälblings den unterschiedlichen Endpunkten entsprechend exponiert.

Ziel war es, die beladenen MP-Partikel nicht nur optisch im Zielorganismus nachzuweisen, sondern den Anteil von MP-assoziiertem Transfer am gesamten Schadstofftransfer abzuschätzen. Ein weiteres Ziel war, den Einfluss unterschiedlicher Oberflächenstrukturen von MP zu berücksichtigen, da sowohl die Sorption als auch Desorption von Schadstoffen durch die Oberfläche der MP-Partikel beeinflusst werden kann. Aus diesem Grund wurden kryogen-vermahlene, unregelmäßigen Partikel von den Partnern TU Berlin und Goethe-Universität Frankfurt im Vergleich zu sphärischen PMMA-Partikeln im In vivo-EROD eingesetzt.

Der Nachweis des erfolgreichen Transfers von BkF und MP-assoziierten BkF konnte bereits in dem Nahrungskettenexperiment mit optischen Methoden und konfokaler Laserscanningmikroskopie nachgewiesen werden. Die Messung der In vivo-EROD-Aktivität in 96 h alten Zebraabälblingsembryonen erfolgte an der Uni Heidelberg mittel Epifluoreszenzmikroskopie im Gastrointestinaltrakt bei einer Emissionswellenlänge von 590 nm (Kais et al. 2017, Otte et al. 2010) nach 3-stündiger Pulsbelastung mit

BkF-beladenen MP-Partikeln. Die Ergebnisse von verschiedenen MP-Sorten und drei unterschiedlichen BkF-Konzentrationen (0,048 µg/L, 3,125 µg/L, 50 µg/L) sind in Abbildung 115 dargestellt.

Zwischen den unterschiedlichen MP-Sorten (PMMA, PS) und Oberflächenstrukturen (kryogen vermahlen, sphärisch) zeigten sich keine deutlichen Unterschiede. Die Intensität der EROD-Induktion der unterschiedlichen Ansätze lag stets in Abhängigkeit von der BkF-Konzentration in einem ähnlichen Bereich. Es wurde deutlich, dass eine CYP 450-Aktivierung und somit eine Desorption von BkF in die wässrige Phase und Aufnahme durch *D. rerio* ab einer Konzentration von ca. 3 µg/L BkF stattfindet.

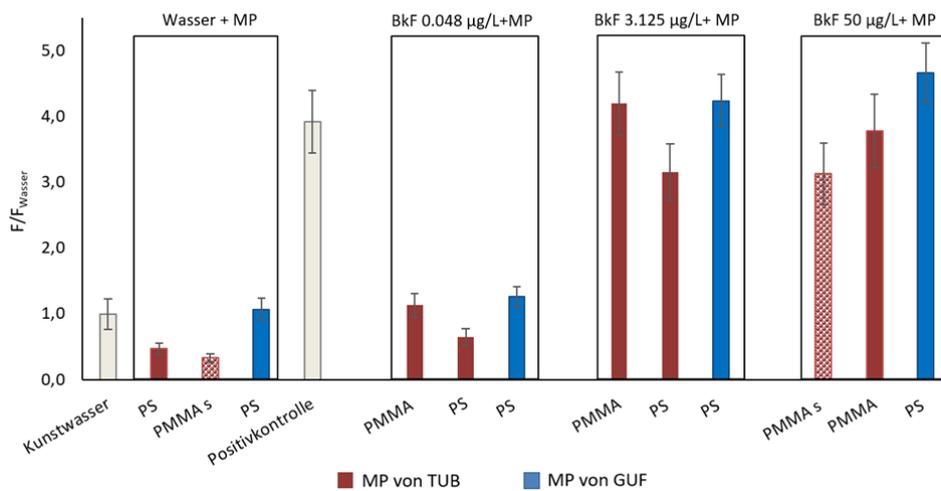


Abbildung 115: *In vivo*-EROD-Induktion in Embryonen des Zebrafisch (Danio rerio) nach 3h Puls-belastung mit drei verschiedenen BkF-Konzentrationen und verschiedenem MP. Rot: MP von Partner TU Berlin, rot gemustert: PMMA sphärisch. Blau: MP von Partner Goethe-Uni Frankfurt

Die Messung der AChE-Aktivität in erfolgt an der Universität Heidelberg routinemäßig nach einem modifizierten Protokoll von (Ellman et al. 1961, Padilla et al. 1999) in Ganzkörperhomogenaten von 96 h alten Zebrafischembryonen. Die Enzymaktivität wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen.

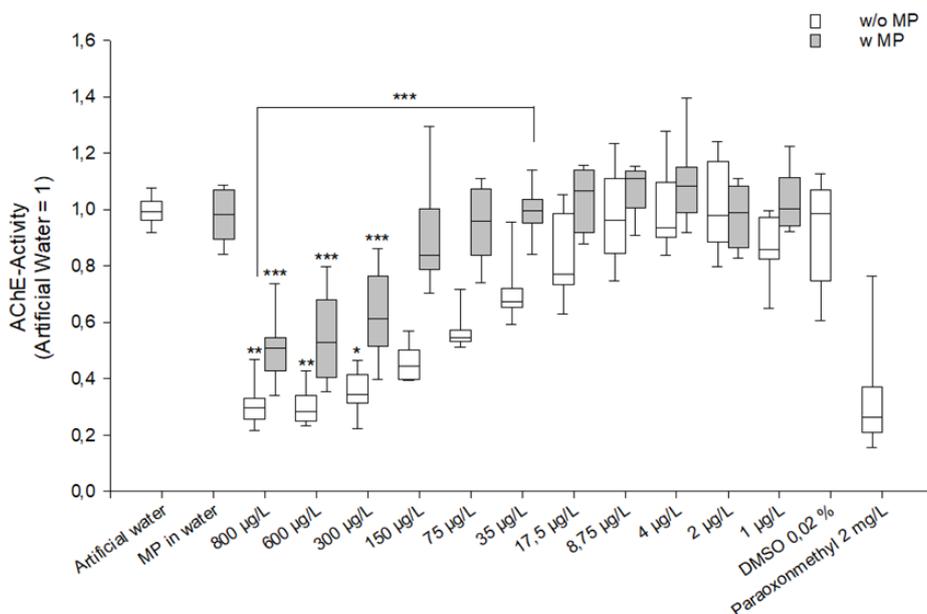


Abbildung 116: Aktivität der Acetylcholinesterase in Embryonen des Zebrafisch (Danio rerio) nach Exposition gegenüber wassergelöstem Chlorpyrifos (weiß) und MP-gebundenem Chlorpyrifos (grau)

Der erfolgreiche Transfer von MP-assoziiertem Chlorpyrifos konnte ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 116). Es zeigte sich, dass bei der Verwendung von schadstoffbelasteten Partikeln die Desorption und Aufnahme durch den Zielorganismus im Vergleich zur Exposition gegenüber wassergelöster Substanz nur in reduziertem Umfang stattfindet. Signifikante Unterschiede zwischen den MP-assoziierten und wassergelösten Expositionsgruppen traten im Konzentrationsbereich von 35 bis 800 µg/L CPF auf. In diesem Bereich führte die Exposition gegenüber partikelgebundenem CPF (grau) im Vergleich zur Exposition über die Wasserphase (weiß) zu einer deutlich geringeren Hemmung der AChE-Aktivität. Bei niedrigeren Konzentrationen waren die Unterschiede nicht mehr signifikant (t-test).

Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei dem Vergleich der EROD-Induktion von MP-assoziiertem BkF und wassergelöstem BkF. Die CYP450-Induktion war deutlich geringer, wenn das BkF an MP-Partikel gebunden war, dennoch findet eine messbare Desorption von BkF bereits bei einer 3-stündigen Pulsbelastung von *D. rerio* mit belasteten MP statt.

Der Schadstofftransfer von Substanzen mit Eigenfluoreszenz lässt sich nicht nur optisch in biologischem Material nachweisen, sondern auch indirekt über die Hemmung z. B. der Acetylcholinesterase (bspw. Phosphorsäureester wie Chlorpyrifos) oder über eine Modulierung der CYP450-Aktivität (bspw. PAKs wie Benz(k)fluoranthren). Es wurde deutlich, dass diese Endpunkte ähnlich empfindlich reagieren, wenn schadstoffbeladenes MP eingesetzt wird oder aber eine Exposition über die Wasserphase erfolgt. Für die untersuchten Modellsubstanzen wurde zudem deutlich, dass eine geringe Desorption von den Partikeln stattfindet. Die Mengen sind bis in niedrige µg/L-Konzentrationen ausreichend, um messbare biologische Effekte in den Embryonen der Zebrabärblinge auszulösen.

im EROD-Assay konnte ein Einfluss der Oberflächenstruktur weder für PMMA (kryogen gemahlen und sphärisch) noch für PS (kryogen, TUB und GUF) nachgewiesen werden.

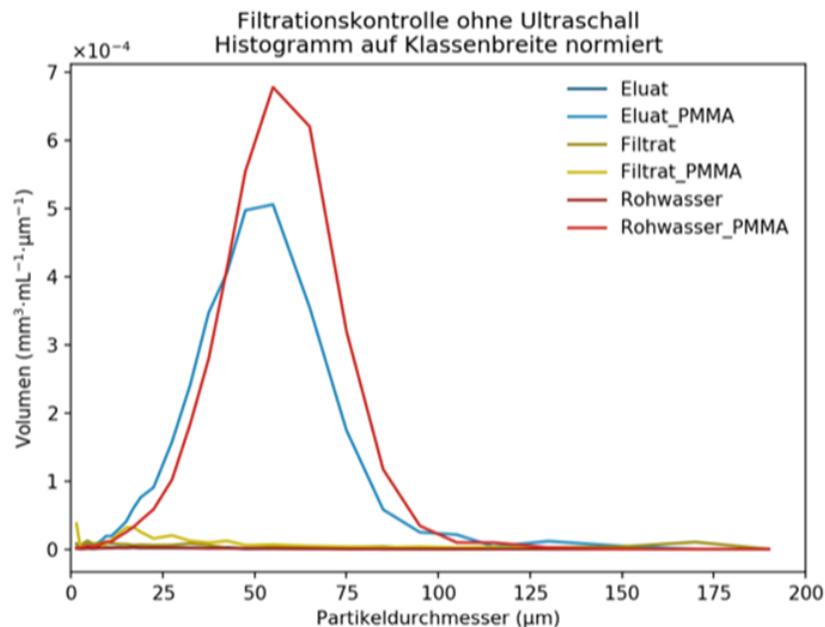


Abbildung 117: Validierung des Beladungsprozess von MP und Wiederfindung der Partikel. Rohwasser=Kunstwasser mit PMMA, Eluat_PMMA=Eluat nach Spülen und Filtration. Messungen der TU Berlin

Es ist nicht auszuschließen, dass die Schwankungen der Messergebnisse durch variierende Partikelmengen und damit der verfügbaren Menge an Schadstoff hervorgerufen wurden. Die Anteile der Feinfraktionen (< 20 µm) bei kryogen-vermahlten Partikeln sind höher als bei dem sphärischen PMMA (Ø = 48 µm), so dass möglicherweise eine höhere Anzahl kleiner Partikel zur Verfügung stand. Aller-

dings kann auch ein stärkerer Verlust von kleineren Partikeln beim Beladungsprozess durch die Filtration über den Spritzenfilter nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen zur Validierung des Filtrationsprozesses in Kooperation mit der TU Berlin zeigten für PMMA hohe Wiederfindungsraten im Eluat von 80–90 % (Abbildung 117, blaue Kurve) im Vergleich zur ursprünglichen MP-Dispersion (rote Kurve). Es ist daher wahrscheinlich, dass die verminderte Effektstärke bei der Verwendung von schadstoffbelastetem MP eher auf den langsamen Prozess der Desorption zurückzuführen ist.

7.3.14 Toxikologische Untersuchungen an real-belastetem MP (UHEI)

In Kooperation mit dem Partner aus TP A3 (Hochschule Fresenius, Idstein) sollte die Relevanz von MP als Vektor für Schadstoffe unter realen Expositionsbedingungen bewertet werden. Dazu wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen in einem Oberflächengewässer in Hessen (Schwarzbach) Behältnisse mit einer definierten MP-Mischung ausgesetzt, sowie in regelmäßigen Abständen Wasser-, Schwebstoff- und Sedimentproben entnommen. Darüber hinaus wurden im gleichen Zeitraum Referenzwasserproben aus einer Quelle bei Niedernhausen (Hessen) bezogen.

Neben den Untersuchungen, inwiefern sich MP-Partikel in einem schadstoffbelasteten Oberflächengewässer im Vergleich zu natürlichen Schwebstoffen hinsichtlich der Sorption und Desorption von anthropogenen Schadstoffen verhalten, wurde an der Hochschule Fresenius ein Target-Analytik auf ca. 90 bekannte Schadstoffe durchgeführt. Zeitgleich wurden für alle 4 Kompartimente des Untersuchungsgewässers (Schwebstoffe, MP-Partikel, Wasser und Sediment) toxikologische Untersuchungen an der Uni Heidelberg durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit sich die natürlichen Partikel in ihren toxikologischen Effekten von MP-Partikeln oder frei verfügbaren Schadstoffen (gelöst) unterscheiden und mögliche Effekte auf die Vertebraten Fauna im Schwarzbach auswirken können.

Die im Untersuchungsgewässer auftretenden anthropogenen Schadstoffe legten Untersuchungen hinsichtlich akuter Toxikologie (Fischembryotest, Acetylcholin-Esterase-Hemmung, Ethoxyresorufin-O-deethylase Induktion) und Beeinflussung des Verhaltens (Lichtzyklus-Test) nahe. Die erzielten Ergebnisse sollen einen Teil der Fragestellung der toxikologischen Relevanz von MP-Partikeln unter realitätsnahen Bedingungen sowie der Relevanz von MP als Schadstoffvektor beantworten.

Die Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen der Wasserproben spiegeln die Effekte aus dem im Schwarzbach vorhandenen Mix aus Medikamenten, Flammenschutzmitteln, Pestiziden wider. Im FET zeigten sich im Schwarzbachwasser die meisten subletalen Effekte, das Quellwasser aus Niedernhausen induzierte jedoch ebenfalls leichte subletale Effekte im Vergleich zum Kunstwasser nach OECD-Richtlinie 236 (Abbildung 118A). Die Wasserproben vom Ende des Expositionszeitraums führten bei allen Wässern zu vermehrten Effekten, was möglicherweise auf die längere Trockenperiode in diesem Zeitraum und den geringen Wasserstand zurückzuführen ist.

Die Induktion von CYP450 in Embryonen des Zebraärbings war in den Wasserproben des Schwarzbachs signifikant höher im Vergleich zum Quell- und Kunstwasser. Die Induktion durch das Quellwasser war vergleichbar mit der basalen Aktivität im Kunstwasser (Abbildung 118B). Die signifikante Hemmung der AChE sowohl im Schwarzbach als auch im Quellwasser kann möglicherweise auf Pestizide oder Medikamente zurückzuführen sein (Abbildung 118C). Eine Hemmung der Acetylcholinesterase-Aktivität ist möglicherweise auf die sowohl im Schwarzbach als auch im Quellwasser vorhandenen Huminsäuren zurückzuführen, da diese bereits in niedrigen Konzentrationen eine hemmende Wirkung aufweisen können (Akincioglu et al. 2017). Aus den GC-MS- und LC-MS-Messungen der Hochschule Fresenius geht hervor, dass insbesondere hohe Konzentrationen des Flammenschutzmittel TCPP (Tris(2-chlorisopropyl)phosphat, 1,3–1,7 µg/L) und des Korrosionsschutzmittel Benzotriazol (4 ng/L) vorliegen. Die akut-toxischen Effekte und die veränderte Induktion von CYP450 durch diese Substanzen wurden für den Zebraärbing bereits beschrieben (Dishaw et al. 2014, Liu et al. 2012, Wang et al. 2017).

Die Effekte der Matrixproben (Sediment und Schwebstoffe) sind im Gegensatz zu den Effekten der Wasserproben weniger eindeutig zuzuordnen. Im FET (Abbildung 118D) zeigte sich bereits für den nativen MP-Mix eine erhöhte akute Toxizität, die im Vergleich zum exponierten MP, dem Sediment und den Schwebstoffen nur noch geringfügig abweicht. Das unbelastete MP wirkt demzufolge ähnlich toxisch wie das exponierte MP und die beiden Passiv-Sammler Sediment und Schwebstoffe aus dem Schwarzbach. Der MP-Mix setzte sich aus 50 % Polyethylen (PE), 25 % Polypropylen (PP), 15 % Polystyrol (PS) und 10 % Polyvinylchlorid (PVC) zusammen. Insbesondere für PVC ist die Toxizität der Additive bekannt (Hermabessiere et al. 2017), darüber hinaus wurde im Rahmen von MiWa gezeigt, dass PS und PE per se keine akut toxischen Effekte bewirken, obwohl die Ergebnisse vielfach im Widerspruch zu anderen MP-Studien stehen. Eine 1:2-Verdünnung der eingesetzten Materialmengen von 0,08 mg/ml (MP Mix, Sediment und Schwebstoffe) hatte nur geringfügige Auswirkungen auf die Toxizität.

Dies zeigte sich auch bei der Untersuchung der EROD-Induktion (Abbildung 118E). Alle Matrixproben hatten zu einer geringen Inhibierung der CYP450-Aktivität geführt. Die Verdünnungen der unterschiedlichen Matrixproben haben lediglich bei dem exponierten MP-Mix und den Schwebstoffen zu einem signifikant veränderten Fluoreszenzsignal im Gastro-Intestinal-Trakt von *Danio rerio* geführt. Die deutliche Inhibierung der CYP450-Aktivität nach 3-stündiger Pulsbelastung lässt auf das Vorhandensein anderer Substanzen als in den Wasserproben schließen. Es ist bekannt, dass einige Medikamente (bspw. Fluoxetin) oder auch zyklische Kohlenwasserstoffe wie Fluoranthen zu einer Inhibierung führen können (Brown et al. 2015, Smith et al. 2012).

Die Schwankungen in den AChE-Messungen (jedoch ohne signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kunstwasserkontrolle) könnten durch den Beginn akuter Toxizität bedingt sein, die sich bereits im FET abzeichnete. Es ist möglich, dass die morphologischen Veränderungen und die subletalen Effekte zu einer Maskierung der Modulierung der AChE-Aktivität geführt haben. Um die Sensitivität des AChE-Assay optimal nutzen zu können, wurde der EC10 als Expositionsmaximum festgesetzt (Kais et al. 2015). Jedoch hat auch die 1:2-Verdünnung der eingesetzten Matrixprobenmenge nicht ausgereicht, um diese Schwelle zu unterschreiten. Eine abschließende Beurteilung der Effekte wird nur über eine weitere Kooperation mit der Hochschule Fresenius möglich sein.

Grundsätzlich ist eine eindeutige Zuordnung der Effekte auf Grund der Komplexität der Umweltproben (Wasser, Sediment, Schwebstoffe) schwierig, da die Abschätzung von Mischungstoxizität grundsätzlich problembehaftet ist (Cedergreen 2014).

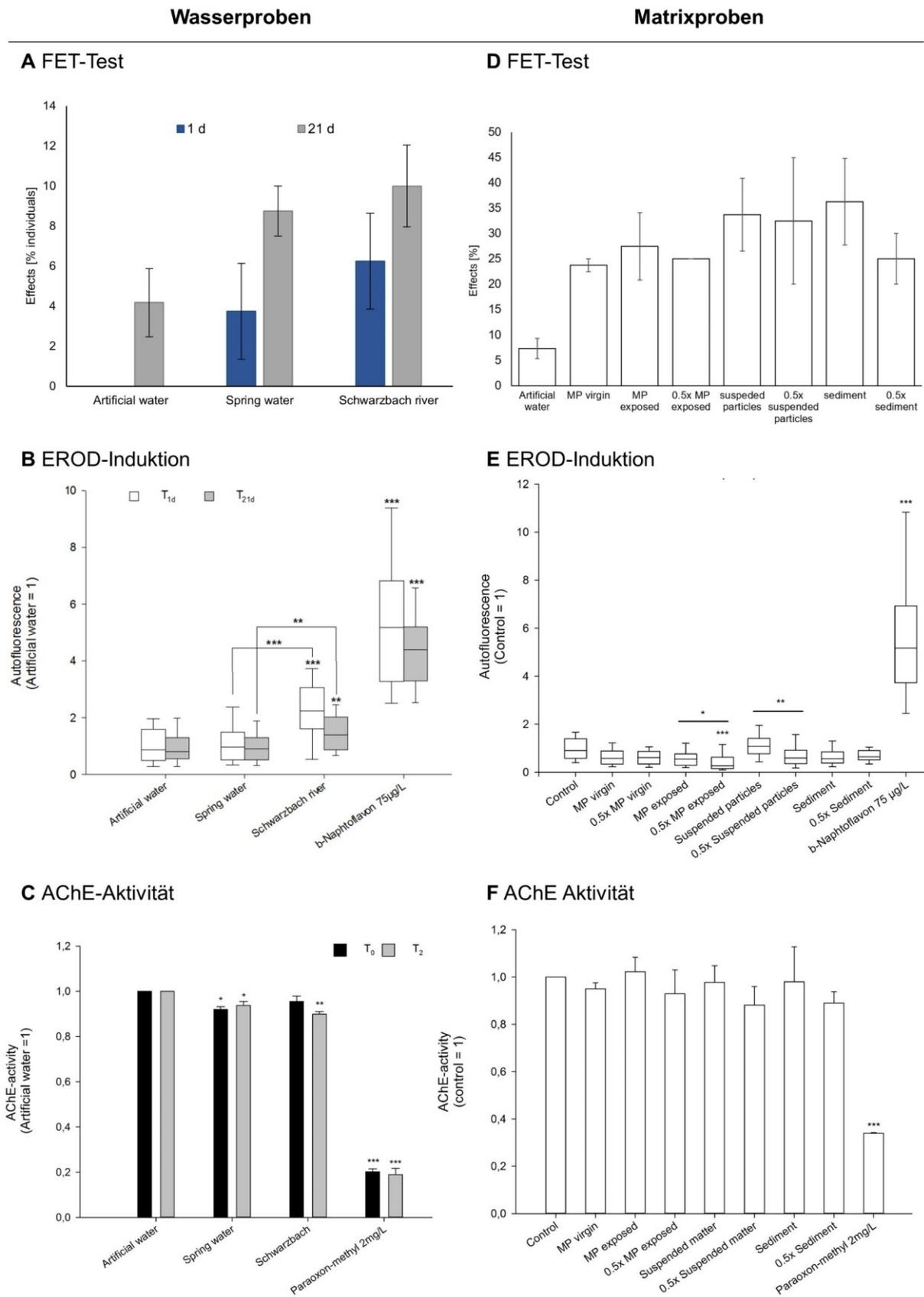


Abbildung 118: Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen an real belasteten Wasserproben (Wasser- und Matrixproben bestehend aus Sediment- und Schwebstoffproben). A Ergebnisse des FET für Wasserproben, B Ergebnisse der EROD-Induktion für Wasserproben, C Ergebnisse des AChE-Tests für Wasserproben, D Ergebnisse des FET für Matrixproben, E Ergebnisse der EROD-Induktion für Matrixproben, F Ergebnisse der AChE-Aktivität für Matrixproben

7.3.15 Quantifizierung der Aufnahme von Schadstoffen über MP (UHEI)

Mittels fluoreszenzoptischer Methoden ist lediglich eine semiquantitative Abschätzung von Schadstofftransfer und Sorption an MP-Partikel möglich. Über eine Kooperation mit der Hochschule Fresenius konnte die an der Uni Heidelberg hergestellte Befrachtung von MP mittels GC-MS (für Benz(k)fluoranthren) und LC-MS (für Chlorpyrifos) chemisch-analytisch gemessen werden, um zwischen den Schadstoffmengen zu differenzieren, die an MP-Partikel binden, in der Wasserphase zurückbleiben (Spülwasser) oder dem System durch Sorption an die Glaswaren entzogen wurden. Dazu wurden die entsprechenden MP-Fractionen an der Uni Heidelberg mit Schadstoffen befrachtet und an der Hochschule Fresenius wieder filtriert, um die partikuläre und flüssige Phase zu trennen. Als Extraktionsmittel diente n-Hexan, als interner Standard wurde Phenanthren eingesetzt. Nach der Phasentrennung (2 min Vortex und Einfrieren bei -20°C) wurden die Proben sterilfiltriert und in Glasröhrchen für die GC-MS Messung (Agilent Technologies, GC-Säule: Agilent 19091S-433I HP-5ms Inert; 30 m x 250 μm x 0,25 μm) überführt.

Für eine Quantifizierung der verfügbaren, übertragbaren Mengen an gelöstem und partikelassoziiertem Benz(k)fluoranthren im Nahrungskettenexperiment wurde daneben in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Universität Heidelberg, AG Erdinger) ein Aufschlussverfahren für die Bestimmung von Modellsubstanzen in Invertebraten (*D. magna*, *C. riparius*) via GC-MS etabliert. Als Grundlage diente das Extraktionsverfahren nach Kurth et al. (2017): Mit dieser Methode können PAHs in Konzentrationen bis zu 3 ng/ml nachgewiesen werden. Dazu wurden die Invertebraten aus dem Nahrungskettenexperiment nach der Inkubation mit BkF und BkF-beladenen Partikeln 3x in Elendt-M4 Medium gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Aufschluss (mechanische Lyse) der Organismen erfolgte in Acetonitril, MgSO_4 und NaCl für eine integrierte Flüssig-Flüssig-Extraktion des BkF in die hydrophobe Acetonitrilphase. Die Messung erfolgte mittels GC-MS (QP2010 SE Shimadzu, Säule HP 5 MS 30 m/0,25 mm/0,25 μm , Trägergas He).

Die Messungen an der Hochschule Fresenius zeigten, dass für Benz(k)fluoranthren bis zu 80 % der Substanz an das MP gebunden wird, weniger als 10 % BkF in der Wasserphase verbleiben und weitere 10 % BkF durch das Spülen von MP abgewaschen werden. Nach einer 24-stündigen Inkubation des beladenen MPs werden bis 20 % des Schadstoffes von den Partikeln in die wässrige Phase rückgelöst (Tabelle 41). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass ca. 10 % des BkF bereits während der Inkubation des MP an das Glas adsorbieren können und somit für den Beladungsprozess der MP-Partikel nicht mehr zur Verfügung stehen. Ebenfalls ist zu berücksichtigen, dass vor der GC-MS-Messung die Lösungen bis zu dreimal filtriert wurden, so dass ein gewisser Partikel- und Schadstoffverlust wahrscheinlich ist und die tatsächliche Menge an gebundener Substanz höher sein kann.

Tabelle 41: Ergebnisse der GC-MS Messungen von BkF-Partikeldispersionen.

	Ausgangskonzentration	Filter	Wasserphase	Filtrat	Spülwasser	Desorption (24 h)
[$\mu\text{g/L}$]	50	$31,8 \pm 8,1$	$4,2 \pm 0,2$	3	1,8	$7,5 \pm 3,4$
[%]	100	$63,6 \pm 16,3$	$8,4 \pm 0,2$	6	3,6	$14,9 \pm 6,7$

Die Messungen der Invertebraten aus dem Nahrungskettenexperiment haben die vorliegenden Ergebnisse aus den optischen Fluoreszenzmessungen und der EROD-Induktion bestätigt. Die transferierten Mengen an BkF liegen im niedrigen ng-Bereich (siehe Tabelle 42). Bei den Daphnien, die mit BkF-beladenen Partikeln inkubiert wurden, konnte keine Akkumulation festgestellt werden. Bei der Belastung

mit gelöstem BkF wurden durch die Fütterung ca. 60 ng BkF pro Tag auf einen Zebra-Bärbling transferiert. Diese Mengen liegen um Faktor 1000 unter den transferierten Mengen aus den Untersuchungen von Batel et al. (2016), die durch den Transfer mit *Artemia*-Nauplien bereits nach 2-tägiger Fütterung eine Induktion von CYP450 in *D. rerio* nachweisen konnte.

Im Gegensatz zu *D. magna* konnte in *C. riparius* eine Akkumulation von BkF durch die Verwendung von BkF-beladenen Partikeln nachgewiesen werden. Die Menge an durch das MP transferiertem BkF war dreimal höher als bei der Inkubation mit wassergelöstem BkF. Somit konnten pro Tag 22 ng BkF bei der gelösten BkF-Inkubation übertragen werden und ca. 64 ng BkF bei der Verwendung beladener Partikel.

Tabelle 42: Ergebnisse der GC-MS Messungen von Invertebraten aus Nahrungskettenexperimenten (Angaben als MW±SEM). * 10 Tiere/Messung ** 40 Tiere/Messung

	Ansatz	BkF (ng/mL)	Peak area	BkF / Tag / Fisch
<i>Daphnia</i> *	100 µg/L BkF _{aq}	13,8 ± 2,1	2137 ± 326	55,2 ng ± 8,4
	100 µg/L BkF + PMMA	<LoD		
Chironomus **	100 µg/L BkF _{aq}	10,6 ± 0,6	1637 ± 74	21,1 ng ± 1,1
	100 µg/L BkF + PMMA	31,7 ± 0,4	4907 ± 68.5	63,4 ng ± 0,8

Trotz hoher Partikelzahl (ca. 700.000 Partikel/L) und hoher Schadstoffkonzentration (100 µg/L BkF) führten die Mengen von transferiertem BkF bei keiner Nahrungskette zu signifikanten Effekten, was unter anderem durch die Anzahl der verfügbaren Invertebraten/Fütterung bedingt sein kann. Möglich sind auch erste Metabolisierungsprozesse in *D. magna/C. riparius*, so dass weniger BkF auf die Zebra-Bärblinge transferiert werden konnte. Für die Akkumulation von BkF im Organismus der Nährtiere ist die Desorption des Schadstoffes von aufgenommenen Partikeln eine notwendige Voraussetzung. Teuten et al. (2007) und Bakir et al. (2014) zeigten, dass sich hydrophobe Chemikalien unter darmähnlichen Bedingungen beschleunigt von Plastikpartikeln ablösen können. Trotzdem nimmt dieser Prozess offensichtlich mehr Zeit in Anspruch als die direkte Aufnahme von im Wasser gelöstem BkF. Möglicherweise war die Verweildauer der Partikel im Darm bei Chironomus länger, sodass trotz einer geringeren MP-Aufnahmerate mehr BkF desorbieren konnte.

Es kann also nachgewiesen werden, dass MP grundsätzlich über das Potential verfügt, hydrophobe Chemikalien auf Organismen zu übertragen. Verglichen mit der direkten Aufnahme von im Wasser gelöstem BkF ist der Transfer über MP jedoch weniger effektiv, da nur eine geringere Akkumulation in *C. riparius* nachgewiesen werden konnte. Dies ist in Einklang mit Studien von Bakir et al. (2016), Kleinteich et al. (2018) sowie Koelmans et al. (2016), die der Aufnahme von MP keinen signifikanten Beitrag zum Transfer von adsorbierten Chemikalien aus dem Wasser auf höhere Organismen beimaßen.

Durch Arbeiten von Batel et al. (2016) und Batel et al. (2018) im Rahmen des JPI-Oceans-Projekts Ephemare konnte gezeigt werden, dass MP nicht über das Darmepithel von Fischen aufgenommen werden und so eine Organverteilung von Schadstoffen durch partikel-assoziierten Transfer nicht stattfindet.

7.3.16 Langzeitwirkung von schadstoffbelastetem MP auf Fische (UHEI)

Um einen möglichen Transfer von Schadstoffen über MP auf Organismen zu untersuchen, wurden Langzeittests zur Wirkung umweltrelevanter Konzentrationen von MP-assoziierten Schadstoffen beim

Zebrabärbling durchgeführt. In Ergänzung zu den durchgeführten akuten Fischembryotests sollten potenziell adverse Langzeitauswirkungen von partikelassoziierten Schadstoffen auf adulte Zebrabärblinge untersucht werden. Dazu wurden als Modellsubstanzen Benz(k)fluoranthen, Chlorpyrifos und 17 α -Ethinylestradiol ausgewählt und mit unterschiedlichen MP-Sorten (PMMA, PS-fluoreszierend) Versuche in Anlehnung an OECD-Richtlinie 230 (OECD 2009) durchgeführt. Da es sich hierbei um echte Tierversuche handelt, wurden die Experimente nur in 2 Replikaten durchgeführt (Tierversuchsgenehmigung: AZ 35-9185.81/G-122/15).

Die Partikelzahl wurde auf 10^6 Partikel/L festgelegt, die Konzentrationsbereiche der Modellsubstanzen wurde aus Vorversuchen mit Embryonen und Literaturbefunden abgeleitet.

In Abhängigkeit vom primären Wirkungsmechanismus der einzelnen Substanzen wurden in den Zebrabärblingen unterschiedliche Endpunkte bestimmt. Es wurden Proben für die Analyse der EROD-Induktion (Leber), AChE-Inhibierung (Gehirn) und Vitellogenin-Induktion (Kopf-Schwanz) sowie der gesamte Magen-Darm-Trakt für die Kryoschnitte entnommen. Bei jeder Probennahme wurden Gewicht, Größe, Geschlecht erfasst. Zusätzlich wurden Proben zur Bestimmung der Wasserqualität und zur Bestimmung der Realkonzentration der Modellsubstanz (in Kooperation mit TP A3) entnommen. Zusätzlich wurde über eine Kooperation mit AG Transformationsprozesse am UfZ Leipzig (Prof. Reemtsma, Dr. Seiwert) eine analytische Quantifizierung der Transformationsprodukte von BkF und CPF in Leber- und Gehirnproben ermöglicht (Daten liegen noch nicht vor).

Alle Experimente wurden semi-statisch einem einfachen Wasserwechsel pro Tag durchgeführt. Die Expositionsgruppen bestanden immer aus 2 Negativkontrollen (Wasser, unbelastete MP) sowie aus 2 verschiedenen Konzentrationen der gelösten Modellsubstanz als Positivkontrollen und 2 Behandlungsgruppen, in denen das MP mit den festgelegten Konzentrationen belastet wurde.

Da EE2 nur über einen geringen $\log K_{ow}$ (3,67) und somit über eine geringe Bindungsaffinität für MP verfügt, wurden zwei weitere Expositionsszenarien hinzugefügt: die ausgewählten Konzentrationen von EE2 und das MP wurden im Sinne einer Ko-Exposition direkt in die Wasserphase gegeben. Auf diese Weise konnten alle mögliche Wechselwirkungen von Substanz und MP im Organismus abgedeckt werden. Die Exposition erfolgte über die Dauer von 14 Tage für EE2 und 21 Tage für BkF und CPF.

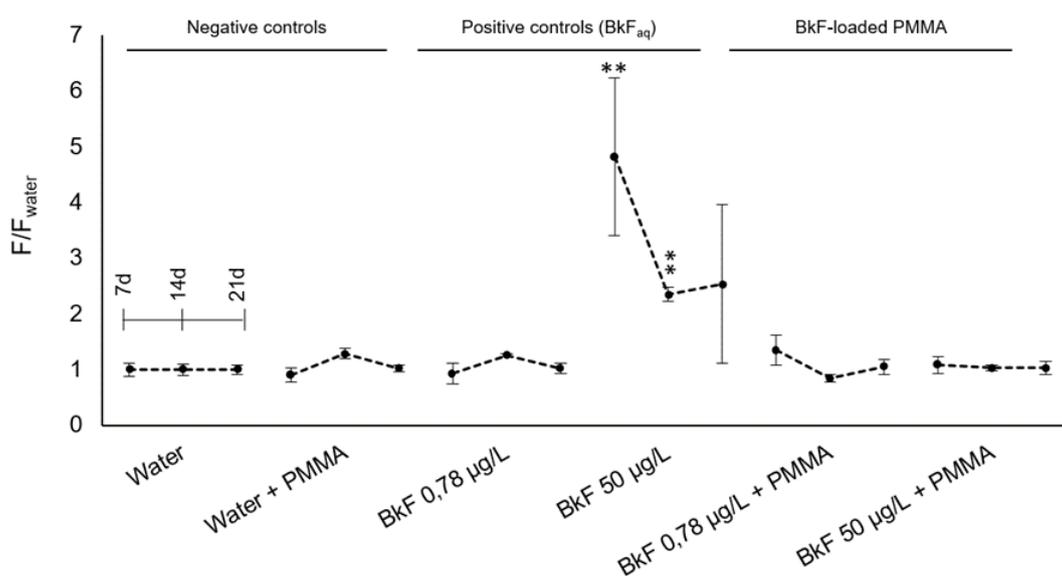


Abbildung 119: Fluoreszenzsignal im Magen-Darmschnitten von *D. rerio* nach 21 tägiger BkF Exposition

Über die Kryoschnitte der Magen-Darm-Proben konnte die Aufnahme von MP für alle Versuchsansätze nachgewiesen werden. Die Biomarker Acetylcholinesterase, CYP450-Induktion bzw. Vitellogenin-Synthese konnten dagegen keinen Effekt der Exposition gegenüber schadstoffbeladenem MP nachweisen. Lediglich die Positivkontrolle mit wassergelöstem BkF produzierte eine signifikante EROD-Induktion und ein eindeutiges Fluoreszenzsignals im Darm (Abbildung 119 und Abbildung 120). Die AChE-Inhibierung von ca. 10 % durch Chlorpyrifos und MP-gebundenes CPF war in allen Expositionsgruppen ähnlich. Die EROD-Induktion durch Chlorpyrifos führte auf Grund starker Varianz (n = 6) zu keinen eindeutigen Ergebnissen (Abbildung 121). In der EE2-Exposition zeigten sich lediglich für die Positiv-Kontrollen (gelöstes EE2, ohne PMMA) und die Ko-Expositionen mit gelöstem EE2 und PMMA Effekte (Abbildung 127). Über den Zeitraum von 14 Tagen kam es zu einer ähnlich signifikanten Zunahme des Dottervorläuferproteins Vitellogenin in diesen Szenarien, was auf das Vorhandensein von EE2 in der Wasserphase (nicht partikel-assoziiert) zurückzuführen ist. Die Effekte auf die Vtg-Induktion wurden durch eine Ko-Exposition von EE2 und MP nicht moduliert. Es zeigten sich Unterschiede in der Vtg-Induktion in Abhängigkeit von der EE2-Konzentration. Bei 5 ng/L EE2 begann die erhöhte Vtg-Induktion erst nach drei Tagen, wohingegen die Exposition gegenüber 20 ng/L EE2 bereits nach drei Tagen zu einer signifikant erhöhten Vtg Induktion führte. Die Expositionen von partikel-assoziiertem EE2 haben zu keiner Vtg-Induktion geführt, die Ergebnisse sind ähnlich zu den Vtg-Konzentrationen in den Kontrollen. Auf Grund des niedrigen log K_{ow} und der geringen Bindungsaffinität hat wahrscheinlich kein Transfer von EE2 über PMMA Partikel auf *Danio rerio* stattgefunden, oder der größte Anteil wurde bereits während des Beladungsprozesses von den Partikeln herunter gewaschen.

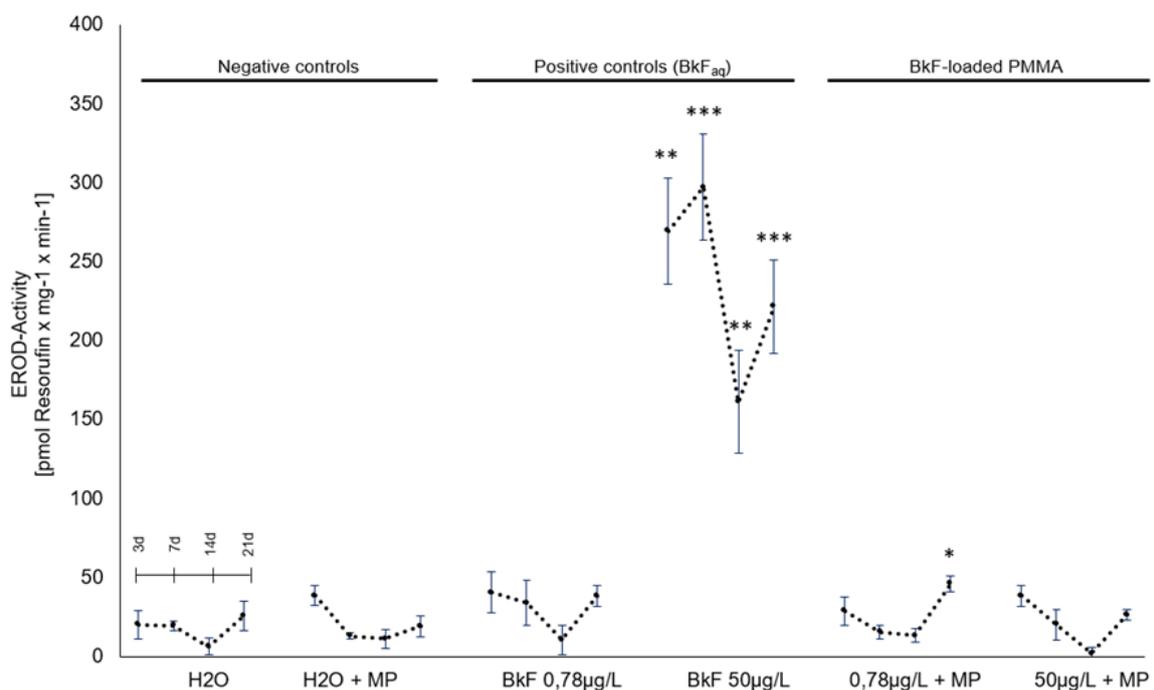


Abbildung 120: EROD-Induktion nach 21 tägiger BkF Exposition

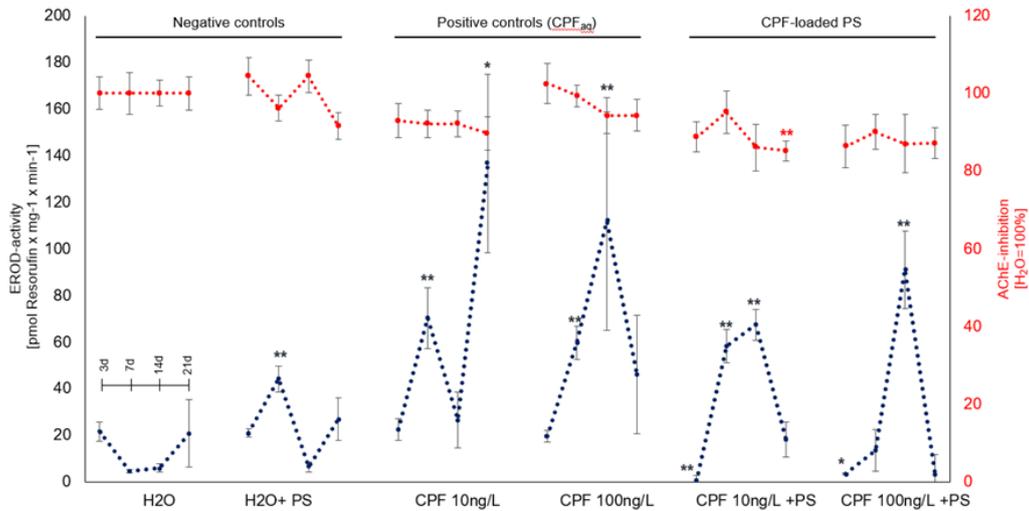


Abbildung 121: EROD-Induktion und AChE-Hemmung nach 21 tägiger Chlorpyrifos-Exposition

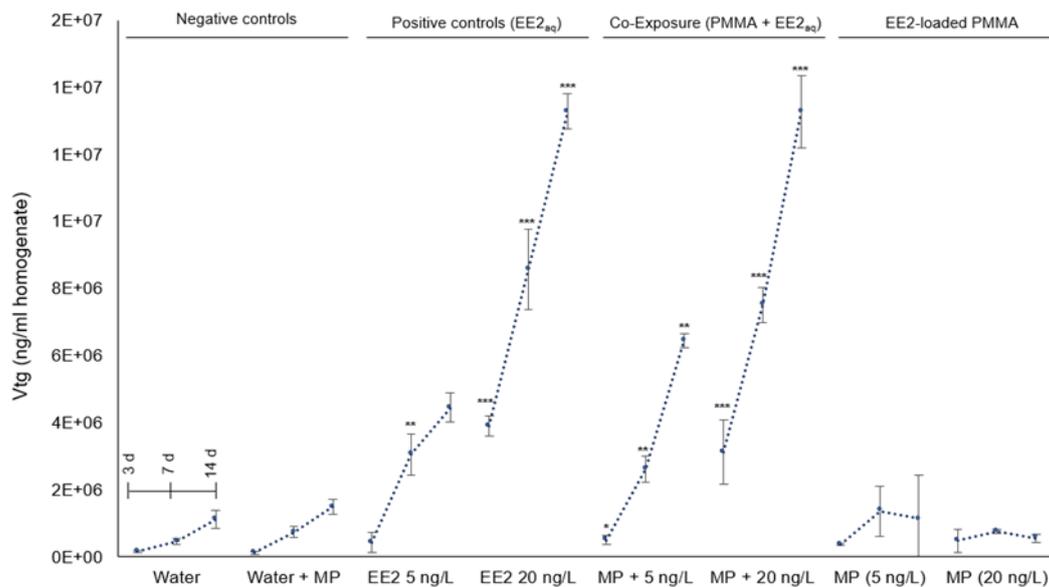


Abbildung 122: Vitellogenin-Konzentration in Kopf-Schwanz-Homogenaten nach 14tägiger EE2-Exposition

Mit den ausgewählten Endpunkten konnte nach einer Belastung über 21 Tage ein Schadstofftransfer durch partikelgebundene Substanzen nicht nachgewiesen werden. Trotz täglichen Wasserwechsels fand kaum Bioakkumulation in den unterschiedlichen Geweben von *Danio rerio* statt. Ebenso konnte ein Herunterlösen der Substanzen von MP-Partikeln in der Wasserphase durch die analytischen Messungen der Hochschule Fresenius ausgeschlossen werden. Denkbar wäre, dass sowohl BkF als auch Chlorpyrifos nach der Desorption an andere organische Partikel (Faeces, Futterreste) im Becken gebunden haben und somit eine Aufnahme durch den Zebraabrling nicht mehr möglich war. Bereits vorherige Messungen zum Sorptions- und Desorptionsverhalten bei dem Projektpartner aus TP A3 konnte nur geringfügige Desorption von 10 % BkF über 24 h gezeigt werden. Die gewählte MP-Konzentration von 1 Mio. Partikel/L übersteigt bisher berichtete umweltrelevante Konzentrationen in Oberflächengewässern (Koelmans et al. 2019; Triebkorn et al. 2019), daher scheinen Effekte bei geringeren (umweltrelevanten) MP-Konzentrationen unwahrscheinlich.

7.4 Humantoxische Wirkungen (UBA)

Für eine humantoxikologische Bewertung von MP müssen im Wesentlichen zwei potentielle Wirkmechanismen betrachtet werden: Zum einen die Wirkung des MP-Partikels selbst, bei welcher physikochemische Eigenschaften, wie z. B. Größe, Form und Oberflächenchemie, von Bedeutung sind; zum anderen die Effekte freigesetzter (migrierter) Stoffe aus dem Partikel (Additive, Kunststoffmonomere) bzw. die Wirkungen von an der Kunststoffoberfläche adsorbierten Stoffen (z. B. polychlorierte Biphenyle, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe). Im Gegensatz zu den partikulären Auswirkungen sind die Effekte vieler Additive und Kunststoffmonomere durch die Zulassung von Kunststoffmaterialien im Kontakt zu Trinkwasser gut belegt. Daher erfolgten im vorliegenden Projekt dahingehend keine Untersuchungen. Zu den Auswirkungen einer MP-Partikelexposition auf die menschliche Gesundheit besteht jedoch noch dringender Forschungsbedarf. Hierzu ist die Entwicklung und Etablierung einer humantoxikologischen Teststrategie erforderlich, um mögliche Gefährdungspotenziale von MP zu erfassen. Es wurden daher die Interaktionen zwischen MP-Partikeln und humanen Zellen sowie definierte Endpunkte (Zytotoxizität, Gentoxizität, Inflammation) untersucht, wobei unterschiedliche In-vitro-Testverfahren zum Einsatz kamen, deren Kombination eine hinreichende Identifizierung des Wirkmechanismus von MP erlaubt (Abbildung 123). Dabei wurden die Erfahrungen und entwickelten Verfahren zur Bewertung von Einzelsubstanzen (nach entsprechender Modifikation) des BMBF-Verbundprojektes "Tox-Box: Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung" (Förderkennzeichen: 02WRS1282A) einbezogen. Die Durchführung erfolgte unter Beachtung potentieller Interferenzen zwischen den In-vitro-Testverfahren (Testreagenzien/Messtechnik) und den MP-Partikeln sowie unter Berücksichtigung der OECD-Guidelines für Nanopartikel.

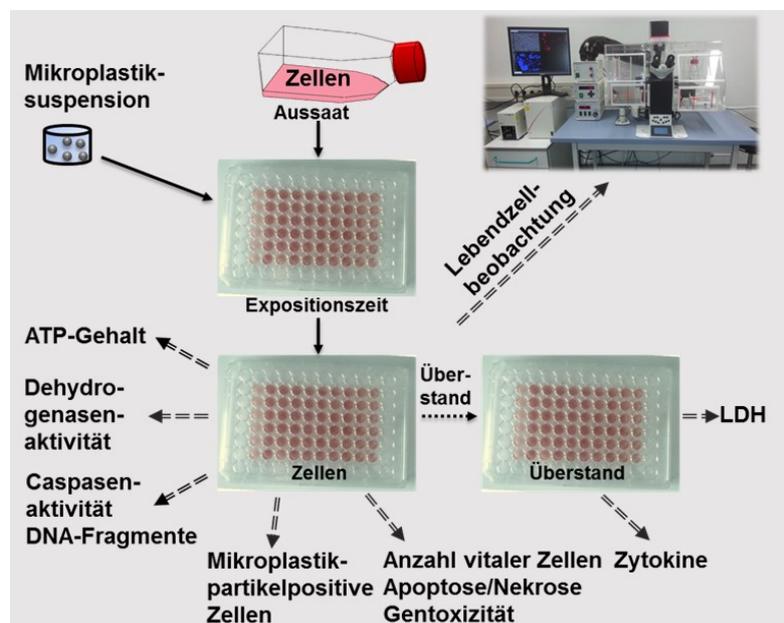


Abbildung 123: Testprinzip zur Erfassung des humantoxikologischen Gefährdungspotenzials. (ATP: Adenosintri-phosphat; LDH: Lactatdehydrogenase)

7.4.1 Material und Methoden

7.4.1.1 Auswahl der Zellkulturen

In den vorliegenden Untersuchungen wurden Humanzellen verwendet, da hierdurch über die Identifizierung toxikologischer Schlüsselmechanismen eine Vorhersage potentieller In-vivo-Wirkungen (im menschlichen Organismus) möglich ist.

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer dermalen MP-Partikelexposition diente die immortalisierte humane Keratinozytenzelllinie HaCat (Cell Line Services, Eppelheim, Abbildung 124). Es handelt sich dabei um spontan transformierte, nicht karzinogene, adulte Zellen der Epidermis, die eine Vielzahl an epidermalen Differenzierungsmarkern exprimieren (Boukamp et al. 1988, Grabbe et al. 1996, Lehmann 1997) und daher ein gutes In-vitro-Modell für diesen Zelltyp darstellen, der ca. 95 % der epidermalen Zellen ausmacht (Colombo et al. 2017).

In Vorversuchen wurden zusätzlich bezüglich des dermalen Expositionspfades humane primäre Fibroblasten der adulten Haut (NHDF [Normal human dermal fibroblasts]; Lonza, Köln) getestet. Jedoch erwiesen sich die Zellen für die geplanten Versuche als ungeeignet (starke Zellverluste infolge von Waschschritten und Zellfärbung), sodass dieser Zelltyp keine weitere Anwendung fand.

Um die Konsequenzen einer inhalativen Exposition zu untersuchen, wurde die alveoläre Zelllinie A-549 (ACC 107, Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig; Abbildung 124) verwendet. Diese humane Plattenzell-Lungenkarzinomzelllinie (Giard et al. 1973) dient als Modell für Type-II-Pneumozyten (Carmona-Rosas et al. 2017, Lieber et al. 1976), den häufigsten Zelltyp der Alveolen, die das Surfactant bilden.

Zur Untersuchung einer möglichen Lebertoxizität dienten humane Leberkarzinomzellen (HepG2-Zelllinie, ACC 180, Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig, Abbildung 124).

Weiterhin wurden bestimmte Experimente an MonoMac-1-Zellen, einer humanen Monozyten-Zelllinie (akute monozytäre Leukämie-Zellen (Steube et al. 1997, Ziegler-Heitbrock et al. 1988); ACC 252, Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig, Abbildung 124) durchgeführt.

Durch den Einsatz der hier beschriebenen Zellen wurde die Mehrzahl der möglichen Expositionspfade abgebildet.

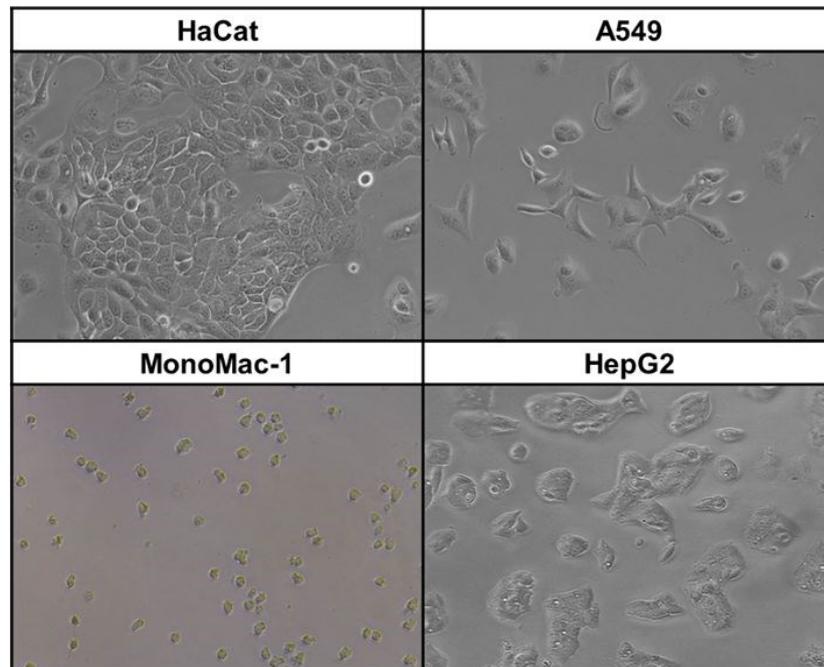


Abbildung 124: Verwendete Zelltypen

Die Kultivierung der genannten Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Das jeweilig verwendete Kulturmedium ist in Tabelle 43 aufgeführt. Der Anteil an fötalem Kälberserum (FKS) war in einigen Versuchsansätzen (Zytokinbestimmung; Untersuchungen zur Partikelaufnahme) auf 1 % reduziert. Gegebenenfalls wurden Antibiotika (Penicillin (100 U/mL)/Streptomycin (100 µg/mL)) zugesetzt.

Tabelle 43: Übersicht der eingesetzten Kulturmedien

Zelltyp	Kulturmedium
HaCat-Zelllinie	90 % Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich, D5546) + 10 % FKS (Sigma Aldrich, F7524) + 1 % Glutamin (Sigma Aldrich, G7513)
A549-Zelllinie	90 % RPMI 1640 (Sigma Aldrich, R0883) + 10 % FKS (Sigma Aldrich, F7524) + 1 % Glutamin (Sigma Aldrich, G7513)
MonoMac-1-Zelllinie	90 % RPMI 1640 (Sigma Aldrich, R0883) + 10 % FKS (Sigma Aldrich, F7524) + 1 % Glutamin (Sigma Aldrich, G7513) + 1 mM Natrium Pyruvat (Sigma Aldrich, S8636) + 1x MEM Non-Essential Amino Acid Solution (Sigma Aldrich, M7145)
HepG2-Zelllinie	90 % RPMI 1640 (Sigma Aldrich, R0883) + 10 % FKS (Sigma Aldrich, F7524) + 1 % Glutamin (Sigma Aldrich, G7513)

7.4.1.2 Verwendete Mikroplastikproben

In den humantoxikologischen Untersuchungen wurden PS-Partikel unterschiedlicher Größe (Tabelle 44 und Tabelle 45) und Form (sphärische Partikel (microParticles GmbH); unregelmäßig geformte Partikel (TU Berlin)) sowie ein Melaminharzpartikel (MF-FluoGrün-0.5, sphärisch, microParticles GmbH) getestet. Darunter waren sowohl fluoreszenzmarkierte Partikel als auch ein unmarkierter Partikel (microParticles GmbH; Tabelle 44) sowie Partikel ohne bzw. mit Pigmenten (TU Berlin).

Tabelle 44: Übersicht der verwendeten kommerziellen MP-Partikel.

Labornummer	Probenbezeichnung	Herkunft & Eingangsdatum	Größe [µm]	Cwässrige Ausgangs-suspension	Bemerkungen
PS024	PS-Forschungspartikel (Charge: PS-F-KM317)	microParticles GmbH 08.08.2019	0,239 ± 0,006	50 mg/ml	keine Fluoreszenzmarkierung
PS025	PS-FluoGrün-0.25 (Charge: PS-FluoGrün-Fi289-1)	microParticles GmbH 04.06.2019	0,235 ± 0,008	25 mg/ml	fluoreszenzmarkierte PS-Partikel: abs/em = 502/518 nm
PS03	PS-FluoRot-0.3 (Charge: PS-FluoRot-Fi207-1)	microParticles GmbH 24.01.2017	0,250 ± 0,060	25 mg/ml	fluoreszenzmarkierte PS-Partikel: abs/em = 530/607 nm
PS05	PS-FluoGrün-0.5 (Charge: PS-FluoGrün-Fi194-1)	microParticles GmbH 04.06.2019	0,450 ± 0,010	25 mg/ml	fluoreszenzmarkierte PS-Partikel: abs/em = 502/518 nm
PS075	PS-FluoGrün-0.75 (Charge: PS-FluoGrün-Fi132-1)	microParticles GmbH 04.06.2019	0,710 ± 0,023	25 mg/ml	fluoreszenzmarkierte PS-Partikel: abs/em = 502/518 nm
PS1	PS-FluoRot-1.0 (Charge: PS-FluoRot-Fi267)	microParticles GmbH 24.01.2017	0,980 ± 0,040	25 mg/ml	fluoreszenzmarkierte PS-Partikel: abs/em = 530/607 nm
MF05	MF-FluoGrün-0.5 (Charge: MF-FluoGrün-S876-1)	microParticles GmbH 04.06.2019	0,447 ± 0,03	25 mg/ml	fluoreszenzmarkierte Melaminharz-Partikel: abs/em = 506/529 nm

Tabelle 45: Übersicht der verwendeten MP-Partikel der TU Berlin

Labor-nummer	Probenbezeichnung	Eingangsdatum	Größe [µm]	Cwässrige Ausgangs-suspension	Bemerkungen
MP03	PS < 5 µm	20.02.2017	< 5	13.800 Partikel/ml	farblose PS-Partikel
MP03 (170330)	PS < 5 µm 170330	03.04.2017	< 5	38.900 Partikel/ml	farblose PS-Partikel
MP04	Red GG < 50 µm	20.02.2017	< 50	50.500 Partikel/ml	PS-Partikel mit gelblich-rotem Pigment (Hostasol Red GG S.O.63)
MP05	Red 5B < 50 µm	20.02.2017	< 50	54.200 Partikel/ml	PS-Partikel mit bläulich-rotem Pigment (Hostasol Red 5B V.R.41)
MP06	Yellow 3G < 50 µm	20.02.2017	< 50	70.600 Partikel/ml	PS-Partikel mit grün-gelbem Pigment (Hostasol Yellow 3G S.Y.98)
MP07	orange < 5 µm (= Red GG)	28.07.2017	< 5	6.667 Partikel/ml	PS-Partikel mit gelblich-rotem Pigment (Hostasol Red GG S.O.63)
MP08	Red < 5 µm (= Red 5B)	28.07.2017	< 5	6.667 Partikel/ml	PS-Partikel mit bläulich-rotem Pigment (Hostasol Red 5B V.R.41)
MP09	Gelb < 5 µm (= Yellow 3G)	28.07.2017	< 5	6.667 Partikel/ml	PS-Partikel mit grün-gelbem Pigment (Hostasol Yellow 3G S.Y.98)
MP10	Fluoreszierend < 5 µm (= Red 5B)	09.10.2017	< 5	100.000 Partikel/ml	PS-Partikel mit bläulich-rotem Pigment (Hostasol Red 5B V.R.41)
MP11	< 5 µm nicht fluoreszierend	17.11.2017	< 5	104.000 Partikel/ml	farblose PS-Partikel

Die von der TU Berlin bereitgestellten Proben wurden für die ersten Testungen verwendet. In Vorversuchen konnten Fluoreszenzeigenschaften der pigmentierten Proben nachgewiesen werden (Abbildung 125).

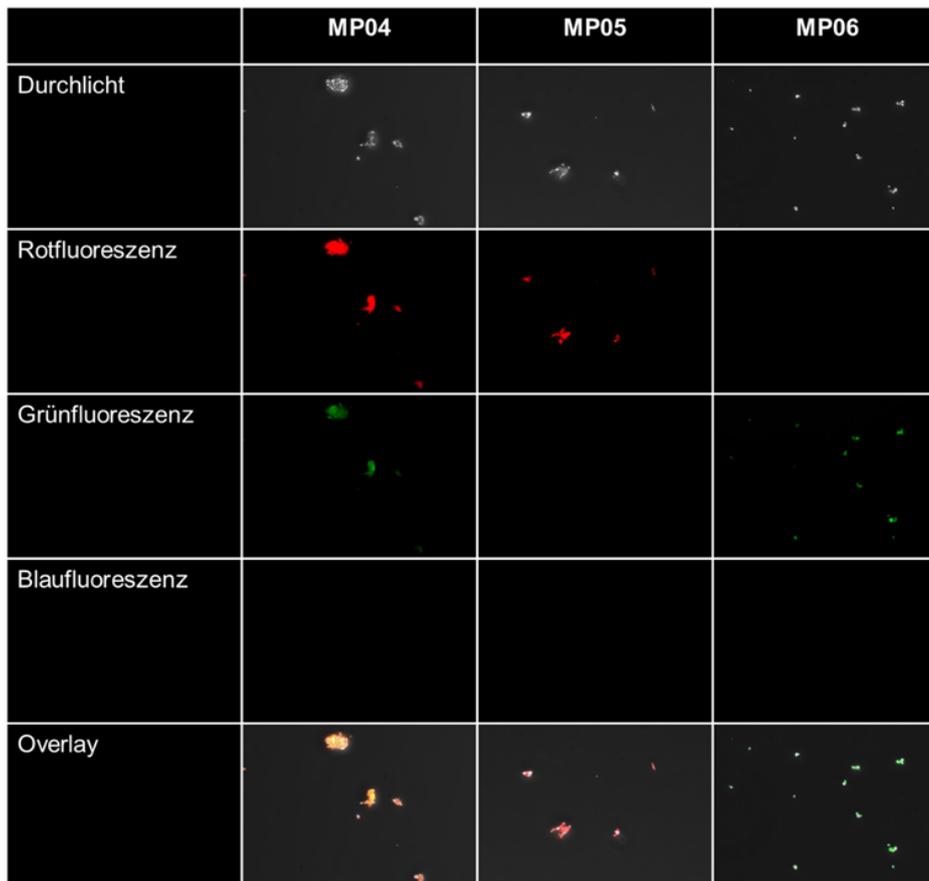


Abbildung 125: Mikroskopische Aufnahmen ausgewählter MP-Proben (rot: Filtersystem N3 [Ex:535–557 nm, DC: 565 nm, Em: 560–640 nm]; grün: Filtersystem L5 [Ex:440–520 nm, DC: 505 nm, Em: 497–557 nm]; blau: Filtersystem A4 [Ex: 320–400 nm, DC: 400 nm, Em: 430–510 nm]; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar)

Jedoch stellte sich im weiteren Testverlauf heraus, dass deren Fluoreszenzeigenschaften nicht für die geplanten mikroskopischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen geeignet waren, da die Fluoreszenzintensitäten der kleineren, für die Untersuchungen der MP-Zell-Interaktionen relevanten Partikel unzureichend waren. Daher wurden für die entsprechenden Testungen die kommerziellen Partikel verwendet, welche zudem den Vorteil einer einheitlichen Größenverteilung aufwiesen und somit eine standardisierte Untersuchung ermöglichten.

7.4.1.3 Interaktionen zwischen Mikroplastikpartikeln und Zellen

Untersuchungen zu MP-Zell-Interaktionen erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskopie (Forschungsmikroskop Leica DMI6000; Software: Leica LAS X; Filtersysteme: N2.1 [Ex: BP 515–560 nm, Dichroid (DC): 580 nm, Em: LP 590 nm]; N3 [Ex: 535–557 nm, DC: 565 nm, Em: 560–640 nm]; L5 [Ex: 440–520 nm, DC: 505 nm, Em: 497–557 nm]; A4 [Ex: 320–400 nm, DC: 400 nm, Em: 430–510 nm], Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) und mittels Durchflusszytometrie (BD FACSCanto™ II, BD Biosciences).

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden $0,28 \times 10^5$ HaCat pro ml und Well in eine 6-Well-Platte eingesät und nach 24-stündiger Anwachsphase mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ PS03 bzw. $1 \mu\text{g/ml}$ PS1 für 24 h, 48 h oder 72 h exponiert. Für A549 wurden $0,4 \times 10^5$ und für HepG2 $0,5 \times 10^5$ Zellen pro ml und Well eingesät und nach 24 h mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ der jeweiligen MP-Suspension für 48 h inkubiert. Es schlossen sich Waschschritte mit serumfreien Puffer (37°C) und die Färbung der Zellen mittels Hoechst 33342 (PromoKine, Heidelberg) an (HaCat: $1 \mu\text{g/ml}$, 30 min; A549: $0,5 \mu\text{g/ml}$, 15 min; HepG2: $0,5 \mu\text{g/ml}$, 15 min; 37°C). Weiterhin wurden $0,8 \times 10^5$ MonoMac-1 pro ml und Well mit $1 \mu\text{g/ml}$ PS1 für 24 h exponiert.

Zur quantitativen Untersuchung mittels Durchflusszytometrie wurden $3,3 \times 10^5$ HaCat pro Well in eine 6-Well-Platte eingesät und 24 h später mit $50 \mu\text{g/ml}$ PS03 belastet. Für Langzeitversuche erfolgte die Aussaat von $0,2 \times 10^5$ A549, $3,3 \times 10^5$ MonoMac-1 bzw. $0,5 \times 10^5$ HepG2 pro ml und Well in einer 24-Well-Platte. Nach 24 h wurden die Zellen mit $10 \mu\text{g/ml}$ MP-Suspension exponiert. Nach entsprechenden Expositionszeiten wurden die Überstände und die Zellen, jeweils nach vorheriger Durchmischung zur Gewährung einer homogenen Verteilung, mittels Durchflusszytometrie (BD FACSCanto™ II, BD Biosciences, Heidelberg) analysiert.

7.4.1.4 Wirkmechanismus Entzündungen

Zur Bestimmung des proinflammatorischen Einflusses von MP wurden nach einer Anwachsphase von 24 h HaCat für 24 h und 72 h, A549 für 48 h; 72 h und 192 h, sowie HepG2 für 72 h mit MP-Partikeln belastet. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit IFN- γ und TNF- α behandelt wurden (HaCat: je 5 ng/ml ; A549: je 10 ng/ml , 5 ng/ml , $2,5 \text{ ng/ml}$ und 1 ng/ml ; HepG2: je 20 ng/ml , 10 ng/ml , 5 ng/ml , $2,5 \text{ ng/ml}$ und 1 ng/ml). Der Gehalt verschiedener relevanter pro- und antiinflammatorischer Zytokine wurde im Zellkulturüberstand unter Verwendung der BD™ Cytometric Bead Arrays: Human Inflammatory und Human Chemokine Kit (BD Biosciences, Heidelberg) durchflusszytometrisch (BD FACSCanto™ II, BD Biosciences, Heidelberg) bestimmt.

7.4.1.5 Wirkmechanismus Zytotoxizität

Die zytotoxische Wirkung der MP-Partikel wurde über die Detektion des relativen Gehaltes an Adenosintriphosphat (ATP) vitaler Zellen erfasst. Hierzu wurde der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega GmbH) entsprechend den Herstellerangaben angewandt und die Lumineszenz gemessen (Centro XS3 LB 960, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad).

Des Weiteren wurden Testungen zur Bestimmung des relativen Dehydrogenasegehaltes vitaler Zellen mittels Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und die Detektion des relativen Laktatdehydrogenasegehaltes im Zellkulturüberstand mittels LDH-Assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) sowie die Erfassung der Caspasenaktivität (Homogeneous Caspases Assay, fluorimetric; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und von DNA-Fragmenten (Cell Death Detection ELISA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die Absorption wurde am Plattenphotometer Zenyth 200rt (Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co.KG, Bremen) und die Fluoreszenz am GENios™-Plattenreader (Tecan Group Ltd., Crailsheim) gemessen und mit den Werten unbehandelter Kontrollzellen ins Verhältnis gesetzt. Im Zuge der Anwendung des In Vitro MicroFlow® Micronucleus Analysis Kit (Litron Laboratories, USA) wurden Daten zur Anzahl vitaler Zellen und zum Anteil apoptotischer/nekrotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie (BD FACSCanto™ II, BD Biosciences, Heidelberg) erhalten.

7.4.1.6 Wirkmechanismus Gentoxtizität

Um mögliche gentoxische Konsequenzen einer MP-Exposition aufzudecken, wurden A549 für 48 h und 192 h sowie HepG2 für 72 h mit $5 \mu\text{g/ml}$ und $10 \mu\text{g/ml}$ MP-Suspension exponiert. Es folgte die Analyse mittels In Vitro MicroFlow® Micronucleus Analysis Kit (Litron Laboratories, USA) am Durchflusszytometer (BD FACSCanto™ II, BD Biosciences, Heidelberg) gemäß Herstellervorgaben zur Detektion von Micronuclei und hypodiploiden Kernen.

7.4.2 Ergebnisse

7.4.2.1 Irreguläre Partikel $< 5 \mu\text{m}$ bzw. $< 50 \mu\text{m}$

Die ersten Testungen (MP-Partikel-Zell-Interaktionen; Zytokinausschüttung; Zytotoxizität/Vitalität (XTT; LDH; ATP), Caspasenaktivität, DNA-Fragmente; Gentoxtizität (In Vitro MicroFlow® Micronucleus Analysis Kit) erfolgten mit Partikelproben der TU Berlin und Keratinozyten, teilweise mit Pneumozyten. Insgesamt wurden für diese Partikel keine bzw. keine bedeutenden Effekte detektiert (Daten nicht gezeigt).

7.4.2.2 Partikel < 1 µm

7.4.2.2.1 Interaktionen zwischen Mikroplastikpartikeln und Zellen

Mikroskopisch konnten Interaktionen zwischen den MP-Partikeln und den Keratinozyten festgestellt werden (Abbildung 126a). Es zeigte sich eine deutliche Anlagerung der Partikel an die Zellen und zwischen den Zellen. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung bestätigten die Interaktion der Partikel mit den Zellen (Abbildung 126b).

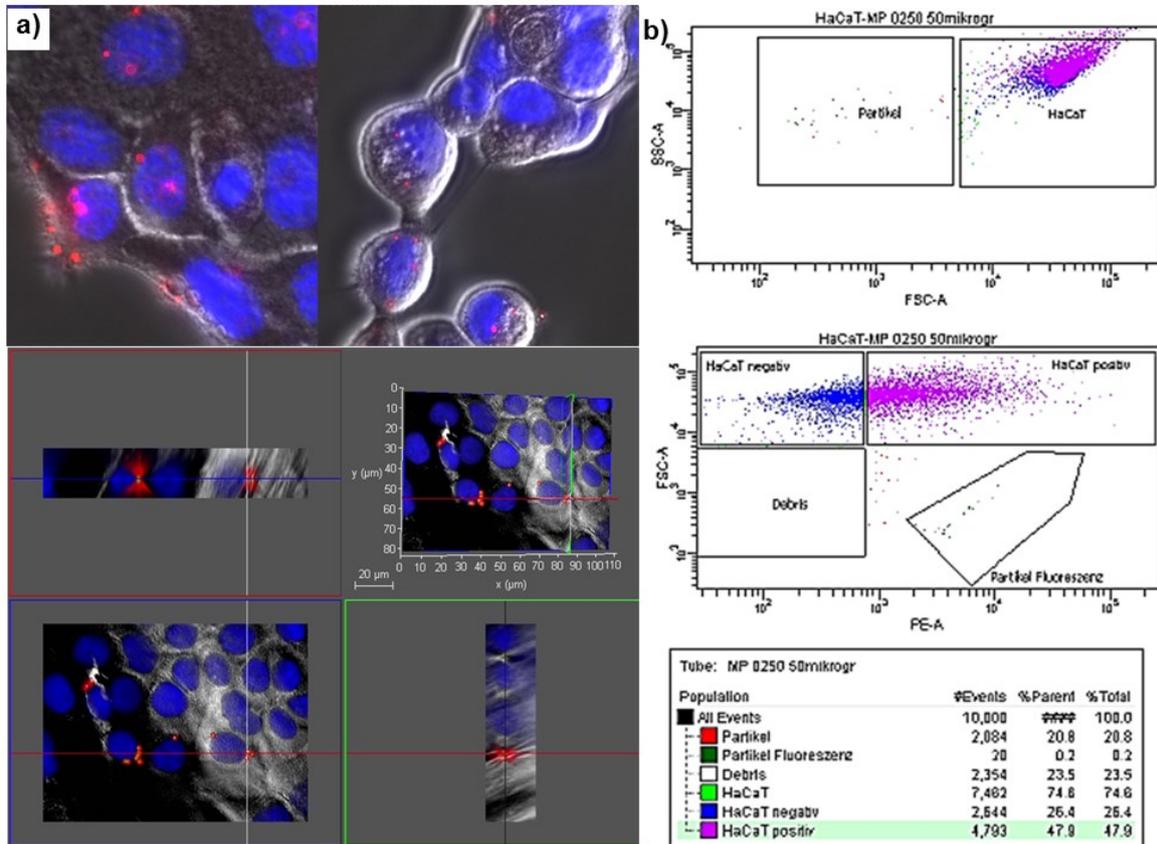


Abbildung 126: Interaktion zwischen MP-Partikeln und humanen Keratinozyten nach 24 h Exposition. (a) Mikroskopische Untersuchung, rot: MP-Partikel PS03 (PS-FluoRot-0.3; $c = 1 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,5 \mu\text{g/ml}$); blau: Zellkern (Hoechst 33342); (b) Ergebnisse der Durchflusszytometrie ($c = 50 \mu\text{g/ml}$)

Interaktionen zeigten sich auch zwischen Pneumozyten und MP-Partikeln unterschiedlicher Größe (Abbildung 127a). Zudem deutet die dreidimensionale Auswertung der mikroskopischen Aufnahme auf eine intrazelluläre Lokalisation der Partikel hin (Abbildung 127b).

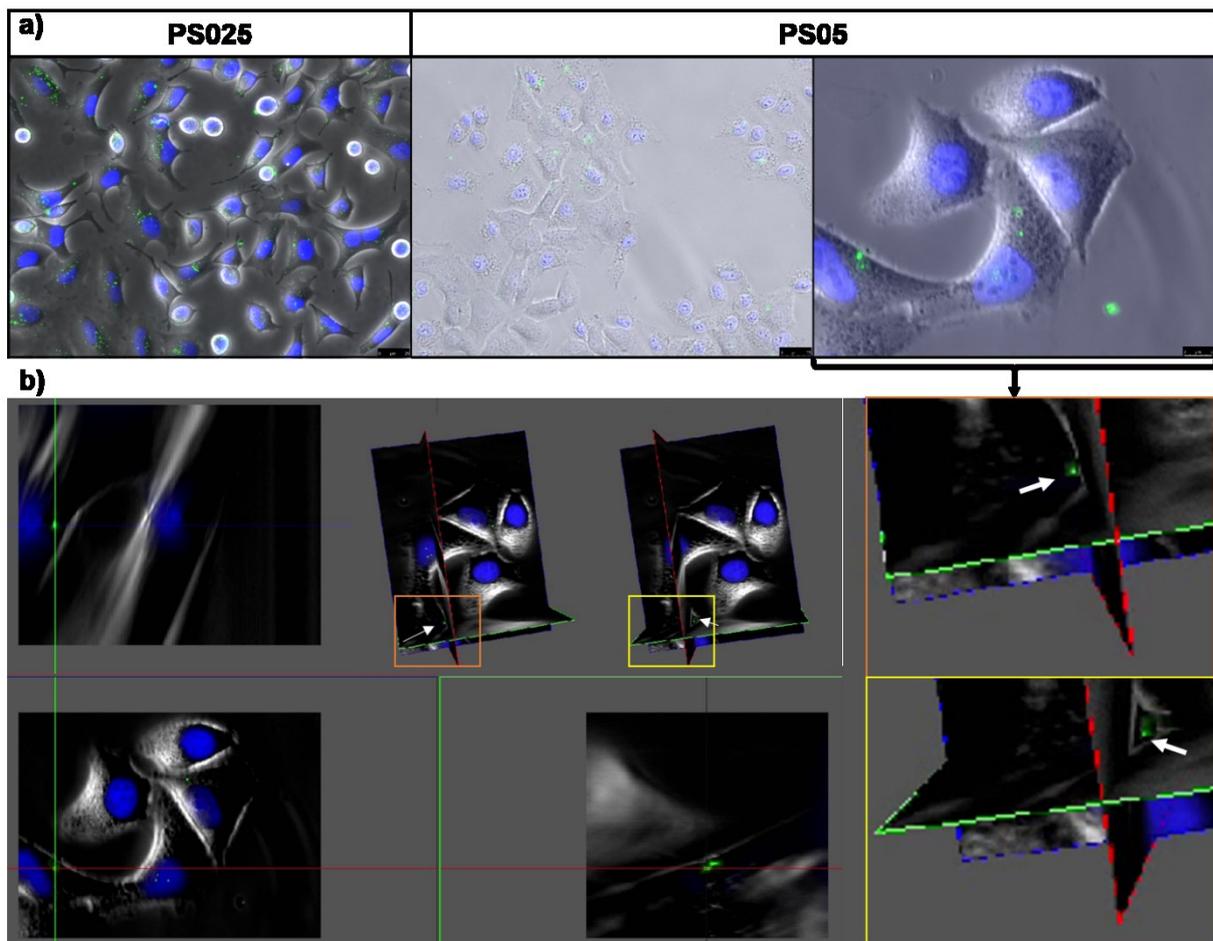


Abbildung 127: MP-Partikelinteraktionen mit Pneumozyten (A549) nach 48 h Inkubation. a) Vergleich zwischen PS025 und PS05. b) Dreidimensionale Auswertung. grün: MP-Partikel (PS025 bzw. PS05); blau: Zellkern (Hoechst 33342)

Die Interaktionen zwischen MP-Partikeln und Pneumozyten wurden über einen Zeitraum von bis zu 216 h verfolgt (Abbildung 128 und Abbildung 129). Der Anteil an Pneumozyten mit intrazellulären PS-Partikeln bzw. an der Zelle gebundenen Partikeln war nach Exposition mit 0,25 μm (PS03; Abbildung 128a; PS025 Abbildung 129b) und 0,5 μm großen Partikeln (PS05; Abbildung 129b) deutlich höher als nach Exposition mit 0,98 μm großen PS-Partikeln (PS1; Abbildung 128b). Der Anteil freier Partikel, die im Zellkulturüberstand detektiert werden konnten, sank nach Exposition mit 0,3 μm großen Partikeln deutlich innerhalb der ersten 120 h (Abbildung 128a). Nach Exposition mit den größeren Partikeln nahm der Anteil freier Partikel im Zellkulturüberstand langsamer und weniger stark ab (Abbildung 128b), sodass die Pneumozyten die kleineren PS-Partikel deutlich stärker aufnahmen. Der Anteil an Pneumozyten ohne MP-Partikelkontakt war nach Exposition bei allen Partikelgrößen gering. Im Vergleich zu den PS-Partikeln gleicher Größe wurde für die Melaminharzpartikel eine geringere Interaktion mit den Pneumozyten beobachtet (Abbildung 129a). Die Abnahme an MP-positiven Zellen bei gleichzeitigem Anstieg freier Partikel in der Zellprobe, aber nicht im Überstand (Daten nicht gezeigt) deutet auf eine vermehrte Exozytose der 0,98 μm großen Partikel nach 144 h und 192 h (Abbildung 128b) bzw. der 0,5 μm großen PS- und MF-Partikel nach 96 h (Abbildung 129b) hin. Für PS05 resultiert die Abnahme zum Teil aus einer höheren Menge an PS05-positiven Zellen, die im abgenommenen Zellkulturüberstand bei 96 h im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten detektiert wurde.

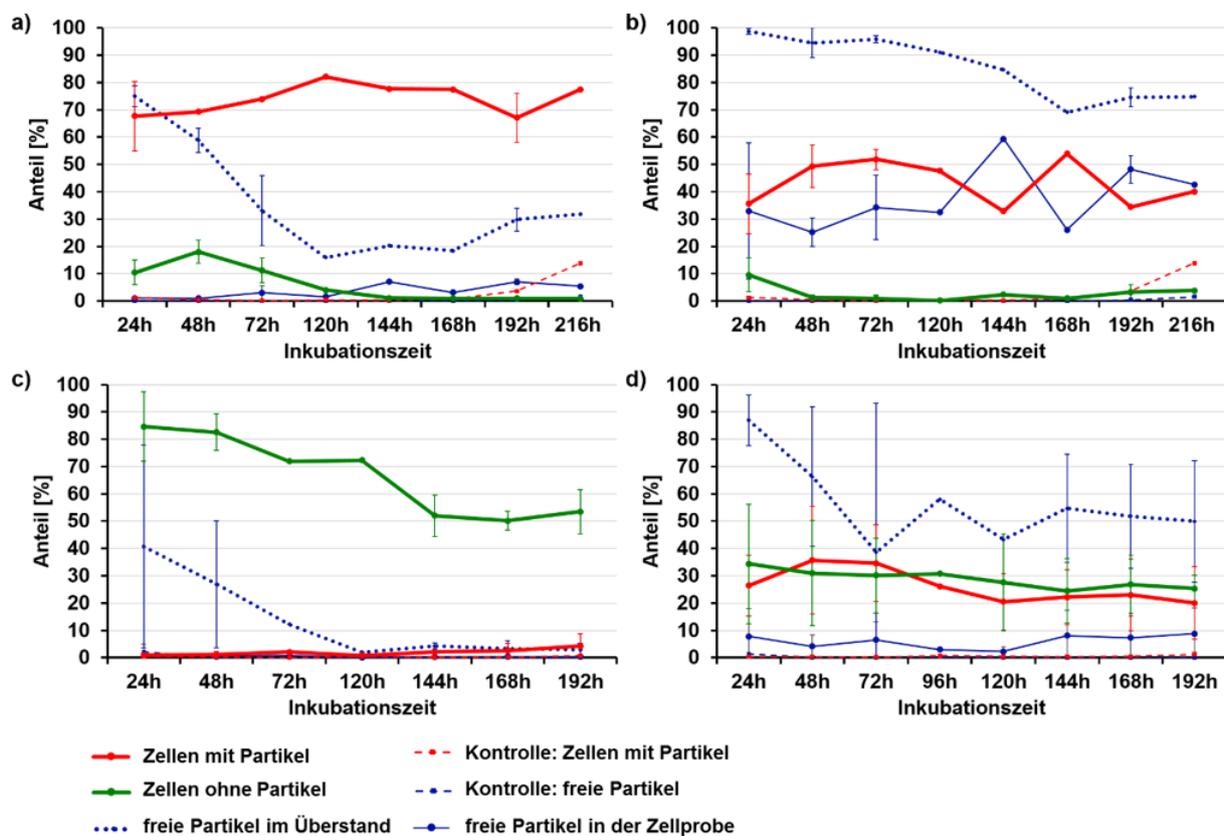


Abbildung 128: Quantitative Analyse der MP-Zell-Interaktion: (a) Pneumozyten (A549) nach Exposition mit 0,25 μm großen PS-Partikeln (PS03), $n = 1$ (120, 144, 168 und 216 h), $n = 2$ (48, 72 und 192 h), $n = 3$ (24 h); (b) Pneumozyten (A549) nach Exposition mit 0,98 μm großen PS-Partikeln (PS1), $n = 1$ (120, 144, 168 und 216 h), $n = 2$ (48, 72 und 192 h), $n = 3$ (24 h); (c) Monozyten (MonoMac-1) nach Exposition mit 0,25 μm großen PS-Partikeln (PS03), $n = 1$ (72 h, 120 h), $n = 2$ (24, 48, 144, 168 und 192 h); (d) Monozyten (MonoMac-1) nach Exposition mit 0,98 μm großen PS-Partikeln (PS1), $n = 1$ (96 h), $n = 2$ (72 h, 120 h), $n = 3$ (144, 168 h und 192 h), $n = 4$ (24 h, 48 h)

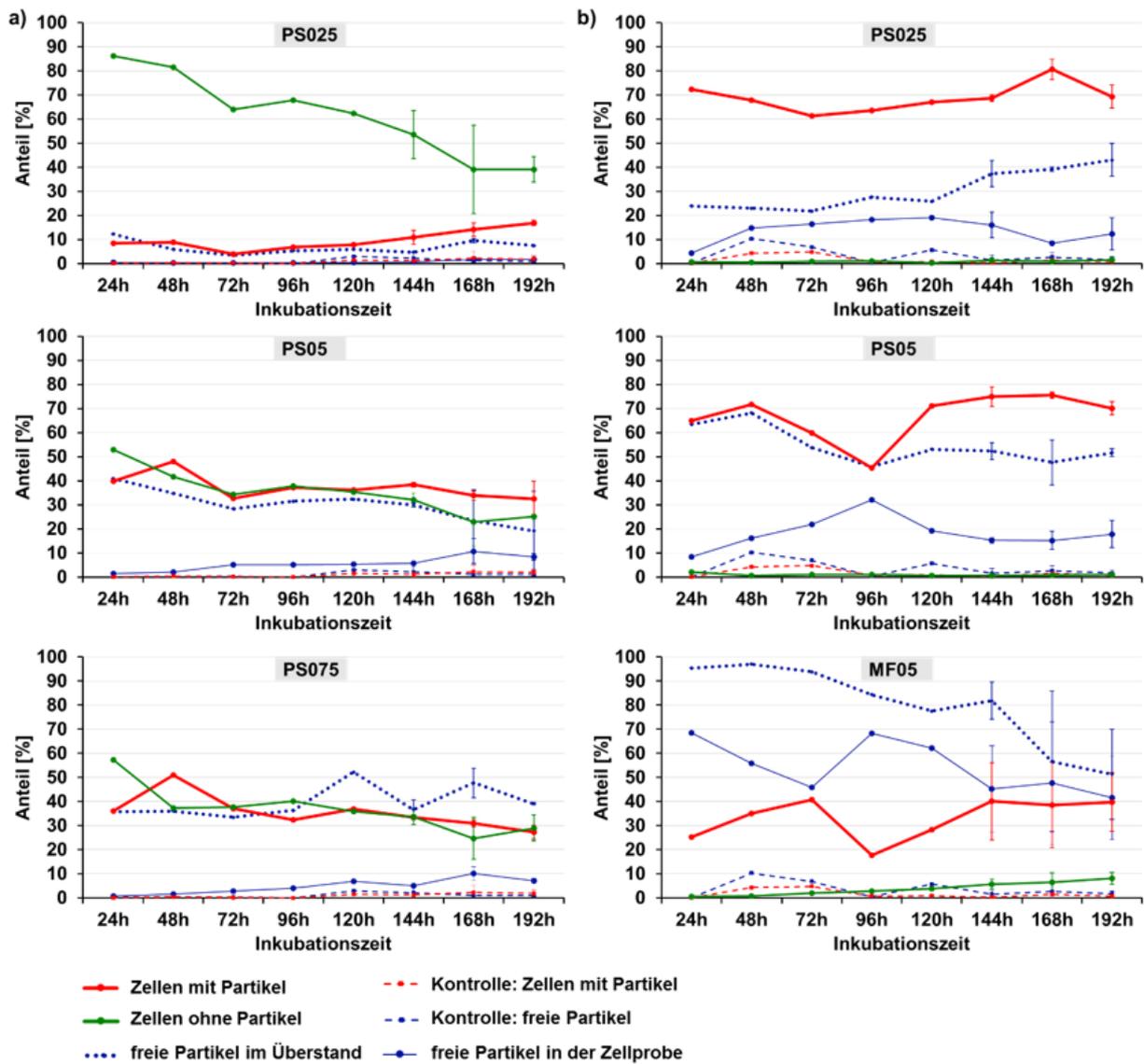


Abbildung 129: Quantitative Analyse der MP-Zell-Interaktion: (a) Monozyten (MonoMac-1) nach Exposition unterschiedlich großer PS-Partikel (PS025, PS05, PS075); (b) Pneumozyten (A549) nach Exposition mit PS-Partikeln (PS025 & PS05) und einem Melaminharzpartikel (MF05). $n = 1$ (24 h–120 h); $n = 2$ (144 h–192 h)

Abbildung 130 zeigt die Interaktionen von Monozyten und 0,98 µm großen PS-Partikeln (PS1) über einen Zeitraum von 4 h (siehe Pfeile).

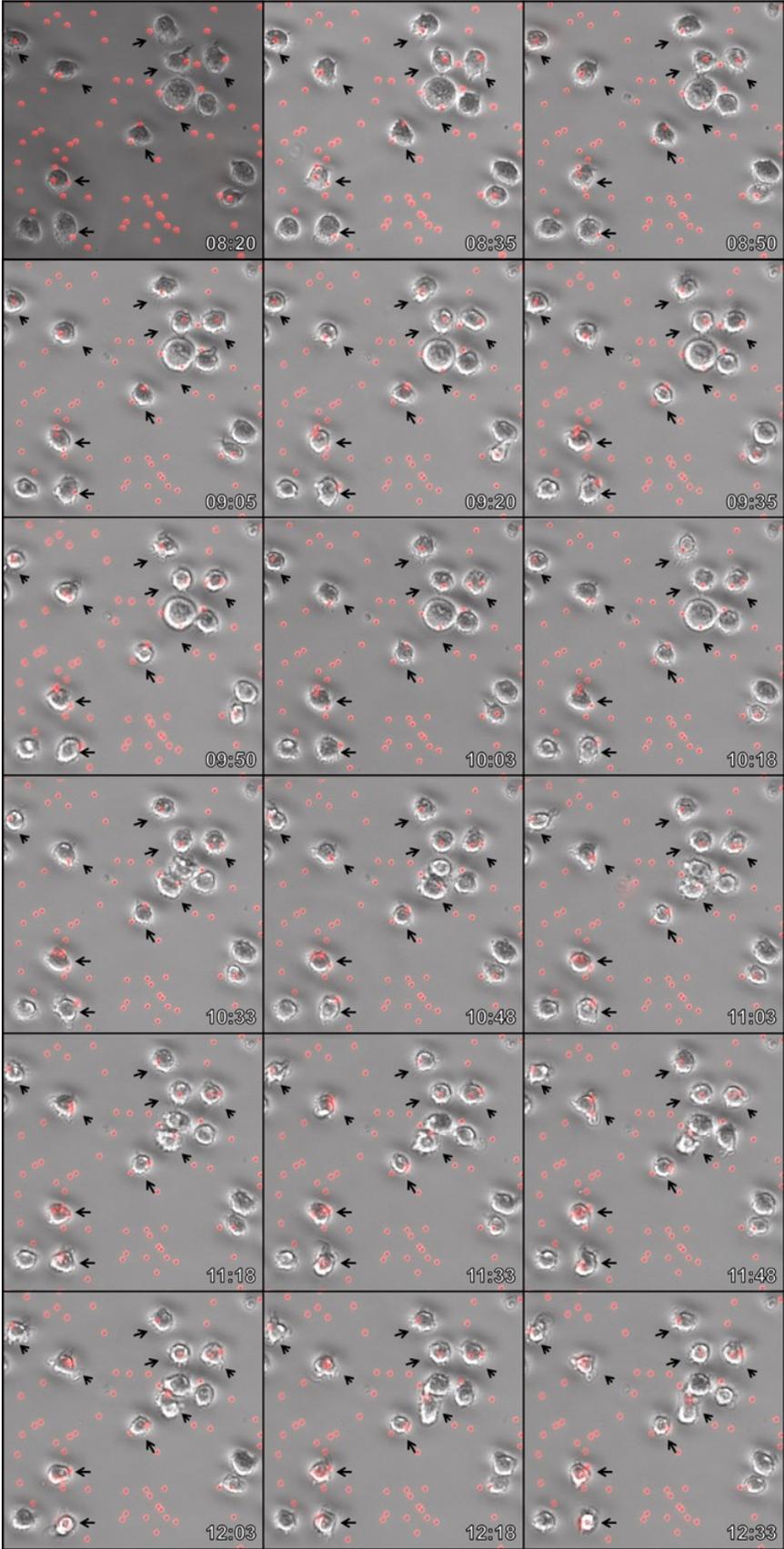


Abbildung 130: Lebendzellbeobachtung zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Monozyten und PS1 (1 µg/ml) nach 24 h Exposition

Während für die Pneumozyten insgesamt eine starke Interaktion mit den Partikeln zu verzeichnen war (Großteil der Zellen war MP-partikelpositiv), war die Interaktion zwischen Monozyten und den untersuchten Partikeln gering (Abbildung 128c und d; Abbildung 129a). Es konnte für die Monozyten eine partikelgrößenabhängige Interaktion/Aufnahme festgestellt werden. Die geringste Interaktion zeigte sich nach Exposition mit PS025 (0,235 μm) und PS030 (0,250 μm), die stärkste infolge der 0,450 μm (PS05) und 0,710 μm (PS075) großen Partikeln (Abbildung 128c; Abbildung 129a). Hier (PS05; PS075) war nach 48 h der höchste Wert an MP-partikelpositiven Monozyten zu verzeichnen, danach sank der Wert und blieb über den Beobachtungszeitraum relativ konstant (Abbildung 129a). Bei PS025 kam es erst nach längerer Expositionszeit zu einem Anstieg des Anteils partikelpositiver Zellen (Abbildung 129a). Der Anteil an Monozyten mit Partikelinteraktionen war für die 0,980 μm großen Partikel (PS1; Abbildung 128d) höher als für die kleinsten ($\leq 0,25 \mu\text{m}$), aber geringer als für PS05 und PS075. Diese partikelgrößenabhängige Interaktion deutet auf eine Endozytose (Phagozytose) der Partikel durch die Monozyten hin.

Für humane Leberzellen konnte eine Anlagerung (Abbildung 131) bzw. eine Interaktion der MP-Partikel (Abbildung 132) festgestellt werden. Der zeitliche Verlauf der Partikel-Zell-Interaktionen war bei beiden untersuchten Partikelgrößen ähnlich (Abbildung 132) und somit partikelgrößenunabhängig.

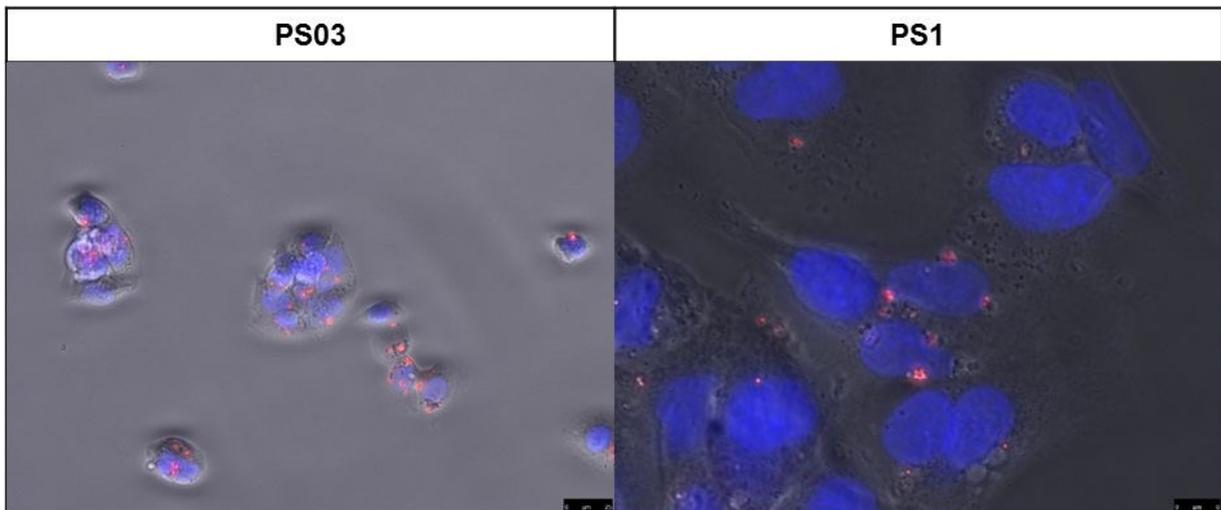


Abbildung 131: MP-Partikelinteraktionen mit Leberzellen (HepG2) nach 48 h Inkubation. rot: MP-Partikel (PS03 bzw. PS1); blau: Zellkern (Hoechst 33342)

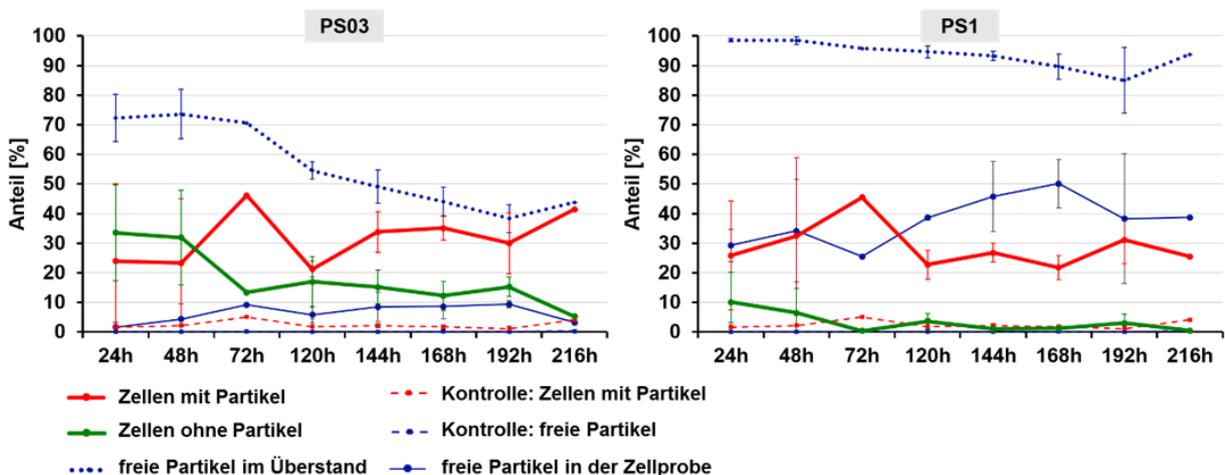


Abbildung 132: Quantitative Analyse der MP-Leberzellen-Interaktion nach Exposition mit 0,25 μm (PS03) und 0,98 μm (PS1) großen Polystyrolpartikeln. $n = 1$ (72 h; 216 h); $n = 2$ (120 h; 192 h); $n = 3$ (24; 48; 144 und 168 h)

Eine Auswertung der parallelen Färbung mittels Propidiumiodid zur Korrelation von Partikelaufnahme und Zelltod konnte nur für die Monozyten erfolgen, da nur hier eine abgegrenzte Population mittels Durchflusszytometrie zu verzeichnen war. Es konnte kein Unterschied zwischen unbehandelten Kontrollzellen und mit Partikeln einer Größe kleiner/gleich 0,75 µm behandelten Zellen festgestellt werden. Ein tendenziell erhöhter Anteil propidiumiodidpositiver Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und kleineren Partikeln war für Monozyten nach Exposition mit 0,98 µm großen Partikeln zu verzeichnen, sodass es hier vermehrt zu nekrotischen Ereignissen kam. Deutlich war dies insbesondere nach einer Expositionszeit von 48 h (1,2 % (Kontrolle) vs. 32,8 % (PS1); n = 1; Daten nicht gezeigt).

7.4.2.2.2 Wirkmechanismus Entzündungen

Über den dermalen Expositionspfad zeigten sich proinflammatorische Effekte in Abhängigkeit der Partikelgröße (0,250 µm vs. 0,980 µm; vgl. Abbildung 133) und der Partikelkonzentration (0,01 µg/mL; 0,05 µg/mL und 0,1 µg/mL; vgl. Abbildung 134). Eine Exposition mit kleineren MP-Partikeln (0,250 µm) hatte bei der höchsten untersuchten Konzentration (0,1 µg/mL) tendenziell eine stärkere MCP-1- und IL-8-Ausschüttung zur Folge als nach Belastung mit den größeren untersuchten MP-Partikeln (0,980 µm; Abbildung 133).

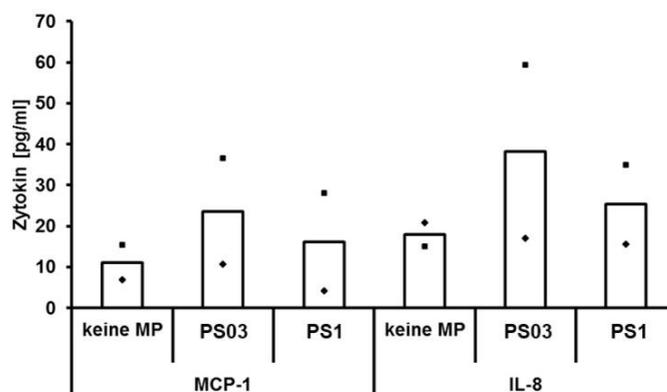


Abbildung 133: Größenabhängiger proinflammatorischer Einfluss von PS-MP-Partikeln ($c = 0,1 \mu\text{g/ml}$; 72 h Exposition) auf humane Keratinozyten (HaCat-Zellen). Die Symbole \blacklozenge und \blacksquare markieren die Ergebnisse der beiden unabhängig durchgeführten Replikate, die Balken entsprechen dem Mittelwert

Mit ansteigender Expositionskonzentration konnte für MCP-1 und IL-8 eine tendenzielle Erhöhung der Zytokinmenge im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Abbildung 134a und b). Höhere Zytokinwerte als bei unbehandelten Kontrollzellen (0 µg/ml; Abbildung 134a und b) wurden nur für die höchste Partikelkonzentration verzeichnet.

Die Exposition mit 0,250 µm Partikeln hatte eine Verringerung an IP-10 zur Folge (Abbildung 134c). Dies könnte an einer Interaktion zwischen Zytokin und MP-Partikeln (Ausbildung einer Proteincorona) liegen.

Eine MP-Exposition von Pneumozyten resultierte in eine gesteigerte Zytokinausschüttung (Abbildung 135 und Abbildung 136), insbesondere nach längeren Expositionszeiten (24 h vs. 72 h / 192 h) und bei höheren Expositionskonzentrationen. Eine längere Expositionsdauer führte zu einer deutlichen Erhöhung der IL-8 und IL-6-Werte (Abbildung 135; 24 h-IL-6-Wert nicht dargestellt). Es konnte keine direkte Korrelation zur Partikelgröße oder Fluoreszenzmarkierung festgestellt werden. Eine Erhöhung der TNF-Sekretion konnte nach 24 h infolge der 0,239 µm großen PS-Partikel ohne Fluoreszenzmarkierung (PS024), insbesondere für die höchste untersuchte Expositionskonzentration (10 µg/ml), detektiert werden; die anderen untersuchten Partikel führten zu keinem Anstieg (Daten nicht gezeigt). Die Exposition mit 100 µg/ml Melaminharzpartikeln resultierte nach 72 h in eine verstärkte Erhöhung der Sekretion von MCP-1 und IL-8.

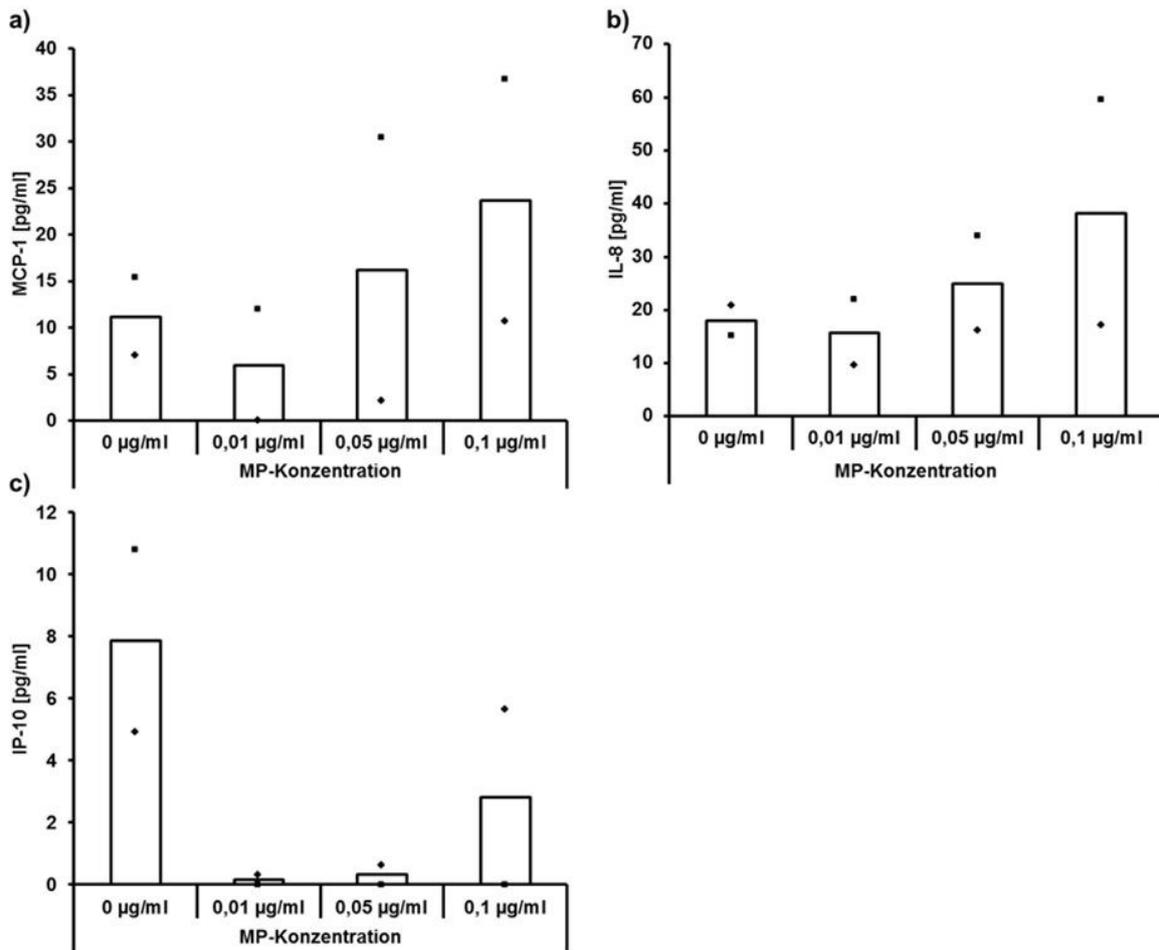


Abbildung 134: Zytokinausschüttung humaner Keratinozyten (HaCat-Zellen) in Abhängigkeit der MP-Partikelkonzentration (0,250 µm PS-Partikel (PS03); 72 h Exposition). Die Symbole ♦ und ■ markieren die Ergebnisse der beiden unabhängig durchgeführten Replikate, die Balken entsprechen dem Mittelwert

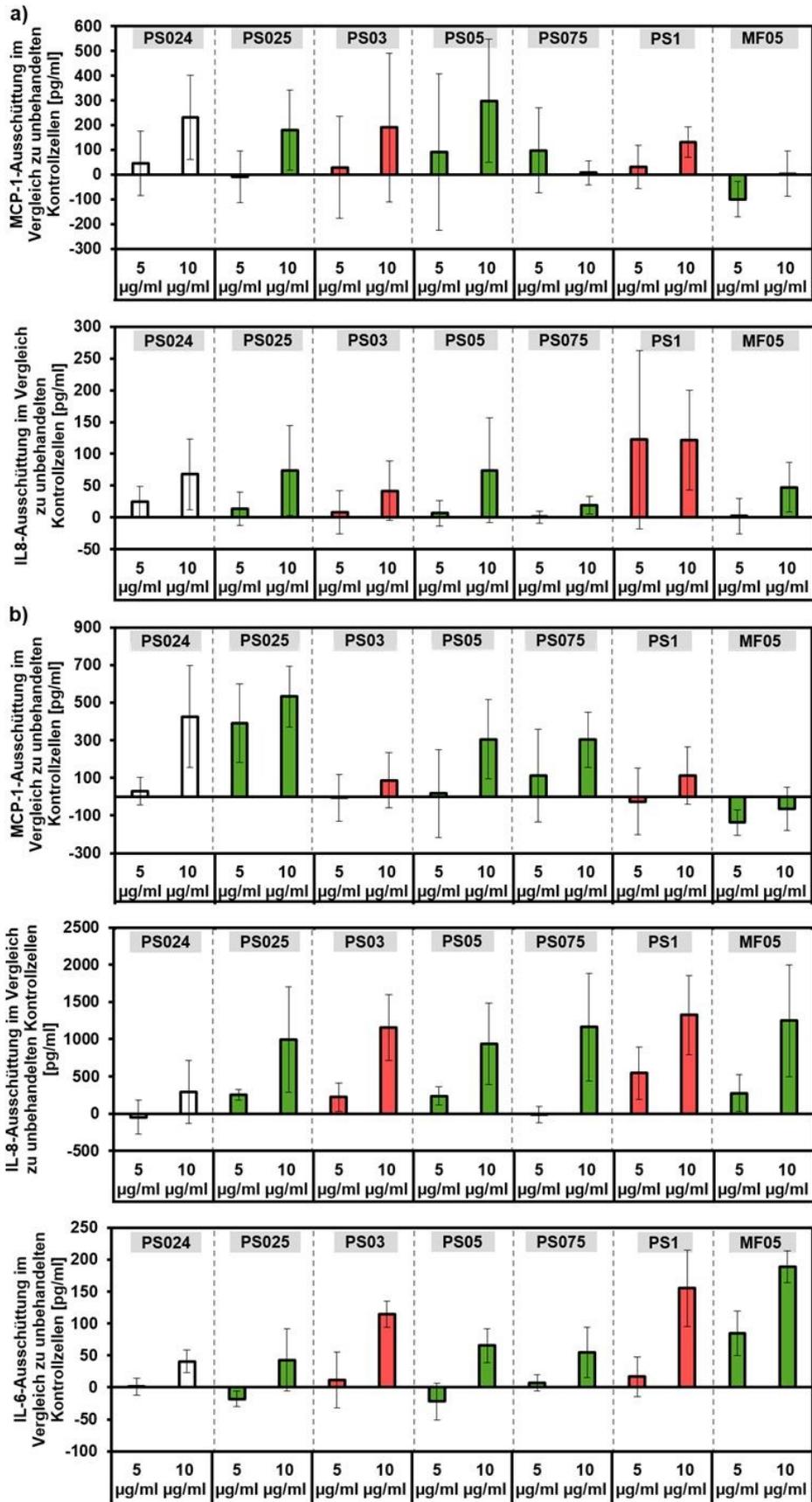


Abbildung 135: Zytokinausschüttung humaner Pneumozyten (A549-Zellen) nach 24 h (a) und 192 h (b) Exposition mit MP-Partikeln (5 µg/ml und 10 µg/ml). In der Darstellung wurden die Werte der unbehandelten Kontrollzellen von den Werten der exponierten Zellen abgezogen. Weiße Balken: unpigmentierte MP ohne Fluoreszenzfarbstoff; grüne Balken: grünfluoreszierende MP; rote Balken: rotfluoreszierende MP; n = 3

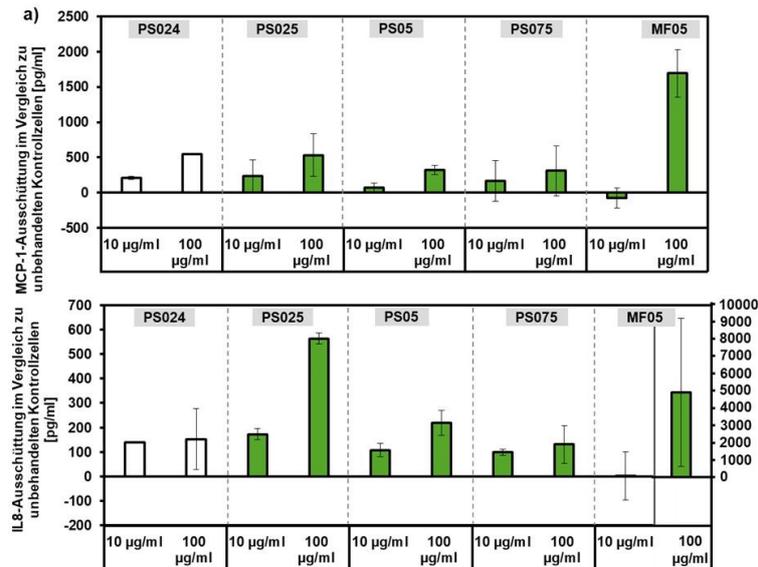


Abbildung 136: Zytokinausschüttung humaner Pneumozyten (A549-Zellen) nach 72 h Expositionsdauer mit MP-Partikeln (10 µg/ml und 100 µg/ml). In der Darstellung wurden die Werte der unbehandelten Kontrollzellen von den Werten der exponierten Zellen abgezogen. Weiße Balken: unpigmentierte MP ohne Fluoreszenzfarbstoff; grüne Balken: grünfluoreszierende MP; n = 2

Eine MP-Partikelexposition (10 µg/ml und 100 µg/ml) führte bei humanen Leberzellen nach 72 h-Inkubation zu keinen bedeutenden Effekten. Es konnte, je nach untersuchter Partikel, eine sehr geringe bis keine Erhöhung der Sekretion von MCP-1 festgestellt werden, z. T. wurden geringere Werte als bei unbehandelten Kontrollzellen detektiert; letzteres galt auch für die IL-8-Ausschüttung (Daten nicht gezeigt).

7.4.2.2.3 Wirkmechanismen Zytotoxizität und Genotoxizität

Es wurde für eine Expositionszeit von bis zu 72 h keine wesentliche Änderung des ATP-Gehaltes der mit MP-Partikeln behandelten Zellen (höchste getestete Konzentration: HaCat 0,1 µg/ml, A549 & HepG2 100 µg/ml) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen detektiert, sodass keine zytotoxischen Ereignisse festgestellt werden konnten.

Bezüglich einer möglichen Genotoxizität müssen weitere Versuche durchgeführt werden, da der verwendete In Vitro MicroFlow® Micronucleus Analysis Kit (Litron Laboratories, USA) Interferenzen mit den MP-Partikeln zeigte, sodass keine verlässlichen Aussagen hierzu getroffen werden konnten.

7.4.3 Bewertungsansätze

Eine humantoxikologische Bewertung von MP muss unter Berücksichtigung der realen MP-Partikelexposition erfolgen. Dabei muss neben der externen Exposition die interne Exposition geklärt werden. Die Exposition hängt dabei maßgeblich von der potentiellen Überwindung der biologischen Barrieren (z. B. Hautbarriere oder Darmbarriere) und dem Vordringen der Partikel in die unterschiedlichen Bereiche des Atemtrakts ab sowie vom Verbleib der Partikel (Clearance-Mechanismen). Hier wird, wie auch bereits für andere Partikel bekannt ist, die Partikelgröße entscheidend sein (z. B. Nanopartikel (Laresse Filon et al. 2015, Oberdörster et al. 2005); Feinstaub (Deng et al. 2019)). So können Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser kleiner als 2,5 µm bis in die Alveolen vordringen. Dies konnte u. a. von Li et al. (2019) für PS-Mikropartikel in experimentellen Studien an Mäusen gezeigt werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Partikel mit einem Durchmesser < 1 µm alveolargängig sein werden. Eine Durchbrechung der Hautbarriere kann beispielsweise über Hautläsionen (Oberdörster et al. 2005) und über eine Penetration in die Haarfollikel erfolgen, wobei Partikel > 1 µm die lebenden Zellen via follikulären Penetrationsweges nicht erreichen werden (Lademann et al. 2004).

Insgesamt waren infolge der untersuchten Expositionsszenarien geringe Effekte der Polystyrol-MP-Partikel und Melaminharzpartikel auf zellulärer Ebene zu verzeichnen, insbesondere für die größeren von der TU Berlin bereitgestellten Proben. Jedoch sind gesundheitliche Beeinträchtigungen infolge der aufgedeckten MP-Partikel-Zell-Interaktionen und des Triggers der Zytokinausschüttung wahrscheinlich, wobei zu beachten ist, dass die in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzten Konzentrationen über den derzeitigen im Trinkwasser und in Oberflächengewässern detektierten MP-Konzentrationen/Partikelmengen liegen. Die festgestellten deutlichen Interaktionen (Anlagerung an die Zelloberfläche, interzelluläre Anlagerung, z. T. Hinweis auf intrazelluläre Lokalisation), deren Ausmaß zelltyp- und partikelgrößenabhängig erfolgten, könnten möglicherweise zu einer Störung des Zellverbandes und somit zu einer defekten Organausbildung sowie zu Funktionsstörungen führen. Die festgestellte Partikelgrößenabhängigkeit bei Monozyten mit dem höchsten Anteil partikelpositiver Zellen nach Exposition mit 0,5 µm und 0,75 µm großen Partikeln ist ein Indiz für deren phagozytäre Aufnahme, die bekannter Weise ab einer Partikelgröße von etwa 0,5 µm erfolgt (Hess and Tseng 2007). Pneumozyten zeigten demgegenüber eine stärkere Tendenz zu kleineren Partikeln.

Aufgrund der gesteigerten proinflammatorischen Zytokinausschüttung bei Pneumozyten und Keratinozyten nach MP-Partikelinkubation ist davon auszugehen, dass eine entsprechende Exposition zu Entzündungsprozessen führen kann. So ist bekannt, dass MCP-1, das eine Infiltration von Leukozyten bedingt, an der Pathogenese verschiedener entzündlicher Erkrankungen, u. a. der Lunge und der Haut, beteiligt ist (Deshmane et al. 2009, Rose et al. 2003, Tang et al. 2017). Ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-8, welches zu einer Rekrutierung von Neutrophilen führt, und IL-6 findet sich auch bei Vorliegen entzündlicher Hauterkrankungen (Barker et al. 1991, Hänel et al. 2013) und verschiedener Lungenerkrankungen (z. B. chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD (Henrot et al. 2019))). Unter Umständen können diese Entzündungsreaktionen chronisch werden, insbesondere wenn die Partikel über eine längere Zeitspanne im Körper verbleiben. Dadurch kann beispielsweise die Entstehung/Entwicklung einer Fibrose oder von Ödemen und Tumoren gefördert werden. Entzündungsreaktionen der Lunge können unter Umständen auch zur Ausbildung einer systemischen Inflammation und somit zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen (Brook et al. 2010).

Falls die Partikel nicht wieder vollständig ausgeschieden werden, kann es bei einer wiederholten Exposition mit MP-Partikeln zu einer Anreicherung an/in den Zellen kommen, wodurch die effektive Partikelkonzentration pro Zelle ansteigt. Daher sind für eine entsprechende toxikologische Bewertung Kenntnisse zum Verbleib der Partikel (Exozytose; Abtransport; Ausscheidung) essentiell. Dies sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Es zeigten sich Unterschiede zwischen Polystyrol- und Melaminharzpartikeln, sodass die chemische Zusammensetzung der Partikel für deren Interaktionen mit den Zellen und den daraus resultierenden Effekten bedeutsam ist. Daher sollten in zukünftigen Untersuchungen Partikel aus weiteren Kunststoffmaterialien untersucht werden.

7.4.4 Schlussfolgerungen und Empfehlungen

Insgesamt ist festzustellen, dass die untersuchten MP-Partikel infolge der deutlichen Interaktionen (An-/Zwischen-/Einlagerung) und des proinflammatorischen Effektes nach einer entsprechenden Exposition zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen könnten. Dies dürfte insbesondere nach langandauernder und wiederholter Exposition der Fall sein, falls sich die aufgenommenen Partikel in den Zellen/Geweben anreichern. Daher sollte die Minimierung von MP in der Umwelt ein großes Ziel der Umweltpolitik darstellen.

Untersuchungen zum Verbleib der Partikel, Testungen von Partikeln weiterer Kunststoffmaterialien und unterschiedlicher Formen sollten Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

8 Methodische Ansätze in rechtlichen Regelungen (UBA)

Grundsätzlich gibt es unterschiedliche rechtliche Instrumente, um Anforderungen zu formulieren, die dazu beitragen können, unerwünschte Einträge von Kunststoffen in die Umwelt zu vermindern oder zu vermeiden. Liegen in den relevanten Gesetzen entsprechende Ermächtigungen vor, können Verbote, Gebote, Freistellungen oder auch ökonomische Anforderungen gestellt werden. Mögliche Maßnahmen zur Reduktion von MP-Einträgen in die Umwelt sind grundsätzlich über eine Vielzahl von Rechtsregelungen möglich. Teilweise beeinflussen sich entsprechende Regelungen in verschiedenen Rechtsbereichen auch gegenseitig. Die Verordnungen im Bereich des Verbraucherschutzes und des Produktrechts wirken sich möglicherweise auf Begrenzungen von Immissionen in die Umweltmedien aus und sind von entsprechender Bedeutung.

Um materielle Anforderungen in rechtlichen Regelungen zu formulieren ist es notwendig, dass zunächst ein Bewertungskonzept erstellt wird. Abbildung 137 zeigt den grundsätzlichen Ablauf. Zunächst ist zu berücksichtigen, welche Ermächtigung in den jeweiligen Rechtsbereichen für entsprechende Anforderungen vorliegt. Daraufhin kann dann ein fachliches Konzept entwickelt werden, welches materielle Anforderungen beschreibt, die dann mit bestimmten Parametern unterlegt werden. Diese Parameter müssen messbar sein, wozu spezifische Methoden erforderlich sind. Insofern ist bei der Erstellung eines fachlichen Konzeptes bereits auf die Methodenfrage abzuheben.



Abbildung 137: Grundsätzlicher Ablauf bei der Erstellung materieller Anforderungen in rechtlichen Regelungen

Die Etablierung von Grenz-, Richt- oder Orientierungswerten findet somit im Zusammenspiel von Parameter- und Messverfahren statt. Ohne Hinweise zu Messverfahren können keine Werte in rechtlichen Regelungen festgelegt werden. An die Qualität der Verfahren werden erhebliche Anforderungen in Hinblick auf die Verfahrenskenndaten gestellt. Diese können über Vergleichsuntersuchungen ermittelt werden.

Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten solche Messverfahren zu etablieren. Oftmals werden geeignete Normen zitiert. Diese werden heute in der Regel auf Europäischer oder internationaler Ebene in den jeweils verantwortlichen Technischen Komitees (Technical Committees, abgekürzt TCs) erarbeitet. Diese sind weitgehend unabhängig hinsichtlich Ihres Arbeitsbereiches. Hierzu gibt es in ISO, CEN und DIN ein umfangreiches Regelwerk. Die DIN 820 ist hier einschlägig (DIN 2009).

Insgesamt sind etwa 50 ISO TCs mit dem Material Kunststoff befasst. Eine etwa gleiche Anzahl von CEN TCs spiegeln die Arbeiten auf europäischer Ebene.

- ISO/TC 34 Food products
- ISO/TC 38 Textiles
- ISO/TC 45 Rubber and rubber products
- ISO/TC 61 Plastics (SC 14 Environmental Aspects)
- ISO/TC 83 Sports and other recreational facilities and equipment
- ISO/TC 122 Packaging
- ISO/TC 134 Fertilizers and soil conditioners
- ISO/TC 146 Air quality
- ISO/TC 147 Water quality
- ISO/TC 190 Soil quality
- ISO/TC 207 Environmental management
- ISO/TC 217 Cosmetics
- ISO/TC 275 Sludge recovery, recycling, treatment and disposal
- ISO/TC 323 Circular Economy

Um Doppelarbeiten zu vermeiden, wurden von DIN im ISO TC 61 Plastics Strukturen etabliert, die eine zentrale Bearbeitung von Verfahren zur Untersuchung von Kunststoffen in verschiedenen Umweltmatrices auf ISO Ebene ermöglichen.

9 Schlussfolgerungen und Empfehlungen

9.1 Probenahme, Aufbereitung, Analyse, Senken

Derzeit gibt es keine standardisierte MP-Partikel-Analytik um belastbare Daten über MP-Partikel-Konzentrationen in Gewässern zu erheben. Im Rahmen von MiWa wurde erfolgreich ein Gesamtverfahren zur MP-Partikel-Analytik in Oberflächen-, Grund- und Trinkwässern entwickelt und validiert. Dabei kristallisierte sich vor allem heraus, dass eine eingehende Blindwertbetrachtung und -vermeidung unerlässlich ist (vor allem bei gering bis nicht belastetem Wasser). Die individuellen Risiken für einen Blindwerteintrag, z. B. durch verwendete Materialien, Raumluft oder die Qualität des Reinstwassers, sollten regelmäßig erhoben und durch geeignete Maßnahmen, wie z. B. Materialumstellung, Verwendung von Laminar-Flow-Boxen und Baumwoll-Laborkitteln, minimiert werden. Eine besondere Bedeutung kommt der Berücksichtigung von Prozessblindwerten zu, die für jede Probe parallel mitgeführt werden sollten um z. B. auch diffuse Kontaminationen zu erfassen. Wird der Prozessblindwert nicht berücksichtigt kann es zu einer deutlichen Überinterpretation der Ergebnisse kommen und somit zu einer Verzerrung der tatsächlichen MP-Partikel-Gehalte in einem Medium.

Die Probenahme und Probenaufbereitung sollte auf die spätere Analytik abgestimmt und eine abschließende Gesamtverfahrens-Validierung, z. B. mit Referenz-MP-Partikeln unterschiedlicher Größe und Polymersorte, durchgeführt werden. Insbesondere sollte darauf geachtet werden, dass das beprobte Volumen und die minimal beprobte Partikelgröße bei der späteren Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. So kann beispielsweise im Falle einer Beprobung aus Wässern mittels Filtration keine Aussage über MP-Partikel mit einem geringeren Durchmesser als die verwendete Maschenweite getroffen werden, obwohl durch die Kuchenbildung auch Partikel abgeschieden werden können, die kleiner als die Öffnungen des Filtermediums sind. In der Aufbereitung und der aufwändigen Probenbehandlung bei den spektroskopischen Methoden sollten nur Verfahren genutzt werden, die eine chemische und physikalische Beschädigung von MP-Partikel ausschließen (was zu prüfen ist).

9.1.1 Raman-Mikrospektroskopie (TZW, TUM)

An der TUM wurde im Rahmen von MiWa eine Optimierung, Weiterentwicklung und Validierung der Raman-mikrospektroskopischen Methode zur selektiven Analytik von MP-Partikeln auf Filtern und in Biota (2D- & 3D-Imaging) durchgeführt. Da eine repräsentative Analyse die Messungen einer sehr hohen Anzahl von Partikel erfordert, ist eine Automatisierung der Methode notwendig. Deswegen wird an der TUM eine automatisierte Raman-Analyse entwickelt, welche es ermöglicht eine Detektion, morphologische und chemische Charakterisierung sowie Quantifizierung von Partikeln durchzuführen. Zudem wurden die Möglichkeiten zur Bestimmung einer minimal zu messenden Partikelzahl bzw. zur Berechnung eines statistischen Fehlers für Messungen ausgelotet. Darüber hinaus wurden neben der Auswahl von Si-Filtern bzw. Au-beschichteten PC-Filtern und Dunkelfeldbelichtung Empfehlungen hinsichtlich der Wahl der Laserwellenlänge (532 nm), der Laserleistung (bis 10 mW), des zu verwendenden Objektivs (20× oder 50× mit längerem Arbeitsabstand), des zu untersuchenden spektralen Bereichs (200–3200 cm^{-1}), des optischen Gitters (300 Linien/mm oder 600 Linien/mm) und der Messzeit (ca. 10–30 s) erarbeitet. Die Entwicklung eines Filterhalters ermöglicht, durch die damit erzielte geringe Rauigkeit der eingespannten Filter, eine optimale Raman-mikroskopische Analyse. Ebenfalls erwiesen sich PTFE-Filter für die Raman-Analyse im Hellfeld als gut geeignet (TZW).

Die gewählte Analytik hängt im Wesentlichen von der wissenschaftlichen Fragestellung ab: Spektroskopische Methoden liefern umfangreiche Informationen zu Partikelanzahl, -größe, -morphologie und Polymerart und arbeiten zerstörungsfrei. Kommerziell verfügbare oder selbsterstellte Datenbanken ermöglichen es alle kommerziell verfügbaren Polymere zu identifizieren. Der Nachteil spektroskopischer Methoden liegt in der langen Analysenzeit. Thermogravimetrische Methoden zeichnen sich

durch eine schnelle Analyse aus und liefern Massenkonzentrationen der am häufigsten auftretenden Polymere bei minimaler Probenaufbereitung. Die wesentlichen Nachteile sind die hohe Nachweisempfindlichkeit und die fehlenden Informationen über die Partikelanzahl und -größe sowie die Begrenzung auf wenige einkalibrierte Polymersorten.

9.1.2 FT-IR

Zusammenfassend stellt die FT-IR-Methode eine einfache und robuste Methode zur MP-Analyse dar, die in allen Labors ohne Einschränkungen angewendet werden kann. Die Probenvorbereitung und -messung erfolgt zu Forschungszwecken in einem akzeptablen Zeitrahmen (eintägige Probenvorbereitung, vier bis acht Stunden Messzeit) und unterliegt keinen wesentlichen Einschränkungen. Abhängig von der analytischen Frage kann diese Methode für alle Arten von Umweltproben und Partikelgrößen bis herab zu 20 µm angewendet werden. Geringere Partikelgrößen sind im Einzelfall möglich.

9.1.3 Elementanalysen

Die Anreicherung von TRWP aus straßennahen Umweltproben mit Dichteseperation war erfolgreich bei einer Dichte der SPT-Lösung von 1,9 g/cm³. Dies zeigt, dass die aus der MP-Analytik bekannte Vorgehensweise prinzipiell nach Anpassung auch für TRWP eingesetzt werden kann. Zudem wurde gezeigt, dass die Dichteseperation von TRWP dabei helfen kann, diese Partikel zu charakterisieren und Alterung, Aggregation und Transport zu untersuchen. Zur Quantifizierung von TRWP anhand von Elementmarkern wurde Zn als das am besten geeignete Element identifiziert. Zudem wurde gezeigt, dass die Analyse von Gesamt-Zn ohne Anreicherung stark fehlerbehaftet ist. Weiterhin wurde die Dichte von TRWP in Realproben bestimmt. Diese Dichte kann sich mutmaßlich durch Alterungsprozesse verändern. TRWP Konzentrationen wurden in verschiedenen Umweltproben gemessen. Die Methode der TRWP Quantifizierung anhand des Zn-Gehalts der angereicherten Fraktion scheint vor allem für hohe Konzentration, also in Straßen nahen Bereichen, einsetzbar zu sein.

Die untersuchten Korngrößenfraktionen zeigten, dass TRWP nicht nur in einer Fraktion enthalten ist. Vielmehr waren die dominanten Größenfraktionen abhängig von den Entstehungsbedingungen und dem Partikeltransport. Der größte Mengenanteil der TRWP scheint in der Fraktion 100–250 µm zu entstehen.

Folgende Aspekte sollten weiter untersucht werden:

- Die Eignung der TRWP Quantifizierung anhand von Zn sollte für weitere Probenmatrices und Konzentrationsbereiche geprüft werden.
- Die Größenverteilung von TRWP und deren Veränderung mit zunehmender Distanz zur Quelle sind von entscheidender Wichtigkeit für die Bewertung von TRWP als partikulärer Umweltschadstoff.
- Der Einfluss von Alterungsprozessen auf die TRWP Eigenschaften wie beispielsweise Dichte und damit zusammenhängend Auswirkungen auf das Transportverhalten sind nicht nur für den Nachweis zur Ermittlung des Verbleibs von TRWP, sondern vor allem auch für die Bestimmung ihrer Umweltrelevanz entscheidend.
- Eine Veränderung der Partikelgröße aufgrund von Alterungsprozessen ist ebenso entscheidend für den Transport von TRWP und eine mögliche Gefährdung aquatischer Organismen durch TRWP.
- Das Verhalten von TRWP Inhaltstoffen hinsichtlich einer möglichen Auslaugung und deren Stabilität, Mobilität und Toxizität in der aquatischen Umwelt sollten bewertet werden.
- Schließlich muss es möglich sein, die Umweltrelevanz von TRWP zu ermitteln.

9.1.4 TED-GC/MS

Das thermoanalytische Analysenverfahren TED-GC/MS konnte im Rahmen des MiWa-Projektes erfolgreich automatisiert werden. Es wurde eine Optimierung des Verfahrens durchgeführt, sowie ein vertieftes Verständnis der Methode entwickelt. Es wurde ein interner Standard, deuteriertes Polystyrol, in das Standardmessprotokoll aufgenommen und die Reproduzierbarkeit dadurch verbessert. Zugleich wurden aber auch Limitationen für die Anwendbarkeit des Standards untersucht.

Da eine intensive Aufarbeitung von Umweltproben für die TED-GC/MS in der Regel nicht notwendig ist, die Messzeit rund 2,5 Stunden beträgt und auch die Interpretation der Chromatogramme teilautomatisiert werden kann, ist die TED-GC/MS eine der schnellsten Methoden zur Detektion von Massen und Sorten an MP. Vorteilhaft ist außerdem, dass relativ große Analysenproben gemessen werden, so dass repräsentative Ergebnisse erhalten werden können. Reifenabriebsgehalte können abgeschätzt werden. Ergebnisse werden in Form von Massen oder Massengehalten generiert; Partikelgrößen oder -formen sind durch das zerstörende Verfahren nicht zugänglich.

Die regelmäßige Messung von Blindwerten kann bei der TED-GC/MS erforderlich werden, wenn stark belastete Proben Kreuzkontaminationen auslösen.

9.1.5 Senken (BWB)

Im Projekt MiWa konnte gezeigt werden, dass bereits eine konventionelle Kläranlage sehr hohe Entfernungsleistungen für MP-Partikel durch die Reduktion der im Klarwasser enthaltenen Partikel von bis zu 98 % bewirken kann. Mit der Installation der weitergehenden Abwasserreinigung zur Phosphor- und Spurenstoffentfernung ist davon auszugehen, dass der MP-Gehalt im Klarwasser der Kläranlagen weiter um ca. eine Größenordnung gesenkt wird. Nach der Einschätzung der Praktiker hat sich hier gezeigt, dass als Indikatorparameter besonders die Partikelgrößenverteilung als quasi-Online-Parameter weiterverfolgt werden sollte. Die Vorteile sind, dass sowohl die Fehler durch die Siebkaskade als auch bei der Analytik, die sehr zeit- und kostenaufwendig sind, vermieden werden. Die Übertragbarkeit der gemessenen Werte auf MP-Partikel in der kleinsten Größenklasse konnte nicht vollständig geklärt werden. Je kleiner die betrachtete Partikelgröße ist, desto höher ist die Anzahl an Partikeln und desto schwieriger ist es, diese Partikel aus dem Abwasserstrom abzutrennen. Es ist aber auch davon auszugehen, dass trotz Installation einer Anlage zur weitergehenden Abwasserreinigung weiterhin MP-Partikel in geringen Konzentrationen über das Klarwasser der Kläranlage in die aquatische Umwelt gelangen werden. Ausgenommen von dieser Annahme sind Mischwasserüberläufe und Niederschlagswässer ohne eine gezielte Reinigungstechnik.

9.1.6 Adsorptionsprozesse an MP

Mikroschadstoffe sorbieren in Abhängigkeit von ihrem $\log K_{ow}$ an MP. Bei $\log K_{ow}$ -Werten von > 4 ist eine Sorption an MP zu erwarten. Substanzen mit ähnlichem $\log K_{ow}$, aber unterschiedlichen funktionellen Gruppen, können ein unterschiedliches Sorptionsverhalten aufweisen. Dies kann durch sterische Hinderungen für Absorptionsvorgänge begründet sein. Oberflächenmodifikationen wie Maskierung, Biofouling und Alterung haben dann einen Einfluss, wenn die Adsorption an Oberflächen der vorherrschende Sorptionsmechanismus ist. Des Weiteren sind Eigenschaften des Sorbens entscheidend. Hier ist neben der Glastemperatur besonders die Polymerarchitektur von entscheidender Bedeutung. Semikristalline Polymere und Polymere, die unterhalb ihrer Glastemperatur vorliegen, neigen eher zur Adsorption, wohingegen amorphe Polymere, die oberhalb der Glastemperatur vorliegen, eher Schadstoffe absorbieren. Allerdings ist es aufgrund der Komplexität der Beziehung zwischen den beschriebenen Parametern nicht möglich, alle diese Parameter in einem Versuchsaufbau zu untersuchen. Des Weiteren erschweren Umweltbedingungen wie Temperatur- und pH-Schwankungen, Intersorption und variable Schadstoffkonzentrationen Vorhersagen, wie viel gelöste Mikroschadstoffe von

MPs in z. B. Oberflächengewässer sorbiert werden. Diese sind daher kaum mehr als grobe Schätzungen. Eine Übertragbarkeit von Laborversuchen auf die reale Umwelt – und vice versa – wie wir es auch im Rahmen von MiWa experimentell versucht haben, scheint aktuell als nicht durchführbar bzw. ist mit zu großen Unsicherheitsfaktoren behaftet.

In einem zentralen Experiment wurde die Sorption von Mikroschadstoffen an MP im Vergleich zu Sedimenten untersucht. Dazu wurden Messmethoden für die Spurenstoffe Benzo(k)fluoranthen, Methiocarb und Thiacloprid entwickelt. Als Sorbentien wurden verschiedene Polymermaterialien eingesetzt: Polyvinylchlorid (PVC), Polystyrol (PS), Polycarbonat (PC), Polymethylmethacrylat (PMMA) und Reifenabrieb. Die Sorption der Modellschadstoffe wurde in verschiedenen Matrices untersucht: Synthetisches Süßwasser und synthetisches Süßwasser mit Sedimenten (Sand und getrockneter Torf; 2:1; W:W). Dabei konnte keine Sorption für Methiocarb und Thiacloprid festgestellt werden. Die Sorption von Benzo(k)fluoranthen an die Gefäßwände war stärker als die Sorption an MP und Sediment, was eine wissenschaftliche Auswertung unmöglich machte. Dies zeigte aber auch, dass die Affinität von Benzo(k)fluoranthen zu allen freien Oberflächen höher war als die zu Wasser. Es ist also davon auszugehen, dass Benzo(k)fluoranthen an alle verfügbaren Oberflächen, und somit auch an natürlich vorkommende Partikel, sorbiert.

Durchgeführte Sorptionsversuche an MP in synthetischem Süßwasser in Gegenwart von Huminstoffen weisen zusätzlich auf einen erheblichen Einfluss des NOM hin. So zeigen Sorptionsisothermen bei der Sorption von ausgewählten Mikroschadstoffen in Gegenwart von Huminstoffen eine Sorption in/an die Huminstoffschicht. Dadurch verhalten sich die mit Huminstoff maskierten Partikel ähnlich – unabhängig vom eingesetzten Sorbensmaterial (mit Ausnahme von PS und PC). Aufgenommene Isothermen weisen hier auf eine Sorption in die Huminstoffschicht hin, die nicht durch die Oberfläche begrenzt ist (multi layer).

Das Sorptionsverhalten der MP-Partikel unterscheidet sich demnach nur wenig von dem Sorptionsverhalten natürlicher Partikel. Da diese in natürlichen Systemen in deutlich höheren Konzentrationen vorkommen, weisen diese Ergebnisse auf einen nicht signifikanten Beitrag des MP für den Transport von organischen Spurenstoffen hin. Dies wurde in vergleichenden Sorptionsexperimenten mit Boden und Boden mit MP auch gezeigt.

Weitere Sorptionsversuche wurden durchgeführt, um den Transport von anthropogenen Schadstoffen mittels Sorption und Desorption an MP im Vergleich zu natürlich vorkommenden Partikeln beurteilen zu können. Dazu wurde ein Mix aus den Spurenstoffen Atrazin, Phenanthren und Galaxolid für sieben Tage mit einer simulierten Umweltmatrix inkubiert. Die verschiedenen simulierten Matrices setzten sich aus Mischungen aus Grundwasser, Boden, Huminstoffen und MP zusammen. Dabei zeigte Atrazin kein relevantes Sorptionsverhalten. Für Phenanthren und Galaxolid konnten Sorptionen bis zu 90 % festgestellt werden, allerdings unterschieden sich die Matrices Boden und Boden mit MP nicht signifikant voneinander. Dies weist darauf hin, dass eine Sorption an MP durchaus vorkommt, aber durch die Gegenwart von anderen (natürlichen) Oberflächen überlagert wird. In Kombination mit der Annäherung des Sorptionsverhaltens an natürliche Partikel in Gegenwart von Huminstoffen und den niedrigen Desorptionsraten zeigen die erhaltenen Ergebnisse deutlich, dass der Beitrag von MP als Transportvektor für anthropogene Schadstoffe unter Umweltbedingungen von untergeordneter Bedeutung ist.

9.2 Biologische Untersuchungen

9.2.1 Allgemeine Herausforderungen und Empfehlungen (GU)

Im Projektverlauf sind die folgenden allgemeinen Herausforderungen zu Tage getreten, aus denen sich allgemeine Empfehlungen ergeben:

- Diskrepanz hinsichtlich der Partikelform des in Toxizitätstests eingesetzten und in der Umwelt gefundenen MPs.

Zur Untersuchung von MP-Effekten wird nach wie vor hauptsächlich kommerziell erhältliches, sphärisches Polystyrol verwendet. Dies ist zwar ein pragmatischer Ansatz, Plastikbeads repräsentieren allerdings nicht das in der Umwelt gefundene MP, das hauptsächlich irregulär ist und aus diversen Polymeren besteht.

- Verwendung von polydispersen Mischungen von MP-Fragmenten und -fasern in Toxizitätstests, so wie es im Teilprojekt bereits umgesetzt wurde,
- Verwendung von diversen Polymeren in Toxizitätstests, um materialspezifische Effekte zu charakterisieren.
- Diskrepanz hinsichtlich der Größe des in Toxizitätstests eingesetzten und in der Umwelt gefundenen MPs.

Die Mehrheit der verfügbaren ökotoxikologischen Studien verwendet sehr kleines MP, typischerweise $< 100 \mu\text{m}$. Demgegenüber liegen – wegen methodischer Limitationen – Daten zu Umweltkonzentrationen hauptsächlich zu MP vor, das größer als $100 \mu\text{m}$ ist. Die Diskrepanz in den untersuchten Größenbereichen macht eine Risikobewertung unmöglich, da ein Vergleich der Effekte und Umweltkonzentrationen von unterschiedlich großem MP nicht zulässig ist.

- Erhebung von Toxizitätsdaten von $\text{MP} > 100 \mu\text{m}$,
- Ermittlung von Umweltkonzentrationen von $\text{MP} < 100 \mu\text{m}$.
- Unbekannte Umweltkonzentrationen von Nanoplastik.

Während die Effekte von Nanoplastik häufig Gegenstand der Forschung sind, bleiben die Umweltkonzentrationen unbekannt. Das macht eine Risikobewertung unmöglich.

- Entwicklung von Methoden zur Detektion von Nanoplastik in Umweltproben.
- Charakterisierung des MPs und dessen Verhaltens in den ökotoxikologischen Testsystemen.

Aufgrund der Heterogenität der physiko-chemischen Eigenschaften von MP und deren Einfluss auf die Bioverfügbarkeit ist es notwendig, dass in ökotoxikologischen Studien eingesetzte Testmaterial gut zu charakterisieren. Dies ist bisher nur in wenigen Untersuchungen der Fall. Das gilt auch für das Verhalten der Partikel in den Testsystemen. So werden zum Beispiel häufig Polymere untersucht, die eine geringere Dichte haben als Wasser, also aufschwimmen. Um sinnvolle Aussagen über die tatsächlichen Expositionskonzentrationen in der Wasserphase treffen zu können, ist es notwendig, deren Verhalten sowie die durch Biota aufgenommenen Mengen zu bestimmen.

- Etablierung von Parametern (Größenverteilung, Form, Oberflächenladung etc.), die bei der Untersuchung von MP charakterisiert und berichtet werden müssen,
- Bestimmung des Verhaltens von MP und der tatsächlich von Biota aufgenommenen Konzentration in ökotoxikologischen Testsystemen.
- Transparenz bei der Beschreibung der Methoden und Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

In einem jungen Forschungsfeld, in dem sich noch keine gemeinsamen wissenschaftlichen Standards herausgebildet haben, ist es unumgänglich, dass die Beschreibung von Methoden und Ergebnissen heterogen ist. Dies verhindert in vielen Fällen allerdings einen Vergleich von vorliegenden Erkenntnissen. Ein prominentes Beispiel ist die Darstellung von Umweltkonzentrationen, die häufig summarisch für nicht vergleichbare Größenbereiche und in nicht konvertierbaren Einheiten erfolgt.

- Unterstützung der Herausbildung gemeinsamer wissenschaftlicher Standards durch Workshops,

- Festlegung von reporting guidelines, die die relevanten Informationen definieren, die zur Interpretation und Vergleichbarkeit verschiedener Arbeiten notwendig sind.
- Diversität von MP.

MP ist ein Überbegriff, der eine äußerst vielfältige Gruppe von Materialien beschreibt, die sich in Polymer, chemischer Zusammensetzung, Größe, Form etc. unterscheiden. Demgemäß kann „MP“ nicht reduktionistisch als eine homogene Substanzklasse betrachtet werden (Lambert et al. 2017, Rochman et al. 2019) und Effektdaten, die mit einem Material erhoben wurden, können nicht zwingend auf andere Materialien und Expositionsszenarien übertragen werden. Eine differenziertere Betrachtung setzt jedoch voraus, dass die Effekte und das Umweltvorkommen von diversen Untergruppen von MP gesondert untersucht werden. Dies ist hinsichtlich der Umweltkonzentrationen zumindest für Größe, Form und Polymertyp möglich. Hinsichtlich der Toxizität hingegen erscheint es unrealistisch, alle möglichen (Kombinationen von) physiko-chemischen Eigenschaften zu charakterisieren.

- Identifizierung der toxikologisch relevanten Materialeigenschaften, die eine sinnvolle Gruppierung von MP erlaubt,
- Priorisierung dieser Gruppen hinsichtlich ihrer negativen Effekte,
- Entwicklung entsprechender Risikobewertungssysteme.
- Systematische Analyse des Wissenstandes und der Wissenslücken.

Während sich die Datenlage zu MP exponentiell vergrößert, wächst das Wissen nicht in gleichem Maße (Science Advice for Policy by European Academies 2019). Gründe hierfür sind zum einen eine Forschungsförderung, die nicht zielgerichtet genug auf relevante Wissenslücken ausgerichtet ist, und zum anderen eine Publikationspraxis, die die Veröffentlichung von inkrementellen Studien begünstigt, die keinen signifikanten Wissenszuwachs erbringen. Dem können eine gründliche Synthese des vorhandenen Wissens und eine Priorisierung der Wissenslücken entgegenwirken.

- Förderung von Metaanalysen und systematischen Reviews, die zur Formierung eines wissenschaftlichen Konsenses zu MP beitragen,
- Etablierung eines internationalen, wissenschaftlichen Gremiums, das den Wissensstand regelmäßig feststellt und überprüft (ähnlich dem IPCC).

9.2.2 Embryotoxizität (UTUE)

Hypothese: MP wirkt sich als physikalischer Stressor negativ auf die Embryonal- und Larvalentwicklung wasserlebender Tiere aus.

Durchgeführte Arbeiten:

- Drei Embryotests mit *Marisa cornuarietis* mit PS, PMMA und PA.
- Zwei Embryotests und anschließender Exposition früher Entwicklungsstadien mit *Salmo trutta f. fario* mit PS.

Schlussfolgerungen:

- Keine Effekte durch MP auf die Embryonalentwicklung von Paradiesschnecken.
- Effekt von einer Million PS Partikel/L auf das Verhalten von Bachforellenlarven. Die biologische Relevanz dieses Effekts ist unklar.
- Ansonsten keine Effekte auf die Entwicklung von Bachforellen.

Herausforderungen:

Bei den Embryotests mit Paradiesschnecken mussten die Partikel abgewogen und die Suspension anschließend verdünnt werden. Da die Zählung der Partikel nur teilweise (auf Grund von Partikelgröße und Verunreinigungen durch die Testorganismen) möglich war, bleiben Unsicherheiten bezüglich der exakten Partikelkonzentrationen. Zudem musste bei allen Versuchen bei Wasserwechseln eine gleichmäßige Verteilung der Partikel im Aquarium/Petrischale angenommen werden. Dies ist bei MP im Gegensatz zu gelösten Stoffen allerdings fraglich. Die gewählten Partikel hatten alle eine Dichte über 1 g/cm^3 , um ein Aufschwimmen zu verhindern. Wie lange die Partikel in der Wasserphase verblieben waren, konnte nicht bestimmt werden. Die Partikelkonzentration konnte demnach im Gegensatz zu Versuchen mit Chemikalien weder exakt bestimmt noch über die Zeit konstant gehalten werden.

9.2.3 Oxidativer Stress in Fischlarven (UTUE)

Hypothese: MP verursacht oxidativen Stress und erhöhte Lipidperoxidation in frühen Entwicklungsstadien.

Durchgeführte Arbeiten:

- Exposition von Fischlarven gegenüber 100; 10.000; 100.000 und 1.000.000 Partikel/L.
- Analyse der Aktivität der Superoxiddismutase und dem Gehalt der Lipidperoxide.

Schlussfolgerungen:

- Entgegen der Hypothese wurden keine Auswirkungen von MP auf oxidativen Stress sowie den Gehalt der Lipidperoxide in frühen Entwicklungsstadien von *Salmo trutta f. fario* gefunden.

Herausforderungen:

Entsprechend 9.2.2

9.2.4 Effekte organischer Schadstoffe und deren Modulation durch MP (UTUE)

Hypothese: MP kann die Toxizität bestimmter organischer Verbindungen modulieren.

Durchgeführte Arbeiten:

- Expositionsexperimente mit *Marisa cornuarietis*: Paradiesschnecken wurden gegenüber PS-Partikeln (10.000, 100.000 und 1.000.000 P./L; $< 100 \mu\text{m}$), Cypermethrin, Methiocarb und Amitriptylin jeweils alleine und in Kombination exponiert. Überprüfte Endpunkte: Verhalten, Stressproteinnachweis mittels Hsp70 Level, Grad des oxidativen Stresses (Superoxiddismutaseaktivität), Carboxylesterasenaktivität und Gewebeanalysen von histologischen Proben der Mitteldarmdrüse.
- Zusätzlich: Akute Toxizitätsstudien mit *C. riparius*-Larven, exponiert gegenüber PS-Partikeln (150.000 und 1.000.000 P./L; $< 50 \mu\text{m}$), Thiacloprid und Methiocarb.
- Exposition juveniler Bachforellen gegenüber 10.000 Partikeln/L PS, Methiocarb sowie deren Mischung und in einem zweiten Experiment gegenüber 10.000 und 100.000 Partikeln/L PS, Amitriptylin sowie deren Mischung.
- Zusätzlich: Exposition von Bachforellenlarven gegenüber 100.000 und 1.000.000 Partikel/L PS und Amitriptylin und den Mischungen.

Schlussfolgerungen:

- Irreguläre PS-Partikel ($< 50 \mu\text{m}$) in der Testkonzentration 150.000 Partikel/L modulieren die Toxizität von $1 \mu\text{g/L}$ Thiacloprid und verringern die Mortalität bei *C. riparius* nach 96 h. Effekt trat bei 1.000.000 Partikeln/L nicht auf.

- Keine Effekte durch PS-Partikel bei allen überprüften Biomarkern bei *M. cornuarietis* und keine Modulation der Toxizität von Cypermethrin, Methiocarb und Amitriptylin durch das eingesetzte PS-MP. Alle aufgetretenen Effekte (Mortalität, Hemmung der Acetylcholinesterase, Verhaltensänderungen, Veränderung der Gewebeintegrität) sind auf die Exposition gegenüber Cypermethrin, Methiocarb oder Amitriptylin zurück zu führen.
- Bei juvenilen Bachforellen traten keine signifikanten Effekte durch PS-Partikel bei allen getesteten Biomarkern auf.
- Die verursachte Verhaltensveränderung durch Amitriptylin (Position im Aquarium) bei juvenilen Bachforellen trat bei der Mischung von Amitriptylin mit 100.000 Partikeln/L nicht auf. Der Effekt des Antidepressivums wurde demnach vermindert.
- Bei wenigen der untersuchten Endpunkte (Mortalität bei Chironomiden, Verhalten Bachforellen) wurden Effekte von Chemikalien mit verhältnismäßig guter Wasserlöslichkeit (Amitriptylin und Thiachlopid) durch MP-Partikel moduliert.

Herausforderungen:

Um die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen MP-Partikeln und Chemikalien zu erhöhen, werden meist Stoffe mit relativ hohem log K_{ow} gewählt. Diese binden allerdings auch stark an alle genutzten Glasflächen (Flaschen, Aquarien), so dass eine Absättigung dieser mit der Chemikalie unabdingbar ist. Zudem ist die Wasserlöslichkeit dieser Chemikalien ohne Lösungsvermittler oft zu gering, um eine Konzentration zu erreichen, welche Effekte bei den Testorganismen verursacht.

9.2.5 Effekte durch mit Mikroplastik belasteten Umweltproben (*C. riparius*) (UTUE)

Hypothese: Das Reifenabrieb enthaltende Halensee-Sediment beeinflusst das Überleben von Zuckmückenlarven.

Durchgeführte Arbeiten:

- Exposition von Chironomidenlarven gegenüber Sediment, das einem Sedimentationsbecken entnommen wurde sowie einer daraus dichteseparierten Fraktion (1,7–1,9 g/cm³).

Schlussfolgerungen:

Die aus dem Halensee-Sediment gewonnene Fraktion wirkt akut toxisch auf Chironomiden. Inwiefern Rückstände des Separationsmittels (Natriumpolywolframat) in der Fraktion hierfür verantwortlich sind, ist noch zu überprüfen.

9.2.6 Gewebetransfer von Mikroplastik (GU)

Hypothese: Sehr kleines MP (< 10 µm) passiert Epithelien und kann in das Gewebe aquatischer Invertebraten übergehen.

Durchgeführte Arbeiten:

- Literaturstudie zum Wissensstand zum Gewebetransfer von MP in aquatischen Invertebraten und Fischen,
- Replikation der Studie von Rosenkranz et al. (2009) mit 20 nm und 1 µm großem Polystyrol-MP und *Daphnia magna*,
- Folgeexperimente mit verbesserter Sichtbarkeit der Objekte in der konfokalen Laserscan-Mikroskopie und höheren MP-Konzentrationen sowie mit Passivsammlern.

Schlussfolgerungen:

- Die Mehrzahl der veröffentlichten Studien postuliert einen Gewebetransfer von MP, insbesondere werden Fische, Krebstiere und Muscheln untersucht.
- Die Mehrzahl der Studien verwendet PS-Partikel $\leq 1 \mu\text{m}$, deren Visualisierung und Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgt.
- Die Befunde von Rosenkranz et al. (2009) können unter den Originalbedingungen nicht repliziert werden, da sich das MP in den eingesetzten Konzentrationen nicht detektieren lässt.
- Nach Exposition gegenüber 1000-fach höheren Konzentrationen lässt sich ein Fluoreszenzsignal im Verdauungstrakt und in den Fettspeichergeweben von *D. magna* detektieren.
- Das Fluoreszenzsignal im Gewebe ist deutlich unabhängig von dem im Verdauungstrakt verbleibenden $1 \mu\text{m}$ großem MP.
- Untersuchungen mit Passivsammlern bestätigen, dass der lipophile Fluoreszenzfarbstoff aus dem MP auslaugt und somit kein Gewebetransfer von $1 \mu\text{m}$ großem MP stattfindet. Stattdessen akkumuliert der ausgelaugte Farbstoff.
- Die Verwendung von fluoreszenzmarkiertem MP kann zu Artefakten (falsch-positive Ergebnissen) bei der Untersuchung des Gewebetransfers führen.

Herausforderungen:

Die Lokalisation von Nano- und MP in Organismen und Geweben stellt nach wie vor eine methodische Herausforderung dar. Die im Teilprojekt durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass Fluoreszenz alleine nicht als Indikator für einen Gewebetransfer dienen kann, sofern die Fluoreszenz nicht deutlich als Partikel-assoziiert zu erkennen ist. Mitrano et al. (2019) veröffentlichten kürzlich eine Methode zur Synthese von Nano- und MP mit Metallkern, sodass alternative Methoden zum Nachweis der Partikel in Gewebe genutzt werden und durch Auslaugen verursachte Artefakte vermieden werden können.

9.2.7 Inflammation und zelluläre Stressreaktion (GU)

Hypothese: Eine Exposition gegenüber MP induziert Entzündungs- und Stressreaktionen in aquatischen Invertebraten.

Durchgeführte Arbeiten:

- Expositionsstudie mit *Radix balthica* und irregulärem Polystyrol-MP sowie Kaolin als natürlichem Referenzpartikel,
- NA-Sequenzierung des Transkriptoms und Analyse der differentiellen Genexpression,
- Langzeitstudie mit *D. magna*-Populationen und Mischungen von Polystyrol-MP und Kieselgur als natürlichem Referenzmaterial.

Schlussfolgerungen:

- Die Exposition gegenüber MP und Kaolin verursacht signifikante Expressionsänderungen im Fall von 50 bzw. 153 Genen. Somit induzieren natürliche Partikel eine stärkere Transkriptionsänderung als MP.
- Eine Analyse der Funktionalität der differentiell exprimierten Gene zeigt, dass allgemeine physiologische und biochemische Prozesse betroffen sind, nicht jedoch spezifische Entzündungs- oder Stressreaktionen.
- In *D. magna* führt eine Exposition gegenüber hohen Partikelkonzentrationen zu populationsrelevanten Effekten. Hierbei ist natürliches Kieselgur toxischer als MP.

Herausforderungen:

Die Notwendigkeit der Verwendung adäquater Referenzpartikel bei der Untersuchung der Toxizität von MP wird zunehmend diskutiert (Backhaus and Wagner 2019, Ogonowski et al. 2018). Dies ist wichtig, um die potentiellen Effekte von MP mit denen von natürlicherweise vorkommenden Partikeln vergleichen zu können. Um diese Frage untersuchen zu können, bedarf es gut charakterisierter Referenzpartikel, die in ihren physikalischen Eigenschaften möglichst ähnlich zum verwendeten bzw. in der Natur vorkommenden MP sind. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es kein solches Referenzmaterial, und es bleibt fraglich, ob ein natürliches Material, das in Größenverteilung, Form und Dichte mit MP übereinstimmt, jemals gefunden werden kann.

Beim Einsatz in Biotests gibt es demnach bereits eine deutliche Diskrepanz hinsichtlich des Verbleibs von synthetischen und natürlichen Partikeln im Expositionsmedium. Kaolin ist beispielsweise ein häufig als Referenz benutzter Partikel natürlichen Ursprungs (Ogonowski et al. 2016), von dem bekannt ist, dass er beispielsweise bei Daphnien Effekte auf Nahrungsaufnahme und Reproduktion hervorruft (Kirk 1991, 1992). Seine Dichte liegt allerdings mit $2,6 \text{ g cm}^{-3}$ weit über der der meisten Polymere. Damit ist schnelleres Absinken im Testsystem zu erwarten, was Einfluss auf die Bioverfügbarkeit für Biota mit unterschiedlichen Ernährungstypen hat. Filtrierende Organismen wären somit kontinuierlich Partikeln ausgesetzt, die eine ähnliche Dichte wie Wasser haben, während Partikel mit höherer Dichte nur zu einer kurzzeitigen Exposition kurz nach Beginn des Versuchs oder nach den Wechseln der Testmedien führen würden.

Ähnlich verhält es sich mit den Oberflächeneigenschaften von verschiedenen Materialien. Gezielte Oberflächenmodifikation und Bewuchs mit Biofilmen bestimmen die Interaktion von Partikeln mit Gewebeerflächen (Zhu et al. 2013). Damit einhergehend beeinflussen sie Effekte von Partikeln auf Biota – direkt, z. B. durch veränderte Interaktion mit dem Organismus (Saavedra et al. 2019) oder indirekt, z. B. durch Einfluss auf die Nahrungsquelle eines Organismus (Vosshage et al. 2018). Diese Einflüsse auf das Verhalten in der Umwelt und die Interaktion mit Organismen sind bis dato nicht gut erforscht, und so ist es unwahrscheinlich, dass in absehbarer Zeit adäquate Referenzmaterialien nachgebildet werden können.

9.2.8 Mikroschadstoffe und Mikroplastik (GU)

Hypothese: Die chronische Toxizität von schadstoffbelastetem MP ist höher als die von reinem MP.

Durchgeführte Arbeiten:

- Multigenerationsstudie mit *D. magna* und verschiedenen Konzentrationen von Polystyrol-MP und Kaolin als natürlichem Referenzmaterial.
- Multigenerationsstudie mit *D. magna* und verschiedenen Konzentrationen von unbelastetem und mit Rohabwasser inkubiertem Polystyrol-MP.

Schlussfolgerungen:

- Eine Nahrungslimitation führt über vier Generationen zu einer reduzierten Reproduktion von *D. magna*, beeinflusst aber nicht das Überleben.
- Ein solches Szenario ist realistischer als ein Überangebot von Nahrung, wie es in standardisierten Testverfahren vorgesehen ist. Dies gilt insbesondere für den Fall, dass MP-Effekte über eine verringerte Nahrungsaufnahme vermittelt sind.
- Eine Exposition gegenüber hohen Konzentrationen von MP führt zum Aussterben von *D. magna* nach einer bzw. vier Generationen.

- Eine Exposition gegenüber vergleichbar hohen Konzentrationen von natürlichen Partikeln hat keine negativen Effekte. Das bedeutet, dass MP toxischer ist als Kaolin.
- Hinsichtlich des Überlebens von *D. magna* über vier Generationen ist Abwasser-inkubiertes MP weniger toxisch als „reines“ MP.
- Das bedeutet, dass die Sorption von Chemikalien und kleinskaligem organischem Material aus Rohabwasser die Toxizität von MP verringert. Gründe hierfür können eine veränderte Oberflächenchemie sein.

Herausforderungen:

Die ökotoxikologische Bewertung von Chemikalien basiert vielfach auf standardisierten und in Ringtests validierten Biotestverfahren mit Stellvertreterorganismen. Die Richtlinien, zum Beispiel der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD), finden teilweise auch Anwendung in der MP-Forschung (z. B. (Jaikumar et al. 2018, Rist et al. 2017)), sind aber nur eingeschränkt geeignet für den Umgang mit Partikeln. Bei gelösten Substanzen kann man von einer homogenen Verteilung innerhalb des Expositionsmediums ausgehen. Diese Annahme lässt sich nicht auf MP übertragen, das aufgrund seiner spezifischen Dichte aufschwimmt oder absinkt und aufgrund seiner Hydrophobizität agglomeriert. Experimentelle Faktoren, wie Belüftung und Wasserwechsel, beeinflussen ebenfalls den Verbleib im Medium (Karami 2017). Der Verbleib im Medium wiederum bedingt die Interaktionswahrscheinlichkeit zwischen Biota und Partikeln, in Abhängigkeit vom Ernährungstyp.

Ein zusätzlicher Aspekt ist die Verfügbarkeit von Nahrung im Biotest: Sollte die Verringerung der Nahrungsaufnahme durch eine physische Verdrängung tatsächlich ein Hauptwirkmechanismus von MP sein, werden der resultierenden Effekte durch ein Nahrungsüberangebot kompensiert und maskiert. Da dies bei standardisierten Testverfahren der Fall ist, in Ökosystemen aber nur selten ein Nahrungsüberangebot zu finden ist, sollten weitere Versuche unter nahrungslimitierten Bedingungen durchgeführt werden, um potenzielle Effekte von MP zu detektieren.

9.2.9 Toxizität von nativen MP-Partikeln (UHEI)

Hypothese: Natives MP hat bereits toxische Wirkung auf Embryonen des Zebraablings, partikelassoziierte Schadstoffe zeigen veränderte akut-toxische Effekte im Vergleich zu gelösten Schadstoffen.

Durchgeführte Arbeiten:

- FET-Tests nach OECD 236 mit Embryonen von *Danio rerio* über 96 h mit partikelassoziierten Schadstoffen (BkF, CPF, Cypermethrin und EE2);
- FET-Tests mit gelösten Substanzen (BkF, CPF, Cypermethrin und EE2);
- FET-Tests mit MP (unbelastet) mit PMMA, PS (< 50 µm, < 250 µm).

Schlussfolgerungen:

- Untersuchtes unbelastetes MP hat keine akut-toxischen Effekte auf Embryonen von *D. rerio*.
- Im Vergleich zu partikelassoziierten Schadstoffen erzeugen direkt in Wasser gelösten Substanzen stärkere akut toxische und subletale Effekte.
- MP bindet effektiv Substanzen mit hohem log K_{ow} ; eine Desorption findet nur in geringem Maße statt.

Herausforderungen:

Eine reproduzierbare Schadstoffadsorption an MP-Partikel ist auf Grund der Schwankungen beim Einwiegen des MP sowie geringfügiger Verluste bei Inkubation und Filtrieren und eines ungleichmäßigen Herunterlösens vom Spritzenfilter problematisch. Zahlreiche Zwischenschritte führen letztlich zu

schwer zu kontrollierenden Verlusten von MP und einer variablen Verfügbarkeit von Partikeln im Experiment. Untersuchungen zur Quantifizierung von Sorption und Filtration zeigten sehr gute Wiederfindungsraten und gestatten eine Quantifizierung der Verluste von Substanz und MP.

Der Fischembryotest nach OECD-Richtlinie 236 (OECD 2013) konnte durch die Nutzung von Flachbodengläsern so angepasst werden, dass Interaktionen zwischen MP und den 24-Well-Platten minimiert werden.

Für zukünftige Untersuchungen erscheinen MP-Negativkontrollen zwingend notwendig. Bei der Analyse der Effekte von MP und partikelassoziierten Substanzen sind unbedingt unterschiedlich empfindliche Entwicklungsstadien von aquatischen Organismen separat zu untersuchen (vgl. auch Gellert and Heinrichsdorff (2001), Maack and Segner (2004) und Massei et al. (2015)).

9.2.10 Nahrungsketten (UHEI)

Hypothese: MP kann von wirbellosen Organismen aufgenommen und an adulte Zebrabärblinge weitergereicht werden. Daraus lässt sich eine potenzielle Exposition für den Menschen ableiten.

Durchgeführte Arbeiten:

- Nahrungsnetzexperimente zum partikelassoziierten Schadstofftransfer von BkF über Wasserflöhe (*Daphnia magna*) und Zuckmückenlarven (*Chironomus riparius*) auf den Zebrabärbling (*Danio rerio*);
- Quantifizierung der MP-Aufnahme durch Invertebraten mittels Fluoreszenzmikroskopie;
- Quantifizierung von MP-Partikeln in *D. rerio*;
- Quantifizierung des Schadstofftransfers mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie an Kryoschnitten des Magen-Darm-Trakts von Zebrabärblingen.

Schlussfolgerungen:

- MP (PMMA und PS < 50 µm) wird durch Invertebraten aufgenommen und auf höhere Trophiestufen übertragen.
- In den Wirbellosen kann auf Grund von Re-Ingestion bei längerer Inkubationszeit eine Akkumulation von Schadstoff stattfinden.
- Über einen Versuchszeitraum von 2 Tagen findet keine Akkumulation (Biomagnifikation) der Modellschadstoff in *Danio rerio* statt.

Herausforderungen:

Eine gleichmäßige Verfügbarkeit der MP-Partikel für die wirbellosen Organismen ist schwierig zu realisieren (Scherer et al. 2017). In Anpassung an die unterschiedlichen Ernährungsstrategien von *Daphnia magna* und *Chironomus riparius* sollten MP-Partikel mit entsprechenden Dichteigenschaften (schwebend bzw. sedimentierend) ausgewählt werden. In Vorversuchen zeigte sich, dass PMMA (Dichte 1,19 g/cm³) nach Inkubation und Filtration nur teilweise sedimentiert, so dass PMMA sowohl für den pelagischen Filtrierer *Daphnia magna* als auch die sedimentbewohnenden Larven von *Chironomus riparius* verfügbar waren.

Bereits die Negativkontrollen von *Danio rerio* zeigten eine hohe biologische Variabilität bezüglich des Fluoreszenzsignals im Magen-Darm-Trakt, so dass es schwierig ist, für die Expositionsgruppen, die Wirbellosen gefüttert wurden, die mit schadstoffbelasteten Partikeln inkubiert worden waren, signifikante Abweichungen von den Kontrollen nachzuweisen. Es sind daher relativ hohe Tierzahlen notwendig, mit denen es dann möglich sein sollte, auch über eine Quantifizierung der Fluoreszenz in Kryoschnitten einen effektiven Schadstofftransfer über MP-Partikel nachzuweisen.

Da auch bei histologischen Befunden erhebliche Varianzen auftreten können, können ein MP-assoziiertes Transfer und adverse Effekte von PAHs über Nahrungsketten für längere Expositionszeiträume nicht ausgeschlossen werden. In einer Studie von Spink et al. (2008) wurde z. B. gezeigt, dass Metabolite von BkF zu einer erhöhten Toxizität und vielfach stärkeren CYP450-Induktion in Brustkrebs-Zelllinien führen können.

9.2.11 Quantifizierung des Schadstofftransfers via MP (UHEI)

Hypothese: Mittels fluoreszenzoptischer Methoden lassen sich der Transfer von Schadstoffen (MP-gebunden oder frei im Wasser) und der Einfluss unterschiedlicher Oberflächen von verschiedenem MP wenigstens semiquantitativ bestimmen. Eine exakte Quantifizierung ist jedoch nur chemisch-analytisch möglich.

Durchgeführte Arbeiten:

- Epifluoreszenz und konfokale Laserscanningmikroskopie in Wirbellosen sowie Larven und Kryoschnitten des Magen-Darm-Trakts von *Danio rerio*;
- Etablierung einer neuen Methode zur Quantifizierung des Fluoreszenzsignals aus CLSM Aufnahmen in Kryoschnitten
- Kontrolle des Beladungsprozesses von MP mittels GC-MS und LC-MS in Kooperation mit Partner TP A3 (HSF, Idstein);
- Etablierung eines analytischen Aufschlusses für GC-MS Messungen für Wirbellose;
- Vergleich der EROD-Induktion in *Danio rerio* nach Belastung mit unterschiedlichen MP-Sorten (PMMA sphärisch, PMMA kryogen vermahlen, PS der TU Berlin, PS der GU), die mit BkF beladen worden waren.

Schlussfolgerungen:

- Fluoreszenz lässt sich bei geeigneten Substanzen bzw. MP-Sorten zur Detektion und semiquantitativen Erfassung und Verteilung in biologischen Proben nutzen
- Für eine quantitative Auswertung der Fluoreszenz ist konfokale Laserscanningmikroskopie besser geeignet als Epifluoreszenzmikroskopie. Biologische Varianz kann geringe Unterschiede zwischen Expositionsszenarien maskieren.
- Bei Substanzen mit $\log K_{OW} > 5$ kann die Sorption an MP-Partikel bis zu 80 % betragen. Die Verluste an MP-Partikeln während Inkubation, Filtration, Spülen und Elution sind gering.
- MP-assoziiertes Transfer von BkF kann in Wirbellosen mittels GC-MS erfolgreich nachgewiesen werden.
- Die getesteten MP-Sorten mit variierenden Oberflächen zeigten keine signifikante Veränderung im EROD-Assay.

Herausforderungen:

Die (semi-)quantitative Bestimmung von Substanzen bzw. MP-Sorten ist nur über Fluoreszenz möglich, jedoch können kommerziell erhältliche vormarkierte MP-Partikel durch Auslaugen der Fluorophoren ohne entsprechende Kontrollen problematisch sein (Schür et al. 2019). Eine mögliche Alternative stellt die Färbung von MP in Umweltproben mit Nilrot dar (Erni-Cassola et al. 2017, Maes et al. 2017); auch hier ist eine Kontrolle des Färberefolgs notwendig.

Für den Nachweis eines Schadstofftransfers via Fluoreszenz eignen sich Modellsubstanzen mit Eigenfluoreszenz (Rivera-Figueroa et al. 2004). Zur Quantifizierung ist jedoch chemische Analytik unabdingbar.

Über GC-MS-Messungen konnte belegt werden, dass bis zu 80 % von Benz(k)fluoranthen an MP gebunden werden, weniger als 10 % in der Wasserphase verbleiben. Beim Spülen bzw. Filtrieren des MPs gehen jeweils 10 % BkF verloren. Partikelverluste und Adsorptionsprozesse während der Präparation können die geringere Akkumulation von BkF über MP im Vergleich zu einer BkF-Belastung direkt über das Wasser jedoch nur zum Teil erklären.

Für die Untersuchungen des Schadstofftransfers über den EROD-Assay sollten nach Möglichkeit identische Mengen an MP eingesetzt werden, was jedoch bei unterschiedlicher Vermahlung und Korngrößen problematisch sein kann.

9.2.12 Exposition gegenüber real belasteten Wasser- und Sedimentproben (UHEI)

Hypothese: Natürliche Partikel wie Schwebstoffe und Sedimente unterscheiden sich in ihren toxikologischen Effekten von MP-Partikeln, die in einem Oberflächengewässer einer komplexen Schadstoffmatrix exponiert werden.

Durchgeführte Arbeiten:

- Beladung einer Mischung von MP-Partikeln in einem realen Gewässer über einen Zeitraum von 3 Wochen;
- Untersuchung diverser toxikologischer Effekte (FET, EROD-Assay, AChE-Aktivität, Verhaltensuntersuchungen) nach Belastung von *Danio rerio* mit realen Wasser-, Sediment- und Schwebstoffproben sowie MP, das in den realen Proben mit Schadstoffen beladen wurde.

Schlussfolgerungen:

- Der MP-Mix zeigt bereits in geringer Konzentration von 0.04 mg/ml per se ad-verse Effekte auf Embryonen von *Danio rerio*; die Effekte sind höchstwahrscheinlich auf die Additive im PVC-Anteil (10 %) des MP-Mix zurückzuführen.
- Die Reaktion auf die Belastung mit den Wasserproben unterscheidet sich für alle untersuchten Endpunkte von der Reaktion auf die Schwebstoff- bzw. Sedimentproben.
- Erste chemische Analysen ergaben im Wasser v.a. relevante Konzentrationen des Flammschutzmittels TCPP und Korrosionsschutzmittels Benzotriazol; für beide Substanzen sind in der Literatur Effekte auf die EROD-Induktion bei *Danio rerio* belegt.

Herausforderungen:

Bisher existieren nur wenige Untersuchungen zur Wirkung von in realen Gewässern belasteten MP-Partikeln auf aquatische Organismen (Rochman et al. 2013a, Rochman et al. 2014, Teuten et al. 2009), und die Befunde sind aufgrund mangelnder Standardisierung der Exposition nur schwer vergleichbar. Der Einfluss abiotischer Faktoren wie Wasserstand, Fließgeschwindigkeit, Witterung etc. ist schwer zu bestimmen. Obwohl bei dem ausgewählten Untersuchungsgewässer und der Referenzstelle auf langfristige Monitoringdaten der HSF Idstein zurückgegriffen werden konnte, ist eine umfassende Bewertung der toxikologischen Effekte im Hinblick auf die auslösenden Substanzen aufgrund der Komplexität der Systeme kaum möglich (Cedergreen 2014).

9.2.13 Langzeitwirkungen einer Belastung mit MP-Partikeln (UHEI)

Hypothese: Eine Langzeitbelastung mit MP-Partikeln unterscheidet sich in ihrer Wirkung auf adulte *Danio rerio* von einer Kurzzeitbelastung.

Durchgeführte Arbeiten:

- 14- und 21-tägige Exposition von adulten Zebrafischen gegenüber Ethinylestradiol (EE2), Benz(k)fluoranthren (BkF) und Chlorpyrifos (CPF) in je zwei verschiedenen umweltrelevanten Konzentrationen, sowie gegenüber MP, das mit analogen Schadstoffkonzentrationen beladen worden war;
- Untersuchung folgender Endpunkte: Gewicht, Größe, Geschlecht, MP-Gehalt in Magen-Darm-Trakt, Fluoreszenzsignal (BkF) im Magen-Darm-Kryoschnitten, EROD-Induktion (Leber, BkF und CPF), AChE-Aktivität im Gehirn (CPF), Vitellogenin in Kopf und Schwanz (EE2);
- chemische Analytik der Substanzen im Wasser (BkF, CPF) sowie der Substanz und Metaboliten in Organen von *Danio rerio* (Gehirn: CPF; Leber: BkF).

Schlussfolgerungen:

- Natives MP ohne stoffliche Vorbelastung führt auch bei Exposition über den Versuchszeitraum von 2–3 Wochen zu keinem biologischen Effekt.
- Trotz hoher Partikelzahl ist der Umfang des Schadstofftransfers via MP auch bei chronischer Exposition nicht ausreichend, um biologische Effekte zu erzeugen.
- Die ausgewählten Substanzen führten nur bei direkter Belastung über das Wasser zu nachweisbaren biologischen Effekten.

Herausforderungen:

Um eine gleichmäßige Exposition in Aquariensystemen zu gewährleisten, ist eine konstante Wasserbewegung über Belüftung oder Pumpen notwendig (vgl. Karami (2017)). In den in Heidelberg durchgeführten Versuchen wurde dies durch eine Belüftung über Glasröhrchen (geringe Adsorption) und täglichen Wasserwechsel sichergestellt. Dennoch ist langfristig ein geringfügiger Anstieg oder Abfall der MP-Konzentration durch (vorübergehende) Sedimentation oder Adsorption an Glas, Silikon oder Fäzes nicht völlig auszuschließen. Chemische Analysen der realen Substanzkonzentrationen sind daher unabdingbar. Die Messungen durch den Partner HSF Idstein haben gezeigt, dass es über den Versuchszeitraum weder zu einer nennenswerten Anreicherung der Substanzen (CPF) in den Becken noch eine Ablösung der Substanzen von MP-Partikeln kam.

9.2.14 Schlussfolgerungen tabellarisch (UHEI)

Allgemeine Herausforderungen	Empfehlungen
Überprüfung der Beladung der MP-Partikel und Quantifizierung der partikelgebundenen Menge an Modellsubstanz notwendig	<ul style="list-style-type: none"> • Chemisch-analytische Überprüfung der realen Konzentrationen • Quantifizierung von Verlusten bei Probenherstellung • Quantifizierung von Leaching-Prozessen
Wiederfindung von MP in komplexen biologischen Proben mittels optischer Methoden	<ul style="list-style-type: none"> • Nutzung fluoreszierender Partikel und Substanzen • Kontrolle von Auslaugungsprozessen der Fluorophoren
Anpassung von Testverfahren für den Einsatz von MP	<ul style="list-style-type: none"> • Verwendung von Glaswaren, um Plastik-Plastik Interaktionen (Sorption und Verlust) zu vermeiden
Anpassung der MP-Sorte entsprechend Endpunkt und Organismus	<ul style="list-style-type: none"> • MP mit Dichte > 1 bei sedimentlebenden Organismen bzw. benthischen Prozessen • MP mit Dichte ~ 1, wenn pelagische Organismen untersucht werden • Verhalten der Partikel im jeweiligen Testsystem durch Vorversuche untersuchen • Quantifizierung von Absetzungsprozessen (Bindung an Oberflächen und Organik)

10 Referenzen

- Akincioglu, H., Gulcin, I. and Alwasel, S.H. (2017) Investigation of inhibitory Effect of Humic Acid on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase enzymes. *Fresenius Environmental Bulletin* 26, 3733–3739.
- Aminot, Y., Litrico, X., Chambolle, M., Arnaud, C., Pardon, P. and Budzindki, H. (2015) Development and application of a multi-residue method for the determination of 53 pharmaceuticals in water, sediment, and suspended solids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(28), 8585–8604.
- Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, Å., Norrgren, L. and Petersen, G.I. (2003) Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 134, 365–374.
- Andrady, A.L. (2017) The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin* 119(1), 12–22.
- Anger, P.M., Prechtel, L., Elsner, M., Niessner, R. and Ivleva, N.P. (2019) Implementation of an open source algorithm for particle recognition and morphological characterisation for microplastic analysis by means of Raman microspectroscopy. *Analytical Methods* 11(27), 3483–3489.
- Anger, P.M., von der Esch, E., Baumann, T., Elsner, M., Niessner, R. and Ivleva, N.P. (2018) Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 109, 214–226.
- Arthur, C., Baker, J. and Bamford, H. (2009) Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Micro-plastic Marine Debris.
- Au, S.Y., Lee, C.M., Weinstein, J.E., van den Hurk, P. and Klaine, S.J. (2017) Trophic transfer of microplastics in aquatic ecosystems: Identifying critical research needs. *Integrated Environmental Assessment and Management* 13, 505–509.
- Backhaus, T. and Wagner, M. (2019) Microplastics in the Environment: Much Ado about Nothing? A Debate. *Global Challenges*, 1900022.
- Baker, D.R. and Kasprzyk-Hordern, B. (2013) Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. *Science of The Total Environment* 454–455, 442–456.
- Bakir, A., O'Connor, I.A., Rowland, S.J., Hendriks, A.J. and Thompson, R.C. (2016) Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. *Environmental Pollution* 219, 56–65.
- Bakir, A., Rowland, S.J. and Thompson, R.C. (2014) Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environmental Pollution* 185, 16–23.
- Bannick, C.G., Szewzyk, R., Ricking, M., Schniegler, S., Obermaier, N., Barthel, A.K., Altmann, K., Eisentraut, P. and Braun, U. (2019) Development and testing of a fractionated filtration for sampling of microplastics in water. *Water Research* 149, 650–658.
- Barker, J.N., Jones, M.L., Mitra, R.S., Crockett-Torabe, E., Fantone, J.C., Kunkel, S.L., Warren, J.S., Dixit, V.M. and Nickoloff, B.J. (1991) Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes. *Am J Pathol* 139(4), 869–876.
- Barron, M.G. and Woodburn, K.B. (1995) *Ecotoxicology of chlorpyrifos.*, Springer Verlag, New York, 1–93.
- Batel, A., Borchert, F., Reinwald, H., Erdinger, L. and Braunbeck, T. (2018) Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo[a]pyrene to adult zebrafish (*Danio rerio*) gills and zebrafish embryos. *Environmental Pollution* 235, 918–930.
- Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L. and Braunbeck, T. (2016) Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 1656–1666.
- Ben-Dov, E., Saxena, D., Wang, Q., Manasherob, R., Boussiba, S. and Zaritsky, A. (2003) Ingested particles reduce susceptibility of insect larvae to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Entomology* 127(3), 146–152.

- Bilotta, G.S. and Brazier, R.E. (2008) Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research* 42(12), 2849–2861.
- BMBF (2017) Die Elbschwimmstaffel. Wissenschaftsjahr 2016/17 Meere und Ozeane. Ozeane, R.W.M.u. (ed), Berlin.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Bretkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106(3), 761–771.
- Braun, U., Jekel, M., Ivleva, N., Gerds, G. and Reiber, J. (2018) Mikroplastik-Analytik Probenahme, Probenaufbereitung und Detektionsverfahren.
- Brinke, A. and Buchinger, S. (2016) *Toxicogenomics in Environmental Science*, Springer International Publishing, 159–186.
- Brook, R.D., Rajagopalan, S., Pope, C.A., 3rd, Brook, J.R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A.V., Holguin, F., Hong, Y., Luepker, R.V., Mittleman, M.A., Peters, A., Siscovick, D., Smith, S.C., Jr., Whitsel, L., Kaufman, J.D., American Heart Association Council on, E., Prevention, C.o.t.k.i.C.D., Council on Nutrition, P.A. and Metabolism (2010) Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 121(21), 2331–2378.
- Brown, D.R., Clark, B.W., Garner, L.V.T. and Di Giulio, R.T. (2015) Zebrafish cardiotoxicity: the effects of CYP1A inhibition and AHR2 knockdown following exposure to weak aryl hydrocarbon receptor agonists. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 8329–8338.
- Burns, E.E. and Boxall, A.B.A. (2018) Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37, 2776–2796.
- BVL (2010) PSM-Zulassungsbericht: Mesurol Schneckenkorn, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Braunschweig, Germany.
- BVL (2011) PSM-Zulassungsbericht: Thiocloprid Low-Flow-Aerosol, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Braunschweig, Germany.
- BVL (2012) PSM-Zulassungsbericht: Cyperkill, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Braunschweig, Germany.
- Carmona-Rosas, G., Alfonso-Mendez, M.A., Hernandez-Espinosa, D.A., Romero-Avila, M.T. and Garcia-Sainz, J.A. (2017) A549 cells as a model to study endogenous LPA1 receptor signaling and regulation. *Eur J Pharmacol* 815, 258–265.
- Carr, S.A., Liu, J. and Tesoro, A.G. (2016) Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Res* 91, 174–182.
- Catarino, A.I., Frutos, A. and Henry, T.B. (2019) Use of fluorescent-labelled nanoplastics (NPs) to demonstrate NP absorption is inconclusive without adequate controls. *Science of The Total Environment* 670, 915–920.
- Cedergreen, N. (2014) Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PloS one* 9, e96580.
- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M.B. and Janssen, C.R. (2013) New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin* 70(1), 227–233.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J. and Galloway, T.S. (2013) Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science and Technology* 47, 6646–6655.
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P.A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D. and Dell'Agli, M. (2017) HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm* 2017, 7435621.
- Conversio (2018) *Stoffstrombild Kunststoffe in Deutschland 2017*, Conversio Market & Strategy GmbH, Mainaschaff.
- De Wael, K., Gason, F.G.C.S.J. and Baes, C.A.V. (2008) Selection of an Adhesive Tape Suitable for Forensic Fiber Sampling. *Journal of Forensic Sciences* 53(1), 168–171.

- Deng, Q., Deng, L., Miao, Y., Guo, X. and Li, Y. (2019) Particle deposition in the human lung: Health implications of particulate matter from different sources. *Environ Res* 169, 237–245.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S. and Sawaya, B.E. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29(6), 313–326.
- Détrée, C. and Gallardo-Escárate, C. (2017) Polyethylene microbeads induce transcriptional responses with tissue-dependent patterns in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Molluscan Studies* 83(2), 220–225.
- Dietrich, G. (2017) Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen den Parametern Trübung, abfiltrierbare Stoffe und Partikelzahl am Beispiel zweier Abwasserfiltrationsanlagen im Berliner Klärwerk Ruhleben, Beuth Hochschule für Technik Berlin.
- DIN (2009) Grundsätze der Normungsarbeit, Beuth Verlag, Berlin.
- Dishaw, L.V., Hunter, D.L., Padnos, B., Padilla, S. and Stapleton, H.M. (2014) Developmental exposure to organophosphate flame retardants elicits overt toxicity and alters behavior in early life stage zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological Sciences* 142, 445–454.
- Dumichen, E., Eisentraut, P., Bannick, C.G., Barthel, A.K., Senz, R. and Braun, U. (2017) Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method. *Chemosphere* 174, 572–584.
- Dußling, U. and Berg, R. (2001) Fische in Baden-Württemberg, Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg, Stuttgart, Germany.
- DWA (2016) Mikroplastik in der Siedlungswasserwirtschaft - Arbeitsbericht des DWA-Fachausschusses KA-8 "Weitergehende Abwasserreinigung". *Korrespondenz Abwasser, Abfall* 63, 108–113.
- EC (2013) Grünbuch zu einer europäischen Strategie für Kunststoffabfälle in der Umwelt, Europäische Kommission, Brüssel.
- EC (2015) Development of the first Watch List under the Environmental Quality Standards Directive, European Commission.
- EC (2017) Intentionally added microplastics in products - Final report, Amec Foster Wheeler Environment & Infrastructure UK Limited.
- Eisentraut, P., Dümichen, E., Ruhl, A.S., Jekel, M., Albrecht, M., Gehde, M. and Braun, U. (2018) Two Birds with One Stone—Fast and Simultaneous Analysis of Microplastics: Microparticles Derived from Thermoplastics and Tire Wear. *Environmental Science & Technology Letters* 5(10), 608–613.
- Eitzen, L., Paul, S., Braun, U., Altmann, K., Jekel, M. and Ruhl, A.S. (2019) The challenge in preparing particle suspensions for aquatic microplastic research. *Environmental Research* 168, 490–495.
- Elert, A.M., Becker, R., Duemichen, E., Eisentraut, P., Falkenhagen, J., Sturm, H. and Braun, U. (2017) Comparison of different methods for MP detection: What can we learn from them, and why asking the right question before measurements matters? *Environmental Pollution* 231(Part 2), 1256–1264.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 7, 88–95.
- Erni-Cassola, G., Gibson, M.I., Thompson, R.C. and Christie-oleza, J. (2017) Lost, but found with Nile red; a novel method to detect and quantify small microplastics (20 µm–1 mm) in environmental samples. *Environmental Science & Technology*, acs.est.7b04512.
- Eubeler, J.P., Bernhard, M. and Knepper, T.P. (2010) Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29(1), 84–100.
- European Commission (2014) Commission implementing regulation (EU) No 187/2014 amending implementing regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance methiocarb. *Official Journal of the European Union L* 57, 24–26.
- European Commission (2015) Development of the first Watch List under the Environmental Quality Standards Directive.
- European Commission (2019) Commission implementing regulation (EU) 2019/1606. *Official Journal of the European Union L* 250, 53–55.

- Overall, N.J. (2010) Confocal Raman microscopy: common errors and artefacts. *Analyst* 135(10), 2512–2522.
- Fedotov, P.S., Ermolin, M.S., Karandashev, V.K. and Ladonin, D.V. (2014) Characterization of size, morphology and elemental composition of nano-, submicron, and micron particles of street dust separated using field-flow fractionation in a rotating coiled column. *Talanta* 130, 1–7.
- Fent, K. (2013) *Ökotoxikologie: Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Ferrey, M.L., Heiskary, S., Grace, R., Hamilton, M.C. and Lueck, A. (2015) Pharmaceuticals and other anthropogenic tracers in surface water: A randomized survey of 50 Minnesota lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34(11), 2475–2488.
- Foley, C.J., Feiner, Z.S., Malinich, T.D. and Höök, T.O. (2018) A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. *Science of The Total Environment* 631-632, 550–559.
- Fong, P.P. and Molnar, N. (2013) Antidepressants cause foot detachment from substrate in five species of marine snail. *Marine Environmental Research* 84, 24–30.
- Foulon, V., Le Roux, F., Lambert, C., Huvet, A., Soudant, P. and Paul-Pont, I. (2016) Colonization of Polystyrene Microparticles by *Vibrio crassostreae*: Light and Electron Microscopic Investigation. *Environmental Science & Technology* 50(20), 10988–10996.
- Gellert, G. and Heinrichsdorff, J. (2001) Effect of age on the susceptibility of zebrafish eggs to industrial wastewater. *Water Research* 35, 3754–3757.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. and Parks, W.P. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51(5), 1417–1423.
- Grabbe, J., Welker, P., Rosenbach, T., Nürnberg, W., Krüger-Krasagakes, S., Artuc, M., Fiebiger, E. and Henz, B.M. (1996) Release of stem cell factor from a human keratinocyte line, HaCaT, is increased in differentiating versus proliferating cells. *J Invest Dermatol* 107(2), 219–224.
- Grabbe, U. (1998) *Untersuchungen zur weitergehenden Abwasserreinigung mithilfe textiler Filtermedien*, Universität Hannover, Hannover.
- Gunawardana, C., Goonetilleke, A., Egodawatta, P., Dawes, L. and Kokot, S. (2012) Source characterisation of road dust based on chemical and mineralogical composition. *Chemosphere* 87(2), 163–170.
- Hammers-Wirtz, M. and Ratte, H.T. (2000) Offspring fitness in *Daphnia*: Is the *Daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(7), 1856.
- Hänel, K.H., Cornelissen, C., Luscher, B. and Baron, J.M. (2013) Cytokines and the skin barrier. *Int J Mol Sci* 14(4), 6720–6745.
- Hartmann, N.B., Hüffer, T., Thompson, R.C., Hassellöv, M., Verschoor, A., Daugaard, A.E., Rist, S., Karlsson, T., Brennholt, N., Cole, M., Herrling, M.P., Hess, M.C., Ivleva, N.P., Lusher, A.L. and Wagner, M. (2019) Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environmental Science & Technology* 53(3), 1039–1047.
- Henrot, P., Prevel, R., Berger, P. and Dupin, I. (2019) Chemokines in COPD: From Implication to Therapeutic Use. *Int J Mol Sci* 20(11).
- Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P. and Duflos, G. (2017) Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere* 182, 781–793.
- Hess, H. and Tseng, Y. (2007) Active intracellular transport of nanoparticles: opportunity or threat? *ACS Nano* 1(5), 390–392.
- Hintersteiner, I., Himmelsbach, M. and Buchberger, W.W. (2015) Characterization and quantitation of polyolefin microplastics in personal-care products using high-temperature gel-permeation chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(4), 1253–1259.
- Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G.I., Korsgaard, B., Pedersen, K.L. and Bjerregaard, P. (2001) Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 130, 119–131.

- Huppertsberg, S. and Knepper, T.P. (2018) Instrumental analysis of microplastics—benefits and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410(25), 6343–6352.
- Imhof, H.K., Laforsch, C., Wiesheu, A.C., Schmid, J., Anger, P.M., Niessner, R. and Ivleva, N.P. (2016a) Pigments and plastic in limnetic ecosystems: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes. *Water Research* 98, 64–74.
- Imhof, H.K., Laforsch, C., Wiesheu, A.C., Schmid, J., Anger, P.M., Niessner, R. and Ivleva, N.P. (2016b) Pigments and Plastic in Limnetic Ecosystems: A Qualitative and Quantitative Study on Microparticles of Different Size Classes. *Water Res.* 98, 64–74.
- Imhof, H.K., Schmid, J., Niessner, R., Ivleva, N.P. and Laforsch, C. (2012) A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. *Limnol Oceanogr Methods* 10.
- ISO (2006) Anleitung zur Erstellung von Probenahmeprogrammen und Probenahmetechniken.
- Ivleva, N.P., Wiesheu, A.C. and Niessner, R. (2017) Mikroplastic in Aquatic Ecosystems. *Angewandte Chemie International Edition* 55.
- Jaikumar, G., Baas, J., Brun, N.R., Vijver, M.G. and Bosker, T. (2018) Acute sensitivity of three Cladoceran species to different types of microplastics in combination with thermal stress. *Environmental Pollution* 239, 733–740.
- Kais, B., Schiwiy, S., Hollert, H., Keiter, S.H. and Braunbeck, T. (2017) In vivo EROD assays with the zebrafish (*Danio rerio*) as rapid screening tools for the detection of dioxin-like activity. *Science of The Total Environment* 590–591, 269–280.
- Kais, B., Stengel, D., Batel, A. and Braunbeck, T. (2015) Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 16329–16339.
- Kappler, A., Fischer, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K.J. and Voit, B. (2016) Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408(29), 8377–8391.
- Karami, A. (2017) Gaps in aquatic toxicological studies of microplastics. *Chemosphere* 184, 841–848.
- Ke, M.-T., Fujimoto, S. and Imai, T. (2013) SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature Neuroscience* 16(8), 1154–1161.
- Kirk, K.L. (1991) Suspended clay reduces *Daphnia* feeding rate. *Freshwater Biology* 25(2), 357–365.
- Kirk, K.L. (1992) Effects of suspended clay on *Daphnia* body growth and fitness. *Freshwater Biology* 28(1), 103–109.
- Klein, S., Worch, E. and Knepper, T.P. (2015) Occurrence and Spatial Distribution of Microplastics in River Shore Sediments of the Rhine-Main Area in Germany. *Environmental Science & Technology* 49(10), 6070–6076.
- Kleinteich, J., Seidensticker, S., Marggrander, N. and Zarf, C. (2018) Microplastics reduce short-term effects of environmental contaminants. part II: Polyethylene particles decrease the effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on microorganisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M.F. and Mortensen, E. (2003) Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* 12(1), 1–59.
- Klößner, P., Reemtsma, T., Eisentraut, P., Braun, U., Ruhl, A.S. and Wagner, S. (2019) Tire and road wear particles in road environment – Quantification and assessment of particle dynamics by Zn determination after density separation. *Chemosphere* 222, 714–721.
- Koelmans, A.A., Bakir, A., Burton, G.A. and Janssen, C.R. (2016) Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. *Environmental Science and Technology* 50, 3315–3326.
- Kreider, M.L., Panko, J.M., McAtee, B.L., Sweet, L.I. and Finley, B.L. (2010) Physical and chemical characterization of tire-related particles: Comparison of particles generated using different methodologies. *Science of The Total Environment* 408(3), 652–659.

- Kurth, D., Krauss, M., Schulze, T. and Brack, W. (2017) Measuring the internal concentration of volatile organic compounds in small organisms using micro-QuEChERS coupled to LVI-GC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409, 6041–6052.
- Lademann, J., Schaefer, H., Otberg, N., Teichmann, A., Blume-Peytavi, U. and Sterry, W. (2004) Penetration von Mikropartikeln in die menschliche Haut. *Hautarzt* 55(12), 1117–1119.
- LAGESO (2016) Halensee - Badegewässerprofil. Soziales, L.f.G.u. (ed).
- Lambert, S., Scherer, C. and Wagner, M. (2017) Ecotoxicity testing of microplastics: Considering the heterogeneity of physicochemical properties. *Integrated Environmental Assessment and Management* 13(3), 470–475.
- Lambert, S. and Wagner, M. (2016) Formation of microscopic particles during the degradation of different polymers. *Chemosphere* 161, 510–517.
- Laresse Filon, F., Mauro, M., Adami, G., Bovenzi, M. and Crosera, M. (2015) Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol* 72(2), 310–322.
- Larsen, M.G., Hansen, K.B., Henriksen, P.G. and Baatrup, E. (2008) Male zebrafish (*Danio rerio*) courtship behaviour resists the feminising effects of 17 α -ethinyloestradiol-morphological sexual characteristics do not. *Aquatic Toxicology*.
- Lee, S., Kwak, J., Kim, H. and Lee, J. (2013) Properties of roadway particles from interaction between the tire and road pavement. *International Journal of Automotive Technology* 14(1), 163–173.
- Lehmann, B. (1997) HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin. *J Invest Dermatol* 108(1), 78–82.
- LeMoine, C.M.R., Kelleher, B.M., Lagarde, R., Northam, C., Elebute, O.O. and Cassone, B.J. (2018) Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution* 243, 591–600.
- Li, D., Li, Y., Li, G., Zhang, Y., Li, J. and Chen, H. (2019) Fluorescent reconstitution on deposition of PM2.5 in lung and extrapulmonary organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(7), 2488–2493.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. and Todaro, G. (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17(1), 62–70.
- Lin, W., Jiang, R., Hu, S., Xiao, X., Wu, J., Wei, S., Xiong, Y. and Ouyang, G. (2019) Investigating the toxicities of different functionalized polystyrene nanoplastics on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 180, 509–516.
- Liu, X., Ji, K. and Choi, K. (2012) Endocrine disruption potentials of organophosphate flame retardants and related mechanisms in H295R and MVLN cell lines and in zebrafish. *Aquatic Toxicology* 114–115, 173–181.
- Löder, M.G.J., Imhof, H.K., Ladehoff, M., Löschel, L.A., Lorenz, C., Mintenig, S., Piehl, S., Primpke, S., Schrank, I., Laforsch, C. and Gerdts, G. (2017) Enzymatic Purification of Microplastics in Environmental Samples. *Environmental Science & Technology* 51(24), 14283–14292.
- Lohse, M.J. and Müller-Oerlinghausen, B. (2018) *Arzneiverordnungs-Report 2018*. Schwabe, U., Paffrath, D., Ludwig, W.-D. and Klauber, J. (eds), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 733–761.
- Loos, R., Marinov, D., Sanseverino, I., Napierska, D. and Lettieri, T. (2018) Review of the 1st watch list under the Water Framework Directive and recommendations for the 2nd Watch List, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Lorenz, C.S., Wicht, A.-J., Guluzada, L., Luo, L., Jäger, L., Crone, B., Karst, U., Triebkorn, R., Liang, Y., Anwander, R., Haderlein, S.B., Huhn, C. and Köhler, H.-R. (2017) Nano-sized Al₂O₃ reduces acute toxic effects of thiacloprid on the non-biting midge *Chironomus riparius*. *PLoS one* 12(5), e0176356.
- Maack, G. and Segner, H. (2004) Life-stage-dependent sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) to estrogen exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 139, 47–55.
- Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K. and Mayes, A.G. (2017) A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific Reports* 7, 44501.

- Massei, R., Vogs, C., Renner, P., Altenburger, R. and Scholz, S. (2015) Differential sensitivity in embryonic stages of the zebrafish (*Danio rerio*): The role of toxicokinetics for stage-specific susceptibility for azinphos-methyl lethal effects. *Aquatic Toxicology* 166, 36–41.
- MECANA (2017a) Drucktrommel-Filter. GmbH, M.U. (ed).
- MECANA (2017b) Polstoff-Filtration. GmbH, M.U. (ed).
- Michielssen, M.R., Michielssen, E.R., Ni, J. and Duhaime, M.B. (2016) Fate of microplastics and other small anthropogenic litter (SAL) in wastewater treatment plants depends on unit processes employed. *Environmental Science: Water Research & Technology* 2(6), 1064–1073.
- Miklos, D., Obermaier, N. and Jekel, M. (2016) Mikroplastik: Entwicklung eines Umweltbewertungskonzepts. Umweltbundesamt (ed).
- Mintenig, S., Int-Veen, I., Löder, M. and Gerdts, G. (2014) Mikroplastik in ausgewählten Kläranlagen des Oldenburgisch-Ostfriesischen Wasserverbandes (OOWV) in Niedersachsen.
- Mitrano, D.M., Beltzung, A., Frehland, S., Schmiedgruber, M., Cingolani, A. and Schmidt, F. (2019) Synthesis of metal-doped nanoplastics and their utility to investigate fate and behaviour in complex environmental systems. *Nature nanotechnology* 14(4), 362–368.
- MLS (2016) The Declaration of the Global Plastics Associations for Solutions on Marine Litter, Marine Litter Solutions.
- Moore, C.J. (2008) Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environ Res* 108.
- Müller, Y. (2018) Identification and Quantification of Microplastics in the Longitudinal Profile of the River Elbe, Germany, Universität Duisburg-Essen, Essen.
- Müller, Y.K., Wernicke, T., Pittroff, M., Witzig, C.S., Storck, F.R., Klinger, J. and Zumbülte, N. (2020) Microplastic analysis—are we measuring the same? Results on the first global comparative study for microplastic analysis in a water sample. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412(3), 555–560.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J. (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113(7), 823–839.
- OECD (1998) Test No. 212: Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages.
- OECD (2009) Test No. 230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, 1–38.
- OECD (2011) Test No. 235: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test.
- OECD (2012) Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.
- OECD (2013) Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD, 1–22.
- OECD (2019) Test Guideline No. 203: Fish, Acute Toxicity Testing. OECD, 1–24.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M. and Markert, B. (2000) Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (mollusca: gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xenoestrogens. *Ecotoxicology* 9(6), 383–397.
- Ogonowski, M., Gerdes, Z. and Gorokhova, E. (2018) What we know and what we think we know about microplastic effects – A critical perspective. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 1, 41–46.
- Ogonowski, M., Schür, C., Jarsén, Å. and Gorokhova, E. (2016) The Effects of Natural and Anthropogenic Microparticles on Individual Fitness in *Daphnia magna*. *PLoS one* 11, e0155063.
- Örn, S., Holbech, H., Madsen, T.H., Norrgren, L. and Petersen, G.I. (2003) Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology* 65, 397–411.
- Oßmann, B.E., Sarau, G., Holtmannspötter, H., Pischetsrieder, M., Christiansen, S.H. and Dicke, W. (2018) Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Research* 141, 307–316.

- Osterauer, R., Haus, N., Sures, B. and Köhler, H.-R. (2009) Uptake of platinum by zebrafish (*Danio rerio*) and ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and resulting effects on early embryogenesis. *Chemosphere* 77(7), 975–982.
- Osterauer, R., Köhler, H.-R. and Triebkorn, R. (2010) Histopathological alterations and induction of hsp70 in ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to PtCl₂. *Aquatic Toxicology* 99(1), 100–107.
- Otte, J.C., Schmidt, A.D., Hollert, H. and Braunbeck, T. (2010) Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 100, 38–50.
- Padilla, S., Lassiter, T.L. and Hunter, D. (1999) Biochemical measurement of cholinesterase activity. *Methods in molecular medicine* 22, 237–245.
- Panko, J.M., Chu, J., Kreider, M.L. and Unice, K.M. (2013) Measurement of airborne concentrations of tire and road wear particles in urban and rural areas of France, Japan, and the United States. *Atmospheric Environment* 72, 192–199.
- Renner, G., Schmidt, T.C. and Schram, J. (2018) Analytical methodologies for monitoring micro(nano)plastics: Which are fit for purpose? *Current Opinion in Environmental Science & Health* 1, 55–61.
- Rist, S., Baun, A. and Hartmann, N.B. (2017) Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environmental Pollution* 228, 398–407.
- Rivera-Figueroa, A.M., Ramazan, K.A. and Finlayson-Pitts, B.J. (2004) Fluorescence, Absorption, and Excitation Spectra of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as a Tool for Quantitative Analysis. *Journal of Chemical Education* 81, 242.
- Rochman, C.M., Brookson, C., Bikker, J., Djuric, N., Earn, A., Bucci, K., Athey, S., Huntington, A., McIlwraith, H., Munno, K., De Frond, H., Kolomijeca, A., Erdle, L., Grbic, J., Bayoumi, M., Borrelle, S.B., Wu, T., Santoro, S., Werbowski, L.M., Zhu, X., Giles, R.K., Hamilton, B.M., Thaysen, C., Kaura, A., Klasios, N., Ead, L., Kim, J., Sherlock, C., Ho, A. and Hung, C. (2019) Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38(4), 703–711.
- Rochman, C.M., Hoh, E., Hentschel, B.T. and Kaye, S. (2013a) Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: Implications for plastic marine debris. *Environmental Science and Technology* 47, 1646–1654.
- Rochman, C.M., Hoh, E., Kurobe, T. and Teh, S.J. (2013b) Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific Reports* 3, 3263.
- Rochman, C.M., Kurobe, T., Flores, I. and Teh, S.J. (2014) Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of The Total Environment* 493, 656–661.
- Rodríguez Chialanza, M., Sierra, I., Pérez Parada, A. and Fornaro, L. (2018) Identification and quantitation of semi-crystalline microplastics using image analysis and differential scanning calorimetry. *Environmental Science and Pollution Research* 25(17), 16767–16775.
- Römpf Online (2014) Makromoleküle, Georg Thieme Verlag.
- Rose, C.E., Jr., Sung, S.S. and Fu, S.M. (2003) Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation* 10(3-4), 273–288.
- Rosenkranz, P., Chaudhry, Q., Stone, V. and Fernandes, T.F. (2009) A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(10), 2142.
- Saavedra, J., Stoll, S. and Slaveykova, V.I. (2019) Influence of nanoplastic surface charge on eco-corona formation, aggregation and toxicity to freshwater zooplankton. *Environmental Pollution* 252, 715–722.
- Santana, M.F.M., Moreira, F.T. and Turra, A. (2017) Trophic transference of microplastics under a low exposure scenario: Insights on the likelihood of particle cascading along marine food-webs. *Marine Pollution Bulletin* 121, 154–159.
- Scherer, C., Brennholt, N., Reifferscheid, G. and Wagner, M. (2017) Feeding type and development drive the ingestion of microplastics by freshwater invertebrates. *Scientific Reports* 7, 1–9.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682.
- Schirling, M., Bohlen, A., Triebkorn, R. and Köhler, H.R. (2006) An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors. *Chemosphere* 64(10), 1730–1738.
- Schmidt, C., Krauth, T. and Wagner, S. (2017) Export of Plastic Debris by Rivers into the Sea. *Environmental Science & Technology* 51(21), 12246–12253.
- Schür, C., Rist, S., Baun, A., Mayer, P., Hartmann, N.B. and Wagner, M. (2019) When Fluorescence Is not a Particle: The Tissue Translocation of Microplastics in *Daphnia magna* Seems an Artifact. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38, 1495–1503.
- Schwarz, S., Schmiege, H., Scheurer, M., Köhler, H.-R. and Triebkorn, R. (2017) Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*. *Science of The Total Environment* 607–608, 1026–1036.
- Schymanski, D., Goldbeck, C., Humpf, H.-U. and Fürst, P. (2018) Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Research* 129(Supplement C), 154–162.
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V. and Lehtiniemi, M. (2014) Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution* 185, 77–83.
- Singh, V. and Singh, D.K. (2009) The effect of abiotic factors on the toxicity of cypermethrin against the snail *Lymnaea acuminata* in the control of fascioliasis. *Journal of Helminthology* 83(1), 39–45.
- Smith, E.M., Iftikar, F.I., Higgins, S., Irshad, A., Jandoc, R., Lee, M. and Wilson, J.Y. (2012) In vitro inhibition of cytochrome P450-mediated reactions by gemfibrozil, erythromycin, ciprofloxacin and fluoxetine in fish liver microsomes. *Aquatic Toxicology* 109, 259–266.
- Sommer, F., Dietze, V., Baum, A., Sauer, J., Gilge, S., Maschowski, C. and Gieré, R. (2018) Tire Abrasion as a Major Source of Microplastics in the Environment. *Aerosol and Air Quality Research* 18(8), 2014–2028.
- Spink, D.C., Wu, S.J., Spink, B.C., Hussain, M.M., Vakharia, D.D., Pentecost, B.T. and Kaminsky, L.S. (2008) Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: Roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 226, 213–224.
- Stengel, D., Wahby, S. and Braunbeck, T. (2017) In search of a comprehensible set of endpoints for the routine monitoring of neurotoxicity in vertebrates: sensory perception and nerve transmission in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–19.
- Steube, K.G., Teepe, D., Meyer, C., Zaborski, M. and Drexler, H.G. (1997) A model system in haematology and immunology: the human monocytic cell line MONO-MAC-1. *Leuk Res* 21(4), 327–335.
- Talvitie, J., Mikola, A., Koistinen, A. and Setälä, O. (2017a) Solutions to microplastic pollution – Removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment technologies. *Water Research* 123, 401–407.
- Talvitie, J., Mikola, A., Setälä, O., Heinonen, M. and Koistinen, A. (2017b) How well is microlitter purified from wastewater? – A detailed study on the stepwise removal of microlitter in a tertiary level wastewater treatment plant. *Water Research* 109, 164–172.
- Tang, S.C., Liao, P.Y., Hung, S.J., Ge, J.S., Chen, S.M., Lai, J.C., Hsiao, Y.P. and Yang, J.H. (2017) Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6, IL-8, MCP-1 and COX-2 inflammation by modulating NF-kappaB signaling pathway in keratinocytes and mice skin. *J Dermatol Sci* 86(3), 238–248.
- Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S. and Thompson, R.C. (2007) Potential for Plastics to Transport Hydrophobic Contaminants. *Environmental Science & Technology* 41, 7759–7764.

- Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M. and Takada, H. (2009) Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 2027–2045.
- Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J. and John, A.W. (2004) Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304.
- Tosetto, L., Williamson, J.E. and Brown, C. (2017) Trophic transfer of microplastics does not affect fish personality. *Animal Behaviour* 123, 159–167.
- Triebkorn, R., Braunbeck, T., Grummt, T., Hanslik, L., Huppertsberg, S., Jekel, M., Knepper, T.P., Kraus, S., Müller, Y.K., Pittroff, M., Ruhl, A.S., Schmieg, H., Schür, C., Strobel, C., Wagner, M., Zumbülte, N. and Köhler, H.-R. (2019) Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 110, 375–392.
- Trifuoggi, M., Pagano, G., Oral, R., Pavičić-Hamer, D., Burić, P., Kovačić, I., Siciliano, A., Toscanesi, M., Thomas, P.J., Paduano, L., Guida, M. and Lyons, D.M. (2019) Microplastic-induced damage in early embryonal development of sea urchin *Sphaerechinus granularis*. *Environmental Research* 179, 108815.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Ciofini, M., Lapucci, A. and Camaiti, M. (2013) Microplastic debris in sandhoppers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 129, 19–22.
- Umweltprobenbank (2017) Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung, Umweltbundesamt.
- Unice, K.M., Weeber, M.P., Abramson, M.M., Reid, R.C.D., van Gils, J.A.G., Markus, A.A., Vethaak, A.D. and Panko, J.M. (2019) Characterizing export of land-based microplastics to the estuary - Part I: Application of integrated geospatial microplastic transport models to assess tire and road wear particles in the Seine watershed. *Science of The Total Environment* 646, 1639–1649.
- Vosshage, A.T.L., Neu, T.R. and Gabel, F. (2018) Plastic Alters Biofilm Quality as Food Resource of the Freshwater Gastropod *Radix balthica*. *Environmental Science & Technology* 52(19), 11387–11393.
- Wagner, S., Hüffer, T., Klöckner, P., Wehrhahn, M., Hofmann, T. and Reemtsma, T. (2018) Tire wear particles in the aquatic environment - A review on generation, analysis, occurrence, fate and effects. *Water Research* 139, 83–100.
- Wagner, S., Klöckner, P., Stier, B., Römer, M., Seiwert, B., Reemtsma, T. and Schmidt, C. (2019) Relationship between Discharge and River Plastic Concentrations in a Rural and an Urban Catchment. *Environmental Science & Technology* 53(17), 10082–10091.
- Wang, G., Chen, H., Du, Z., Li, J., Wang, Z. and Gao, S. (2017) In vivo metabolism of organophosphate flame retardants and distribution of their main metabolites in adult zebrafish. *Science of The Total Environment* 590–591, 50–59.
- Wesch, C., Elert, A.M., Wörner, M., Braun, U., Klein, R. and Paulus, M. (2017) Assuring quality in microplastic monitoring: About the value of clean-air devices as essentials for verified data. *Scientific Reports* 7(1), 5424.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J. and Tillitt, D.E. (2000) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 30, 347–570.
- Wicke, D., Matzinger, A. and Rouault, P. (2016) Relevanz organischer Spurenstoffe im Regenwasserabfluss Berlins (Abschlussbericht). Berlin, K. (ed).
- Wiesheu, A.C., Anger, P.M., Baumann, T., Niessner, R. and Ivleva, N.P. (2016) Raman microspectroscopic analysis of fibers in beverages. *Analytical Methods* 8(28), 5722–5725.
- Witzig, C. (2017) Microplastics in Freshwater Systems. Optimized Sample Preparation by Centrifugation and Density Separation with subsequent Raman Microspectroscopy, Universität Augsburg, Augsburg.
- Woodall, L.C., Gwinnett, C., Packer, M., Thompson, R.C., Robinson, L.F. and Paterson, G.L.J. (2015) Using a forensic science approach to minimize environmental contamination and to identify microfibres in marine sediments. *Marine Pollution Bulletin* 95(1), 40–46.
- Zhu, M., Nie, G., Meng, H., Xia, T., Nel, A. and Zhao, Y. (2013) Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Accounts of chemical research* 46(3), 622–631.

Ziajahromi, S., Neale, P.A., Rintoul, L. and Leusch, F.D.L. (2017) Wastewater treatment plants as a pathway for microplastics: Development of a new approach to sample wastewater-based microplastics. *Water Research* 112, 93–99.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A. and Riethmuller, G. (1988) Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* 41(3), 456–461.

Zoubir, A. (2012) *Raman Imaging*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg.

Zweifel, H., Maier, R.D. and Schiller, M. (2009) *Plastic additive handbook*, Carl Hanser Verlag, München.

Förderer



Projektpartner



Mikroplastik im Wasserkreislauf

Das interdisziplinäre Forschungsprojekt MiWa widmete sich grundlegenden Fragestellungen zur Analytik und Wirkung von Mikroplastik-Partikeln im Wasserkreislauf. Es wurden Methoden der Umweltprobennahme, der Probenaufbereitung und verschiedene Detektionsverfahren zur Charakterisierung und Quantifizierung von Mikroplastik intensiv untersucht, miteinander verglichen und weiterentwickelt. Öko- und humantoxikologische Untersuchungen dienten dem Zweck, die potenziell von Mikroplastik ausgehende Gefährdung für die aquatische Umwelt und den Menschen zu analysieren und zu bewerten. Eine Harmonisierung und Standardisierung von Methoden der Probennahme, Probenaufbereitung und Mikroplastik-Detektion sind trotz der erheblichen Fortschritte derzeit nur teilweise möglich. Die ökotoxikologischen Studien zeigen zwar die Aufnahme von Mikroplastik-Partikeln durch einige Organismen, jedoch konnte bisher keine schädigende Wirkung nachgewiesen werden. Dabei wurden für eine Auswahl aquatischer Modellspezies sowohl Szenarien direkter als auch indirekter Exposition innerhalb einer Nahrungskette betrachtet. Interaktionen mit menschlichen Modellzellen wurden bislang nur bei Mikroplastik-Partikeln mit Größen weit unterhalb von 1 μm (also Nanoplastik) beobachtet. Eine umfassende Bewertung ist bislang nicht möglich.

ISBN 978-3-7983-3162-4 (print)

ISBN 978-3-7983-3163-1 (online)



ISBN 978-3-7983-3162-4



<http://verlag.tu-berlin.de>