



SubµTrack Schlussbericht

Tracking von (Sub)Mikroplastik unterschiedlicher Identität – Innovative Analysetools für die toxikologische und prozesstechnische Bewertung

Gefördert durch:
Bundesministerium für Bildung und Forschung

Autoren:

Oliver Knoop, Mohammed S.M. Al-Azzawi, Claus-Gerhard Bannick,
Sebastian Beggel, A. Ronja D. Binder, Martin Elsner, Kyriakos Eslahian,
Korbinian P. Freier, Matin Funck, Jürgen Geist, Michael Gierig, Astrid Götz,
Christian Griebler, Cornelia Hunger, Natalia P. Ivleva, Marco Kunaschk,
Florian Meier, Ruth Müller, Nathan Obermaier, Michael W. Pfaffl,
Julia Reichel, Sarah Schönbauer, Christian Schwaferts, Jochen Türk,
Carmen Wolf, Yuxiang Zhou, Jörg E. Drewes

Eine Initiative des Bundesministeriums
für Bildung und Forschung

Plastik
in der **Umwelt**

Quellen • Senken • Lösungsansätze



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



FONA
Forschung für Nachhaltige
Entwicklung
BMBF

Berichte aus der

Siedlungswasserwirtschaft
Technische Universität München

Berichtsheft Nr. 223

ISSN 0942-914X

2021



Schlussbericht

Plastik – Verbundprojekt SubµTrack

Tracking von (Sub)Mikroplastik unterschiedlicher Identität – Innovative Analysetools
für die toxikologische und prozesstechnische Bewertung

Förderkennzeichen: 02WPL1443A-G

HelmholtzZentrum münchen
German Research Center for Environmental Health

Bayerisches Landesamt für
Umwelt



POSTNOVA



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



Eine Initiative des Bundesministeriums
für Bildung und Forschung

Plastik
in der **Umwelt**

Quellen • Senken • Lösungsansätze



Fördermaßnahme: Plastik in der Umwelt

Verbundprojekt: SubµTrack: Tracking von (Sub)Mikroplastik unterschiedlicher Identität – Innovative Analysetools für die toxikologische und prozesstechnische Bewertung

Laufzeit: 1.09.2017 – 30.06.2021

Berichtsdatum: 31.12.2021

Kontakt: Technische Universität München
Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft
Am Coulombwall 3
84758 Garching
Tel.: +49 89 289 13701
E-Mail: sww@tum.de

Verbundkoordinator: Prof. Dr. Ing. Jörg E. Drewes
Tel.: +49 89 289 13701
E-Mail: joerg.drewes@tum.de

Projektleiter: Dr. Oliver Knoop
Tel.: +49 89 289 13702
E-Mail: oliver.knoop@tum.de

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02WPL1443A-G gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Projektpartner & Anschriften:

TUM-SWW	Technische Universität München Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft Am Coulombwall 3 84758 Garching	Prof. Dr. Ing. Jörg E. Drewes E-Mail: jdrewes@tum.de Dr. Oliver Knoop E-Mail: oliver.knoop@tum.de M.Sc. Julia Reichel E-Mail: Julia.reichel@tum.de M.Sc. Mohammed S.M. Al-Azzawi E-Mail: mohammed.al-azzawi@tum.de
TUM-IWC	Technische Universität München Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie Elisabeth-Winterhalter-Weg 6 81377 München	Prof. Dr. Martin Elsner E-Mail: m.elsner@tum.de PD Dr. Natalia P. Ivleva E-Mail: natalia.ivleva@tum.de M.Sc. Christian Schwaferts E-Mail: christian.schwaferts@tum.de
TUM-LAS	Technische Universität München Lehrstuhl für Aquatische Systembiologie Mühlenweg 22 85354 Freising	Prof. Dr. Jürgen Geist E-Mail: geist@tum.de Dr. Sebastian Beggel E-Mail: sebastian.beggel@tum.de M.Sc. Astrid Götz E-Mail: astrid.bartonitz@tum.de
TUM-LTI	Technische Universität München Lehrstuhl für Tierphysiologie & Immunologie Weihestephaner Berg 3 85354 Freising	Prof. Dr. Michael Pfaffl E-Mail: michael.pfaffl@tum.de A. Ronja D. Binder E-Mail: rbinder@tum.de
TUM-MCTS	Technische Universität München Munich Center for Technology in Society (MCTS) Augustenstraße 46 80333 München	Prof. Dr. Ruth Müller E-Mail: ruth.mueller@tum.de Dr. Sarah Schönbauer E-Mail: sarah.schoenbauer@tum.de
IUTA	Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) Bliersheimerstrasse 58-60 47229 Duisburg	Dr. Jochen Türk E-Mail: tuerk@iuta.de Dr. Carmen Nickel E-Mail: nickel@iuat.de M.Sc. Matin Funck E-Mail: funck@iuta.de

LfU	Bayerisches Landesamt für Umwelt Referat 76 – Stoff- und Chemikalienbewertung Demollstraße 31 82407 Wielenbach	Dr. Michael Gierig E-Mail: Michael.Gierig@lfu.bayern.de Dr. Korbinian P. Freier E-Mail: Korbinian.Freier@lfu.bayern.de Dr. Marco Kunaschk E-Mail: Marco.Kunaschk@lfu.bayern.de
UBA	Umweltbundesamt Fachgebiet III 2.6 Abwassertechnikforschung, Abwasserentsorgung Wörlitzer Platz 1 06844 Dessau-Roßlau	Dr. Claus Gerhard Bannick E-Mail: claus-gerhard.bannick@uba.de M.Sc. Nathan Obermaier E-Mail: nathan.obermaier@uba.de
BS-Partikel	BS-Partikel GmbH Nestléstraße 41 55120 Mainz	Dr. Kyriakos A. Eslahian E-Mail: eslahian@bs-partikel.de Dr. Cornelia Hunger E-Mail: hunger@bs-partikel.de
Postnova	Postnova Analytics GmbH Research & Development Rankinestraße 1 86899 Landsberg am Lech	Dr. Florian Meier E-Mail: florian.meier@postnova.com
HMGU	Helmholtz Zentrum München Institut für Grundwasserökologie Ingolstädter Landstrasse 1 85764 Neuherberg	Prof. Dr. Christian Griebler E-Mail: christian.griebler@univie.ac.at Dr. Yuxiang Zhou E-Mail: yuxiang.zhou@tum.de

Inhalt

Projektpartner & Anschriften:.....	II
Inhalt.....	IV
Einführung	1
Projektziele	5
Projektstruktur.....	6
Arbeitspakete.....	9
AP1: Auswahl und Herstellung von Referenzpartikeln	11
AP2: Umfassende Analytik von Submikroplastik(partikeln).....	19
Anwendung und Erweiterung vorhandener Analysetechniken für die Detektion, Identifizierung und Charakterisierung von Submikroplastik	21
Erweiterung des analytischen Spektrums für die Submikroplastikanalytik durch den Einsatz der Feldflussfraktionierung.....	48
AP3: Untersuchungen zu Alterung, Ad- und Desorption organischer Spurenstoffe auf Referenzpartikeln	71
AP 4: Untersuchungen zum Eintragspfad Kläranlage und prozesstechnische Bewertung.....	87
Einleitung.....	87
Gesamtziel	88
Aufklärung von Rückhalte Mechanismen für Mikroplastik in Kläranlagen im Labormaßstab (LfU)	89
Emission von realen Kläranlagen und Prozessbewertung für tertiäre Filtrationsstufen	101
Prozesstechnische Einordnung.....	111
AP5: Auswirkung auf aquatische Umwelt und menschliche Gesundheit	114
Auswirkungen auf aquatische mikrobielle Lebensgemeinschaften.....	114
Auswirkungen auf aquatische Invertebraten und organismische Effekte.....	139
Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit - In vitro Modelle und molekulare Effektermittlung	157

SubµTrack - Tracking von (Sub)Mikroplastik unterschiedlicher Identität

AP 6: Soziale, politische und rechtliche Dimensionen	167
Soziale und politische Dimensionen	167
Analyse und Bewertung der rechtlichen Rahmenbedingungen	177
Normungsaspekte im Mikro- und Nanoplastikbereich	200
Kernaussagen und Botschaften.....	203
Umfassende Analytik von Submikroplastik(partikeln)	204
Sorption von Spurenstoffen an Mikroplastik.....	206
Prozesstechnische Bewertung für Kläranlagen.....	207
Toxikologische Bewertung	208
Aquatische Umwelt.....	208
Menschliche Gesundheit	208
Soziale & Politische Dimensionen – Politische Botschaften.....	209
Rechtsetzung und Normungsvorhaben.....	210
Literatur	211
Anhang	229
Übersicht zu wissenschaftlichen Veröffentlichungen aus dem Verbundvorhaben SubµTrack.....	230

Einführung



**Tracking von (Sub)Mikroplastik unterschiedlicher Identität
– Innovative Analysetools für die toxikologische und
prozesstechnische Bewertung**

Plastik ist ein wesentlicher Bestandteil des modernen Alltags. Im Jahr 2016 wurden weltweit etwa 335 Millionen Tonnen Plastik produziert [1] und die jährliche Produktion wurde bis ins Jahr 2019 auf 368 Millionen Tonnen Plastik gesteigert [2]. Die zunehmende Plastikverschmutzung und auch der vermehrte Nachweis von Mikroplastik in der Umwelt haben ein starkes Interesse der Öffentlichkeit, Politik und Forschung geweckt. Gerade für Mikroplastik, also Plastikpartikel mit einer maximalen Größe bis 5 mm, bestand zu Projektbeginn noch eine geringe Vergleichbarkeit für Nachweismethoden, Kenntnisse zum Vorkommen in der Umwelt, sowie deren Bedeutung für Mensch und Umwelt.

Auch die kleineren Partikel, insbesondere in den Bereich unter 100 μm , wurden in den Jahren 2015/ 2016 initial diskutiert [3,4]. Ein großes Problem war hier die damals vorhandene große Streubreite an Definitionen für den Mikro- bzw. Nanoplastikbereich. Meist wurden Partikel bis zu 1 μm als Mikroplastik bezeichnet [3]. Nanoplastik war kaum definiert, die Angaben schwankten zwischen $< 1 \mu\text{m}$ und 1 - 100 nm [5].

Gerade die kleineren Mikroplastikpartikel, bis hin in den Nanometerbereich, konnten mit den vorhandenen Methoden nicht zuverlässig analysiert werden [6,7]. In Literatur wurde daher übereinstimmend die Notwendigkeit der Entwicklung von Methoden betont, die auch Plastikpartikel im Nano-, unteren und mittleren Mikrobereich analysieren können [6–8]. Vor dem Hintergrund, dass derartige Partikel teilweise in Zellen, u.a. ins Darmepithel eindringen können, sollte untersucht werden, ob diese kleineren Mikroplastikpartikel unbekannte physiologische oder toxische Auswirkungen haben. Aufgrund ihrer deutlich größeren Oberfläche dürfte darüber hinaus die Adsorption organischer Spurenstoffe ein Parameter sein, der noch mehr als bei Mikroplastik bei potentieller Desorption zu physiologischen Veränderungen im Zielorganismus führt. Zu den Auswirkungen von Mikroplastik auf aquatische Organismen gab es v.a. im marinen Bereich Untersuchungen. Dahingegen bestanden hinsichtlich der Auswirkungen auf Süßwasserorganismen und auch auf den Menschen größere Wissenslücken. Auch gab es wenige Erkenntnisse zu möglichen Effekten von (Sub)Mikroplastik in seiner Funktion als Aufwuchsfläche von Mikroorganismen, als Quelle von Nährstoffen und Toxinen und auf mikrobielle Prozesse und damit den Einfluss auf biogeochemische Stoffkreisläufe in aquatischen Ökosystemen [9]. Einige Untersuchungen haben sich bislang mit der Aufnahme der Partikel in (humane) Zellen und auch mit deren zellschädigender Wirkung beschäftigt. Diese Untersuchungen

haben gezeigt, dass diese Partikel in Zellen und Geweben akkumuliert werden [10,11] und demnach erhebliches cytotoxisches Potential besitzen, sowie die Expression proinflammatorischer Gene und das Immunsystem beeinflussen [12,13] und die Apoptose induzieren [12]. Diese Ergebnisse deuten auf erhebliche physiologische sowie immunstimulierende Wirkungen der Submikropartikel hin, für deren Bewertung die Grundlagen bisher nicht ausreichend sind.

Die Grundidee des Projektes war es deswegen, diesen bislang kaum definierten Größenübergangsbereich **zwischen 50 nm und 100 µm**, im Folgenden als **Submikroplastik** bezeichnet, gezielt zu untersuchen. Vor allem für Partikel im Nano- und den unteren bzw. mittleren Mikrometerbereich (Submikropartikel) fehlt(e) es zu Projektbeginn an standardisierten und etablierten Nachweisverfahren. Dabei müssen alle Elemente der Analytischen Verfahren für Mikroplastik von der Probenahme, Trennung/Aufbereitung, (Größencharakterisierung), bis hin zur Detektion (Identifizierung und Quantifizierung) berücksichtigt werden.

Nachdem Plastikpartikel in der Umwelt, vor allem durch eine starke mediale Präsenz, eine relativ neue, gesellschaftliche Herausforderung darstellten, war bis dato auch wenig über die sozialen, politischen und rechtlichen Dimensionen des Problems bekannt. Deshalb war es notwendig diese Dimensionen durch einen interdisziplinären Ansatz parallel zur naturwissenschaftlichen Problembestimmung zu erforschen und damit im Sinne eines „Responsible Research and Innovation“ (RRI) Ansatzes gesellschaftliche Aspekte nicht nachgelagert zu betrachten, sondern in den Prozess der Problembestimmung selbst einzubringen.

Das Verbundprojekt „*SubµTrack* - Tracking von (Sub)Mikroplastik unterschiedlicher Identität – Innovative Analysetools für die toxikologische und prozesstechnische Bewertung“ war eines von insgesamt 20 Verbundprojekten im Forschungsschwerpunkt *Plastik in der Umwelt*, welche durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert und das Begleitvorhaben PlastikNet koordiniert wurden.

Dabei nahmen sich die Projektpartner des *Sub μ Track*-Verbundprojektes der besonderen Aufgabe an, insbesondere **für Submikroplastik folgende Forschungsschwerpunkte** zu bearbeiten:

- 1) Erweiterung des bisher verfügbaren Detektionsbereichs und Entwicklung neuer Verfahren zur Analytik von Submikroplastik(-partikeln), inklusive Probennahme- und Aufbereitungsstrategien.
- 2) Bestimmung von Ad- und Desorptionsprozessen für organische Spurenstoffe an Submikroplastik.
- 3) Erprobung der neuen Analytischen Verfahren an (Labor-)Kläranlagen und Umweltproben, sowie eine erste prozesstechnische Bewertung für den Eintrag von Submikroplastik über Kläranlagen in die aquatische Umwelt.
- 4) ökotoxikologische Bewertung für aquatische Mikroorganismen und Invertebraten, sowie der menschlichen Gesundheit.
- 5) Untersuchung der Problemwahrnehmungen und Bewältigungsstrategien in Bezug auf Submikropartikel in der Umwelt in Gesellschaft und Politik.

Projektziele

Das Verbundprojekt SubµTrack hatte die primären Aufgabenstellungen neue Nachweisverfahren für Submikroplastik zu entwickeln, sowie erste Erkenntnisse über deren Vorkommen und Effekte in der Umwelt und auf die menschliche Gesundheit hervorzubringen. Darüber hinaus sollten die darauf bezogenen sozialen und politischen Dimensionen untersucht werden, als auch die Möglichkeiten der Rechtssetzung identifiziert werden.

Daraus ergaben sich insgesamt 6 primäre Ziele, die in diesem Verbundvorhaben erreicht werden sollten:

1. Die Entwicklung und Etablierung geeigneter Methoden für die Analyse von Submikro-Plastikpartikeln (50 nm – 100 µm)
2. Die Analyse der Ad- und Desorption organischer Spurenstoffe auf Submikropartikeln
3. Eine prozesstechnische Bewertung von Submikropartikel in Kläranlagen und Umweltproben
4. Eine Bewertung der Auswirkungen von Submikropartikeln auf Mikroorganismen (*in vivo*), die aquatische Umwelt (*in vivo*) und auf die menschliche Gesundheit (*in vitro*)
5. Die Analyse von gesellschaftlichen und politischen Problemwahrnehmungen und Handlungsstrategien mit besonderem Augenmerk auf Submikroplastik, Anregung von gesellschaftlichen Dialogprozessen (Public Engagement)
6. Die Identifizierung von Möglichkeiten zur Implementierung der Forschungsergebnisse durch die Rechtssetzung

Projektstruktur

Um diese Ziele zu erreichen wurden insgesamt 6 Arbeitspakete gebildet, in denen die Arbeiten thematisch gebündelt wurden. Die Arbeitspakete und Teil-Arbeitspakete wurden wiederum meist von mehreren Projektpartnern in enger Kooperation bearbeitet, sodass ein starker inter- bis transdisziplinärer Ansatz umgesetzt werden konnte. Die Arbeitspakete ergaben sich aus den gesetzten Projektzielen:

Da zu Projektbeginn nur eine geringe Verfügbarkeit geeigneter Referenzpartikel für die Untersuchungen gegeben war, mussten im Arbeitspaket 1 (AP 1) zuerst ein Bedarf an benötigten Referenzpartikeln geklärt und entsprechend bereitgestellt werden. Der elementare Aspekt des Projektes, die Entwicklung und Etablierung geeigneter Methoden für die Analyse von Submikro-Plastikpartikeln (50 nm – 100 µm), wurde in AP 2 gebündelt, wobei die Arbeiten in kleineren Arbeitspaketen aufgeteilt und separat bearbeitet wurden. AP 3 beschäftigte sich mit Sorptionsprozessen von organischen Spurenstoffen an Mikroplastik und der Entwicklung einer neuen Analytischen Methode zur Bestimmung auf Partikeln sorbierter Spurenstoffe. Die prozesstechnische Bewertung von Submikroplastik in Kläranlagen wurde in AP 4, unter Einbindung der erweiterten analytischen Methoden, bearbeitet. Die Bewertung der Auswirkungen auf Mikroorganismen, die aquatische Umwelt und die menschliche Gesundheit wurden jeweils in Unterkapiteln des AP 5 bearbeitet. In AP 6 wurden die sozialen, politischen und rechtlichen Dimensionen zu dem Thema Plastik in der Umwelt betrachtet.

Eine Übersicht zu den Arbeitspaketen wie im Projektantrag geplant, inklusive der Unterkapitel und Bearbeiter, ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Projektleitung und -koordination wurde durch den Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, TU München, übernommen.

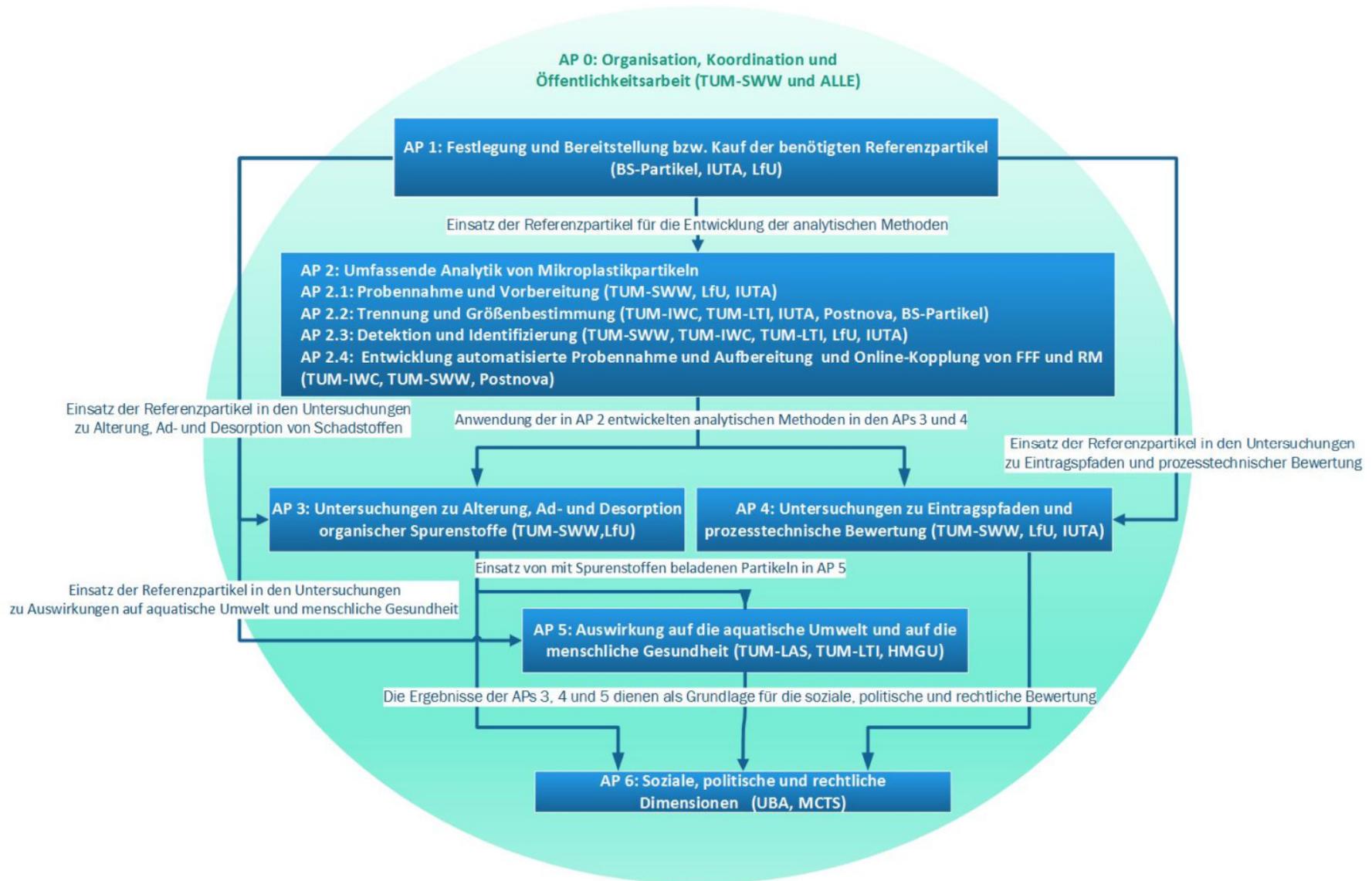


Abbildung 1: Übersicht über die Arbeitspakete im Verbundvorhaben SubµTrack.

Arbeitspakete



**Tracking von (Sub)Mikroplastik unterschiedlicher Identität
– Innovative Analysetools für die toxikologische und
prozess-technische Bewertung**

AP1: Auswahl und Herstellung von Referenzpartikeln

Leitung: IUTA

Partner: BS-Partikel, IWC, LfU

Einleitung

Zu Beginn des Projektes bestand die allgemeine Problematik von divergierenden Bedürfnissen der beiden Themengebiete Partikelanalytik und Toxikologie. Diese Diskrepanz führte dazu, dass sich die untersuchten Partikelsysteme vielfach unterscheiden, was eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus analytischen und (öko-)toxikologischen Untersuchungen schwierig macht. Deshalb sollte ein Setup an Partikelstandardsystemen entwickelt werden, welches den einzelnen, darauffolgenden Arbeitspaketen individuell angepasstes Material liefert und dabei durch Querkorrelation die Vergleichbarkeit der Ergebnisse im Gesamtkontext sicherstellt. Die zu beachtenden Teilaspekte waren Polymerauswahl, die Methoden zur Darstellung der jeweiligen Partikelgrößenklassen, die kolloidale Stabilisierung und die Fluoreszenzmarkierung des entsprechenden Materials.

Ziel

Für die weiteren Aspekte des Projektes sollten einheitliche und geeignete Submikroplastikpartikel zur Verfügung gestellt werden. Die Auswahl der Polymerspezies richtete sich dabei nach den Bedürfnissen der Projektpartner. Polystyrol (PS) wurde aufgrund der bestmöglichen technischen Flexibilität und Polyethylen, PE aufgrund der besonders großen Relevanz in Bezug auf Realproben ausgewählt. Für die Zielsetzung einer Herstellung der verschiedenen Größenklassen $< 100 \mu\text{m}$ können die nachfolgend beschriebenen zwei Ansätze angewendet werden.

Methodik und Durchführung

Bei der Bottom-up-Methode werden je nach Zielgröße Partikel durch ein- oder mehrstufige nasschemische Reaktion synthetisiert [14,15]. Dabei wird gezielt ein stufenweiser Aufbau der Molekülschichten realisiert [16]. Bei der Synthese wachsen die Zielpartikel heran und durch gezielte Reaktionsführung oder Abbruch der Reaktion kann die Zielgröße der Partikel eingestellt werden.

Bei der Top-down-Methode werden kleinere Partikel aus großen Ausgangspartikeln hergestellt. Zumeist werden die Partikel durch Vermahlung hergestellt. Dadurch werden

nicht-sphärische Partikel in verschiedenen Größen erzeugt. Durch anschließende Siebung können verschiedene Größenklassen fraktioniert werden.

Für die Herstellung von PE-Partikeln wurde die Top-down-Methode ausgewählt, da Bottom-up aufgrund des unkontrollierten Polymerisationsprozesses hier nicht möglich ist. Zunächst wurde versucht aus Polyethylen-Chips PE-Partikel mit einem D_{90} -Wert kleiner als 20 µm herzustellen. Hierzu kamen folgende Mühlen zum Einsatz (s. Abbildung 2 und Abbildung 3):

- Schneidmühle SM2000, Fa. RETSCH
- Ultrazentrifugalmühle PULVERISETTE 14, Fa. FRITSCH
- Gegenläufige Stiftmühle, GSM250, Fa. GOTIC

Ergebnisse

Da es technisch schwierig ist, PE direkt auf die Zielkorngröße zu zerkleinern, erfolgte die Vermahlung im Labor stufenweise: 1.000 µm → 500 µm → 100 µm → 20 µm. Um die flexiblen PE-Chips „vermahlbar“ zu machen, erfolgte eine Kalt-(Kryogen) Vermahlung, bei der das PE durch flüssigen Stickstoff (LN₂) bei -196 °C versprödet wurde. Durch die Kryovermahlung konnten **keine** PE-Partikel hergestellt werden, da trotz Kühlung zu hohe Temperaturen erzeugt wurden. Durch die niedrige Glasübergangstemperatur des Materials sind die Partikel miteinander verschmolzen, sodass keine Partikel, sondern Fäden erzeugt wurden.

Um die für das Arbeitspaket zugewiesene Zeit und Mittel effizient zu nutzen wurden PE-Partikel von Cospheric LLC (Santa Barbara CA, U.S.A.) mit einer angegebenen Größenverteilung von 200 nm- 9.900 nm gekauft. Diese Partikel wurden auf Basis einer Polymerreaktion hergestellt, weitere Informationen durch den Hersteller sind nicht verfügbar.

Für die Methodenentwicklung sowie die Effektstudien, welche im Kontext des SubµTrack-Projekts durchgeführt wurden, wurden den Projektpartnern PE- und PS-Referenzpartikel zur Verfügung gestellt, welche für die spezifischen Untersuchungen geeignet sind. Die PS-Partikel wurden nach der Top-down-Methode durch BS-Partikel hergestellt.

Normalerweise werden PS-Partikel in wässrigen Suspensionen durch Dispergierungshilfsmittel wie Tenside stabilisiert und zur Haltbarkeitsverlängerung mit

Bioziden versetzt. Um mögliche toxische Effekte durch Stabilisatoren in dem Medium auszuschließen, wurden die Partikel für das Projekt den Partnern in einer Tensid- und biozidfreien ethanolischen Lösung zur Verfügung gestellt. Sphärische Polystyrol-Partikel wurden in den folgenden nominellen Größen hergestellt:

80 nm, 107 nm, 504 nm, 1,4 µm, 9,6 µm und 41 µm.

Die Angabe der nominellen Partikelgrößen erfolgt basierend auf der Analytik durch BS-Partikel mittels DCS (Differential Centrifugal Sedimentation) und SPOS (Single-Particle Optical Sizing). Eine Übersicht der im Projekt zur Verfügung stehenden Polymere ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung der zur Verfügung stehenden Submikron Polymermaterialien. Die Größenangaben der Polymere wurden vom Hersteller mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmt. Angegeben ist der D50 Wert.

Polymerart	D₅₀-Wert	Hersteller	Medium
PS	78 nm	BS-Partikel	Suspension
PS	108 nm	BS-Partikel	Suspension
PS	504 nm	BS-Partikel	Suspension
PS	1,8 µm	BS-Partikel	Suspension
PS	9,6 µm	BS-Partikel	Suspension
PS	43 µm	BS-Partikel	Suspension
PE	735 nm	Cospheric LLC	Pulver

Weiterhin wurden aus kommerziellen Quellen diverse Partikelproben aus unterschiedlichen Polymeren (PE, PS, PMMA, PVC) mit nominell etwa 40 µm Partikeldurchmesser an die Projektpartner weitergeleitet.

Als Primärmethode zur Untersuchung von Partikelgröße und -form ist die Rasterelektronenmikroskopie (REM) anerkannt und etabliert. Zur Durchführung der REM-Analytik wurde eine geeignete Probenvorbereitungsmethode erarbeitet. Essentiell ist hier die elektrische Leitfähigkeit des Trägermaterials um Aufladungseffekte, welche die REM-Bildgebung beeinträchtigen, zu vermeiden, sowie weiterhin eine hinreichend glatte Oberfläche zu bieten, so dass insbesondere die kleinsten Partikel gut erkennbar sind. Hier wurde herausgearbeitet, dass sowohl Silizium-Wafer und Aluminium-bedampfte Objektträger sehr gut für diesen Zweck geeignet sind.

Mit den erzeugten REM-Bildern konnte die Form, Oberflächenbeschaffenheit und Größenverteilung der PS-Referenzpartikel („107 nm“; „504 nm“; „1,4 µm“; „9,6 µm“) validiert werden. Die Partikel sind kugelförmig und besitzen eine glatte Oberfläche, wie exemplarisch in Abbildung 2a zu sehen ist. Zusätzlich wurde für ausgewählte Partikel ($n = 30 - 79$) die Größe in zwei Achsen bestimmt, um eine Größenverteilung und eine Aussage über die Form zu generieren. Dazu wurden diese separiert fokussiert, um eine höhere Auflösung und damit höhere Genauigkeit der Größenangabe zu gewährleisten (vgl. Abbildung 2a).

Der Vergleich des Durchmessers in der x-Achse und der y-Achse zeigt, dass die Werte um weniger als 2,4% voneinander abweichen, was die Kugelform bestätigt. Die Größenbestimmung deutet auf eine monodisperse Verteilung der Partikel hin (s. Abbildung 2b).

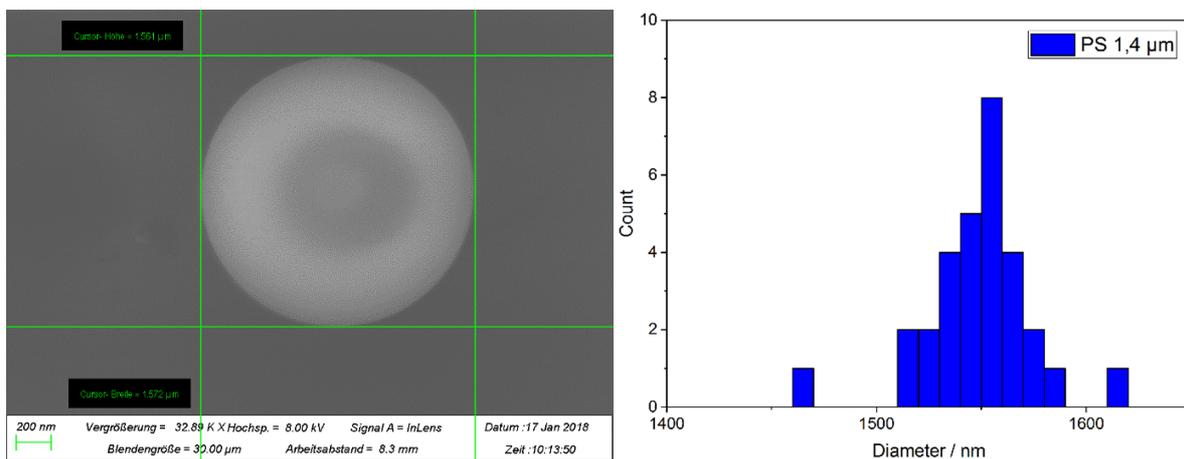


Abbildung 2: a) REM-Bild eines „1,4 µm“-PS-Referenzpartikels mit Größenbestimmung in zwei Achsen (links) und b) Histogramm ($n = 30$) der Größeninformation der „1,4 µm“-Referenzpartikel (rechts).

Um die Größe der Polymerpartikel in Suspension zu bestimmen, wurden die Partikel nach einer harmonisierten Standardarbeitsanweisung dispergiert. Die in Suspension befindlichen Polymere wurden vor dem Entnehmen für 1 min im Ultraschallbad dispergiert. Anschließend wurden 1 mL entnommen und in 10 mL Ethanol überführt um eine Ausgangskonzentration von 10 g/L zu erhalten. Die Suspension wurden dann 15 min. lang beim geringsten Energieeintrag von 10% und bei 2 Zyklen mittels eines Ultraschall-Homogenisators (Bandelin, Berlin, Deutschland) dispergiert. Die Suspensionen wurden mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Laserbeugung (LS) vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

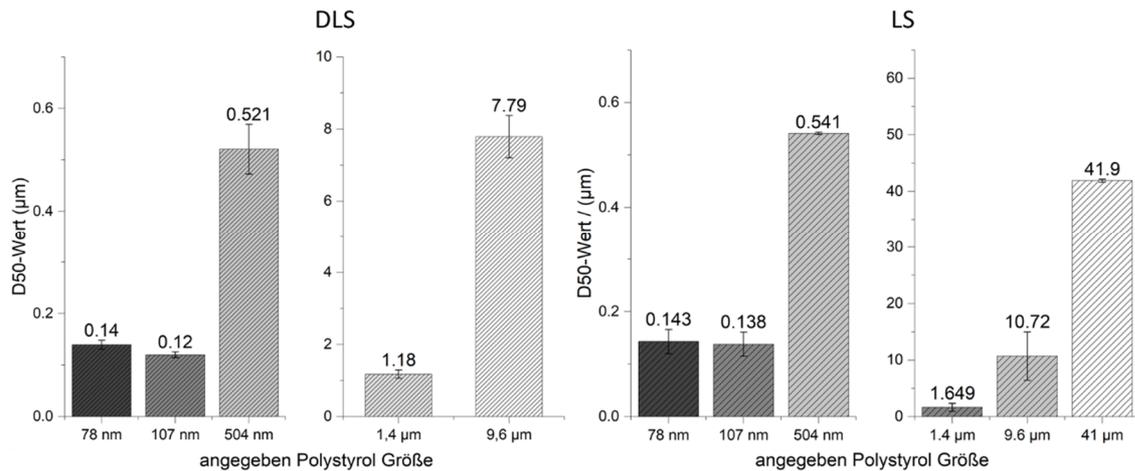


Abbildung 3: Größe der Polystyrolpartikel. Messung mittels Laserbeuger mit eingebautem „Polarization Intensity Differential Scattering“ (PIDS)-System und DLS. Es wurden drei Messungen zur Größenverteilung je Gerät durchgeführt. Die Partikel lagen in Ethanol suspendiert vor.

Die D₅₀-Werte für die Partikel mit 107 nm, 504 nm, 1,4 µm, 9,6 µm und 41 µm sind in dem erwarteten Größenbereich, welche durch REM Analysen bestätigt wurden. Zu beachten ist, dass die Partikel mit einer angegebenen Größe von 41 µm nur mit dem LS analysiert werden konnten, da die DLS nur Partikel bis zu einer Größe von 10 µm messen kann. Bei der Partikelsuspension mit einer Größenangabe von 78 nm wurden doppelt so hohe Werte, sowohl mittels DLS als auch mittels LS detektiert. Es ist denkbar, dass die Abweichung durch Agglomerate zustande kommen, welche durch die Dispergierung nicht aufgebrochen werden konnten.

Im Gegensatz zu den PS-Partikeln, lagen die PE-Partikel als Pulver vor. Daher wurde für die Herstellung einer PE-Partikelsuspension 10 mg des Pulvers eingewogen und in 10 mL Ethanol für 15 Min. lang beim geringsten Energieeintrag von 10% und bei 2 Zyklen mittels eines Ultraschall-Homogenisators mittels eines Ultraschall-Homogenisators (UW 2200, Bandelin, Berlin, Deutschland) dispergiert. Die Größen der Partikel wurden anschließend mittels DLS nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

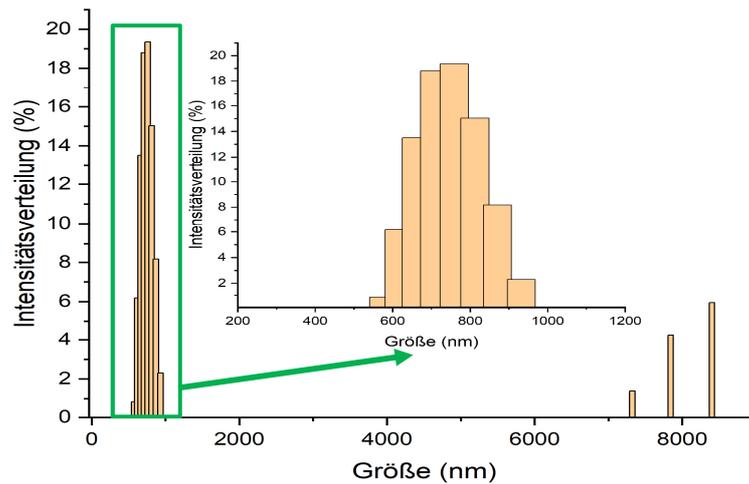


Abbildung 4: Exemplarische Größenverteilung der Cospheric LLC PE-Partikel basierend auf DLS Messungen in 1,5 mL reinst Ethanol.

Die Dreifachbestimmung der Partikel zeigt, dass eine bimodale Verteilung vorliegt. Mit einem Maximum bei $785 \text{ nm} \pm 35 \text{ nm}$ und einem Maximum bei $8.123 \text{ nm} \pm 56 \text{ nm}$. Der durchschnittliche D_{50} -Wert liegt bei $735 \text{ nm} \pm 19 \text{ nm}$, wobei die größeren Partikel bei der Ermittlung nicht einbezogen wurden. Dieser Wert passt sehr gut zu den Herstellerangaben. Ob es sich bei den größeren Partikeln um Verunreinigungen handelt oder um vereinzelte größere Partikel konnte mit der DLS Messung nicht geklärt werden.

Die hausinterne Strategie der BS-Partikel GmbH zur Fluoreszenzmarkierung von Polymerpartikeln ist in ihrer Herangehensweise abhängig von der Partikelzielgröße und der späteren Anwendung der Partikel. Entweder wird der hydrophobe Fluoreszenzfarbstoff während der Partikelherstellung direkt in das Polymer eingebracht („in-situ“). Alternativ kann ein Partikelpulver lösungsmittelinduziert in die Polymermatrix eingebettet werden.

Mit zweiterer Methode wurden PS-Partikel ($40 \mu\text{m}$) hergestellt, die einen grünen Fluoreszenzfarbstoff enthalten. Diese wurden mittels REM und Raman-Mikrospektroskopie (RM) auf Form, Größe und Messbarkeit durch RM hin untersucht. Diese Fragestellung entstammt der Tatsache, dass die Fluoreszenz des zugegebenen grünen Farbstoffs das im Vergleich schwächere Raman-Signal überlagert. Eine Anwendbarkeit konnte für RM-Analysen mit Lasern der Wellenlänge 632 nm und 785 nm bestätigt werden, die Wellenlänge 532 nm kann wegen eines starken Fluoreszenzuntergrundsignals nicht eingesetzt werden.

Diese Partikel wurden für die Untersuchungen in der Laborkläranlage in Wielenbach (LfU) eingesetzt, um die Detektierbarkeit der Partikel zu erhöhen. Es wurde untersucht ob der Fluoreszenzfarbstoff auch bei der Probenvorbereitung für die folgende Analytik stabil bleibt. Dazu wurden die fluoreszenzmarkierten 40 µm-Polystyrolpartikel (s. Abbildung 5) in gereinigtes Abwasser dotiert, filtriert und mittels oxidativem Aufschluss (Fenton-Reaktion) behandelt. Abschließend erfolgte die Überführung auf den Analysenfilter nach max. 15 min im Ultraschallbad und Spülen mit 70%-igem Isopropanol. Diese Behandlungsschritte wirkten sich nicht negativ auf die Partikelform oder die Fluoreszenzintensität aus, sodass die einfache Detektierbarkeit mittels Fluoreszenzmikroskopie erhalten blieb.

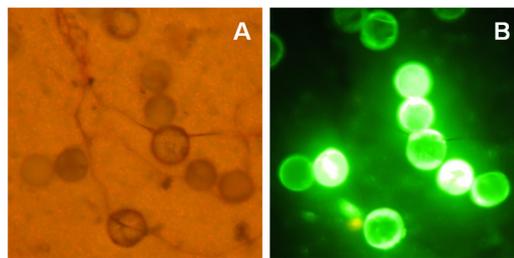


Abbildung 5: Fluoreszierende PS-Partikel im Hellfeld (A) und bei Anregung mit 365 nm (B)

Mit dieser Methode wurde auch Partikelpulver aus PMMA mit nominell 50 µm Partikeldurchmesser hergestellt.

Unter Anwendung der „in-situ“-Methoden wurden diverse fluoreszierende Partikelchargen aus Polystyrol nach Wunsch der Projektpartner synthetisiert und zur weiteren Verwendung verteilt. Diese waren:

- Blau fluoreszierend: 1 µm, 500 nm
- Grün fluoreszierend: 10 µm, 1µm, 500 nm
- Rot fluoreszierend: 1 µm, 500 nm, 150 nm

Final wurden nasschemisch PS-Partikel hergestellt, die eine unregelmäßige Form aufweisen und somit fragmentiertem Plastik gleichen, wie es in der Umwelt zu erwarten ist. Auch hier wurde eine REM-Bildgebung durchgeführt und die Oberfläche der Partikel charakterisiert (s. Abbildung 6). Diese Partikel wurden primär für Untersuchungen in AP 5 verwendet, da diese Partikel Mikroplastik in der Umwelt am ehesten Nachstellen.



Abbildung 6: REM Bildgebung der unregelmäßigen PS-Partikel.

Schließlich wurde in Kooperation mit dem von der Bayerischen Forschungstiftung geförderten Projekt „MiPAq“ an einer Studie zur Entwicklung einer Methode für die Herstellung von umweltähnlichen, fragmentierten Mikro-, Submikro- und Nanoplastik Partikeln, die sich insbesondere durch ihre gute Suspendierbarkeit auszeichnen, mitgearbeitet. Hierfür wurde eine REM-Charakterisierung der erzeugten Partikel durchgeführt, die insbesondere auf die Morphologie und Größe von Partikeln fokussiert war. Die Methode aus dieser Studie wurde den SubµTrack-Projektpartnern zur Verfügung gestellt und in einem internationalen Journal publiziert (<https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00169>, [17]).

Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass für die Herstellung von Polymerpartikeln im Submikrobereich (100 µm bis 50 nm) die Bottom-up-Methode zur Herstellung ein geeignetes Verfahren ist.

Außerdem konnte ein geeigneter Färbeprozess mittels eines Fluoreszenzfarbstoff entwickelt werden, welcher auch oxidativen Aufbereitungsprozessen widersteht und somit geeignet ist um für eine Prozessvalidierung, z.B. in Kläranlagen, eingesetzt zu werden.

AP2: Umfassende Analytik von Submikroplastik(partikeln)

Leitung: TUM-IWC

Partner: Postnova, TUM-SWW, LfU, IUTA, BS-Partikel, TUM-LTI

Die Analytik von Mikroplastik kann in Probenahme, Trennung/Aufbereitung (Größencharakterisierung), Detektion bzw. Identifizierung und Quantifizierung unterteilt werden. Die in diesen Bereichen bis Anfang des SubµTrack-Projektes eingesetzten Methoden sind v.a. für Partikel im Bereich 1 µm bis 5 mm ausgelegt. Im vorrhergehenden BMBF-Verbundprojekt „MiWa“ wurden unterschiedliche Methoden (thermoanalytische und spektroskopische) für die Charakterisierung solcher Partikel eingesetzt und bewertet. Unter anderem wurde die Anwendbarkeit von Raman-Mikrospektroskopie (RM) für die Analytik der unterschiedlichen Plastiksarten und Partikelgrößen (für den Bereich von 1 µm bis 5 mm) in Sediment- und Wasserproben adressiert. Es wurde jedoch damals festgestellt, dass durch Fragmentierung von Mikroplastik noch kleinere Partikel bis hin in den Nanometerbereich entstehen, die aber mit den damals etablierten Methoden nicht zuverlässig analysiert werden konnten. Deswegen hat sich SubµTrack auf die Entwicklung, Optimierung und Anwendung von Methoden fokussiert, die auch Plastikpartikel im Nano-, sowie unteren und mittleren Mikrobereich analysieren können. Dies beinhaltete auch die Erweiterung und Anwendung der Polymer-massenbasierten thermoanalytischen Methoden auf den unteren Mikrobereich durch geeignete Aufkonzentrierungsmethoden.

Ziel war es somit, die Detektionsgrenzen bekannter Methoden für Submikro- und Nanoplastikpartikel zu erweitern und neue Methoden für die unteren Grenzen zu entwickeln.

Eine Übersicht der in diesem Projekt erreichten Erweiterungen der analytischen Grenzen ist in Abbildung 7 dargestellt und wird in den folgenden Kapiteln ausführlich dargestellt.

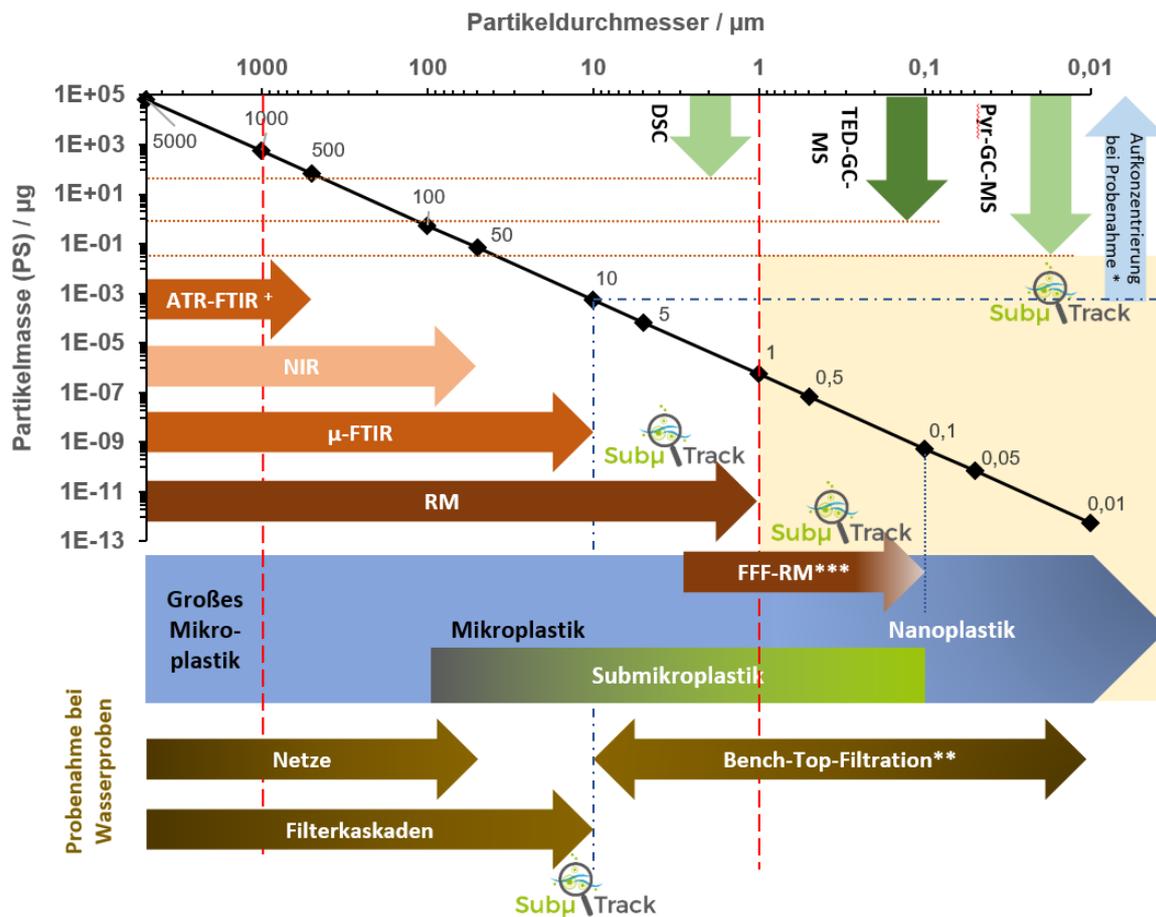


Abbildung 7: Übersicht der Analysenbereiche der verbreitetsten Methoden für die MP-Analytik für Wasserproben aufgetragen über den Durchmesser in μm und die Partikelmasse in μg , berechnet für sphärische Polystyrol-Partikel mit einer Dichte von $1,05 \text{ g cm}^{-3}$. Rauten markieren dabei Partikel am angegebenen Partikeldurchmesser in μm . Rote gestrichelte Linien grenzen die definierten Größenbereiche ein. Die gelbe Fläche stellt den noch nicht analytisch abbildbaren Größenbereich dar. TED-GC-MS: Thermo-Extraktion-Desorption-Gaschromatographie-Massenspektrometrie; Pyr-GC-MS: Pyrolyse-GC-MS; DSC: Dynamische Differenzialkalorimetrie; NIR: Nahinfrarotspektroskopie; ATR-FTIR: Attenuated Total Reflection-Fourier Transformation-IR, ⁺ für Einzelpartikelmessung; μ -FTIR: mikroFTIR; RM: Raman-Mikrospektroskopie; FFF-RM: Feldflussfraktionierung-RM-Kopplung; * Für thermoanalytische Verfahren sind die Nachweisgrenzen für Massen bei einzelner Partikelgröße für Polystyrol angedeutet (Orange gepunktet), durch viele kleinere Partikel in der Probe oder eine zusätzliche Aufkonzentrierung kann das Überschreiten der Nachweisgrenze erreicht werden; ** Filtration großer Volumina ($> \sim \text{L}$) bei Filtern $< 1 \mu\text{m}$ für Umweltproben meist nicht möglich; *** Proof-of-Concept.

Anwendung und Erweiterung vorhandener Analysetechniken für die Detektion, Identifizierung und Charakterisierung von Submikroplastik

Partner: TUM-SWW, TUM-IWC, TUM-LTI, LfU, IUTA

Neben der Weiterentwicklung der analytischen Detektionsmethoden ist für eine zuverlässige und richtige Bestimmung von (Sub-) Mikroplastik in Umweltproben die Entwicklung eines gesamten analytischen Prozesses notwendig. Entsprechend wurden alle Bestandteile des analytischen Prozesses, von der Probenahme über die Probenaufbereitung und die Detektionsverfahren, bis hin zu den Auswertestrategien betrachtet und für die Bestimmung von Submikroplastik in Wasserproben untersucht und optimiert.

Probenahmestrategie für das große Mikroplastik-Spektrum: Die Kaskadenfiltration

IUTA

Einleitung

Im Rahmen des Projektes sollte ebenfalls eine Anwendung der Analysemethoden auf reale (Ab-)Wasserproben umgesetzt und etabliert werden. Wie bei allen analytischen Fragestellungen ist dazu eine verlässliche, reproduzierbare und repräsentative Probenahme ein kritischer Faktor. Zu Beginn des Projektes gab es noch kein Probenahmesystem für Mikroplastik, welches die Beprobung hoher Volumina erlaubte. Dieses ist notwendig, um vor allem eine ausreichende Probenmenge für die thermoanalytischen Verfahren zu erhalten. Hierzu wurde eine Filterkaskade als beste Möglichkeit für einen sequentiellen Partikelrückhalt angesehen. Jedoch muss bei einer solchen Anlage die Bildung eines Filterkuchens vermieden werden, um auf den einzelnen Filtern auch die entsprechenden Partikelgrößen selektiv sammeln zu können.

Methodik und Durchführung

Für die Mikroplastikprobenahmen wurde eine plastikfreie Filtrationsanlage am IUTA aufgebaut. Hierbei wurden drei Korbsiebfilter in einer Kaskade, mit den Filtergrößen von 100 µm, 50 µm und 10 µm, angeordnet. Das Material der Korbsiebfilter besteht aus Edelstahl-Geweben, sodass diese mittels Druckluft und Lösungsmitteln gereinigt werden können. Ein Bild der Anlage ist in Abbildung 8 zu sehen. Die Anlage hat eine

minimale Durchflussmenge von $2 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ und erreicht eine maximale Durchflussmenge von $18 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. Mit dieser Filtrationsanlage können im Feld sowohl kleine (10 L) als auch große Volumina (1.000 L-7.000 L) filtriert werden.

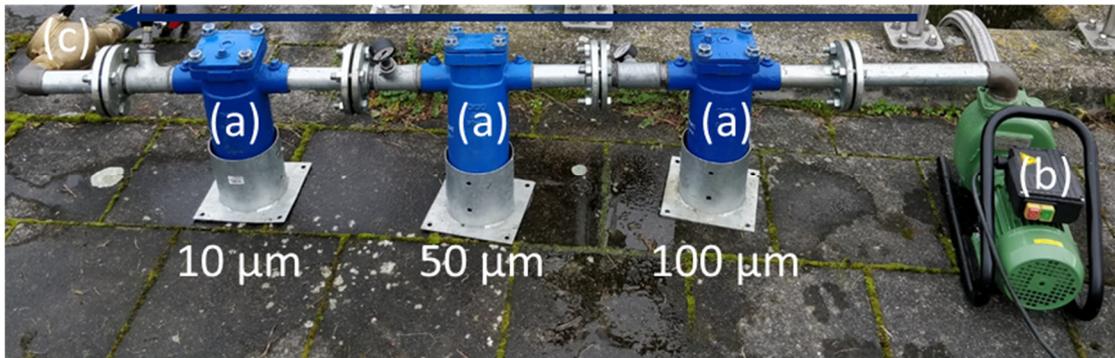


Abbildung 8: Die Mikroplastikfiltrationsanlage mit den Filtergehäusen (a), der Kreiselpumpe (b), und dem Wasserzähler (c) aufgebaut am Sandfilterzulauf der KA Gut-Marienhof.

Vorbereitung der kaskadischen Mikroplastikfiltration

Bei der Vorbereitung der kaskadischen Mikroplastikfiltration werden zunächst die Filterhülsen inklusive Leitungen mit Leitungswasser gespült. Die Korbsiebfiltereinsätze werden mittels einer Bürste aus Edelstahl oder Echthaar, Handspülmittel, Leitungswasser und Druckluft gereinigt und mit Aluminiumfolie bedeckt.

Durchführen der Probenahme

Die Probenahme von Mikroplastik wurde so konzipiert, dass diese im Ablauf oder in anderen Bereichen einer Kläranlage oder eines Industrieunternehmens, sowie aus einem Oberflächengewässer erfolgen kann.

Wichtig ist, dass die Probenahmestelle immer die Entnahme von repräsentativen Proben gewährleisten. Wird in Sonderfällen hiervon abgewichen, so ist ein besonderer Hinweis erforderlich. Zur Bilanzierung einer Eliminationsleistung von Mikroplastik ist die hydraulische Verweilzeit zwischen Zu- und Ablauf zu berücksichtigen.

Technik der Probenahme

Die Probe sollte möglichst unterhalb der Wasseroberfläche entnommen werden, um aufschwimmende Materialien oder Flüssigkeiten nicht mit zu erfassen.

Bei der Probenahme wird zunächst eine Anlage mit einer Pumpe am Probenahmeort aufgebaut, genau wie eine leere Blindwertanlage.

Für das Ansaugen der Pumpe wird zunächst ein Metalleimer mit dem Probenwasser gefüllt und hieraus angesaugt. Im Weiteren wird der Ansaugschlauch nun in die Probenahmestelle heruntergelassen. Die Anlage wird mit ca. 100 L Wasser gespült, bevor die Korbsiebfilter eingesetzt werden. Zunächst wird der 100 µm Korbsiebfilter eingesetzt und anschließend mit 10 L Probenwasser gespült. Danach wird der 50 µm Korbsiebfilter eingesetzt und mit 10 L Probenwasser gespült. Danach wird der 10 µm Korbsiebfilter eingesetzt.

Hiernach kann die Probenahme durchgeführt werden. Im Regelfall sind die Drücke an den Korbsiebfiltern bei Start der Filtration zwischen 0,1 und 0,3 bar. Die Filtration wird zunächst gestoppt, wenn am 10 µm Korbsiebfilter ein Druck von 0,8 bar festgestellt wird. Nachdem der Korbsiebfilter ausgebaut, mit Aluminiumfolie bedeckt und das filtrierte Volumen notiert wurde, wird die Filtration fortgesetzt. Nun wird beprobt bis am 50 µm Korbsiebfilter ein Druck von 1,0 bar erreicht wird. Die Filtration wird nun beendet und die Korbsiebfilter (Probenahmeanlage und Blindwertanlage) werden mit Aluminiumfolie bedeckt und für den Transport vorbereitet.

Vor dem Transport der Anlage muss sämtliches Wasser aus der Anlage und Pumpe abgelassen werden.

Feldblindwert und Verfahrensblindwert Probenahme

Zur Bestimmung eines Feldblindwertes wird am Probenahmeort eine Mikroplastik-Kaskadenfiltration aufgebaut und die Korbsiebfilter ohne Betrieb der Anlage eingesetzt und wieder ausgebaut.

Zur Bestimmung eines Verfahrensblindwertes erfolgt an die in Abbildung 8 gezeigte Anlage der Aufbau einer zweiten, sogenannten „Blindwertanlage“. Diese wird nach dem Vorspülen der ersten Anlage angeschlossen und der bereits filtrierte Ablauf wird erneut über die 100 µm, 50 µm und 10 µm Korbsiebfilter filtrierte und die Siebe auf Mikroplastikpartikel untersucht. Die filtrierte Volumina werden ebenfalls notiert.

Übertragung der Proben aus Korbsiebfiltern

Ein Korbsiebfilter wird in ein 800 mL Becherglas gelegt und die Korbsiebfilteroberfläche mit einem Mikrospatel physikalisch gereinigt. Wenn dieser Vorgang die Partikel nicht von der Innenwand entfernt, wird eine Draht- oder Echthaarbürste verwendet. Dabei ist es wichtig mit der Bürste in Richtung zum Boden des Korbsiebfilters zu arbeiten. Danach werden die Partikel mit einem Glastrichter in

eine Steilbrustflasche (500 mL) überführt. Restliche Partikel an der Korbsiebfilterwand und am Glastrichter werden mit einer Tween 80/Wasserlösung (1 g L^{-1}) übertragen. Diese Proben werden bei 50°C abgedampft und dann mittels Ethanol für die weiteren Analysen aufgenommen.

Ergebnisse & Diskussion

Wiederfindungsversuche wurden mit PE-Partikeln mit d_{50} -Werten von $120 \mu\text{m}$, $70 \mu\text{m}$ (beide VELOX GmbH; Hamburg, Deutschland) und $25 \mu\text{m}$ (Celanese Services Germany GmbH; Sulzbach, Deutschland) für die $100 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$ bzw. $10 \mu\text{m}$ Filter durchgeführt. 10 g jeder PE-Partikelgröße wurden in 1 m^3 Leitungswasser in einem IBC-Behälter suspendiert und filtriert. Hiernach wurde der Behälter mit 1 m^3 Leitungswasser gespült und das Spülwasser ebenfalls filtriert. Die Wiederfindung wurde gravimetrisch bestimmt. Die Filter wurden vor und nach der Filtration getrocknet und gewogen. Die Partikel aus den Korbsieb-Filtern wurden in braune 20 mL Schraubdeckelgläser ND20 (IVA Analysentechnik GmbH & Co. K; Meerbusch; Deutschland) überführt und mit einer MC1 RC210S-Waage (Sartorius AG; Göttingen, Deutschland) erneut gewogen. Mit den extrahierten Partikeln wurden Pyr-GC-MS-Analysen durchgeführt. Diese Wiederfindungsversuche wurden dreimal durchgeführt.

Die Wiederfindungsraten von Partikeln ergaben folgende Ergebnisse. Im $100\text{-}\mu\text{m}$ -Filter wurde eine Wiederfindung von $87\% \pm 2\%$ festgestellt. In den $50 \mu\text{m}$ - und $10 \mu\text{m}$ -Filtern konnten Wiederfindungsraten von $85\% \pm 2\%$ bzw. $88\% \pm 2\%$ erreicht werden, was gut mit Ergebnissen aus der Literatur vergleichbar ist [18–20].

Ein anderes kaskadisches Probenahmesystem wurde von Bannick et al. 2019 [20] in Kombination mit der TED-GC-MS vorgestellt. Unterschiede der beiden Probenahmesysteme liegen im Wesentlichen bei den verwendeten Filtersystemen: In beiden Verfahren werden dieselben kaskadischen Trennstufen von $100 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$ und $10 \mu\text{m}$ verwendet. Jedoch werden hier Siebe aus der Siebanalyse zur Partikelretardierung eingesetzt, wodurch das Probenahme-Wasser zunächst auf diese Flachsiebe gespült wird und entsprechend der Lochgröße des Siebes die Partikel zurückgehalten werden. Das Filtrat einer Siebstufe wird dann in Stahlbehältern gesammelt und dann über die nächstkleinere Siebstufe filtriert.

Das im Projekt entwickelte und vorgestellte Probenahme System wurde von Funck et al. 2020 [19] publiziert. Hiermit wurden vergleichbare Wiederfindungsraten zur

Probenahmemethode von Bannick et al. 2019 [20]. Die Erkenntnisse, die mit der Filterkaskade in diesem Projekt gewonnen werden konnten, sind in das BMBF Diskussionspapier zur Analytik von Mikroplastik [21] eingeflossen.

Schlussfolgerung

Die hier beschriebene Filtrationsanlage wurde mit den erreichten Wiederfindungsraten als geeignet für den Feldeinsatz betrachtet und wurde entsprechend für die Probenahmekampagnen zur prozesstechnischen Bewertung an Kläranlagen und an einem Gewässer im Feld eingesetzt. Diese und deren Ergebnisse sind im AP4 dargestellt.

Probenvorbereitung ohne Veränderung der Mikroplastikpartikel via Fenton

TUM-SWW

Einleitung

Die große Herausforderung der Mikroplastikanalytik ist es, die Mikroplastikpartikel von natürlichen Partikeln wie z.B. Sand, pflanzlichen und tierischen Ablagerungen zu unterscheiden [5]. Selbst beim Einsatz von spektralen Identifikationsmethoden, wie der Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) und der Raman-Spektroskopie, kann durch die natürliche Materie verursachte Interferenz der Nachweis von Mikroplastik erschwert sein. Die Wahl der Aufbereitungsmethode ist abhängig von der Zusammensetzung der Probe und der eingesetzten analytischen Methoden. Anorganische Partikel können durch verschiedene salzbasierte Dichtentrennverfahren entfernt werden [22]. Unter Berücksichtigung, dass organische Stoffe eine ähnliche Dichte wie Mikroplastik aufweisen, müssen diese durch chemische Verdauungsverfahren wie Oxidations-, Alkali- und Säurereaktionen entfernt werden [22]. Allerdings können diese Aufbereitungsmethoden unter Umständen auch das untersuchte Mikroplastik unabsichtlich beeinflussen.

Bereits in früheren Studien wurden die Probenaufbereitungsmethoden untersucht [22–29]. Allerdings weisen diese Studien diverse Mängel auf, die in diesem Vorhaben berücksichtigt werden: (1) Einige der Studien verwendeten relativ große Mikroplastikpartikel ($> 500 \mu\text{m}$) [23,24,26,27]. Kleinere Mikroplastikpartikel weisen ein größeres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen auf, was die Reaktivität gegenüber

Reagenzien erhöht. (2) In der Regel wurde bei bisherigen Studien nur eine geringe Anzahl von Partikeln getestet [22–26]. Daraus ergibt sich eine geringe statistische Signifikanz in einigen Studien. (3) Die Studien, die für die Analyse der Partikel FTIR-Spektroskopie einsetzten, haben aufgrund des geringeren Zeit- und Arbeitsaufwandes in der Regel nur den sogenannten ATR-Modus (Attenuated Total Reflection) zur Validierung verwendet. Der ATR Modus funktioniert aber nur für große, saubere, isolierte Partikel und kann somit nur begrenzt für reale Proben eingesetzt werden [22,24,27,29]. Hier werden stattdessen Focal-Plane-Array (FPA)-Detektoren eingesetzt. Die in der aktuellen Arbeit durchgeführten Vorversuche zeigten jedoch, dass die von ATR- und FPA-Detektoren erhaltenen Spektren nicht vollständig vergleichbar sind. Zum Teil weisen mit dem FPA Detektor aufgenommene FPA-Spektren auch bei neuen Polymeren Peaks im Bereich der C=H-Streckschwingungen auf. Diese weisen bei Spektren, die mittels ATR-FTIR Spektroskopie aufgenommenen wurden, auf eine Alterung des Polymers hin. (4) Keine Studien diskutiert, wie man mit den großen Mengen an ausgefälltem Eisen(III) nach Beendigung der Reaktion umgehen soll. Diese Eisen(III)-haltigen Partikel können sich negativ auf die Wiederfindung von Mikroplastik auswirken.

Ziel

Das Ziel dieser Studie war es, die in der Literatur berichteten Probenaufbereitungsmethoden, zu optimieren und validieren, um eine Entfernung der natürlichen organischen Matrixbestandteile zu gewährleisten und gleichzeitig das Mikroplastik selbst nicht zu beeinträchtigen. Daher wurde in diese Studie versucht, diese oben genannten nicht ausreichend untersuchten Punkte abzudecken: (1) Es wurden Partikeln mit einer durchschnittlichen Größe zwischen 80 und 330 μm verwendet. Dabei wurden alle Partikel mit der gleichen Kryo-Mühle hergestellt. (2) Die Anzahl der analysierten Partikel für die Untersuchung der Veränderungen der Größenverteilung variierte zwischen 1×10^5 - 3×10^5 Partikeln pro Probe. Zusätzlich wurden mindestens zehn Partikel pro Probe mit FTIR auf spektrale Veränderungen untersucht. (3) Die mittels FPA-Detektors gemessenen Spektren von zehn Partikeln wurden gemittelt, um die unterschiedlichen Banden und Intensitäten der Spektren, basierend auf Form und Winkel der Partikeloberfläche, zu berücksichtigen. (4) Zur Entfernung der ausgefällten Eisen(III)-Partikel wurde in diesem Vorhaben ein Protokoll, etabliert und optimiert.

Methodik und Durchführung

Die Protokolleauswahl erfolgte nach einer umfassenden Literaturrecherche zu den häufigsten verwendeten Methoden, die keine Schaden am Mikroplastik verursachen (Tabelle 2). Das Fließschema für die drei Protokolle ist in Abbildung 9 dargestellt.

Tabelle 2: Die in dieser Studie untersuchten Aufbereitungsmethoden (Fenton nach Tagg et al. (2016) [22], KOH nach , H₂O₂ nach Dehaut et al. (2016) [23]).

Protokoll	Temperatur	Zeit
Fenton (30% H ₂ O ₂ + 20 g/L FeSO ₄)	Raum-Temp. (Ungekühlt)	10 Min + 10 min Kühlung
KOH (10%)	60 C°	24 Hr
H ₂ O ₂ (30%)	60 C°	24 Hr

Um den Effekt dieser Probenaufbereitungstechniken zu validieren, wurden diese auf sieben der gängigen Polymertypen (PP, PE, PS, PET, PA, PLA, PVC) angewendet. Größenverteilungsanalysen wurden durch Laserbeugung (Mastersizer 2000) mit Doppelbestimmung und einer Kontrolle durchgeführt. FTIR-Messungen wurden in Einfachbestimmung von 10 Partikeln plus Kontroll- und Blind-Proben durchgeführt. TD-Pyr-GC/MS wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Reduzierung der Partikelgrößenverteilung sowie die Veränderung der FTIR-Spektren und Pyrolyseprodukten wurden als Indikatoren für die Beschädigung und den Verlust von Mikroplastik durch die Probenaufbereitungsmethoden verwendet. Zusätzlich wurde die optische Mikroskopie eingesetzt, um oberflächliche Veränderungen auf der Partikeloberfläche zu beobachten.

Zur Bestimmung des Entfernungsgrads der natürlichen organischen Matrix wurde Überschussschlamm verwendet, in welchem der organische Verlust von Schlammproben mittels Gewichtsverlustes nach Reaktion mit den Protokollen berechnet wurde. Diese wurde für jedes Protokoll sowie eine Kontrollgruppe als dreifach Bestimmung durchgeführt.

Zusätzlich wurden die Unterschiede zwischen diversen Fenton-Reaktionen in Studien untersucht und erklärt. Verschiedene Sorten von Wasserstoffperoxid wurden untersucht, um zu erklären ob unterschiedliche Wasserstoffperoxid-Herstellungsstandards eine Rolle in Fenton-Verhalten spielten.

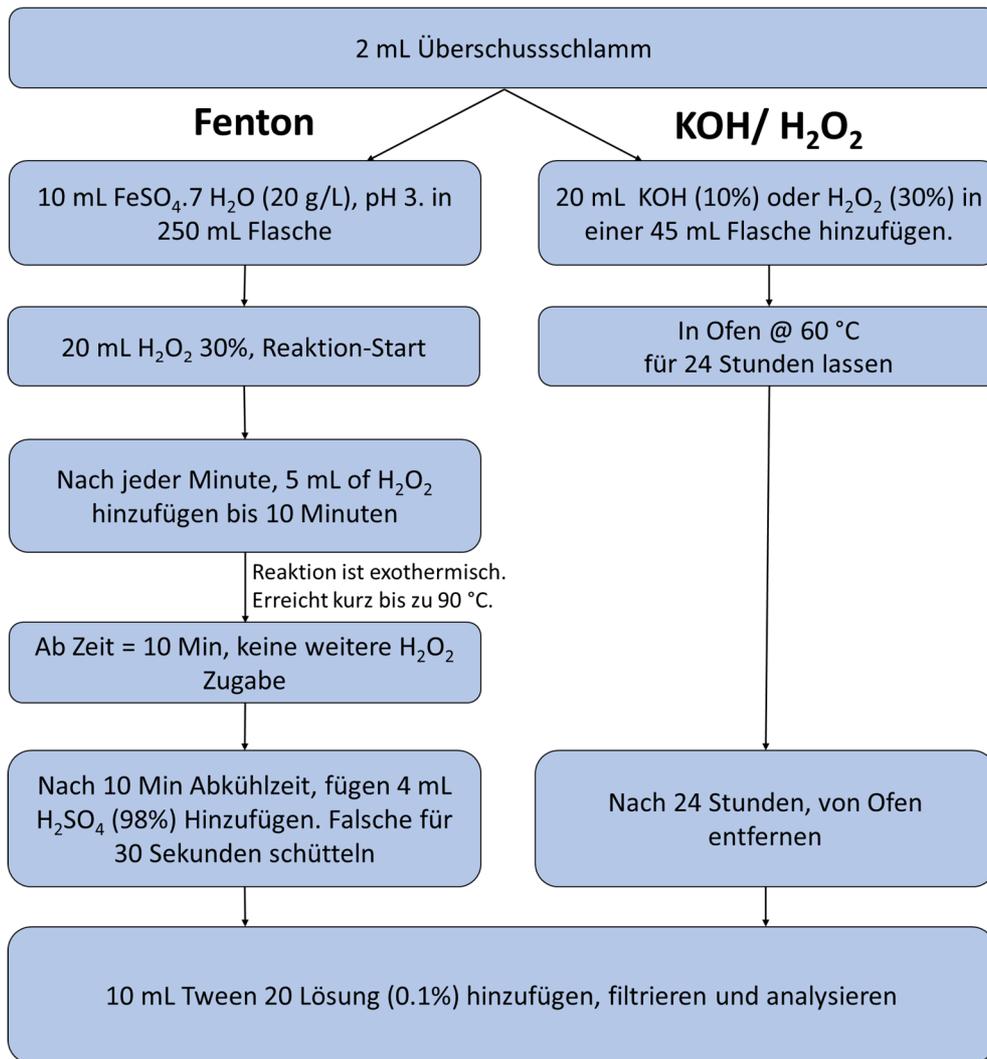


Abbildung 9. Fließschema für die Untersuchte Protokolle. KOH sowie H₂O₂ nutzen das gleiche Verfahren.

Ergebnisse und Diskussion

Die Versuche zeigten, dass das KOH-Protokoll die meisten PET- und PLA-Partikel auflöste (Abbildung 10). Die Aufbereitungsprotokolle mit Wasserstoffperoxid und Fenton-Reagenz zerstörte keines der Polymere weder Größenverteilung noch FTIR-Spektren wurden negativ beeinflusst. Lediglich bei den jeweils kleinsten Partikeln (10% betrachteten Partikel) konnten Veränderungen beobachtet werden. Die Änderungen in Größenverteilung für alle drei Protokolle ist in Abbildung 11 zu sehen. Überraschenderweise zeigten auch die FTIR-Spektren der wenigen, verbliebenen PET- und PLA-Partikel nach der KOH-Behandlung keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die gleichen Beobachtungen ergaben sich bei den mikroskopischen Untersuchungen (Abbildung 10).

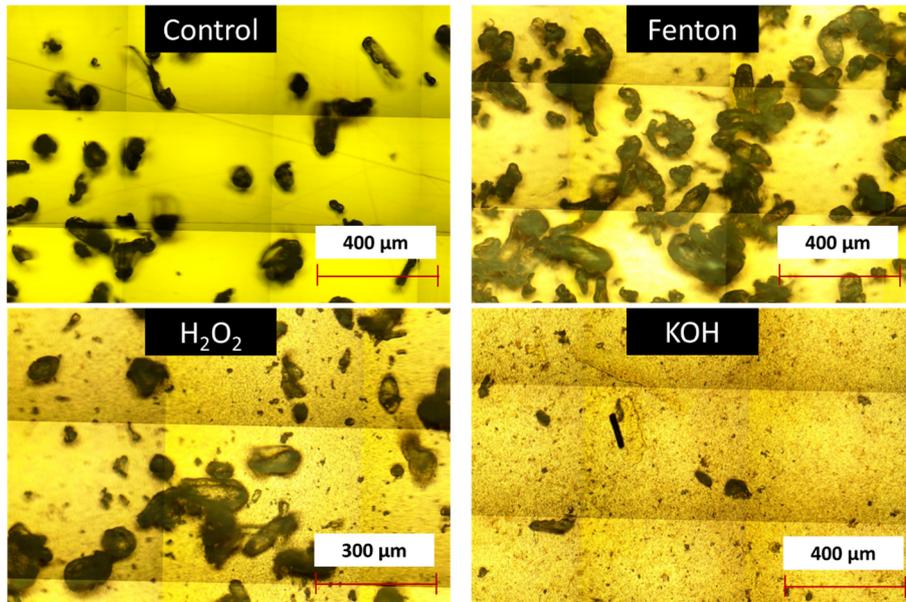


Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahmen von PET Partikel nach Behandlungen.

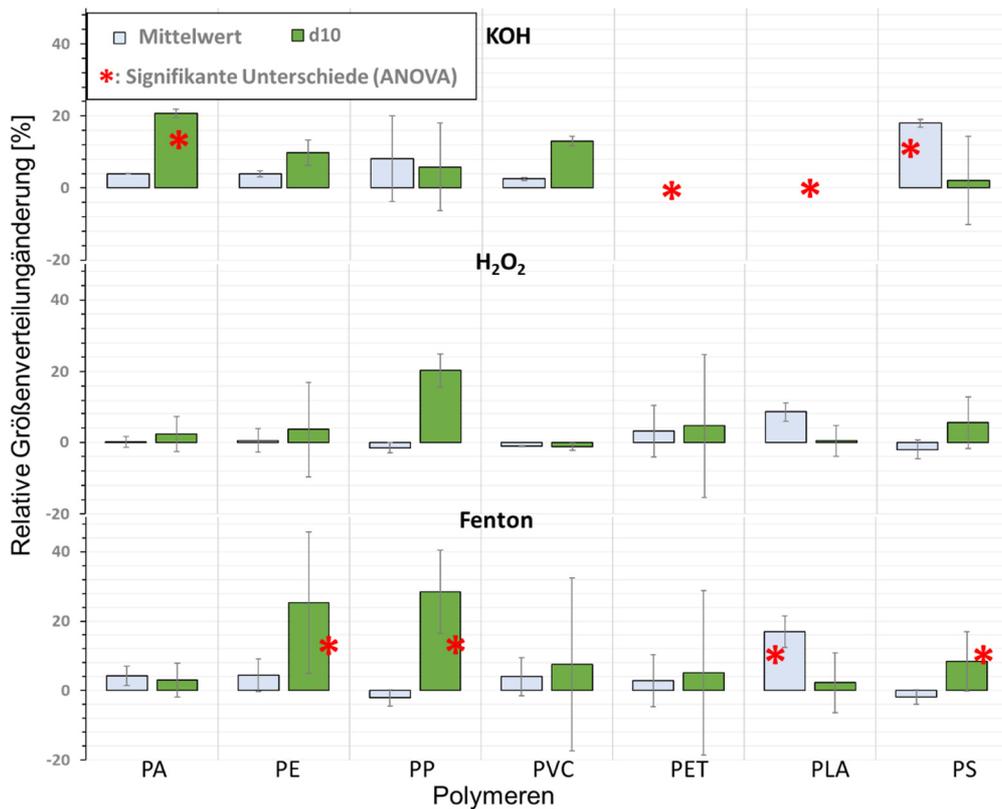


Abbildung 11. Relative Veränderungen in Größenverteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Änderungen wurden durch ANOVA abgestimmt (*). d10 repräsentiert die Gruppe der kleinsten Partikel mit einer Gesamtheit von 10% aller betrachteten Partikel.

Dazu wurden die Partikel mit TD-Pyr-GC/MS untersucht. Bei den Polymeren PA und PS hatte die Behandlung mit Fenton und Wasserstoffperoxid einen Einfluss auf deren thermische Stabilität. Alle Polymere waren jedoch eindeutig identifizierbar. Daher sind

Fenton- und Peroxid Protokolle für eine Mikroplastik-Probenaufbereitung geeignet. In Abbildung 12 ist der Ablauf des Fenton-Protokolls dargestellt.

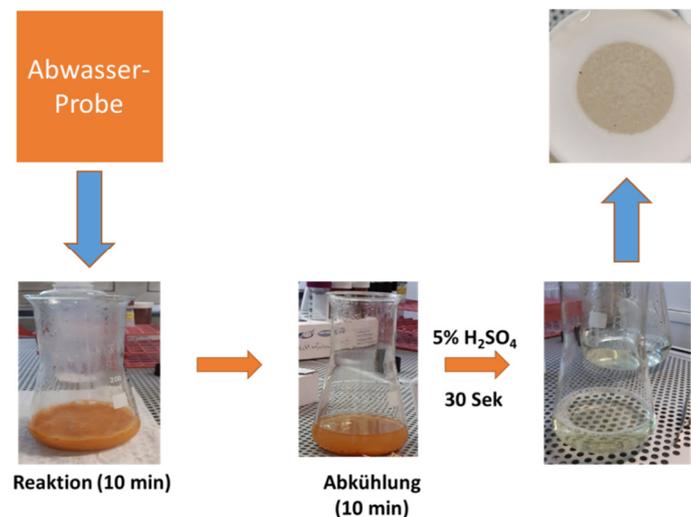


Abbildung 12. Verlauf und Effektivität von Fenton-Reaktion für reale Abwasser-Proben

Die Entfernung von natürlicher, organischer Materie für Belebtschlamm wurde für beide Behandlungen mittels gravimetrischer Analyse validiert. Dabei zeigten beide Behandlungen eine Organik-Entfernungsleistung von 101% bzw. 118% für Peroxid bzw. Fenton. Fenton zeigte eine bessere und schnellere Entfernungsleistung mit besserer Reststoff-Charakteristik. Daher ist das entwickelte Fenton-Protokoll zur Entfernung von organischen Rückständen für die Bestimmung von Mikroplastikpartikeln zu empfehlen.

Weitere Ergebnisse bezüglich der Fenton-Reaktion haben gezeigt, dass es zwei verschiedene Kategorien gibt. Verschiedene Studien berichten unterschiedliche Ergebnisse mit unterschiedlichen Reaktionsverhalten. Das führt zu Verwirrung und verhindert die Reproduzierbarkeit. Als Ursache konnte u.a. der Herstellungsprozess des verwendeten Wasserstoffperoxids ausgemacht werden, da dieser die Stabilität und damit Reaktivität der Reagenz beeinflusst. Diese Ergebnisse wurden im August 2020 erfolgreich veröffentlicht und sind im Open-Access für die Allgemeinheit zugänglich (Al-Azzawi et al. 2020 [30]).

Schlussfolgerung

Das Ziel der Studie war es, eine Probenaufbereitungsmethode zu optimieren und validieren, aber auch alle zugehörigen Details zu erklären.

Fenton wurde als die finale Empfehlung dargestellt, weil es eine besser Organik-Entfernungsleistung bietet und schneller durchzuführen ist. Wasserstoffperoxid kann aber auch verwendet werden und bietet eine sinnvolle Alternative, wenn viele Proben parallel vorbereitet werden müssen.

Thermoanalytische Mikroplastik Analytik

IUTA

Einleitung

Die massenbasierte quantitative Bestimmung von MP in Umweltproben kann nur mittels thermoanalytischer Methoden erfolgen. Diese können unter anderem schneller als die spektroskopischen Methoden sein, bedürfen einer weniger aufwendigen Probenvorbereitung und neben der Identität der Polymere liefern sie Massenanteile in der Probe, aber dafür keine Informationen über die Partikelanzahl, -größe oder -formen. Die Bestimmung der Polymermassenanteile erfolgt durch den Nachweis spezifischer Zersetzungsprodukte, die unter thermischer Behandlung gebildet werden. Gebräuchlich sind die Pyrolyse-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (Pyr-GC-MS) [19,31] oder die Thermo-Extraktion-Desorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (TED-GC-MS) [21,32].

Ziel

Im Hinblick auf eine prozesstechnische Bewertung in AP 4, war es das Ziel, die thermoanalytischen Methoden (zunächst die Pyr-GC-MS und im späterem Projektverlauf die TED-GC-MS) zu etablieren, zu validieren, sodass diese im AP 4 eingesetzt werden können. Hier erfolgte daher die Methodenentwicklung und -validierung immer eng gekoppelt mit der Probenahme-Strategie via Kaskadenfiltration (S. 21ff).

Methodik und Durchführung

Für die Analyse von Mikroplastikproben in komplexen Matrices wurden die beiden thermoanalytische Methode verglichen und bewertet.

Pyr-GC-MS:

Die zu Projektbeginn zur Verfügung stehende Pyr-GC-MS besteht aus einem Pyrola 2000 von Axel Semrau / PYROLAB (Sprockhövel, Deutschland / Lund, Schweden) in direkter Kopplung mit dem Injektor eines ISQ GC-MS-Systems von Thermo Fischer Scientific (Dreieich, Deutschland). Als chromatographische Säule wurde eine 30 m lange Optima 1 MS mit 0,25 mm Innendurchmesser und 25 µm Filmdicke von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Die Probe wird direkt auf dem Platin-Filament der Pyrolyse aufgetragen und in einem inert-Gasstrom (Helium) bei 600 °C pyrolysiert. Die nun gasförmigen Pyrolyseprodukte gelangen über den Injektor in das GC System. Dort werden sie in der Trennsäule aufgetrennt. Anschließend werden die einzelnen Komponenten mit dem Gasstrom ins MS überführt, identifiziert und quantifiziert. Die Ionenquelle eine Temperatur von 250 °C, während die MS-Transferline eine Temperatur von 280 °C hatte. Bei sämtlichen Messungen wurde der Massenbereich zwischen m/z 40-650 betrachtet.

TED-GC-MS:

Bei der TED-GC-MS handelt es sich um eine Kombination aus einer Thermodesorptions-GC-MS (Gerstel GmbH & Co KG, Mülheim a.d. Ruhr, Deutschland) gekoppelt mit einer Thermogravimetrie-Einheit, TGA 2 (Mettler-Toledo, Gießen, Germany). Die Analyse erfolgt über eine indirekte Überführung der Pyrolyse-Produkte aus der TGA 2 in das GC-MS. Dabei wird die Probe zunächst in einer thermogravimetrischen Analyse bei 600 °C pyrolysiert und die dort entstehenden Pyrolyseprodukte sorbieren auf einer Extraktionsphase (PDMS-Stirbar-Twister, Gerstel GmbH, Mülheim an der Ruhr, Deutschland).

Die sorbierten Pyrolyseprodukte werden daraufhin für die Injektion in das GC-MS thermisch von der Extraktionsphase desorbiert und bei -120 °C in einem Kaltaufgabesystem fokussiert [33]. Nach der Fokussierung erfolgt die Mobilisierung der Pyrolyseprodukte, wo sie im GC-MS-System getrennt und detektiert werden. Dieser Aufbau erlaubt die Analyse größerer Probenmengen von bis zu 5 g ohne das Risiko einer Überladung der Trennsäule der GC. Dadurch können für das gesamte Analysenverfahren niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden. Die TGA erlaubt die ergänzende Aufzeichnung der temperaturabhängigen Gewichtsänderung während der Pyrolyse-Reaktion. Die Fraktionen der Filterrückstände der 100 µm-, 50 µm- und 10 µm-Filter wurden so analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Methodenoptimierung und Vergleich von Pyr-GC-MS und TED-GC-MS

Um mit der Pyr-GC-MS die anfallenden Proben analysieren zu können, wurde zunächst die Methode für die Analyse von Mikroplastik optimiert. Um eine qualitative und quantitative Analyse zu ermöglichen, wurden zunächst Fingerprints für Polystyrol (PS), Polyethylen (PE) und Polymethylmethacrylat (PMMA) mittels Pyr-GC-MS aufgenommen. Ziel war es, charakteristische Pyrolyseprodukte zu identifizieren, welche dann in Umweltproben zur Identifizierung und Quantifizierung herangezogen werden können.

In Abbildung 13 ist das total ion current (TIC) Chromatogramm einer Analyse eines Mischstandards aus PS, PE und PMMA dargestellt. Hierbei konnten das Styrol und das Styrol-Dimer als charakteristische Pyrolyseprodukte für PS identifiziert werden. Für PMMA, ist Methylmethacrylat das charakteristische Pyrolyseprodukt. Bei PE konnte eine charakteristische Triplett-Peakverteilung aus Alkanen, Alkenen und Dialkenen nachgewiesen werden. Für PE wurden die Dialkene mit 13, 14 und 15 Kohlenstoffatomen für die Quantifizierung ausgewählt. Die mit dem Pyrolysator erhaltenen charakteristischen Pyrolyse-Fragmente entsprechen denen in der Literatur mittels Pyrolyse und TED-GC-MS beschriebenen Peaks [32,34,35].

Bei der Analyse der ersten Abwasserproben stellte sich heraus, dass die Bestimmungsgrenze für die relevanten Polymere aufgrund der sehr geringen absoluten Probenaufgabemenge von maximal 50 µg relativ hoch ist. Neben der zu kleinen Aufgabemengen führte die manuelle Probenaufgabe auch zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit. Die Pyr-GC-MS ist aus diesen Gründen für qualitative Materialcharakterisierungen sehr gut geeignet, jedoch für die quantitative Mikroplastikanalytik nur bedingt einsetzbar. Für Proben aus Oberflächengewässern und Kläranlagenabläufen sind höhere Probenmengen notwendig, die mit der die TED-GC-MS aufgrund der Einwaage von bis zu 500 mg in einen Tiegel auch reproduzierbar analysiert werden können. Die Methode wurde dabei im Rahmen dieses Forschungsvorhabens in enger Abstimmung mit der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung in Anlehnung an Dümichen et al. (2019) [36] adaptiert, automatisiert und validiert.

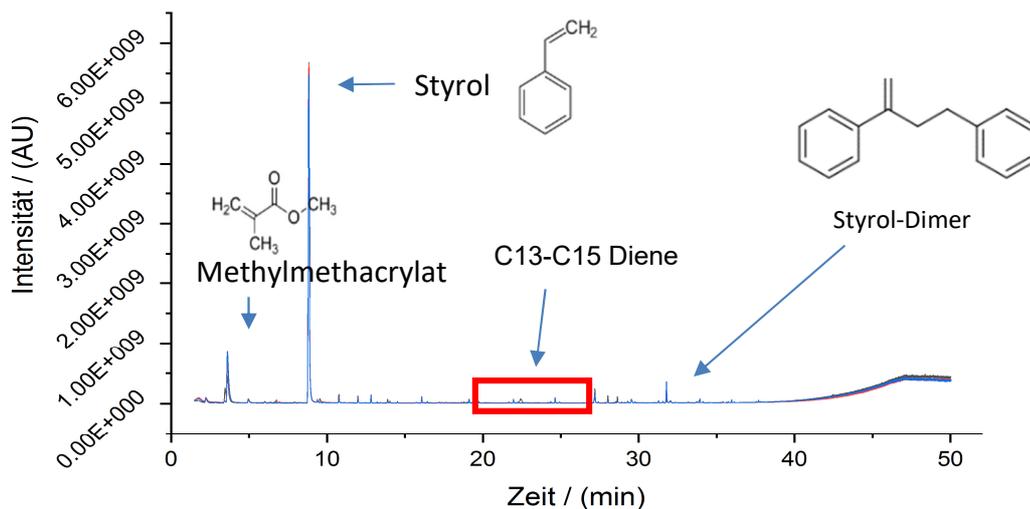


Abbildung 13: Analyse einer Polystyrol- Polyethylen und Polymethylmethacrylat Suspension. Es wurden 5 µL einer Ethanol Suspension mit einer jeweiligen Polymer Konzentration von 0,33 g L⁻¹ appliziert.

Ein Vergleich der beiden Methoden für PS und PE ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die Bestimmungsgrenzen der TED-GC-MS sind im Fall von PS und PE um einen Faktor von 26 und 93 niedriger im Vergleich zur Pyr-GC-MS. Daher wurde entschieden, sämtliche weitere Analysen mit der TED-GC-MS durchzuführen.

Tabelle 3: Bestimmungsgrenzen je µg Probe der Polymere PS und PE, die durch Pyr-GC-MS und TED-GC-MS erreicht wurden. Die Methode der TED-GC-MS wurde entsprechend Dümichen et. al. (2019) [36] adaptiert. Die Methode der Pyr-GC-MS wurde entsprechend Funck et al. (2020) durchgeführt [19]

<u>Pyrolyse-GC-MS</u>	<u>BG (ng / µg Probe)</u>	<u>TED-GC-MS</u>	<u>BG (ng / µg Probe)</u>
Bestimmung von PS	0,08	Bestimmung von PS	0,003
Bestimmung von PE	2,8	Bestimmung von PE	0,03

Ergänzend zum im Rahmen von SubµTrack gewählten Schwerpunkt auf die Analyse von den zwei Polymeren PS und PE wurden ergänzend dazu noch Polypropylen (PP) und Polyethylenterephthalat (PET) bei den TED-GC-MS-Messungen mit analysiert. Diese vier Polymere repräsentierten im Jahr 2018 etwa 67% der in Europa eingesetzten Kunststoffe [15]. Die charakteristischen Pyrolyseprodukte und Retentionszeiten für die TED-GC-MS-Methode sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die externe Kalibration mit Styrol-D8 als Injektionsstandard zur Überprüfung des GC-MS-Systems erfolgte nicht tagesaktuell. Um tagesaktuell die Gültigkeit der Kalibration sicher zu stellen, erfolgte die Messung von Qualitätskontrollproben, die in einer Mittelwertkarte abgelegt wurden. Sobald bei den Qualitätskontrollproben eine

Abweichung von $\pm 10\%$ aufwies wurde eine Rekalibrierung ebenso wie nach jeder Gerätereinigung durchgeführt.

Tabelle 4: Ausgewählte Pyrolyseprodukte für die PE-, PS-, PP- und PET-Identifizierung mit der TED-GC-MS. Charakteristische Fragment-Ionen und Retentionszeiten für jedes Pyrolyseprodukt werden mit den jeweiligen Intensitätsverhältnissen dargestellt.

Polymer	Pyrolyseprodukt	Charakteristische Fragmente <i>m/z</i> (<i>i.r.</i>)	Reten- tionszeit (min)
PS	PS 1 Styrol	51 (18%); 78 (41%); 104 (100%)	8.49
	PS 2 2,4-Diphenyl-1- buten	91 (100%); 104 (24%); 130 (18%); 208 (22%)	27.84
	PS 3 2,4,6-Triphenyl-1- hexen	91 (100%); 117 (30%); 194 (16%); 207 (23%)	42.42
PE	PE 1 1,12-Tridecadien	55 (100%); 81 (84%); 67 (74%); 95 (52%)	21.52
	PE 2 1,13- Tetradecadien	81 (78%); 95 (55%); 109 (27%)	24.22
	PE 3 1,14- Pentadecadien	55 (100%); 81 (82%); 95 (58%); 109 (29%)	26.75
PP	PP 1 2,4,6- Trimethylnon-1-en	43 (89); 69 (100); 111 (32); 125 (12)	11.90
	PP 2 2,4,6,8- Tetramethylundec -1-en	69 (100); 83 (52); 111 (52); 125 (14); 154 (10)	18.01
	PP 3 2,4,6,8- Tetramethylundec -1-en	69 (100); 83 (53); 111 (56); 125 (14); 154 (13)	18.20
PET	PET 1 Vinyl benzoate	77 (48); 51 (14); 105 (100)	12.50
	PET 2 Ethyl benzoate	77 (46); 105 (100); 122 (23); 150 (20)	14.00
	PET 3 1,1 Biphenyl	76 (7); 154 (100)	19.00

Probenvorbereitung und Gesamtworkflow der Probenahme und TED-GC-MS-Analytik

Die Probenvorbereitung der TED-GC-MS bestand aus der Übertragung der Probe aus den Korbsiebfiltern (s. AP 2.1). Anschließend wurde ein Aliquot oder die gesamte Probe mit einem Whatman-Zellulosenitrat-Membranfilter (45 mm Durchmesser, 0,2 µm Porengröße) (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont ST Giles, GB) filtriert. Anschließend wurde der Filter mit 1 mL Tween 20 gespült und in ein braunes 30-mL-Schraubdeckelfläschchen ND20 überführt und mit Aluminiumfolie verschlossen. Der Inhalt des Fläschchens wird bei 50 °C getrocknet, und der Rückstand wird mit 600 µL reinem Ethanol in einen zuvor gewogenen Tiegel überführt. Diese Probenvorbereitung wurde gravimetrisch validiert [37]. Die Transfermethode aus dem Korbfilter wurde ebenfalls gravimetrisch validiert, die Methode ist in Funck et al. 2019 [19] dargelegt. Die Wiederfindungsraten für den 100 µm-Korbfilter betragen $87\% \pm 2\%$, der 50 µm-Korbfilter zeigte eine Wiederfindungsrate von $85\% \pm 2\%$ und der 10 µm-Korbfilter eine Rate von $88\% \pm 2\%$.

Der Probentransfer vom Cellulosenitrat-Membranfilter zur TED-GC-MS wurde durch Zugabe von PE auf den Filter validiert. Auf drei separate Filter wurden 20 µg, 69 µg und 39 µg PE aufgetragen und die Partikel anschließend wie oben beschrieben übertragen und mit der TED-GC-MS analysiert. Die Ergebnisse zeigten eine Wiederfindungsrate von $83\% \pm 2\%$.

Der Gesamtworkflow von der Probenahme mit der Probenvorbereitung bis hin zur Analytik mittels TED-GC-MS ist in der Abbildung 14 dargestellt.

Feldblindwerte und Geräteblindwerte für die Pyr-GC-MS und TED-GC-MS

Bei der Mikroplastikanalytik muss explizit auf Blindwerte und Kreuz-Kontaminationen geachtet werden. Während der Probennahme wurde der Feldblindwert der Kaskadenfiltrations-Anlage bestimmt. Diese Feldblindwertproben durchlaufen die gleiche Probenaufbereitung, wie die normalen Proben. Weder für die Pyr-GC-MS noch für die TED-GC-MS konnten Polymerblindwerte nachgewiesen werden.

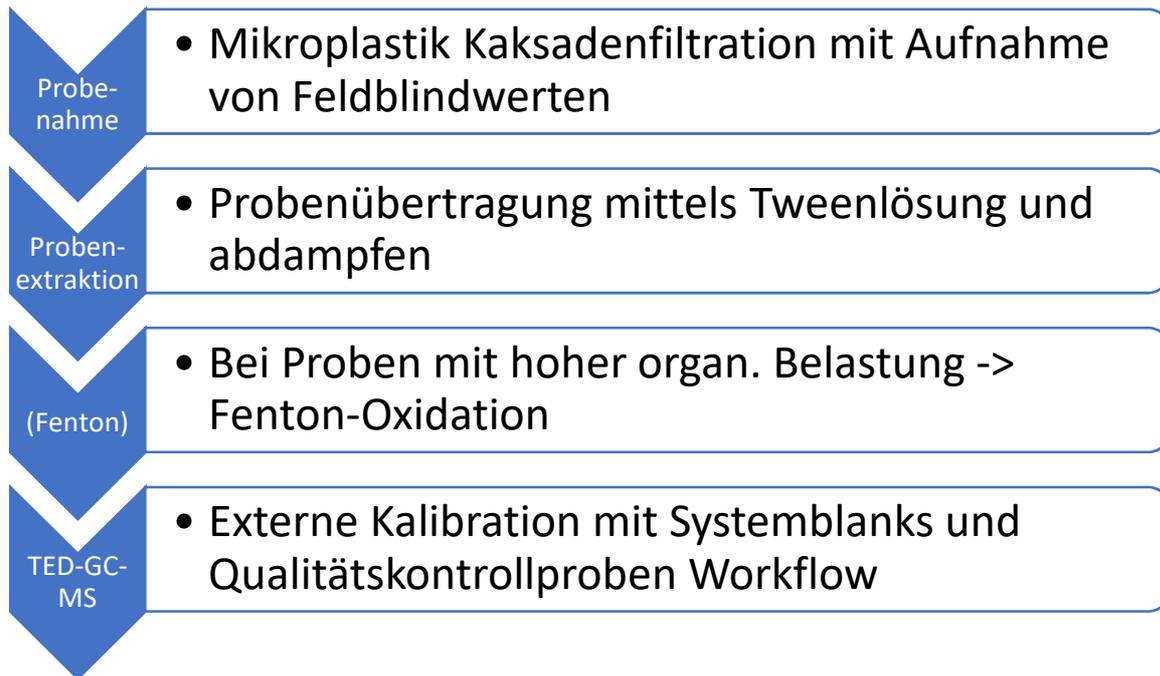


Abbildung 14: Workflow der Probenahme, Probenvorbereitung und Analytik für Mikroplastik Untersuchungen mittel Kaskadenfiltration und TED-GC-MS.

Schlussfolgerung

Mit der Kombination der Mikroplastik Kaskadenfiltration mit der TED-GC-MS Methode, ist ein Workflow etabliert worden, welcher repräsentative Volumina während der Probenahme im Kubikmeter Bereich realisieren kann. Die TED-GC-MS Analytik bildet ein Verfahren ab, das Probenmengen im mg Bereich ohne komplexe Probenvorbereitung, bei einer reproduzierbaren Probenapplizierung, analysieren kann. Mit dieser Methodenkombination ist die Bewertung von Mikroplastikmassen in Kläranlagen und Oberflächengewässern möglich.

Spektroskopische Methoden

TUM-IWC

Einleitung

Die Detektion und Identifizierung von insbesondere Nanoplastikpartikeln (Größenbereich $<1\ \mu\text{m}$) ist eine besondere Herausforderung, da diese Partikel die Größenlimitierungen vieler analytischer Techniken aus der MP-Analytik unterschreiten. Hierzu neue Methoden zu entwickeln und auf Machbarkeit zu prüfen war mit dem AP 2.3 eine Kernaufgabe des SubµTrack-Projekts. Zu Beginn lag die Untergrenze für die RM-basierte Partikelidentifizierung bei ca. $1\ \mu\text{m}$ [5,38]. Dies ist allerdings nicht das theoretische Limit, welches aufgrund der Benutzung von Lasern im sichtbaren Spektrum bei ca. $250\ \text{nm}$ liegt. Weiterhin ist für die morphologische Charakterisierung von MP optische Mikroskopie etabliert. Um selbige Informationen auch für Nanoplastik zu erhalten eignet sich daher die Elektronenmikroskopie, welche auch im unteren Nanometerbereich noch hochauflösende Bildgebung ermöglicht.

Neben der Analysierbarkeit solch kleiner Partikel, erhebt die exponentielle Zunahme der Partikelanzahl mit abnehmender Größe auch Probleme in Bezug auf die Quantifizierung. Hier müssen, um eine ausreichend belastbare Aussage über Nanoplastik-Kontamination machen zu können, eine gewisse Anzahl an Partikeln gemessen werden, die die gesamte Probe (hier Raman-Filter) repräsentieren. Für kleinste Partikel entstehen hierfür besondere technische Herausforderungen, für welche eine optimierte Messprozedur notwendig ist.

Ziel

Ziel des AP 2.3 ist die Entwicklung einer RM- und REM-basierten Methode, die eine eindeutige Partikelidentifizierung und hochauflösende morphologische Charakterisierung von Nanoplastik ermöglicht. Zudem soll der Anwendungsbereich dieser Probe ermittelt werden und eine erste exemplarische Anwendung für eine (einfache) Realprobe durchgeführt werden. Weiterhin soll für sehr kleine Partikel eine geeignete Partikelselektion entworfen und validiert werden.

Plan/Durchführung

Für die Entwicklung der RM-REM basierten Methode ist es nötig, ein geeignetes Probenträgermaterial zu ermitteln, welches gleichzeitig eine optimale REM Bildgebung

ermöglicht und die Raman-Spektrenaufnahme nicht beeinträchtigt. Weiterhin wird mit Partikeln definierter Größe aus AP 1 sowie fragmentierten Nanoplastikpartikeln der Anwendungsbereich untersucht. Diese Methodik soll anschließend für die Untersuchung von gesammelten Fraktionen der Feldflussfraktionierung (FFF) eingesetzt werden. Für die Untersuchung der Realprobe musste eine Aufkonzentrierung entwickelt werden (siehe Seite 49ff). Für die chemometrische Partikelselektion wird anhand von Simulationen eine optimale Methode ermittelt und bewertet.

Ergebnisse und Diskussion

1) Etablierung der Raman-Mikrospektroskopie für Analytik im Größenbereich $< 1 \mu\text{m}$

Für die chemische Identifizierung von Submikro- und Nanoplastik wurde die Einsetzbarkeit der Raman-Mikrospektroskopie (RM) erprobt. Da die untersuchten Partikel sich im Größenbereich der Auflösungsgrenze optischer Mikroskope befinden, wurde eine Kopplung der Raman-Mikrospektroskopie mit der Rasterelektronenmikroskopie (REM) entwickelt. Diese ermöglicht die räumliche und geometrische Visualisierung der untersuchten Partikel durch REM und verbindet sie mit der spektroskopischen Analyse durch das RM. Hierzu wurde eine Probenvorbereitung erarbeitet, die gleichzeitig für die REM und die RM geeignet ist. Entscheidend ist dafür das Substrat, das für eine gute mikroskopische Visualisierung eine sehr glatte Oberfläche haben muss, sowie kein störendes Raman-Signal erzeugen darf. Hierzu wurden diverse, kommerziell erhältliche Materialien untersucht und verglichen (s. Abbildung 15). Ein Kupferband zeigte eine unebene Oberfläche und hatte ein starkes Raman-Hintergrundsignal. Aluminiumfolie, hingegen, hatte kein nennenswertes Hintergrundsignal, dessen Oberfläche war aber sehr uneben für die Visualisierung von Partikeln $< 1 \mu\text{m}$. Silizium-Wafer besitzen eine sehr ebene Oberfläche, die die Visualisierung von selbst kleinsten Nanopartikeln ermöglicht. Aber hier tritt das Raman-Spektrum des einkristallinen Siliziums auf und überlagert mit den Raman-Signalen der Analyten, welche aufgrund ihrer geringen Größe eine deutlich geringere Signalintensität aufweisen. Somit erfüllen Silizium-Wafer die Kriterien für die RM-REM Kopplung nicht ausreichend. Als optimales Substrat wurde, basierend auf den genannten Beobachtungen, Aluminium-beschichtete Glasobjektträger identifiziert, welche alle Anforderungen der RM sowie der REM erfüllen, wie in AP1 beschrieben wird. Die Probenvorbereitung kann analog der Vorbereitung von klassischen REM-

Proben durchgeführt werden, in dem wenige μL der Partikelsuspension auf dem Substrat eingetrocknet werden.

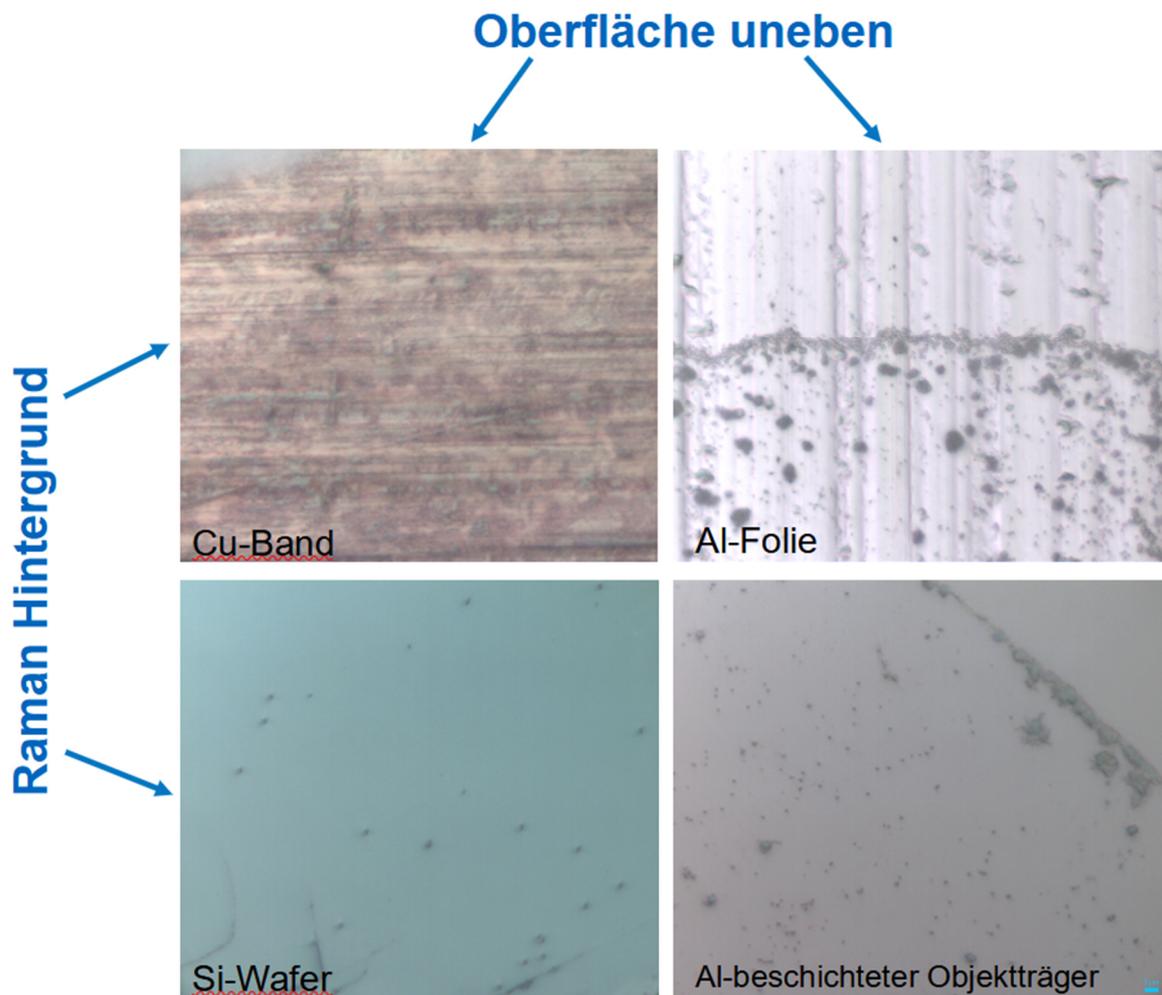


Abbildung 15: Vergleich verschiedener Substrate für die gekoppelte Analytik mit RM und REM.

Mit dieser Kopplung von RM und REM wurde die Detektierbarkeit von Referenzplastikpartikeln kleiner $1\ \mu\text{m}$, der bisherigen Grenze der RM, untersucht. Dies wurde anhand von Referenzpartikeln verschiedener Größen, sowie anschließend fragmentierten Nanoplastikpartikeln demonstriert.

Zunächst wurde die RM-REM-Kopplung mit $500\ \text{nm}$ PS-Partikeln realisiert, in dem die Partikelsuspension auf die Al-beschichteten Objektträger aufgebracht wurde und anschließend mit RM untersucht wurde. Nach erfolgter spektroskopischer Analyse wird die Probe in das REM für die hochauflösende Bildgebung transferiert, wobei der Experimentator darauf achtet, dass die Stelle, der RM-Untersuchung wiedergefunden wird. Dies ist in Abbildung 16 illustriert. Hier sind zum einen Bilder dargestellt, die durch das optische Mikroskop des RM bzw. durch das REM gewonnen wurden, in denen

40

erkennbar ist, dass dieselben Partikel untersucht wurden. Weiterhin wird die Notwendigkeit der hochauflösenden REM-Bildgebung verdeutlicht, da die Partikelgrößen an der Diffraktionsgrenze liegen und das optische Mikroskopbild keine morphologische Charakterisierung zulässt. Die Visualisierung wird zusammen mit der chemischen Identifizierung erhalten. Zur Illustration abgebildet ist hier eine chemische Raman-Map, welche mit 50 nm Schritten aufgenommen wurde und die die Intensität der 1000 cm^{-1} Bande (*ring-breathing*) zeigt, sowie das Raman-Spektrum eines spezifischen PS-Partikels. Diese Raman-Map zeigt, dass Partikel in diesem Größenbereich präzise angesteuert und spektroskopisch identifiziert werden können. Für die allgemeine Anwendung ist die Aufnahme eines Einzelspektrums (Abbildung 16, rechts unten) genügend, da bereits somit eine Partikelidentifizierung möglich ist. Chemische 2D-Maps dieser Art eignen sich besonders zur Klärung spezifischer Forschungsfragen, in denen räumliche Informationen von Interesse sind.

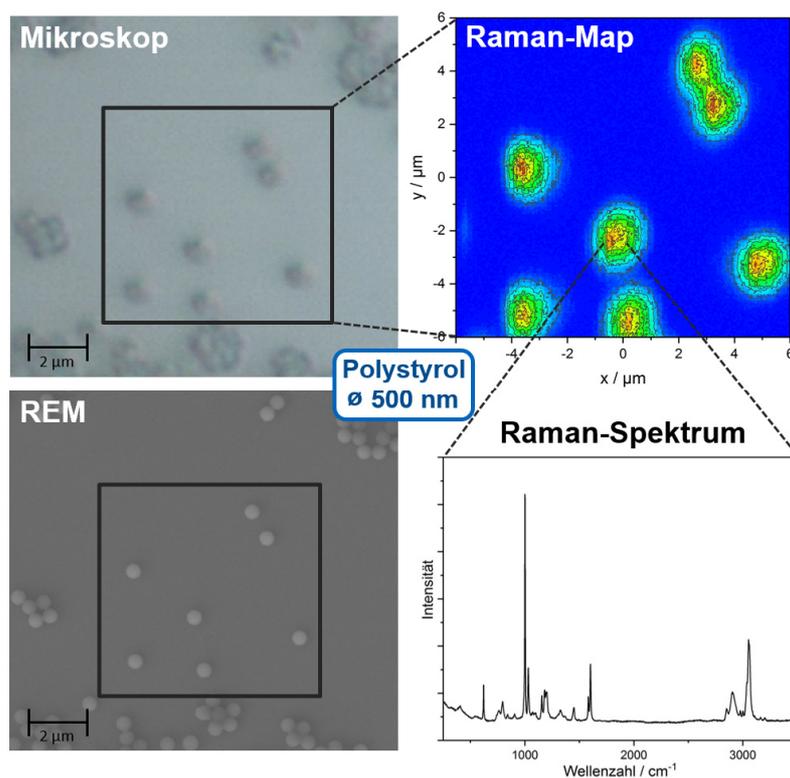


Abbildung 16: Kopplung von REM und RM zur gleichzeitigen Visualisierung und spektroskopischen Identifizierung von 500 nm PS-Partikeln.

Im nächsten Schritt wurden kleinere Partikel getestet, um das Größenlimit der RM-REM-Kopplung zu ermitteln. Auch mit 250 nm PS-Partikeln ist eine RM-REM-basierte Analytik möglich, was anhand Abbildung 17 dargestellt ist. Hier ist erkenntlich, dass die Partikel sowohl im optischen Mikroskopbild, als auch im REM-Bild erkennbar sind,

wobei wieder die vorliegenden Partikelgrößen nahe dem Diffraktionslimit liegen und daher die morphologischen Details aus der hochauflösenden REM-Bildgebung extrahiert werden müssen. Eine Raman-spektroskopische Identifizierung einzelner Partikel ist hierfür ebenfalls möglich. Dies ist anhand einer Linienmessung (Abbildung 17, links) dargestellt, welche über zwei benachbarte Partikel in 50 nm Schritten durchgeführt wurde. Das erhaltene Intensitätsprofil zeigt, dass diese Partikel separiert untersucht werden können, was der theoretisch für optische Mikroskopie möglichen Auflösungsgrenze entspricht.

Der Versuch 100 nm PS-Partikel mit RM zu analysieren konnte nicht durchgeführt werden, obwohl eine REM-Bildgebung nach wie vor möglich ist. Hier war es nicht möglich diese Partikel, welche sich unterhalb des Diffraktionslimits befinden, im optischen Mikroskopbild zu erkennen und für die Raman-Messung anzusteuern. Auch eine zuvor durchgeführte REM-Bildgebung zur Ortung der Partikel konnte die Partikel ebenfalls nicht messbar machen. Dies deutet darauf hin, dass die RM-REM-basierte Analytik von Submikro-Plastikpartikeln eine Größenbegrenzung von 250 nm hat.

Linie über 2 Partikel

Abmessungen aus REM

Partikel oben: 241 nm

Partikel unten: 252 nm

Abstand Zentrum-Zentrum: 766 nm

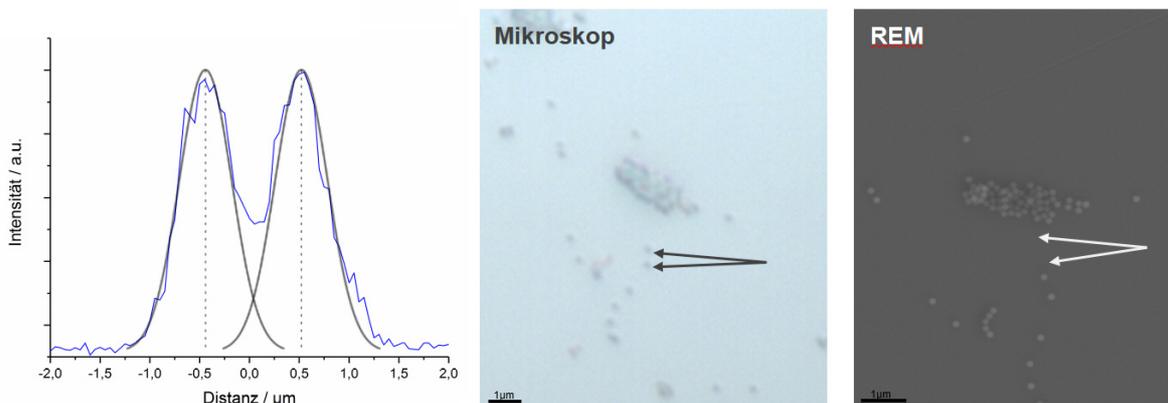


Abbildung 17: RM-REM-Untersuchung von PS 250 nm. Die REM-Bildgebung zeigt die Morphologie und anhand einer 1D-Linien-Raman-Messung (1000 cm^{-1}) wird die chemische Identifizierbarkeit der Partikel gezeigt.

Um die Arbeit mit Realproben vorzubereiten, wurde die Methode mit künstlich fragmentierten PS-Partikeln getestet. Diese wurden nach der Methode von *von der Esch et al. 2020, [17]* erzeugt, indem Plastikstücke 15 h in einem Ultraschallbad mechanischen Kräften ausgesetzt wurden. Nach Filtration durch einen Polycarbonat-

Membranfilter mit Porengröße von 2 μm , zur Abtrennung von größerem Mikroplastik, wurde, wie oben beschrieben, einige μL der Suspension auf dem Aluminiumbeschichteten Objektträger eingetrocknet. Die Anwendbarkeit der RM-REM-Kopplung konnte auch hier demonstriert werden. Abbildung 18 zeigt die unregelmäßigen Partikel optisch und elektronenmikroskopisch visualisiert und Raman-spektroskopisch identifiziert. Dies verdeutlicht zum einen mit der 2D-Raman-Map und zum anderen durch die Einzelspektren (alle wie erwartet Polystyrol) der verschiedenen Fragmente, dass die RM-Analytik von sekundärem Submikroplastik durchführbar ist. Zu der chemischen Identifizierung durch RM ist weiterhin eine genaue Größenbestimmung durch das REM möglich, welche hier für die identifizierten Partikel Größen zwischen 387 nm und 770 nm ermittelt. Diese Größen sind in Übereinstimmung mit dem, durch wohlcharakterisierte Polystyrolatexe, ermittelten Limit von ca. 250 nm.

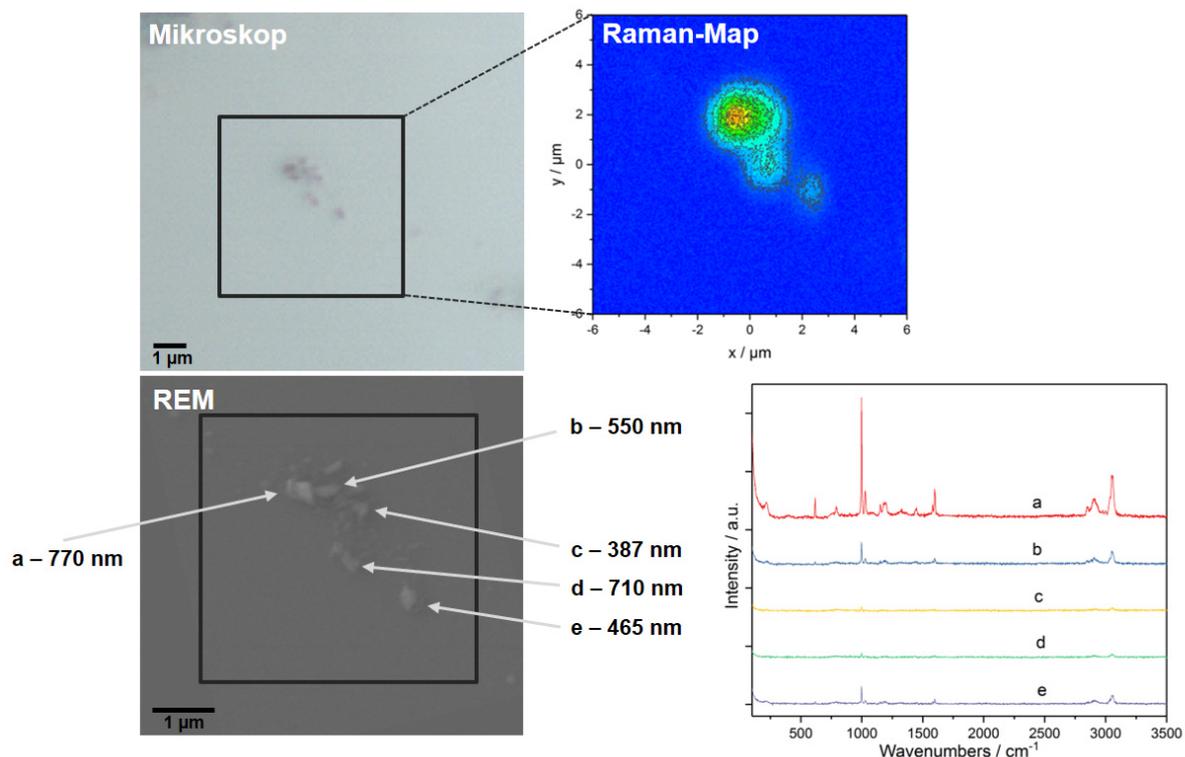


Abbildung 18: Gekoppelte RM- und REM-Analyse von umweltnahen Plastikfragmenten. Links oben: mikroskopische Darstellung; links unten: rasterelektronenmikroskopische Darstellung; rechts oben: 2D-Raman-Identifizierung; rechts unten: Raman-Einzelspektren ausgewählter Partikel

2) Chemometrische Optimierung der Raman-Mikrospektroskopie für sehr kleines MP und Nanoplastik

Die Erschließung des Anwendungsbereichs der RM für Submikro-Plastik ergänzend, wurde zudem eine chemometrische Methode theoretisch erarbeitet, um die

Quantifizierung durch die RM für Mikro- und Submikroplastikpartikel im Größenbereich kleiner $10\ \mu\text{m}$ zu verbessern. Diese Methode zielt auf eine statistische Belastbarkeit der erzeugten Ergebnisse, was bedeutet, dass die Güte der Analytik durch die Fehlerwahrscheinlichkeit und die Länge des Fehlerintervalls beschrieben wird. Wie bereits für Partikel $> 10\ \mu\text{m}$ erarbeitet wurde [17], ergibt sich hier, ausgehend von vorausgesetzten Präzisionsanforderungen, eine notwendige Anzahl an Partikeln, die der RM unterworfen werden müssen, so dass das Ergebnis innerhalb dieser statistischen Anforderungen liegt. Im Größenbereich $> 10\ \mu\text{m}$ ist es möglich den gesamten Filter, welcher die (Plastik-)Partikel enthält optisch zu erfassen und mittels Bilderkennung jeder Partikel zu detektieren. Somit kann aus der Gesamtheit der Partikel eine zufällige Auswahl getroffen werden (*random sampling*).

Die hier durchgeführten Arbeiten begegnen dem Hindernis, dass in dem kleinen Größenbereich ($< 10\ \mu\text{m}$ sowie Submikro-Bereich) der gesamte Filter nicht in einem realistischen Zeitrahmen erfasst werden kann und zudem die Positionierung des Raman-Lasers auf dem Partikel zu unpräzise ist, wenn wie gehabt der gesamte Filter zunächst optisch untersucht wird. Daher basiert diese chemometrische Methode darauf, von einzelnen Fenstern (*window sampling*) ein Mikroskopbild zu erfassen, auszuwerten und mittels RM zu analysieren, so dass Drift minimiert werden kann. Zu diesem Konzept wurde eine statistische Beschreibung des Konfidenzintervalls entwickelt, so dass die Quantifizierung mit einer vorausgesetzten Sicherheit durchgeführt werden kann.

Im Gegensatz zum etablierten *random sampling*, kann das Konfidenzintervall nicht durch statistische Modelle, sprich mittels einfacher Formeln, beschrieben werden, da nicht alle Partikel detektiert werden. Eine Bewertung der Art und Weise, wie die Fenster zur RM-Untersuchung zu legen sind, wurde dementsprechend unter Zuhilfenahme von Simulationen durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 5000 künstliche Filter mit jeweils 20 000 Partikeln und einem MP-Anteil von 20% erzeugt, die zwei Verteilungsmustern folgten. Zum einen wurden die Partikel zufällig positioniert, lediglich mit der Einschränkung, dass keine Überlappung vorliegen soll, zum anderen wurde eine Häufung der Partikel im Zentrum simuliert um die Situation zu untersuchen, dass externe (z.B. physikalische, fluid-dynamische) Einflüsse die Verteilung beeinflussen.

Auf diesen künstlichen Filtern basierend wurde der Einfluss der Fensterpositionierung untersucht und zufällige Positionen (*random windows*) mit regelmäßigen Abständen (*systematic windows*) verglichen. Aus den 5000 Filtern wurde Mittelwert und

Standardabweichung berechnet und gegen die Anzahl der gemessenen Fenster (korreliert mit der gemessenen Partikelzahl) aufgetragen. Diese Daten sind in Abbildung 19 aufgetragen. Hieraus ist, vor allem für wenige gemessene Fenster ersichtlich, dass die systematische Positionierung der Fenster, einen Fehler (Unterbestimmung) erzeugt, wenn die Partikel nicht zufällig auf dem Filter verteilt liegen. Weiterhin zeigt sich aber, dass bei der Anwendung von zufälligen Fensterpositionen die Standardabweichung des Ergebnisses zunimmt, was schließlich in einer größeren Anzahl an zu messenden Partikeln resultiert. Somit erscheint die zufällige Fensterpositionierung als zu bevorzugen, da hier kein Fehler (*bias*) entsteht, auch wenn sich dies in der erhöhten Standardabweichung niederschlägt.

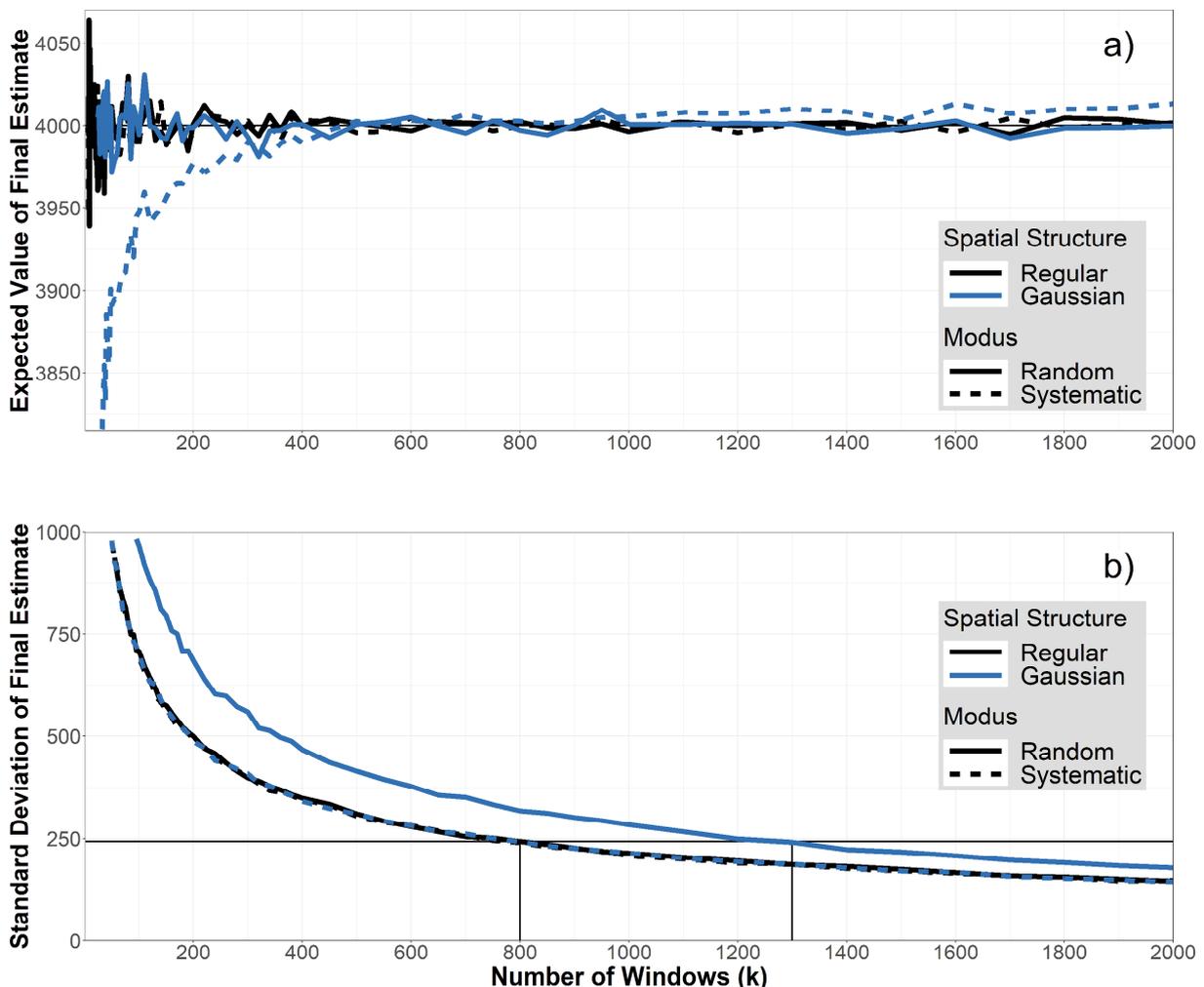


Abbildung 19: Erwartungswert (oben) und Standardabweichung (unten) des window sampling auf den simulierten Raman-Filtern aufgetragen gegen die Anzahl der Fenster (korreliert zu Partikelanzahl). Der wahre Erwartungswert ist $N = 4000$.

Aufbauend auf dieser Beobachtung wurde eine anwendbare Umsetzung untersucht, die nicht auf rechenintensiven Simulationen von einer Vielzahl an Filtern basiert, sondern mit

lediglich einem Messergebnis (Filter) eine Standardabweichung erzeugen kann. Hierzu wurde der *Bootstrap*-Algorithmus eingesetzt, bei welchem aus dem gemessenen Datensatz durch Ziehen mit Zurücklegen neue Datensätze erzeugt werden (s. Abbildung 20). Aus dieser Anzahl an Datensätzen kann dann eine Standardabweichung berechnet werden, welche wiederum zur Ermittlung der zu messenden Partikel für die RM-Analytik verwendet wird.

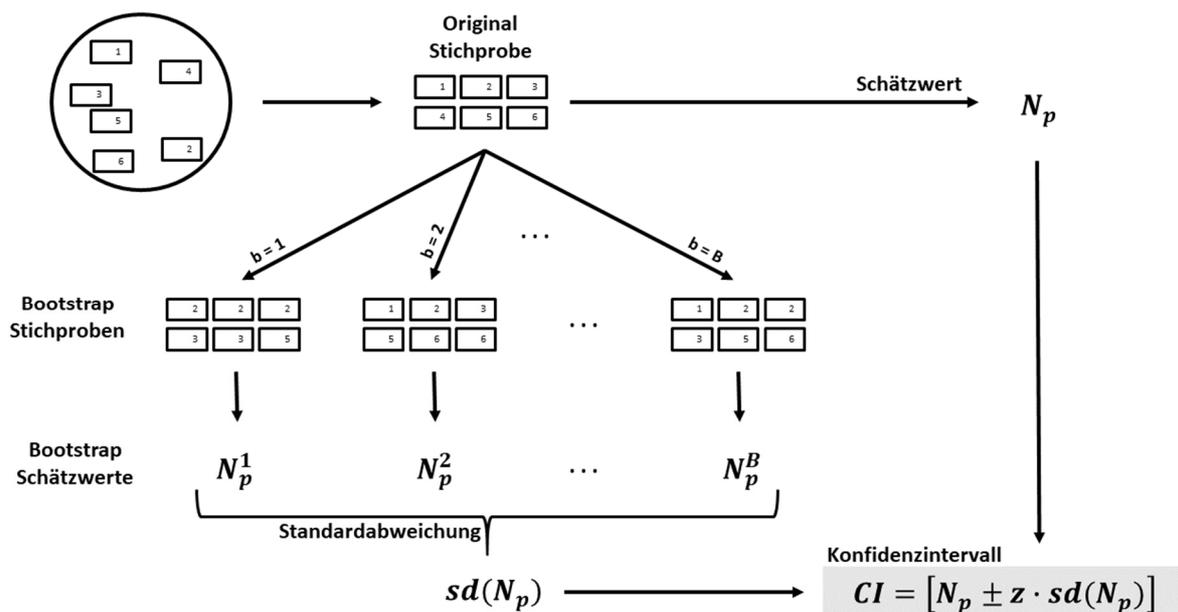


Abbildung 20: Bootstrap-Algorithmus zur Bestimmung der Standardabweichung aus einem einzelnen Messergebnis. Aus den ursprünglichen Daten werden durch Ziehen mit Zurücklegen neue Datensätze erzeugt, welche zur Berechnung der Standardabweichung herangezogen werden können.

Abschließend wurde der erarbeitete Algorithmus dahingehend vertieft, dass simultan während der Messung die gemessenen Daten ausgewertet werden sollen und mittels des *Bootstrap*-Verfahrens bewertet wird, ob das Zwischenergebnis bereits den Präzisionsanforderungen an die RM-Analyse genügt und die Messung beendet werden kann oder ob die Messung fortgesetzt werden muss.

Diese statistische, chemometrische Methode wurde den Projektpartnern, sowie der internationalen Fachöffentlichkeit zur Verfügung gestellt (Schwaferts et al. 2021 [39]).

Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die hier durchgeführten Arbeiten demonstrierten, die Anwendbarkeit der RM-REM Kopplung für Nanoplastik bis zu 250 nm. Es konnten sowohl sphärische sowie fragmentierte Partikel chemisch identifiziert werden. Damit ist es möglich gewesen diese

RM-REM Kopplung für die Analyse von gesammelten FFF Fraktionen in AP 2.2 einzusetzen.

In parallel erschienenen Arbeiten wurde ebenfalls die RM für die Anwendung auf Nanoplastik berichtet [40–42]. Diese basieren allerdings auf Raman *imaging*, welches Zeit-intensiver ist, aber auch die Untersuchung von Partikeln < 100 nm ermöglicht. Weiterhin wurden Arbeiten zur korrelierten RM-REM Untersuchung von Mikro- und Nanoplastik durchgeführt [43–45]. Es wurden dort primäre sowie sekundäre Nanoplastikpartikel untersucht, sowie verschiedene wässrige Probenmedien getestet. Diese Publikationen nutzten allerdings Integrierte RM-REM Systeme, welche die RM-Analytik direkt in der REM-Probenkammer durchführen konnten. Im Gegensatz dazu, bedarf die in AP 2 berichtete Technik nicht dieser kostspieligen Instrumente und ist somit in einer größeren Anzahl an Laboren durchführbar.

Die chemometrische Methode zur Quantifizierung sehr kleiner Partikel wurde theoretisch validiert und es konnte eine eindeutige Präferenz für *window-sampling* gezeigt werden. Dies wurde zusammen mit einer Bootstrap-Methode in einen Messalgorithmus gefasst, der die RM Messung dahingehend optimiert, dass eine optimale Anzahl an Messpunkten gefunden wird. Diese Arbeiten stehen der Öffentlichkeit zur Verfügung. Eine technische Umsetzung dieser Methode ist im Kontext des JPIOcean-Projekts HOTMIC (gefördert durch BMBF) geplant.

Erweiterung des analytischen Spektrums für die Submikroplastikanalytik durch den Einsatz der Feldflussfraktionierung

Trennung und Größenbestimmung mittels Feldflussfraktionierung

Leitung: TUM-IWC & Postnova

Partner: TUM-LTI, IUTA, TUM-SWW, BS-Partikel

Einleitung

Um das Spektrum an analytischen Methoden zu erweitern und eine Brücke zwischen der Nanopartikel- und Mikroplastikanalytik zu schlagen und dabei die Vorteile aus beiden Welten zu kombinieren, wurde eine Kopplung der Feldflussfraktionierung (FFF) und der RM angestrebt. Die FFF als etablierte Methode in der Nanopartikelanalytik ermöglicht die Fraktionierung von Nanoplastikpartikeln, n [46], wobei sie in Kombination mit größensensitiven Detektoren wie beispielsweise dem Mehrwinkellichtstreu-Detektor (MALS) zusätzlich den Zugriff auf die Partikelgrößenverteilung in einer entsprechenden Probe liefert. Die fehlende chemische Selektivität kann hierbei durch die Kopplung mit der in der Mikroplastikanalytik etablierten RM realisiert werden. Diese Kopplung kann sowohl offline durch das Sammeln von Fraktionen als auch online im Durchfluss geschehen. Beide Ansätze wurden im Rahmen von SubµTrack verfolgt. Die Kombination von FFF und RM zu Projektbeginn war für die Untersuchung von Nanoplastik vollständig unerforscht. Ebenso war der Einsatz der FFF für Nanoplastik noch nicht erschlossen. Nennenswert ist hier lediglich eine Proof-of-Principle-Studie vom September 2017, die die Anwendbarkeit von AF4-UV-MALS für künstlich hergestelltes Nanoplastik zeigte [46].

Ziel

Ziel des Teilprojekts war die Etablierung von analytischen Methoden und Verfahren zur Trennung, Größenbestimmung und chemischen Identifizierung der Referenzpartikelsysteme aus AP1, sowie deren Evaluierung hinsichtlich ihrer Eignung zur Untersuchung der potentiellen Nanoplastik-Belastung einfacher Realproben (Mineralwasser).

Plan/Durchführung

Zur Umsetzung der definierten Ziele kam die FFF insbesondere in Form der Asymmetrischen Fluss FFF (AF4) sowie der Zentrifugal FFF (CF3) gekoppelt an konzentrationssensitive (UV/Vis-Detektor) und grössenselektive Detektoren (MALS, DLS) zum Einsatz. Weiterhin ermöglichte die Sammlung von grössenaufgetrennten Fraktionen aus der FFF auch eine nach-geschaltete offline-Untersuchung der Partikelsysteme mit der bereits in AP1 etablierten Elektronenmikroskopie (REM) sowie in Kopplung mit der Raman Mikrospektroskopie (RM-REM) für eine morphologische und chemische Identifizierung. Darüber hinaus wurden erste Vorarbeiten für die in AP 2.4 angestrebte Online-Kopplung von Feldflussfraktionierung (FFF) und Raman-Mikrospektroskopie (RM) durchgeführt, insbesondere der Versuch der Aufkonzentrierung von Nanoplastik aus einfachen Realproben (Mineralwasser) mit Hilfe der AF4.

Ergebnisse und Diskussion

Die Referenzpartikelsysteme aus AP1 konnten sowohl mit der AF4-UV-MALS-DLS als auch der CF3-UV-MALS-DLS-Kopplung nach Entwicklung geeigneter Trennmethode erfolgreich grössen- (AF4) bzw. massegetrennt (CF3) und charakterisiert werden. Untersucht wurden diese Partikelsysteme hierbei in mehreren Matrices (1 mM KCl, 0.2% Natrium-dodecylsulfat (SDS), 0.2% Novachem (wässrige Lösung aus Salzen und nicht-ionischen Tensiden für FFF-Applikationen vertrieben durch die Postnova Analytics GmbH)) um nicht nur die optimalen Trennbedingungen (insbesondere Peakform, Verlauf des MALS-Signals und Wiederfindung) einzustellen, sondern auch den Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Stabilität der Partikelsysteme zu untersuchen. Die erhaltenen Erkenntnisse lieferten darüber hinaus frühzeitig wichtige Informationen im Hinblick auf die Durchführbarkeit einer Kopplung der FFF mit der RM sowohl im offline- als auch im online-Modus, welche im weiteren Verlauf dieses Berichts noch detailliert besprochen wird.

Beispielhaft für die Charakterisierung der Mikro- und Nanoplastik-Referenzpartikelsysteme soll hier die erfolgreiche Trennung und Größencharakterisierung der PS 500 Referenzpartikel mittels AF4-UV-MALS-DLS und CF3-UV-MALS-DLS gemessen in 0.2% Novachem gezeigt werden (Abbildung 21).

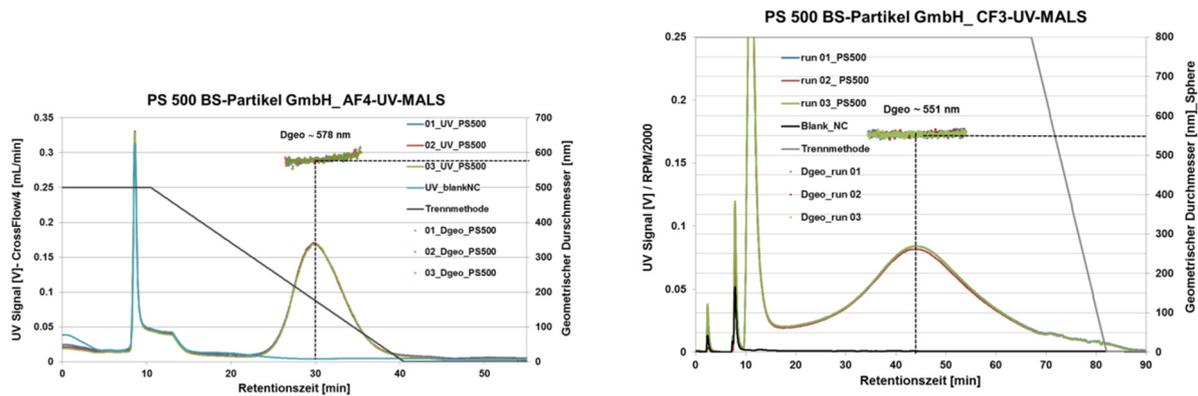


Abbildung 21: AF4-UV-MALS- und CF3-UV-MALS-Fraktogramm der PS 500 Referenzpartikel von BS-Partikel gemessen in 0.2% Novachem. Die aus dem DLS-Detektor Information zur hydrodynamischen Größe der untersuchten Partikel ist aus Übersichtsgründen hier nicht dargestellt.

Eine detaillierte Auflistung aller erhaltenen Ergebnisse (Größe, Wiederfindung) aus diesen Studien inklusive einem Vergleich mit der nominellen Größe laut Hersteller, den gemessenen Daten aus der batch-DLS sowie aus der elektrophoretischen Lichtstreuung (ELS, Zetapotential) findet sich in abelle 5. Sie zeigen eine sehr gute Übereinstimmung der erhaltenen Größen innerhalb der eingesetzten (orthogonalen) Verfahren bei guten bis sehr guten Wiederfindungen für die angewandten FFF-Methoden. Augenscheinlich ist hierbei auch der Anwendungsbereich der jeweiligen FFF-Subtechnik. Während die AF4 insbesondere für die Analytik der Größenfraktionen von 1-1000 nm geeignet ist, ermöglicht die CF3 auch die Charakterisierung von Partikelsystemen > 1000 nm.

Über die reine Charakterisierung der Mikro-, Submikro- und Nanoplastik-Referenzpartikelsysteme von BS-Partikel hinaus und parallel zu den Arbeiten zur Online-Kopplung von FFF-Raman wurde auch die Offline-Kopplung von FFF mit der etablierten Raman-REM Methode erfolgreich umgesetzt.

Hierzu wurden zunächst Mischungen von Standardpartikeln (PS 100 nm, PS 250 nm, PS 500 nm, PMMA 500 nm) jeweils durch AF4 und CF3 getrennt und zu entsprechenden Elutionszeiten im Fraktogramm der Solventfluss gesammelt. Diese, die getrennten Partikel enthaltenden Fraktionen (FR1 – FR4), wurden anschließend durch RM-REM auf chemische Identität und Morphologie analysiert. Abbildung 22 zeigt dies exemplarisch für die Trennung mit AF4. Dort ist zu sehen, dass die Partikel der drei Größenklassen getrennt sind, nicht jedoch die Polymerart. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass das Trennkriterium der AF4 auf der Diffusivität der Partikel basiert, welche kaum von der Polymerart beeinflusst ist. Weiterhin sind durch die Größendaten des MALS-Detektors

die Partikelgrößen jeder Fraktion zugänglich. Die zugeordneten Bilder zeigen die REM-Visualisierung der Partikel sowie das optische Bild des RM. Letzteres wurde im Dunkelfeldmodus aufgenommen, welcher den Kontrast und somit die Erkennbarkeit der Partikel erhöht. Raman-spektroskopisch wurden für jede Fraktion diverse Partikel analysiert und die Polymerart bestätigt. Für die, durch AF4 aufgrund ihrer vergleichbaren hydrodynamischen Größe nur schwer zu trennenden PS 500 nm und PMMA 500 nm kann eine eindeutige Unterscheidung gegeben werden.

abelle 5: Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse bei der Charakterisierung der verschiedenen PS-Partikelsysteme von BS-Partikel (Dh: hydrodynamischer Durchmesser; Dgeo: geometrischer Durchmesser aus Umrechnung des MALS-Gyrationsradius Rg über Sphere-Modell - $D_{geo} = 2 \times R_g / 0.775$; NC: Novachem; KCl: Kaliumchlorid; SDS: Natriumdodecylsulfat). ELS: Elektrophoretische Lichtstreuung.

Partikel	Größe laut Hersteller	Größe (batch-DLS)	Größe (AF4-MALS-DLS)	Größe (CF3-MALS-DLS)	Wiederfindung [%]	Zeta Potential aus ELS
PS 100	107 nm	114 nm (D _h) (0.2% NC)	96 nm (D _{geo})	103 nm (D _{geo})	AF4: 100%	-58.5 mV (0.2% NC)
		109 nm (D _h) (KCl 1mM)	120 nm (D _h)		CF3: 85%	-52.3 mV (KCl 1 mM)
PS 500	504 nm	588 nm (D _h) (0.2% NC)	578 nm (D _{geo})	551 nm (D _{geo})	AF4: 100%	-66 mV (0.2% NC)
		588 nm (D _h) (KCl 1mM)			CF3: 72.5%	-75 mV (KCl 1 mM)
PS 1.4	1400 nm	1.67 µm (D _h) (0.2% NC)	nicht bestimmbar	1.67 µm (D _{geo})	CF3: 71.2%	-19 mV (0.2% NC)
		1.78 µm (D _h) (KCl 1mM)				-14 mV (KCl 1 mM)
		2.1 µm (D _h) (0.2% SDS)				-50 mV (0.2% SDS)
PS 10	9600 nm	10.8 µm (D _h) (0.2% NC)	nicht bestimmbar	nicht bestimmt	nicht bestimmt	-19 mV (0.2% NC)
		11.1 µm (D _h) (KCl 1mM)				-18 mV (KCl 1 mM)
		10.3 µm (D _h) (0.2% SDS)				-51 mV (0.2% SDS)

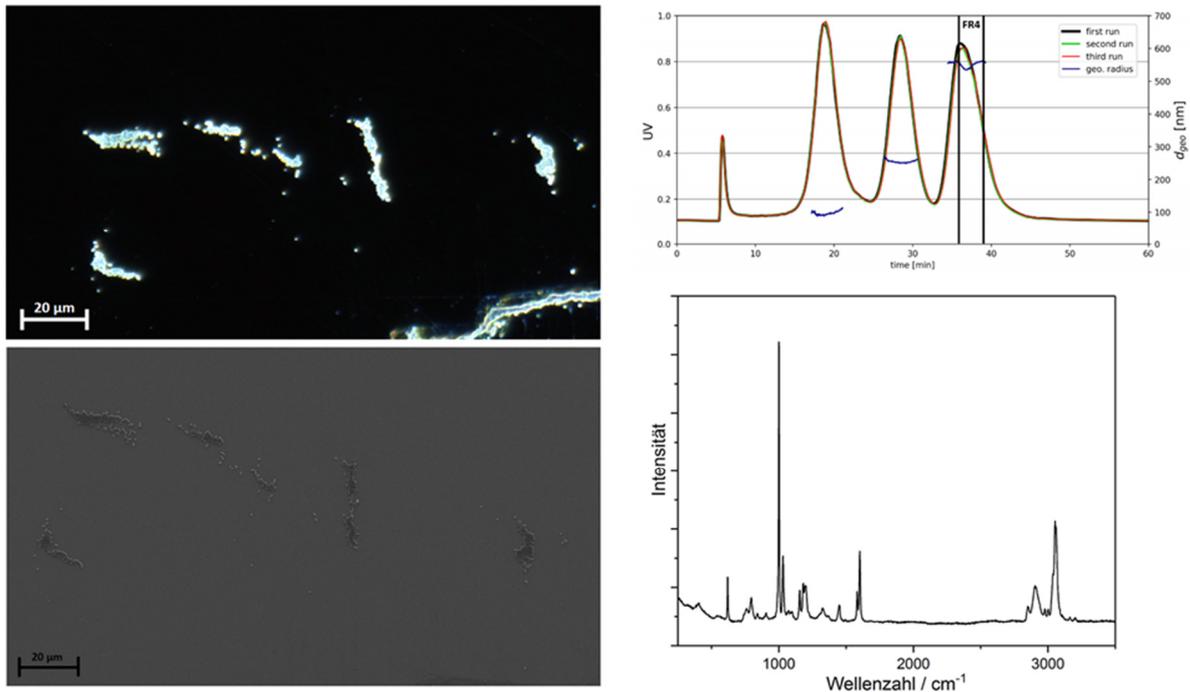


Abbildung 22: AF4-Trennung von PS 100 nm, PS 250 nm, PS 500 nm und PMMA 500 nm (rechts oben). Exemplarisch ist die Untersuchung einer der gesammelten Fraktionen dargestellt. Die gesammelte Fraktion (FR4) wurde durch Raman-Mikrospektroskopie im Dunkelfeld (links oben) und REM (links unten) analysiert. An einzelnen Partikeln aufgenommene Spektren bestätigen die Polymerart (rechts unten).

Die Offline-Kopplung von FFF und RM-REM wurde ebenso erfolgreich für die CF3-Trennung desselben Gemischs angewendet. Für diese ist hier die Trennbarkeit von PS 500 nm und PMMA 500 nm durch das Ausnutzen der unterschiedliche Dichte (PS: 1.05 g/mL PMMA: 1.18 g/mL) der beiden Polymerpartikelsysteme gut gegeben, was auch durch die Raman-Analytik der jeweiligen Fraktionen bestätigt wird. Abbildung 23 zeigt dies in vergleichbarer Weise. An einer exemplarisch dargestellten Fraktion, welche zur Elutionszeit $t = 80$ min bis $t = 85$ min gesammelt wurde, wird die RM-REM Untersuchung illustriert. Das optische Mikroskopbild im Dunkelfeld erlaubt die einfache Erkennung der Partikel und deren Ansteuerung für die spektroskopische Messung und die zugehörige REM-Bildgebung liefert die hochauflösende morphologische Charakterisierung der Partikel. Weiterhin können die Größen der Partikel der jeweiligen Fraktion durch die MALS-Daten bestimmt werden. Durch die Raman-spektroskopische Identifizierung der jeweiligen Fraktionen, kann die Polymerart der eluierenden Partikel bestimmt werden. Was hier die bessere Trennung von PS 500 nm und PMMA 500 nm durch CF3 belegte.

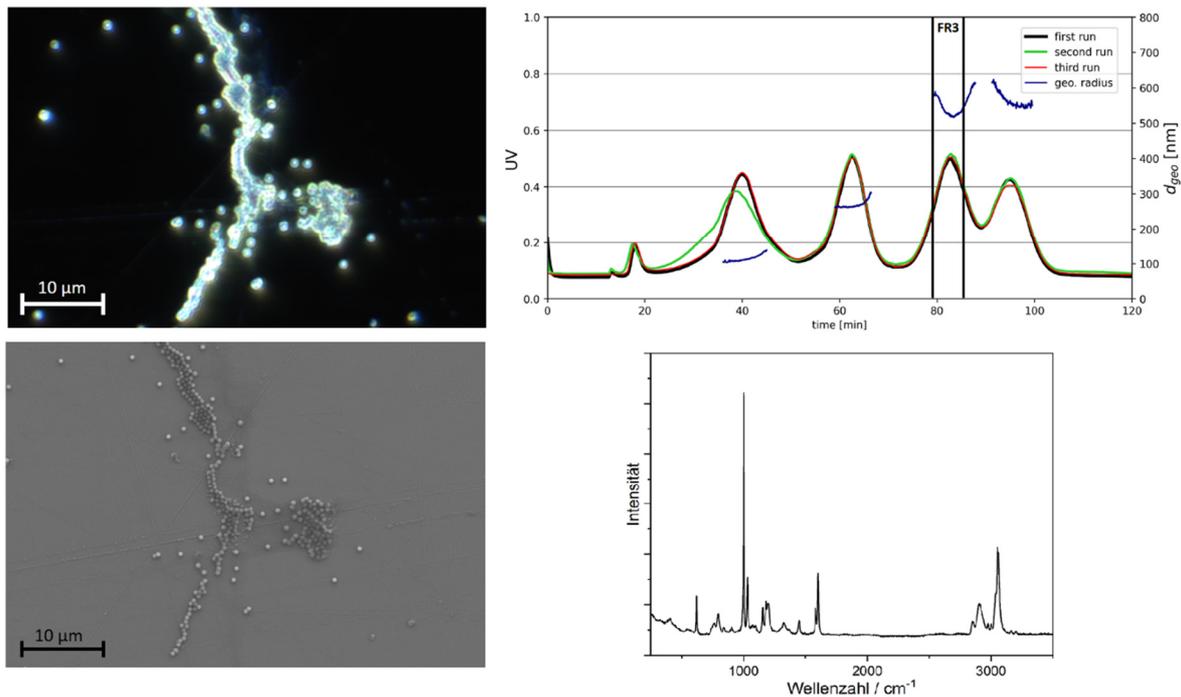


Abbildung 23: CF3-Trennung von PS 100 nm, PS 250 nm, PS 500 nm und PMMA 500 nm (rechts oben). Exemplarisch ist die Untersuchung einer der gesammelten Fraktionen dargestellt. Die gesammelte Fraktion (FR3) wurde durch RM im Dunkelfeld (links oben) und REM (links unten) analysiert. An einzelnen Partikeln aufgenommene Spektren bestätigen die Polymerart (rechts unten).

Da sich die CF3, mit ihrem Arbeitsbereich von ca. 10 nm bis 50 µm, auch für Plastikpartikel im unteren Mikrometerbereich eignet, wurde diese Anwendbarkeit ebenfalls untersucht. Anhand eines Partikelgemischs von PS 1,4 µm und PS 9,6 µm (BS-Partikel GmbH) wurde eine CF3-Trennung mit anschließender Sammlung der Fraktionen für die nachfolgende RM-REM-Untersuchung durchgeführt. Abbildung 24 zeigt dies exemplarisch für eine der Fraktionen. Die optischen Dunkelfeldbilder und die REM-Bilder visualisieren die Partikel und die Raman-spektroskopische Untersuchung ergibt die chemische Identität. Damit konnte gezeigt werden, dass die hier entwickelte Kopplung auch für Mikroplastik bis ca. 10 µm anwendbar ist.

Diese Arbeiten demonstrieren die Anwendbarkeit der entwickelten Kopplung für Plastikpartikel im Mikro- und Submikrometerbereich. Durch die zwei unterschiedlichen FFF-Varianten kann spezifisch auf jeweilige Anwendungen und deren Anforderungen eingegangen werden und die optimale Trennung durchgeführt werden, da die anschließenden RM-REM-Analytik für beide Varianten gut anwendbar ist.

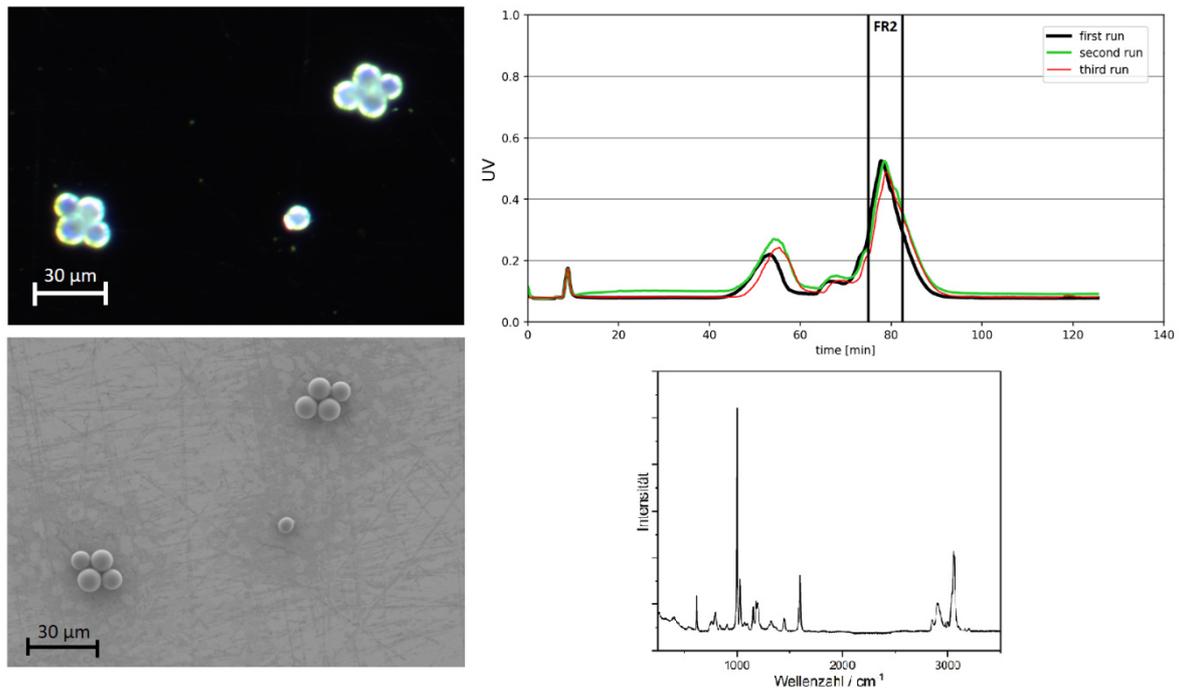


Abbildung 24: CF3-Trennung von PS 1,4 µm und PS 9,6 µm (rechts oben). Exemplarisch ist die Untersuchung einer der gesammelten Fraktionen dargestellt. Die gesammelte Fraktion (FR2) wurde durch RM im Dunkelfeld (links oben) und REM (links unten) analysiert. An einzelnen Partikeln aufgenommene Spektren bestätigen die Polymerart (rechts unten).

Anschließend wurden Untersuchungen zur Anwendbarkeit für sekundäres Nanoplastik durchgeführt. Nach o.g. Methode (AP1) wurde fragmentiertes Submikroplastik aus kommerziellen PET-Mineralwasserflaschen hergestellt, indem diese zerkleinert für 120 Stunden im Ultraschallbad mechanischer Belastung ausgesetzt wurde und anschließend die erhaltenen Suspensionen durch eine Filtermembran mit 1 µm Porengröße filtriert wurde. Hierbei zeigte sich, dass eine präzise Einstellung des Cross-Flows einen großen Einfluss auf die Elution der Submikro- und Nanoplastikpartikel hat. Ferner hat eine Untersuchung von gesammelten Fraktionen zu verschiedenen Elutionszeiten (derselben Probe) mit REM gezeigt, dass das im Laufmittel verwendete Tensid (Novachem) einen Einfluss auf die Partikelablagerung auf dem Raman/REM Probenträger hat. Hier sammeln sich Partikel in kreisförmigen Agglomeraten, was auf die Bildung von Mizellen hinweist. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Fraktionen einer sekundären Submikro- und Nanoplastik-Probe mittels REM analysierbar sind.

Abschließend wurde die etablierte Kopplung von FFF, RM und REM für die Analyse einer Trinkwasserprobe (Stilles Mineralwasser, Mehrweg-PET-Flasche) eingesetzt. Das in dieser Probe vermutete Nanoplastik ist in sehr geringer Konzentration zu erwarten, was

sich daran erkennen lässt, dass die direkte Injektion der Probe in die AF4 kein von der Baseline verschiedenes Signal erzeugt. Daher war es notwendig, eine Methode zur Aufkonzentrierung zu erarbeiten.

Hierzu wurde der Fokussierschritt der AF4 genutzt, bei dem die injizierten Partikel, durch einen Gegenstrom in ihrem Ort gehalten werden, während das Solvent durch die semipermeable Membran am Kanalboden abgepumpt wird. Dieser Schritt ist Teil der typischen FFF-Trennung und dient der Relaxation, sprich der Einstellung des Gleichgewichts von Trennfeld und Partikelbeweglichkeit. Hier wurde er zudem genutzt, um größere Volumina der Probe zu injizieren. Das vorhandene Gerät erlaubt standardmäßig die Injektion von maximal 0,1 mL und typische Injektionsmodule kommerzieller FFF-Systeme ermöglichen Volumina bis zu 5 mL. Um diese Grenze zu erweitern, wurde der Solventfluss in der Art geändert, dass die Probe direkt von der Elutionsmittelpumpe angesogen wird. Somit war es möglich bis zu 300 mL zu injizieren bevor bei noch größeren Volumina viel Analyt verloren wurde.

Die Trinkwasserprobe wurde durch eine Filtermembran mit Porengröße 2 μm filtriert, um die Mikroplastikpartikel abzuscheiden. Weiterhin wurden 1,1 Äquivalente EDTA-Lösung, um die enthaltenen Kationen zu maskieren, und 0,05% des üblichen Tensids Novachem hinzugegeben. Anschließend wurden 300 mL aufkonzentriert und mittels AF4 getrennt. Das erhaltene Fraktogramm ist in Abbildung 25 dargestellt. Hier zeigt sich (im UV Signal) eine eluierende Fraktion bei Elutionszeiten zwischen 322 min und 327 min. Das zugeordnete MALS-Signal ermöglicht die Bestimmung der Partikelgrößen (wie oben beschrieben der geometrische Durchmesser berechnet aus dem Gyrationradius R_g), welche sich im Größenbereich von 140 nm bis 190 nm bewegen und durch den stetigen Anstieg die Polydispersität der Partikel anzeigen.

Von dieser Probe wurde im o.g. Zeitfenster die Fraktion gesammelt und mittels RM-REM untersucht, was in Abbildung 26 dargestellt ist. Auch hier ergänzen die hochauflösenden REM-Bilder die optischen Mikroskopbilder in der morphologischen Charakterisierung. Die Raman-spektroskopische Untersuchung von mehreren ($n=22$) Einzelpartikeln zeigt in fast allen Fällen ein dem Polyethylen ähnliches Spektrum, welches allerdings nicht eindeutig auf PE-Partikel in der Probe zugeordnet werden kann, da das verwendete Tensid ähnliche Signale erzeugt. Aufgrund dieser PE Signale und der Absenz anderer Plastiksarten, kann die Präsenz von Nanoplastik nicht eindeutig belegt werden. Hier werden zukünftige Experimente Aufschluss geben, da in den vorgelegten Arbeiten die

Anwendbarkeit der RM-REM-Kopplung für Realproben dargelegt wurde. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen eindeutig, dass eine Aufkonzentrierung der Probe sowie eine Anreicherung der Plastikpartikel (Erhöhung des Plastik/Nicht-Plastik-Verhältnisses) essentiell für die zukünftigen Analysen von Realproben sind.

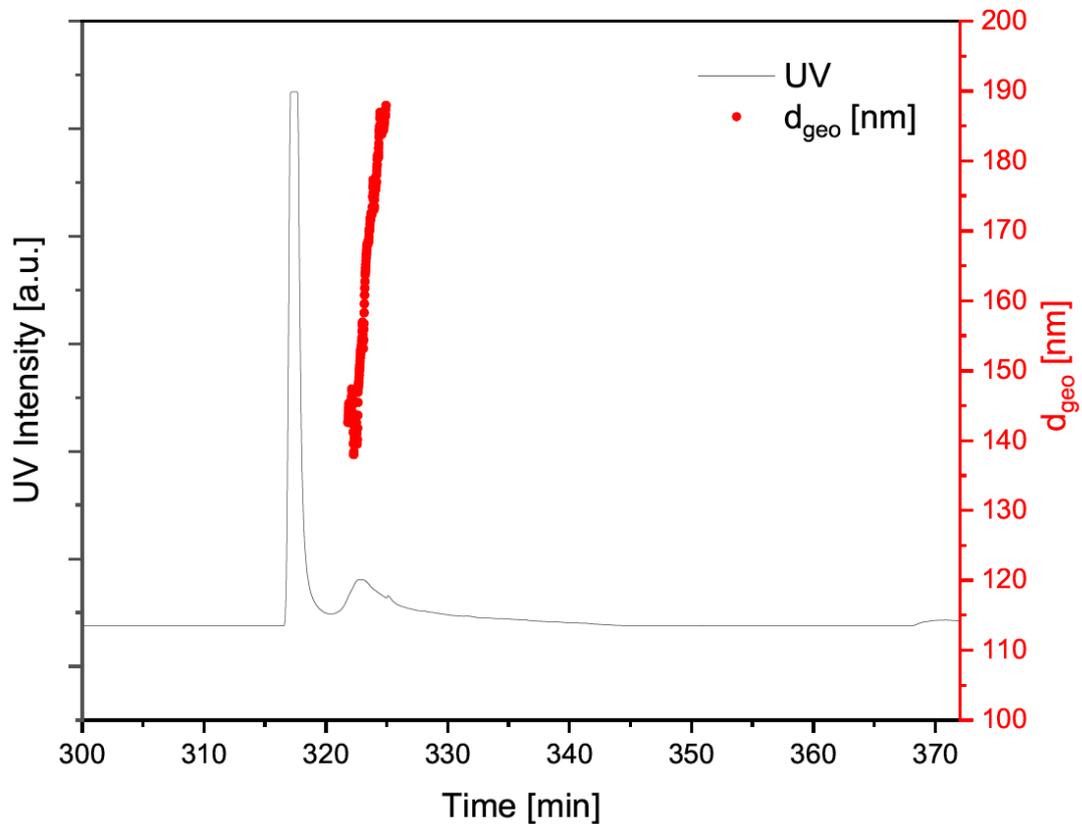


Abbildung 25: AF4-UV-MALS-Fraktogramm der aufkonzentrierten Trinkwasserprobe (300 mL Injektionsvolumen). Es ist zu berücksichtigen, dass die gezeigten geometrischen Durchmesser aufgrund der Irregularität der Partikel Schwankungen unterworfen sind.

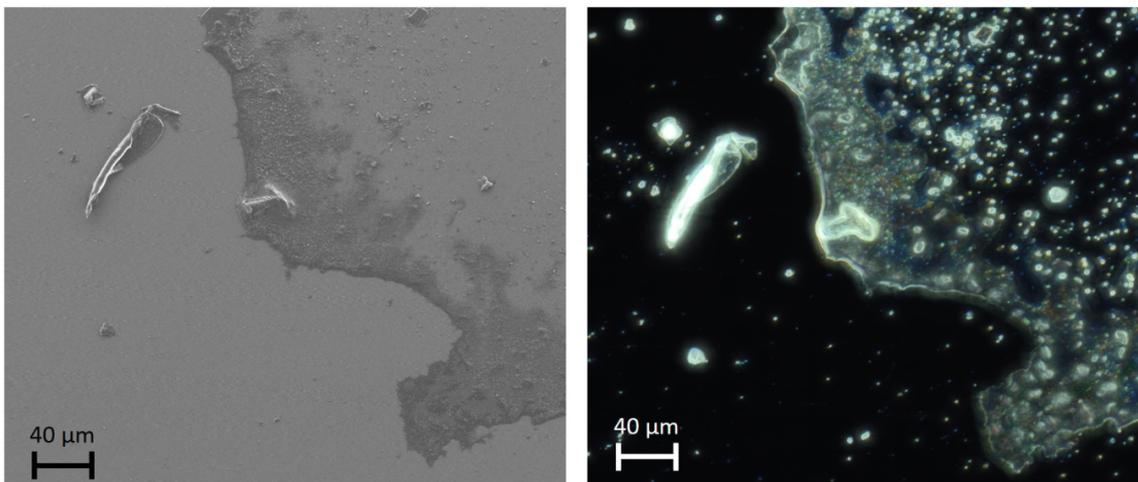


Abbildung 26: RM-REM Bildgebung der gesammelten Fraktion der aufkonzentrierten Trinkwasserprobe.

Von dieser Probe wurde im o.g. Zeitfenster die Fraktion gesammelt und mittels RM-REM untersucht, was in Abbildung 26 dargestellt ist. Auch hier ergänzen die hochauflösenden REM-Bilder die optischen Mikroskopbilder in der morphologischen Charakterisierung. Die Raman-spektroskopische Untersuchung von mehreren ($n=22$) Einzelpartikeln zeigt in fast allen Fällen ein dem Polyethylen ähnliches Spektrum, welches allerdings nicht eindeutig auf PE-Partikel in der Probe zugeordnet werden kann, da das verwendete Tensid ähnliche Signale erzeugt. Aufgrund dieser PE Signale und der Absenz anderer Plastiksarten, kann die Präsenz von Nanoplastik nicht eindeutig belegt werden. Hier werden zukünftige Experimente Aufschluss geben, da in den vorgelegten Arbeiten die Anwendbarkeit der RM-REM-Kopplung für Realproben dargelegt wurde. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen eindeutig, dass eine Aufkonzentrierung der Probe sowie eine Anreicherung der Plastikpartikel (Erhöhung des Plastik/Nicht-Plastik-Verhältnisses) essentiell für die zukünftigen Analysen von Realproben sind.

Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die in AP1 hergestellten Referenzpartikelsysteme konnten mit Hilfe der FFF in Online-Kopplung mit der UV-, MALS- und DLS-Detektion erfolgreich getrennt und gröÙenselektiv charakterisiert werden. Weiterhin konnte die Anwendbarkeit der Offline-Kopplung von FFF und RM-REM für die Nanoplastik-Analyse demonstriert werden. Der initiale Schritt mit synthetischen Partikeln definierter Größe zeigt, dass diese getrennt und anschließend visualisiert und chemisch identifiziert werden können. Dies wurde sowohl für die AF4 in deren optimalen Anwendungsbereich (1 nm – 1000 nm) und die CF3 (100 nm – 20 µm) gezeigt. Hier erwies sich die CF3 auch für die Anwendung für MP im niedrigen Mikrometerbereich geeignet (1 µm – 10 µm). Parallel erschienen zu diesem Thema unabhängige Arbeiten, welche eine AF4-basierte Methode publizierten, die primäres Nanoplastik nach Trennung offline mittels Py-GC-MS identifizierte [47]. Dies unterstreicht das Potential der FFF, gekoppelt mit geeigneter chemischer Identifizierung für die Untersuchung für Nanoplastik. Jüngst hat sich AF4-UV-MALS als Methode zur Charakterisierung von Nanoplastik Referenzpartikeln etabliert [48,49] und wurde auch für Nanoplastik, das aus natürlicher Matrix extrahiert wurde, eingesetzt [50–52]. Diese Anwendungen enthalten allerdings keine chemische Identifizierung, weshalb sie nur zur physikalischen Charakterisierung von Referenzpartikeln genutzt wurden.

Weiterhin konnte in den durchgeführten Arbeiten die Anwendbarkeit der Offline-Kopplung demonstriert werden, indem eine Probe von fragmentiertem Nanoplastik und eine

Realprobe analysiert wurden. Allerdings konnte der Nachweis von Nanoplastik in besagter Trinkwasserprobe noch nicht erreicht werden. Dies deutet drauf hin, dass eine Aufkonzentrierung bzw. Anreicherung der (Plastik-)Partikel für die zukünftigen Analysen von Realproben notwendig ist.

Entwicklung einer automatisierten Probennahme und Aufbereitung sowie einer Online-Kopplung von FFF und RM zur schnellen und automatisierten Analytik

Partner: Postnova & TUM-IWC

Einleitung

Komplementierend zur Offline-Kopplung von FFF und RM wurde auch die Online-Kopplung der beiden Techniken durchgeführt. Dies steht vor dem Hintergrund, dass die FFF allgemein eine Multidetektortechnik ist, bei welcher eluierende Partikelfractionen direkt im Anschluss an den Trennkanal untersucht werden. Unter den etablierten Detektoren (u.a. MALS, DLS, UV, Brechungsindex oder ICP-MS) existierte bisher jedoch keine Möglichkeit der (Raman) spektroskopischen Identifizierung. Raman Spektroskopie ist jedoch eine Methode, welche sich aufgrund ihrer Insensitivität gegenüber Wasser sehr gut für die Anwendung von wässrigen Proben und in Flusszellen eignet.

Ziele

Ziel war es, die Entwicklung einer Online-Kopplung von RM und FFF durch die Konstruktion einer Flusszelle auf Basis des optischen Trappings, welche die Sensitivitätsprobleme üblicher Raman-Flusszellen löst. Somit entstehen Methoden zur schnellen und automatisierbaren Analytik von Mikro- und Nanoplastikpartikeln aus wässrigen Proben. Darüber hinaus wurde die Eignung der AF4 für die Aufkonzentrierung von Nanoplastik untersucht.

Plan/Durchführung

In enger Zusammenarbeit zwischen dem TUM-IWC und der Fa. Postnova Analytics GmbH wurde eine Flusszelle für die Online-Kopplung der FFF und der RM entwickelt.

Die initiale Konzeptualisierung (Abbildung 27), Entwicklung, Fertigstellung und Testung der Flusszelle wurde dabei durch die Fa. Postnova durchgeführt.

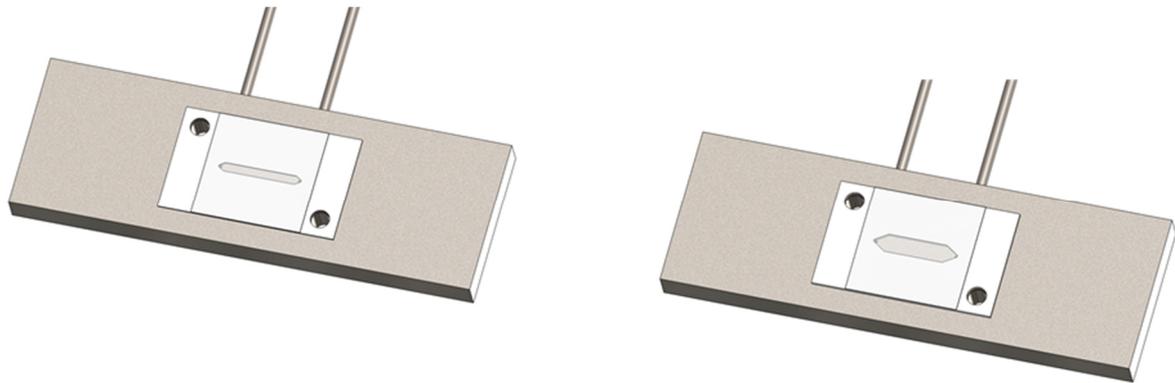


Abbildung 27. Erste Designs für eine AF4-Raman-Flusszelle.

Ergebnisse und Diskussion

Für die Realisierung der Kopplung der FFF mit der RM wurden zunächst unterschiedliche Flusszellendesigns entwickelt. Neben verschiedenen Kanalhöhen und -breiten wurden dabei auch unterschiedliche Oberflächenmaterialien (Edelstahl) bzw. Beschichtungen (Gold) getestet. In Abbildung 28 ist von links nach rechts zunächst die polierte Gold-Beschichtung einer Flusszelle, zwei Flusszellendesigns (gold-beschichteter Edelstahl und aufgerauter Edelstahl, Kanalhöhe je 250 μm , Kanalbreite je 1.5 mm, Kanallänge je 15 mm) sowie die aufgeraute Oberfläche der Edelstahlzelle zu sehen.

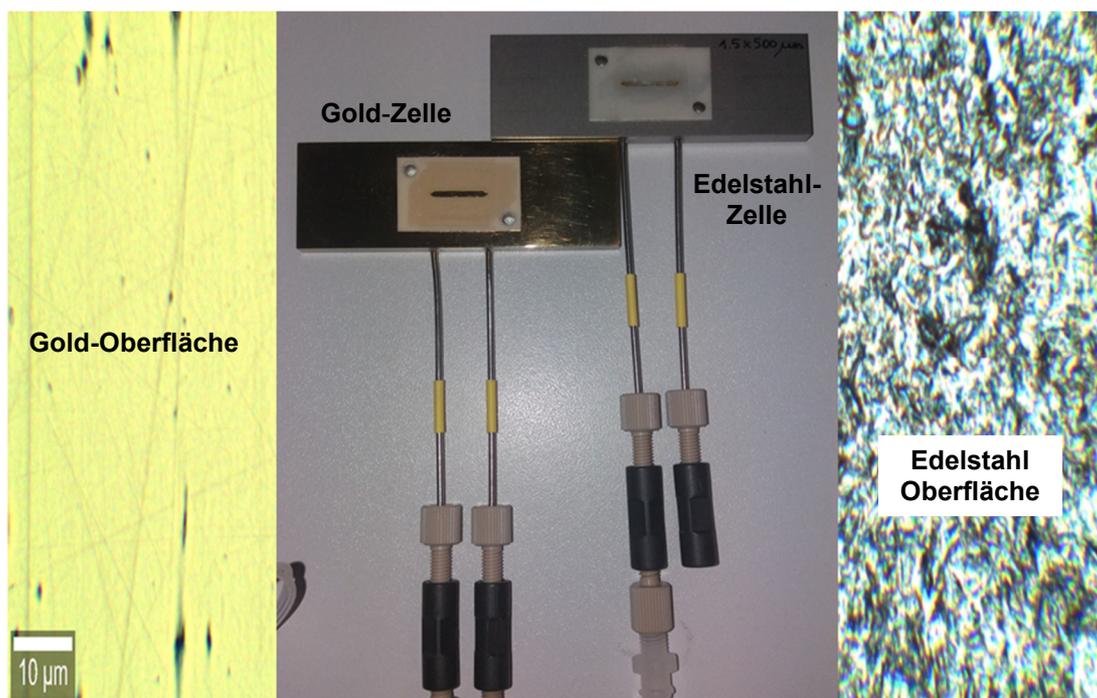


Abbildung 28: Von links nach rechts: Polierte Oberfläche der gold-beschichteten Edelstahl-Flusszelle, zwei Flusszellendesigns im Vergleich und die aufgeraute Oberfläche der Edelstahl- Flusszelle

Erste Tests der verschiedenen Flusszellendesigns hinsichtlich ihrer Eignung für einen Betrieb bei kontinuierlichem Flüssigkeitsstrom wurden zunächst anhand von sogenannten Direktinjektionen mit 5 μm und 1,4 μm großen PS-Partikelstandards überprüft, bei der die Probe über ein manuelles Injektionsventil und eine HPLC-Pumpe in die Flusszelle eingebracht wurde, welche unterhalb des Raman-Mikroskops befestigt wurde. Untersucht wurde dabei sowohl der Einfluss der Fokussierposition des Lasers in der Zelle als auch der Einfluss der Beschichtung auf das Messsignal. Dabei zeigte sich, dass sich die Güte des Messsignals mit zunehmender Nähe der Fokussierposition des Lasers zum Boden der Flusszelle verbesserte (Abbildung 29 links). Darüber hinaus lieferte die polierte, goldbeschichtete Zelle im Flussmodus wesentlich bessere Raman-Signale knapp oberhalb der Oberfläche ohne die Probe auf dem Zellboden festzubrennen, was sich auf eine bessere Wärme-Ableitung im Vergleich zur Edelstahl-Zelle zurückführen lässt. Getestet wurden dabei PS 1,4 μm Partikel in drei unterschiedlichen Konzentrationen (10 mg/L - 1000 mg/L; 500 μL Injektionsvolumen, 0,2 mL/min Fluss), wobei für alle drei Konzentrationen ein stabiles und wiederholbares Raman-Signal im Fluss erhalten werden konnte (Abbildung 29 rechts). Dementsprechend wurde im weiteren Projektverlauf auf die gold-beschichtete Edelstahl-Flusszelle gesetzt.

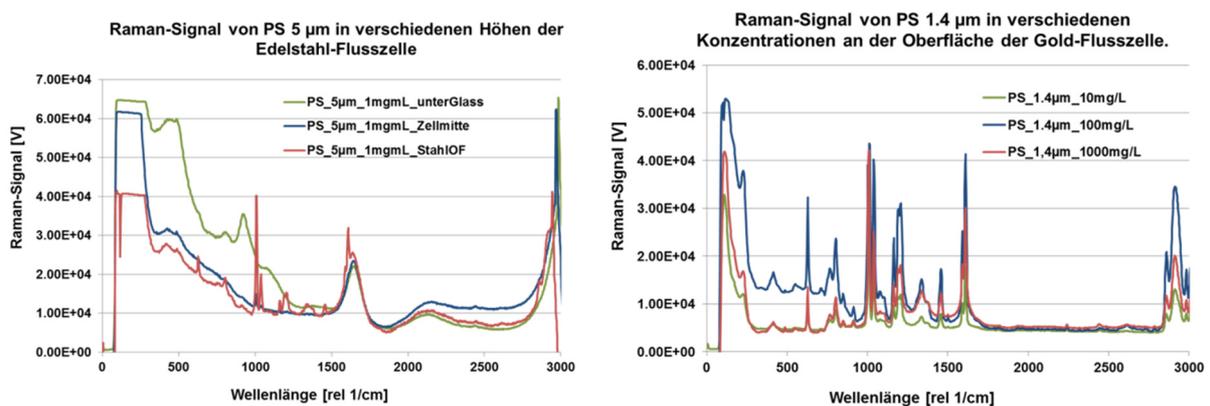


Abbildung 29: Links: Raman-Spektren von PS 5 μm Partikeln gemessen in verschiedenen Höhen oberhalb des Bodens der Edelstahl-Flusszelle im Flussmodus; rechts: Raman-Spektren von PS 1,4 μm Partikeln in unterschiedlichen Konzentrationen in der polierten, goldbeschichteten Edelstahl-Flusszelle im Flussmodus gemessen in Kanalbodennähe.

Nach erfolgreicher Entwicklung und Testung der polierten, gold-beschichteten Edelstahl-Flusszelle im Flussmodus über Direktinjektionen wurde nun auch die Kopplung mit der FFF zunächst in Form der AF4 realisiert. Der entsprechende experimentelle Aufbau dieser ersten Kopplung ist in Abbildung 30 dargestellt.

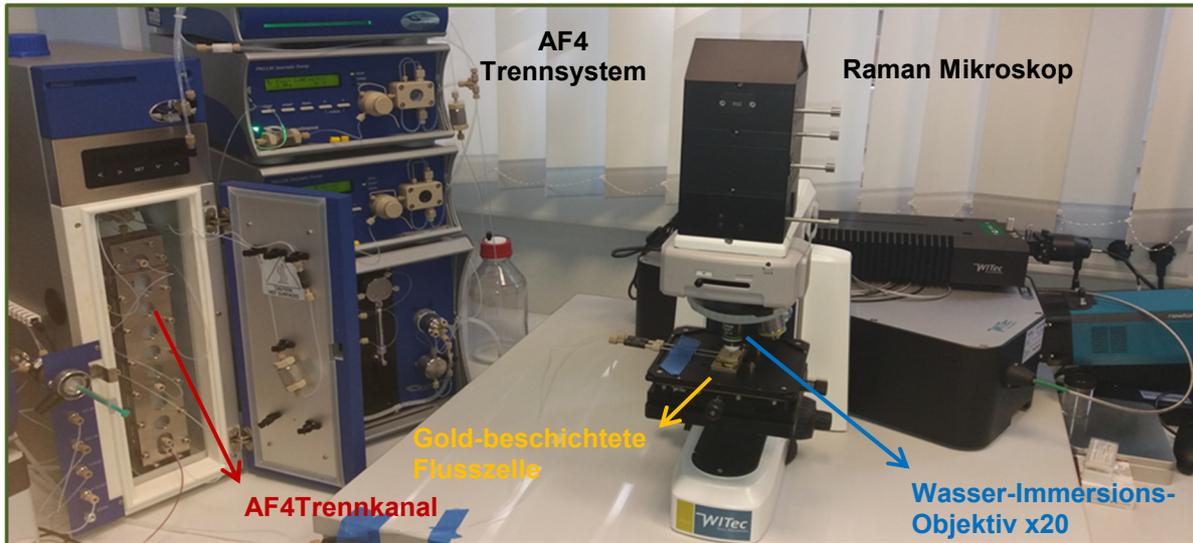


Abbildung 30: Erster experimenteller Aufbau der Kopplung der AF4 (Postnova AF2000 MT) mit dem Raman Mikroskop (WITec alpha access 300) über die polierte, gold-beschichtete Edelstahl-Flusszelle im Postnova Forschungslabor.

Die Funktionsfähigkeit der AF4-Raman-Kopplung wurde dabei zunächst anhand von 500 nm großem PS Referenzpartikeln erfolgreich getestet (Abbildung 31), bevor sie anschließend im Rahmen eines zweiwöchigen Aufenthalts des Doktoranden des TUM-IWC bei der Fa. Postnova final validiert wurde.

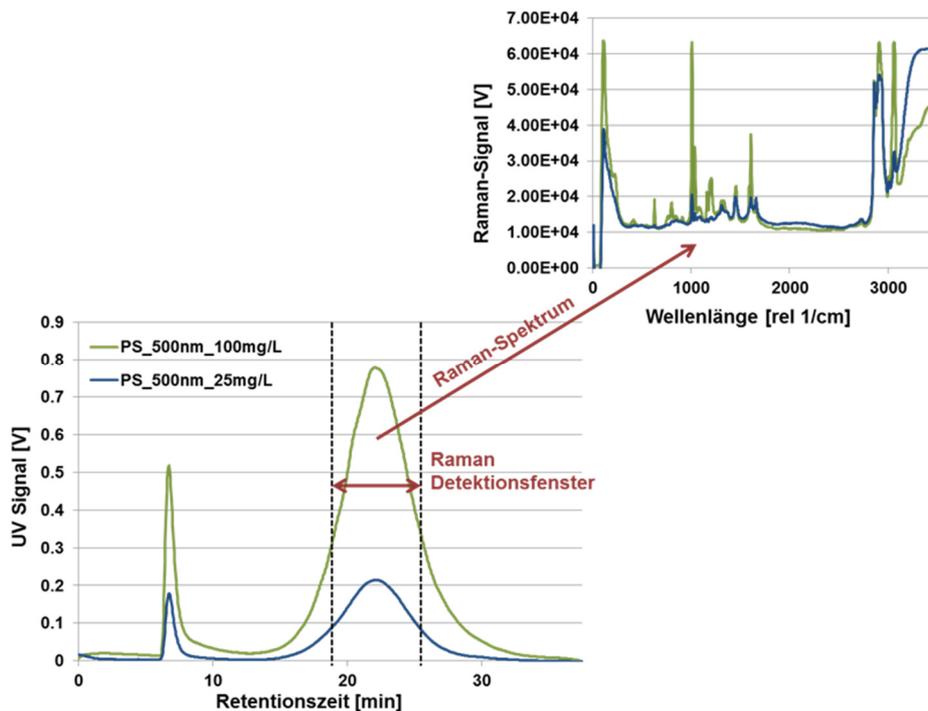


Abbildung 31.: Erstes AF4-UV-Raman-Fraktogramm von PS 500 nm Partikeln gemessen mit Hilfe der gold-beschichteten Edelstahl-Flusszelle.

Im weiteren Verlauf dieser Zusammenarbeit konnte darüber hinaus auch die Funktionsweise der Flusszelle durch Untersuchung verschiedener physikalischer Parameter theoretisch nachvollzogen und beschrieben werden.

Die Funktionsweise der Flusszelle wurde auf den Effekt der „optischen Pinzette“ zurückgeführt, bei dem das Laserlicht des RM durch die Mikroskopobjektive in einem Fokuspunkt mit starkem Intensitätsgefälle gebündelt wird. Dieser Gradient erzeugt eine optische Kraft auf Mikropartikel, welche diese in das Zentrum des Fokuspunkts zieht. Dies hat zur Folge, dass die Partikel längere Zeit in Wechselwirkung mit dem Raman-Laser stehen und genügend Signal erzeugt wird, so dass eine ausreichende Spektrenerzeugung möglich ist. Wie in Abbildung 32 dargestellt ist, stehen die Partikel hier in einem Kräftegleichgewicht, welches sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt: Die rücktreibende optische Gradientenkraft gleicht die Scherkräfte des Solventflusses aus. Hinzu kommt noch ein destabilisierender thermischer Effekt, welcher die Partikel auch aus dem Fokuspunkt bewegt. Zuletzt erfahren die Partikel noch die in Laserausbreitungsrichtung vorwärtstreibende Kraft, welche zur Folge hat, dass sich Partikel an der Oberfläche der Flusszelle sammeln und nicht stabil im 3-dimensionalen Raum. Man spricht hier dann von einer 2D optischen Falle.

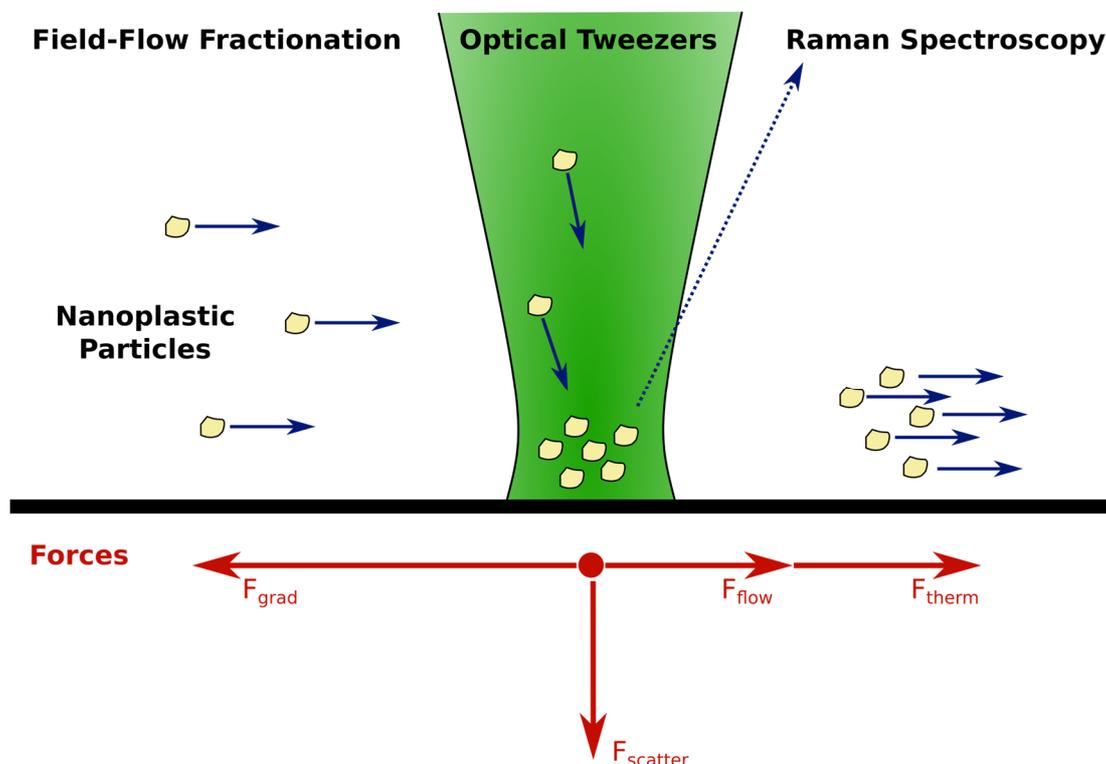


Abbildung 32: Kräftegleichgewicht in der optischen 2D Falle. Eine ausführliche Beschreibung der agierenden Kräfte ist in der aus diesem Projekt hervorgegangenen Publikation zu finden: Schwaferts et al. 2020,).

Nach umfassender experimenteller Validierung konnte gezeigt werden, dass mit der entwickelten Flusszelle Partikel im Größenbereich von 200 nm bis 5 µm und verschiedener Materialien (Polystyrol, Polymethylmethacrylat, Siliziumdioxid, Titandioxid) chemisch charakterisiert werden können. Zudem wurde durch kontinuierliches An- und Ausschalten des Lasers auch eine periodische Freilassung der optisch gehaltenen Partikel implementiert, so dass die Trenninformation der FFF nicht verloren wird.

Anschließend wurden erste Arbeiten für die Kopplung der RM-Flusszelle neben der AF4 auch an der CF3 durchgeführt und anhand von PS-Referenzpartikeln gezeigt, dass auch nach einer Fraktionierung durch FFF die Partikel zur korrekten Elutionszeit mittels RM identifiziert werden können. Dies ist in Abbildung 33 anhand der Trennung eines Partikelgemischs von 350 nm PS und 500 nm Polymethlenmethacrylat mittels AF4 dargestellt. Der abgebildete AF4-UV-MALS-Raman Plot zeigt die kombinierten Informationen der Multidetektoranalyse nach erfolgter Trennung. Das UV-Signal zeigt die Präsenz der verschiedenen eluierenden Fraktionen an, wobei die zweite Fraktion (ca. 38 min) als Schulter der vorigen, signalintensiveren (35 min) erscheint. Diese Partikel konnten mit den gewählten Flusseinstellungen folglich nicht basisliniengetrennt werden. Allerdings zeigt der Durchmesser im Plot, welcher aus den MALS-Daten erhalten wird, dass die Partikel in einer größen-sortierten Sequenz eluieren, sprich, dass korrelierend zur ersten Fraktion 350 nm Durchmesser gesehen werden und zur zweiten Fraktion 500 nm. Dies illustriert die Trennung der Partikel. Neuartig ist nun die Raman-spektroskopische Information zu den eluierenden Partikeln, welche anhand zweier charakteristischer Wellenzahlen dargestellt ist. Die Bande bei 1000 cm^{-1} ist zur Ringatmung von Polystyrol assoziiert und repräsentiert dieses im abgebildeten Plot. Das Signal bei 812 cm^{-1} repräsentiert PMMA. Es ist somit zu sehen, dass den eluierten Fraktionen zeitaufgelöst eine chemische Information zugeordnet werden kann. Folglich kann die erste Fraktion aus 350 nm Partikeln als PS identifiziert werden und die zweite 500 nm Fraktion als PMMA.

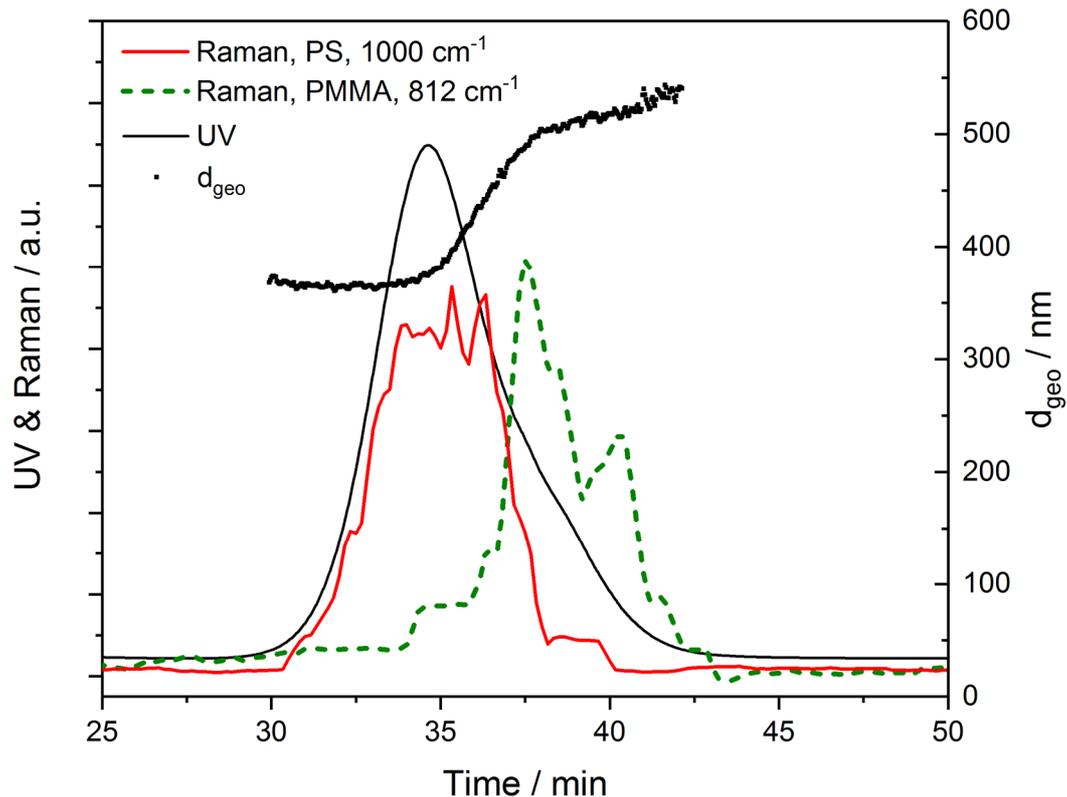


Abbildung 33: AF4-UV-MALS-Raman Plot, der durch UV Absorption (schwarze Linie) die eluierenden Fraktionen anzeigt, durch MALS (schwarze Punkte) die Größen charakterisiert und durch Raman (rote/grüne Linie) chemische Informationen gibt. [53]

Weiterhin wurde diese Online-Kopplung für die CF3 realisiert. Der damit erhaltene CF3-UV-MALS-Raman Plot (Abbildung 34) enthält vergleichbare Informationen. Hier wurde ein Gemisch von sphärischen Partikeln der Größen 350 nm PS, 500 nm PS und 500 nm PMMA getrennt. Das UV Signal zeigt drei Fraktionen (ca. 50 min, 64 min, 78 min), welche gut getrennt eluieren. Anhand der Durchmesser der Partikel (aus MALS Daten) können den Fraktionen die Größen 350 nm, 550 nm und 500 nm zugeordnet werden und die chemische Identifizierung der Raman-Kopplung zeigt anhand o.g. charakteristischer Banden für PS und PMMA, dass die ersten zwei Fraktionen PS enthalten und die letzte Fraktion PMMA. Zusammen mit den Größeninformationen zeigt sich hier eine Stärke der CF3 in der Trennung von Plastikpartikeln auf Basis ihrer Dichte, da hier das dichtere PMMA später eluiert als PS, obwohl letztere Partikel etwas größer sind als die PMMA-Partikel.

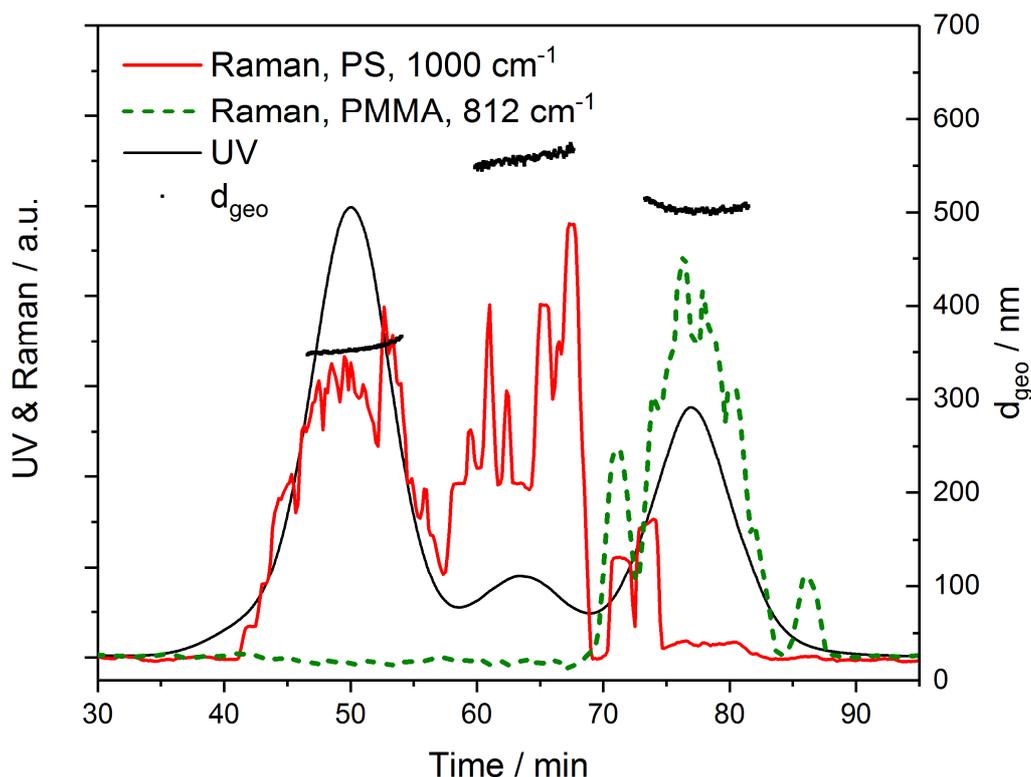


Abbildung 34: CF3-UV-MALS-Raman Plot, der durch UV Absorption (schwarze Linie) die eluierenden Fraktionen anzeigt, durch MALS (schwarze Punkte) die Größen charakterisiert und durch Raman (rote/grüne Linie) chemische Informationen gibt. [53]

Somit steht mit diesen beiden Varianten deren typische Trenneigenschaft zur Verfügung, so dass für spezifische Proben jeweils die optimale Trennung gefunden werden kann. Im Fall der AF4 und CF3 liegen die Unterschiede im optimalen Größenbereich und der Partikeldichte. AF4 hat einen Anwendungsbereich von ca. 1 nm – 3 µm, wobei CF3 im Bereich von 10 nm – 50 µm eingesetzt werden kann, somit ist die AF4 besonders für sehr kleine Partikel geeignet, wobei für diese Anwendung der AF4 die sterische Inversion zu beachten ist, bei welcher sich das Trennprinzip umkehrt. Ab einer von vielen Parametern beeinflussten Größenschwelle, welche typischerweise zwischen 500 nm und 1000 nm liegt, ändert sich die Elutionsreihenfolge so dass nicht mehr kleine Partikel zuerst eluieren, sondern größere. Hierdurch ergeben sich für Partikel größer dieser Schwelle das Problem, dass sie mit den kleineren wieder vermischt eluieren und die Trennung verloren wird. Dagegen ist, durch ihr Trennprinzip, welches auf einem Schwerfeld beruht, die CF3 in der Lage Partikel nach ihrer Dichte besser zu trennen als die AF4.

Diese Ergebnisse wurden der Fachöffentlichkeit präsentiert und im internationalen Journal *Analytical Chemistry* publiziert [53].

In der zweiten Phase des Projekts, nach der erfolgreichen Entwicklung der Flusszelle für die Online-Kopplung der FFF und RM bei Postnova und zahlreichen experimentellen Arbeiten in einer engen und intensiven Zusammenarbeit von Postnova und TUM-IWC, wurde die FFF-Raman Online-Kopplung am TUM-IWC installiert und tiefergehend charakterisiert und weiterentwickelt.

Hiermit war es möglich das Setup auf die neuen Instrumente zu optimieren, indem verschiedene Objektive verglichen wurden. Demgemäß ist hier ebenfalls die Nutzung eines 40× oder 63× vergrößernden Wasserimmersions-Objektivs zu empfehlen. Weiterhin war es nun möglich den Einfluss verschiedener Laserwellenlängen (532 nm, 633 nm, 785 nm) zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass alle drei die Online-Kopplung ermöglichen, allerdings ist eine Präferenz für 532 nm auszusprechen, da hier das beste Raman-Signal erhalten wird. Zudem war das neu angeschaffte Raman-Mikroskop (WITec *apyron*) mit einem Profilometermodul ausgestattet (*TrueSurface 3*), welches prinzipiell ein präzises Fokussieren auf die Probenoberfläche erlaubt. Dies ist für die Online-Kopplung ein essentieller Schritt, da sich, wie bereits gezeigt, der Fokuspunkt des Lasers auf der Oberfläche des Flusszellenbodens befinden muss. Die hier durchgeführten Arbeiten haben diese automatisierten Methoden zur korrekten Einstellung des Fokuspunkts untersucht und zeigen, dass sowohl die optische Autofokusfunktion als auch das *TrueSurface 3* Modul dies ermöglichen. Allerdings sind auch hier feine Schwankungen in der Präzision vorhanden, die sich auf das Ergebnis in Form von größerer Varianz der Messergebnisse darstellen. Trotzdem erscheint die automatisierte Fokussierung als geeignet für eine Automatisierbarkeit der FFF-Raman-Messungen.

Basierend auf den Erfahrungen der Charakterisierung des ersten Prototypen der Fa. Postnova, wurde eine Flusszelle mit erweitertem Design konzipiert und am TUM-IWC validiert. Dieses ist in Abbildung 35 dargestellt. In beiden Flusszellen wird ein Solventstrom durch einen aufgeklebten Kanal geleitet, in welchem die Partikelidentifizierung durch RM erfolgt. Das neue Design soll durch den gewinkelten Einlass das Totvolumen reduzieren und zudem ermöglichte der Aufbau die Evaluation eines anderen Oberflächenmaterials. Es konnte hier die optische Falle auf einer Aluminiumoberfläche untersucht werden und gezeigt werden, dass die störenden thermischen Effekte, welche im ersten goldbeschichteten Prototypen auftraten, nun minimiert wurden.

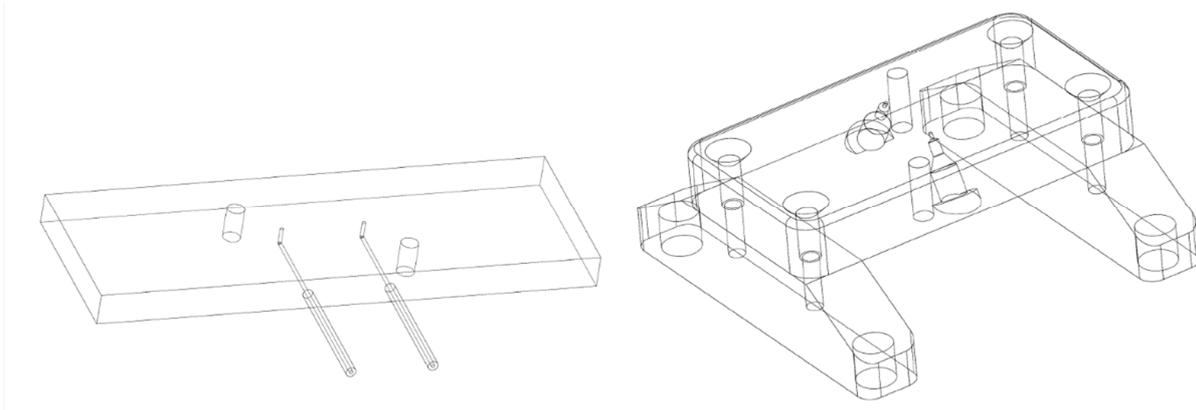


Abbildung 35: Erstes Design der Flusszelle für die Online-Kopplung von FFF und RM (links) und neues Design (rechts). Abbildung: Maximilian Huber.

Weiterhin wurde im Zuge der tiefgehenden Arbeiten der Anwendungsbereich der Online-Kopplung erweitert. Hier konnte nun auch die Messbarkeit von 100 nm Polystyrolpartikeln gezeigt werden, so dass der Größenbereich nun auf 100 nm – 5 µm, anstatt wie früher 200 nm – 5 µm, gesetzt werden kann. Weiterhin wurden neben Plastikpartikeln auch weitere anorganische Partikel untersucht. Diese umfassten Siliziumdioxid und Titandioxid (jeweils 500 nm). Bei letzterem konnte zudem demonstriert werden, dass durch die Raman-Spektren die Modifikationen Rutil und Anatas unterschieden werden konnten. Dies stellt einen wichtigen Schritt für die Nanoplastikanalytik dar, da somit nicht nur die Plastikpartikel sondern auch die natürliche anorganische Matrix erkannt werden kann.

Anschließend wurden weitere Untersuchungen zur Analyse von umweltähnlichem, fraktioniertem Submikro-Plastik (sekundär) unternommen. Diese wurden nach der o.g. Methode (AP 1), durch Ultraschall-Fraktionierung und Filtration mit Porengröße 2 µm erhalten. Es wurden dann die Parameter der AF4 ermittelt, mit denen die sekundären Submikro-Plastikpartikel fraktioniert und mittels UV- und MALS-Detektor charakterisiert werden können.

Schließlich wurde die etablierte Online-Kopplung auch für die Untersuchung einer Trinkwasserprobe (stilles Mineralwasser in PET-Flasche) getestet. Hierzu wurde die Probe durch einen Membranfilter mit Porengröße von 2 µm filtriert und zur Maskierung der gelösten Ionen mit EDTA-Lösung versetzt und ein Volumen von 300 mL im Fokusschritt der AF4 injiziert. Allerdings zeigte sich hier kein auswertbares Signal. Dies indiziert, dass möglicherweise Nanoplastik in sehr geringen Konzentrationen, unterhalb des Anwendungsbereiches der Online-Kopplung, vorliegt. Hierzu sind weitere

Untersuchungen und Entwicklungen, insbesondere zur geeigneten Aufkonzentrierung, vonnöten.

Diese Aufkonzentrierung ist in Abbildung 25 beschrieben und mit der Trinkwasserprobe durchgeführt. Diese Probe wurde hier nun durch die Online-Kopplung von AF4 und RM untersucht. Das erhaltene Fraktogramm ist mit dem in Abbildung 25 dargestellten gleichwertig. Hier konnten mittels der Flusszelle für die Partikel der eluierenden Fraktion kein Raman-Signal erhalten werden. Dies ist vermutlich auf die zu geringe Partikelgröße zurückzuführen, da sich die ermittelten Partikelgrößen (140 – 190 nm) stark am unteren Ende des Anwendungsbereichs befinden und daher sehr hohe Konzentrationen zum Trapping und Generieren eines Raman-Signals nötig sind. Hier ist eine zukünftige Verbesserung der Flusszelle und der Aufkonzentrierung vonnöten.

Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die hier entwickelte Online-Kopplung konnte für Referenzpartikel verschiedener Größe und Art (polymer und anorganisch) bis hinab zu 100 nm angewendet werden. Und auch für fragmentiertes Nanoplastik sowie Realproben wurde die Anwendbarkeit gezeigt. Für die Realproben wurden hier zudem Entwicklungen zur Aufkonzentrierung gemacht. Dies zeigt die hohe Relevanz der neuartigen FFF-RM Online-Kopplung, da hiermit eine zeit-effiziente und automatisierbare *High-Throughput* Methode zur Verfügung steht.

Der hohe Bedarf für eine Raman-Flusszelle zeigt sich auch an parallelen Entwicklungen. Hier wurde eine Raman-Flusszelle berichtet, die für MP > 100 µm genutzt werden kann [54], sowie die Integration von stimulierter Raman Spektroskopie (SRS) in die Durchflusszytometrie [55], welche für Zellen und Partikel von ~ 10 µm eingesetzt werden kann. Ferner hat sich auch die Kombination von Raman-Spektroskopie und *Optical Tweezer* (Raman Tweezer) für die Identifizierung einzelner Partikel in Suspension etabliert [56–59]. In diesen ist es allerdings nötig, einzelne Partikel zu untersuchen. Die Online-FFF-RM aus den präsentierten Arbeiten ist in der Lage große Anzahlen an Partikeln zu analysieren, da die Methoden verschiedene Aufgaben übernehmen: FFF-MALS bietet die physikalische Größencharakterisierung und RM ermöglicht die chemische Identifizierung im Bulk. Hierdurch müssten Partikeln nicht mehr einzeln identifiziert werden, was ein hohes Potenzial für zeit- und kosteneffiziente Messungen bietet.

Überlegungen und Erprobung weiterer Detektionsmethoden für Submikro- und Nanoplastik: Dynamische Lichtstreuung, Laserbeugung und Nano-Tracking Analyzer

Partner: IUTA, TUM-LTI, TUM-SWW

Für die Größenbestimmung von Mikroplastik standen am IUTA zwei Geräte zur Verfügung, ein dynamisches Lichtstreuungs (DLS) Messgerät der Firma Beckman Coulter (Delsa™ Nano C Particle Analyzers von Coulter-Beckmann®, Krefeld, Deutschland) und ein Laserbeugungsmessgerät der Firma Beckman Coulter (LS 230, Coulter-Beckmann®, Krefeld, Deutschland). Mit dem DLS können Partikel im Größenbereich von 5 nm – 10 µm gemessen werden. Mit dem Laserbeuger mit PIDS-System (Polarization Intensity Differential Scattering) können Partikel im Größenbereich von 40 nm bis 2.000 µm detektiert werden.

Bei den Methoden handelt es sich um nicht-invasive Techniken, die für die Größencharakterisierung von Dispersionen im Submikrometerbereich (DLS) bis in den Mikrometerbereich angewendet werden (Laserbeugung). Die Techniken ermöglichen eine schnelle und wenig komplizierte Bestimmung der Partikelgröße in Suspension [60]. Kurz zusammengefasst, erlaubt die dynamische Lichtstreuung die Bestimmung der Partikelgröße in einer stabilen Suspension bei geringer Konzentration an anderen „Umweltpartikeln“. Die Bewegung der Partikel wird detektiert und über einen Algorithmus die Partikelgröße berechnet.

Die Partikelgröße kann ebenfalls mit Hilfe von Laserbeugung bestimmt werden. Diese Methode eignet sich hervorragend für Partikelgrößen im Submikro- und Millimeter-Bereich. Anders als bei der dynamischen Lichtstreuung, wird hier ebenfalls die Winkelabhängigkeit der Streuintensität des Lasers für die Teilchengrößenbestimmung benutzt. Dabei ist der Streuwinkel kleinerer Partikel größer als bei größeren Partikeln. Die Streuintensität wird von fest installierten Detektoren in Abhängigkeit vom Winkel bestimmt. Charakteristische Beugungsmuster mit optischen Modellen (Fraunhofer und Mie-Theorie) korreliert und die Partikelgrößenverteilung der Probe bestimmt [61,62].

Partikel die kleiner als 1 µm sind, sind Aufgrund schwacher Streuungssignale schwer zu bestimmen. Daher verwendet der Laserbeuger für diesen Größenbereich eine spezielle PIDS (Polarization Intensity Differential Scattering) Technologie, dass Polarisierungseffekte der Lichtstreuung nutzt. Die Messwerte werden in einem

Volumen-Histogramm dargestellt, das dieselben Kennzahlen wie beim DLS enthält und ebenfalls auf eine Anzahlverteilung umgerechnet werden kann.

Ebenfalls für die Quantifizierung von Partikeln im Größenbereich von 20 nm – 1 µm ist das Nanopartikeltracking (NTA), bei dem die Partikelgröße über die Brownsche Molekularbewegung ermittelt werden kann. Im Projekt wurde der ZetaView – Nanopartikel Tracking Videomikroskop (Particle Metrix) zur Quantifizierung von Nanopartikeln für biologische Assays (TUM-LTI) und zur Untersuchung der Veränderung von Nanoplastikpartikeln durch die Probenvorbereitung (TUM-SWW) eingesetzt. Für die Bestimmung der Partikelanzahl in biologischen Medien konnte dieser erfolgreich eingesetzt werden und somit die Methodik der Versuche absichern. Für die Untersuchungen zur Alterung der Submikropartikel konnte die Technologie jedoch nicht eingesetzt werden, da hier stark unterschiedliche Größen der entstehenden Partikel eine Quantifizierung in den Proben verhindert.

Aufgrund der Messprinzipien können diese Methoden nicht angewendet werden, um die Partikelgröße in komplexen Matrices zu bestimmen, ohne eine aufwendige Probenvorbereitung durchzuführen. Zudem wird keinerlei Information über die Partikelidentität gewonnen, sodass diese Technologien nicht für reale (Umwelt-) Proben genutzt werden können. Auch in biologischen Assays können diese Technologien lediglich für eine Kontrolle der Gesamtpartikelzahl genutzt werden. Für die Identifizierung und Quantifizierung der Partikelzahlen sind nur mikrospektroskopische Verfahren, in denen eine chemische Identifizierung möglich ist geeignet. Diese Technologien können jedoch die Submikroplastik-Forschung vorantreiben, da die Charakterisierung von Referenzpartikeln und die Verifizierung von Dosierungen in Prozessen oder biologischen Untersuchungen so unterstützt werden können.

AP3: Untersuchungen zu Alterung, Ad- und Desorption organischer Spurenstoffe auf Referenzpartikeln

Leitung: TUM-SWW

Partner: LfU

Mikro- und Nanoplastikpartikel können sowohl als Quelle als auch als Senke für Schadstoffe in der Umwelt dienen. Daher kann einerseits die Sorption von Schadstoffen an Mikroplastik ein Problem darstellen, andererseits muss Mikroplastik selbst als Schadstoff betrachtet werden. Monomere, Additive, Weichmacher und andere Schadstoffe können desorbiert werden und zusätzliche potenzielle Risiken verursachen [63–69]. Diese Kontaminationen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: hydrophobe Chemikalien, die aufgrund ihrer Affinität zur hydrophoben Oberfläche der Kunststoffe aus der Umwelt adsorbiert werden, und Additive, Monomere und Oligomere, die als Bestandteile der Kunststoffe vorliegen [70]. Adsorbierte hydrophobe Spurenstoffe mit geringer Wasserlöslichkeit werden durch Bindung an Kunststoffpartikel mobiler, was ihren Transport und damit ihre Verteilung und Bioverfügbarkeit erhöhen kann. Einige Studien beschäftigen sich mit dem Potenzial von Mikroplastik, hydrophobe organische Schadstoffe zu transportieren [63,70–73].

Es wird davon ausgegangen, dass kleinere Partikel in der Regel eine größere toxikologische Relevanz haben, da sie eine größere Oberfläche haben und damit eine höhere Kapazität zur Adsorption chemischer Substanzen und ein erhöhtes Potenzial, z. B. Entzündungsreaktionen auszulösen [4,63,74].

Für einen Überblick der Analysemethoden wurde ein Reviewartikel verfasst, der die bisherigen Methoden zur Bestimmung von sorbierten Spurenstoffen auf Mikro- und Nanoplastikpartikeln zusammenfasst [75].

Der grundsätzliche Versuchsaufbau zur Untersuchung von Sorptionskinetiken oder -prozessen in wässrigen Suspensionen ist bei allen experimentellen Laborversuchen identisch. Ausgewählte Partikel und Spurenstoffe werden in eine flüssige Phase wie Reinstwasser, Süßwasser, Meerwasser oder synthetisches Wasser gegeben [76–79]. In der wässrigen Lösung werden Partikel und die Spurenstoffe über einen definierten Zeitraum inkubiert. Anschließend müssen die Partikel für die Analyse von der wässrigen Phase getrennt werden. Dies wird z. B. durch Filtration oder Zentrifugation erreicht [77,80,81]. Die Analyse der sorbierten Substanzen erfolgt entweder direkt von

den Partikeln oder indirekt durch Lösemittelextraktion (z. B. n-Hexan, Dichlormethan) der Spurenstoffe [78,80,82]. Eine indirekte Analyse der wässrigen Phase über Flüssig/Flüssig-Extraktion oder durch einen Passivsammler ist ebenfalls möglich [68,83–85]. Aufgrund der verbleibenden Konzentration in der wässrigen Phase kann eine Aussage über die Menge der sorbierten Substanzen an den Partikeln getroffen werden. Die abschließende Analyse kann mit verschiedenen Analysetechniken durchgeführt werden, wie z. B. GC/MS, HPLC/MS, HPLC/UV, oder Spektrophotometer [63,68,86–91]. Besonders etabliert haben sich in der Mikroplastikanalyse GC/MS Verfahren. Dazu wird die GC/MS mit einer Pyrolyseeinheit (Pyr) oder einer Thermalextraktions-Desorptions- (TED) / Thermogravimetrie- (TGA) Einheit gekoppelt [33,92–95]. In dem Reviewartikel werden außerdem Strategien zur Charakterisierung von Partikelgröße und -form (Mikro vs. Nano), gealterter Partikel und Desorptionskinetiken betrachtet (Reichel et al. 2021 [77])

Abbildung 36 gibt einen Überblick der verschiedenen Möglichkeiten zu Design und möglichen Analyseverfahren in Sorptionsstudien an Mikroplastik.

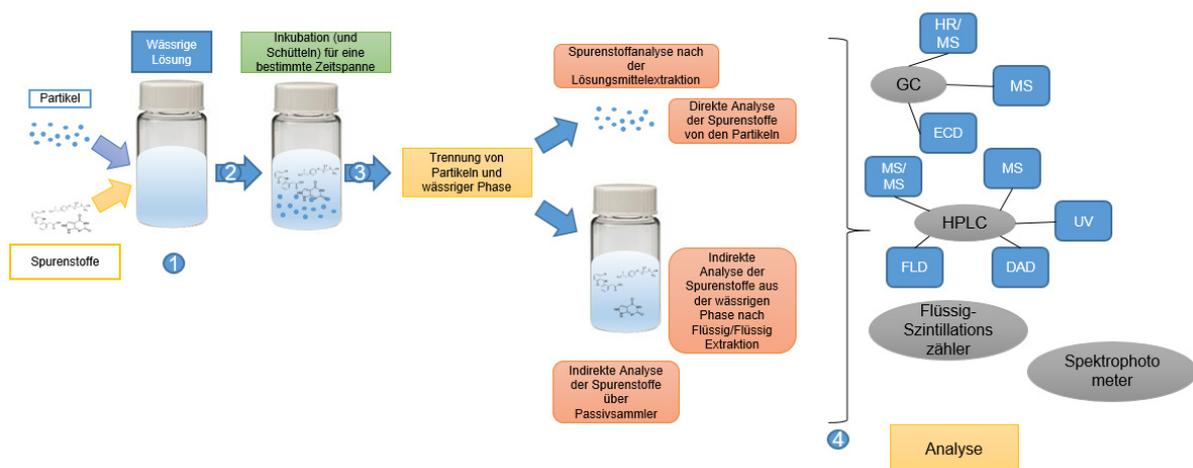


Abbildung 36: Arbeitsablauf einer Probenvorbereitung von Sorptionsversuchen für verschiedene analytische Nachweisverfahren [75].

Entwicklung einer Thermodesorption/Pyrolyse-GC/MS-Analyse für die Bestimmung von Mikroplastik und sorbierten Spurenstoffen

TUM-SWW

Einleitung

Aktuell werden Verfahren weiterentwickelt, die auf Pyr-GC/MS basieren, wie z.B. sequentielle Pyrolyse, „double shot“ Pyrolyse oder eine thermische Desorptionseinheit, die mit der Pyrolyse gekoppelt wurde [77,93–95]. Ziel dieser Methoden ist es, nicht nur das Polymer selbst, sondern auch Zusatzstoffe oder sorbierte Substanzen zu identifizieren. Durch eine Kombination von verschiedenen Probenaufgabesysteme wie der Thermodesorption und der Pyrolyse in einem Gerät, könnte, durch die Reduktion von Umbauaufwand oder doppeltem Gerätebedarf, die Durchführung von Sorptionsstudien deutlich vereinfacht, sowie der Zeitbedarf und die Kosten zudem gesenkt werden.

Ziele

Eine neue Analysenmethode mit Thermodesorption – Pyrolyse – Gaschromatographie / Massenspektrometrie (TD-Pyr-GC/MS), für die Bestimmung sorbierter Spurenstoffe und der Polymere der (Sub)mikro- und Nanopartikel in einem analytischen Setup, sollte entwickelt werden. Bisher waren meist aufwendige Extraktionsschritte notwendig, um die sorbierten organischen Spurenstoffe auf den Polymere zu bestimmen. Das Ziel war die Entwicklung einer schnellen qualitative Analytik (2 h), die zukünftig für Proben aus dem ökotoxikologischen Bereich oder aus Laborkläranlagen eingesetzt werden kann.

Durchführung der Analytik

Der Aufbau der TD-Pyr-GC/MS ist in Abbildung 37 a) dargestellt. Die Methode wurde mit den Referenzpolymeren Polystyrol (PS), Polymethylmetacrylat (PMMA) und Polyethylen (PE) (Tabelle 7) optimiert und im nächsten Schritt mit auf den Partikeln sorbierten Referenzspurenstoffen Phenanthren, α -Cypermethrin und Triclosan (Tabelle 6) validiert. Die charakteristischen Pyrolyseprodukte dienen der Identifizierung der Polymere in den Pyrogrammen, Tabelle 7.

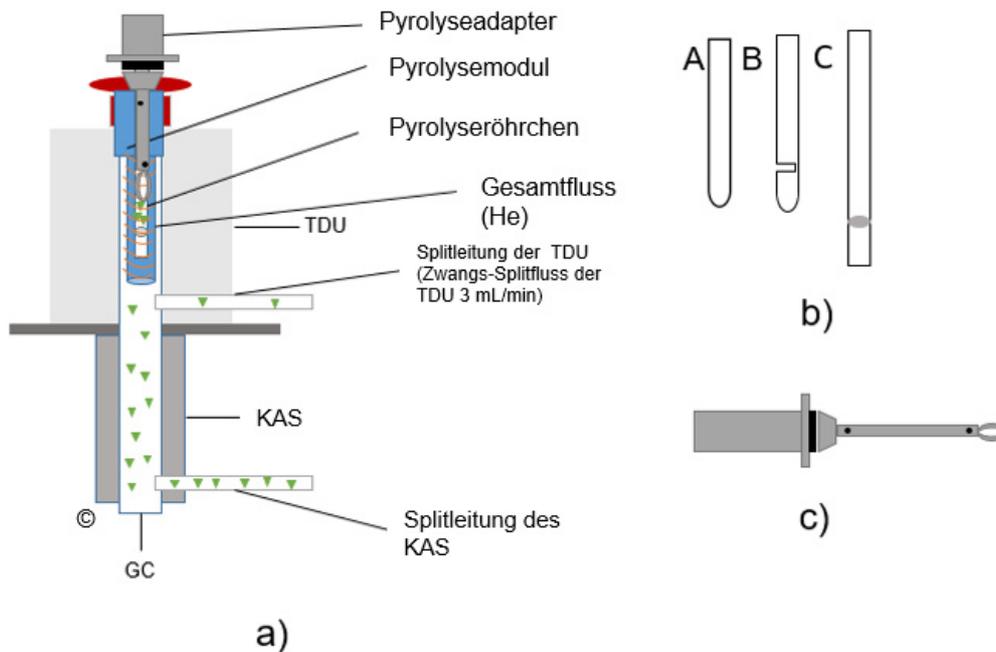


Abbildung 37: a) Aufbau der TD-Pyr-GC/MS; b) Design verschiedener Pyrolyseröhrchen; c) Pyrolysetransportadapter (adaptiert von Reichel et al., 2020 [77])

Im Rahmen der Methodenentwicklung für die TD-Pyr-GC/MS wurde folgende Methode entwickelt (vgl. Reichel et al. 2020 [77]) Im ersten Schritt werden die adsorbierten organischen Spurenstoffe durch thermische Desorption (TD) bei 200 °C vom Partikel desorbiert. Anschließend wird in der Pyrolyse (Pyr) das Polymer bei 800 °C fragmentiert. Beide Behandlungsverfahren sind direkt mit demselben GC/MS-System gekoppelt, das die desorbierten Moleküle bzw. die Pyrolyseprodukte analysiert.

Die Optimierung der Temperatur in der TD ist essentiell. Sie muss so hoch wie möglich sein, um alle sorbierten thermolabilen organischen Spurenstoffe zu desorbieren und gleichzeitig muss sie so niedrig sein, dass während der Thermodesorption so wenig wie möglich Pyrolyseprodukte entstehen. Dazu wurden die Temperaturen 120 °C, 200 °C und 280 °C getestet. Die angelegten Kriterien wurden von der TD-Temperatur bei 200 °C erfüllt. Als Referenzspurenstoffe wurden die Substanzen Phenanthren, α -Cypermethrin und Triclosan ausgewählt, siehe Tabelle 6. Ein Schema des Analysenablaufs ist in Abbildung 38 dargestellt.

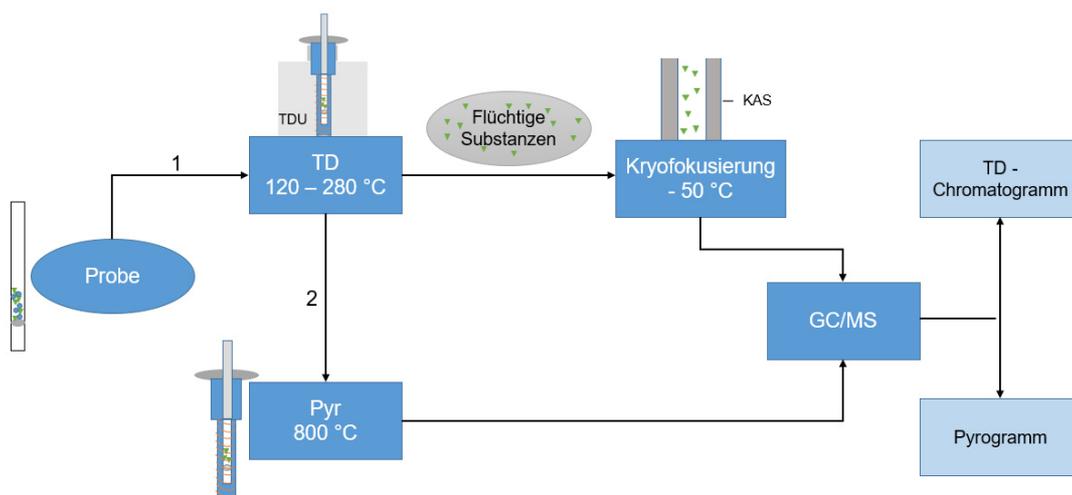


Abbildung 38: Schema der TD-Pyr-GC/MS Analyse. (1) Thermodesorption der Probe (120 – 280 °C), wodurch die leicht flüchtigen Substanzen desorbieren und im KAS bei -50 °C kryofokussiert werden. Danach erfolgt ein Transfer auf die GC-Säule und eine MS-Detektion. Dieselbe Probe (2) wird nun bei 800 °C pyrolysiert, gefolgt von einer GC/MS Analyse. Final folgt die Auswertung der TD-Chromatogramme und Pyrogramme

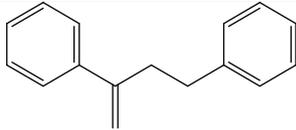
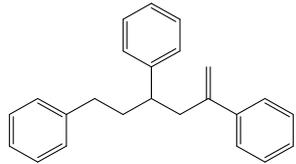
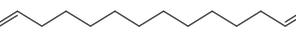
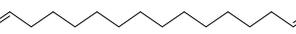
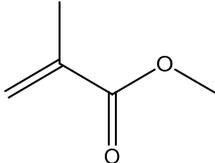
Tabelle 6: Umweltrelevanz, Strukturformeln und charakteristische Signale der ausgewählten organischen Referenzspurenstoffe

Substanz	Umweltrelevanz	Strukturformel	Charakteristische Signale (m/z)
Phenanthren	Hohe Toxizität, mutagen (Samanta, Singh, & Jain, 2002), typischer Schadstoff in Abwasser [78,96]		178
α -Cypermethrin	Das am weitesten verbreitete Isomer des Typ-II-Pyrethroid-Pestizids [78,97]		163, 184, 209
Triclosan	antimikrobielles Mittel, das in Körperpflegeprodukten verwendet wird [98,99]		290, 288, 218, 63

Es wurden gut definierte Partikelfractionen des Projektpartners BS Partikel GmbH verwendet, darunter Polystyrol-(sub) mikro- (41 und 40 μm) und Nanopartikel (78 nm) sowie PE- bzw. PMMA-Partikel mit einer Größe von 48 μm . Die Sorption von Phenanthren (PMMA \ll PS 40 μm < 41 μm < PE < PS 78 nm) und α -Cypermethrin (PS 41 μm < PS 40 μm < PE < PMMA < PS 78 nm) an die Partikel war stark polymerabhängig. Triclosan adsorbierte nur an PE und an den Nanopartikeln aus PS

(PE < PS 78 nm). Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Sorption abhängig ist von der Polymerart- und gröÙe und des Spurenstoffs.

Tabelle 7: Charakteristische Pyrolyseprodukte und Strukturformeln der ausgewählten Polymere

Polymer	Charakteristische Pyrolyseprodukte	Summenformel	m/z (Intensitätsverhältnis / %)*	Strukturformel
PS	3-Buten-1,3-diyldibenzol (Styrol Dimer)	C ₁₆ H ₁₆	91 (100), 104 (27), 130 (23), 208 (30)	
	5-Hexen-1,3,5-triyltribenzol (Styrol Trimer)	C ₂₄ H ₂₄	91 (100), 117 (32), 194 (19), 207 (25)	
PE	1,12-Tridecadien	C ₁₃ H ₂₄	55 (52), 81 (44), 67 (38), 95 (26), 28 (100)	
	1,13-Tetradecadien	C ₁₄ H ₂₆	81 (42), 95 (27), 109 (13), 28 (100)	
	1,15-Hexadecadien	C ₁₆ H ₃₀	55 (63), 81 (50), 96 (45), 69 (37), 28 (100)	
PMMA	Methylmethacrylat	C ₅ H ₈ O ₂	41 (77), 69 (100), 100 (57)	

Im Zuge der Methodenentwicklung konnten diverse Kontaminations- und Verschleppungsquellen ermittelt werden, die für zukünftige Analysen vermieden werden sollten:

Zu Beginn wurden drei verschiedene Pyrolyseröhrchen des Herstellers Gerstel GmbH & Co.KG getestet, Abbildung 37 b). Pyrolyseröhrchen A und B sind unten geschlossen, daher kann kein konstanter Fluss des Trägergases Helium gewährleistet werden. Das hatte zur Folge, dass Anreicherungen in aufeinanderfolgenden Messungen sichtbar wurden. Pyrolyseröhrchen C ist unten geöffnet und wird lediglich durch Quarzwolle verschlossen, um ein Herausfallen der Partikel zu verhindern.

Eine weitere Quelle für Anreicherungen ist das Pyrolysefilament. Optisch erkennbar ist dies an schwarzen Punkten und Rußverfärbung am Glas des Filaments. Daher wird empfohlen dieses nach ca. 300 – 350 Messungen auszutauschen.

Die Probenmenge an Partikeln für die Analyse sollte mindestens 30 µg und maximal 80 µg betragen. Somit wird ein Überladen der GC-Säule ausgeschlossen.

Eine Reinigung der Transportadapter (Abbildung 37 c) nach der Polymeranalyse ist essentiell. Hier können sich noch Pyrolyseprodukte festsetzen, die mit Dichlormethan im Ultraschallbad (15 min) entfernt werden sollten.

Mit einem einfachen Umbau der TD-Pyr-GC/MS können auch Spurenstoffe aus der wässrigen Phase analysiert werden. Dazu wird das Pyrolysemodul manuell demontiert. Die Spurenstoffe in der wässrigen Phase werden mittels Gerstel Twister® extrahiert. Die Methode basiert auf Stir Bar Sorptive Extraction - die Spurenstoffe reichern sich auf der Polydimethylsiloxanschicht an und werden durch TD-GC/MS thermodesorbiert. Der Prozess ist in Abbildung 38 visualisiert.

Ergebnisse: Analytik von Sorptionsprozessen mittels TD-GC/MS und TD-Pyr-GC/MS

Ziel dieser Studie ist es, die Sorptionsprozesse auf den Referenzpartikeln PS (41 µm und 78 nm), PMMA (48 µm) und PE (48 µm) mit den ausgewählten Spurenstoffen (Tabelle 6) Phenanthren, Triclosan und α-Cypermethrin zu untersuchen (Reichel et al, submitted). Erstmals werden dabei sowohl die wässrige Phase (hier: Leitungswasser Garching) mit TD-GC/MS als auch die Partikel mit TD-Pyr-GC/MS untersucht. Das Vorgehen ist in Abbildung 39 dargestellt. Die angewendeten Methoden basieren auf der Publikation Reichel et al. (2020) [77].

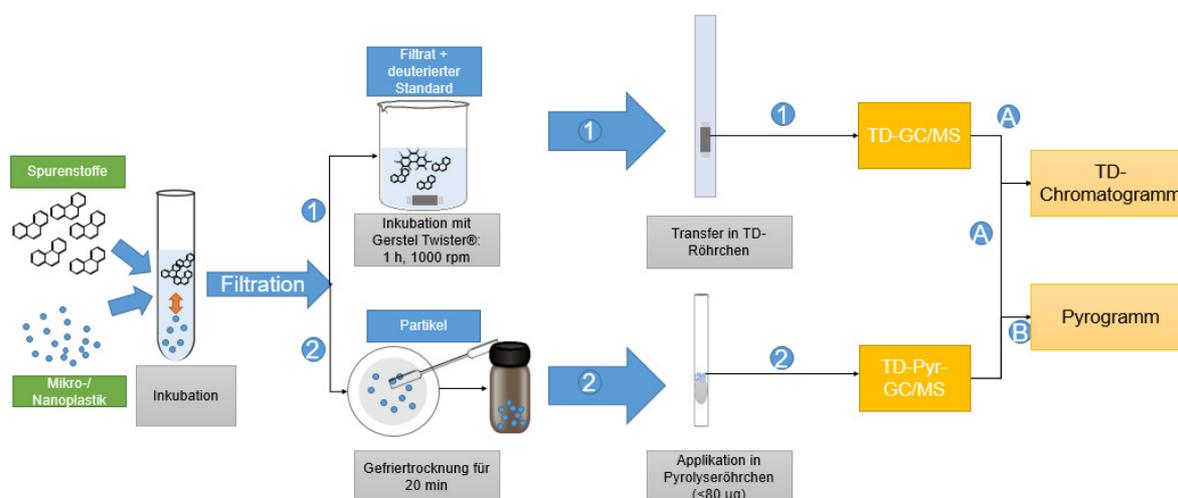


Abbildung 39: Im ersten Schritt wird der Spurenstoff mit den Mikro- bzw. Nanopartikeln inkubiert. Dann wird die Probe filtriert. Das Filtrat (1) wird mit dem entsprechenden deuterierten Standard versetzt und für 1 h mit dem Gerstel Twister® gerührt. Der Gerstel Twister® wird in ein Thermodesorptions (TD)-

Röhrchen gegeben und über TD-GC/MS analysiert. Die Analyse erfolgt über die Auswertung des TD-Chromatogramms (A). Die Partikel (2) werden mit einem Spatel vom Filter abgeschabt, in ein Vial gegeben und gefriergetrocknet. Die getrockneten Partikel werden direkt in das Pyrolyseröhrchen eingewogen und mittels TD-Pyr-GC/MS analysiert. Das TD-Chromatogramm (A) wird für die Auswertung der leicht flüchtigen Substanzen verwendet, das Pyrogramm (B) für die Polymerauswertung. (adaptiert von Reichel et al., submitted)

Zunächst wird die Sorption der einzelnen Spurenstoffe nach unterschiedlichen Inkubationszeiten auf den verschiedenen Partikeln untersucht. Außerdem konnte unter Verwendung von PS 78 nm Nanopartikeln gezeigt werden, dass eine quantitative Analyse der sorbierten Spurenstoffe direkt vom Partikel mittels TD-Pyr-GC/MS möglich ist. Weiterhin wurde die Sorption von Substanzgemischen an den Partikeln PS 78 nm und PE 48 µm untersucht. Die Partikelkonzentration wurde auf 1 g/L festgesetzt, die Spurenstoffkonzentration betrug 1 mg/L.

Für die Untersuchung der Sorption in Abhängigkeit der Zeit wurden Proben nach 1 h, 24 h und 48 h genommen. Als Beispiel ist hier die Sorption des Spurenstoffs Phenanthren auf die Referenzpolymere gezeigt, Abbildung 40.

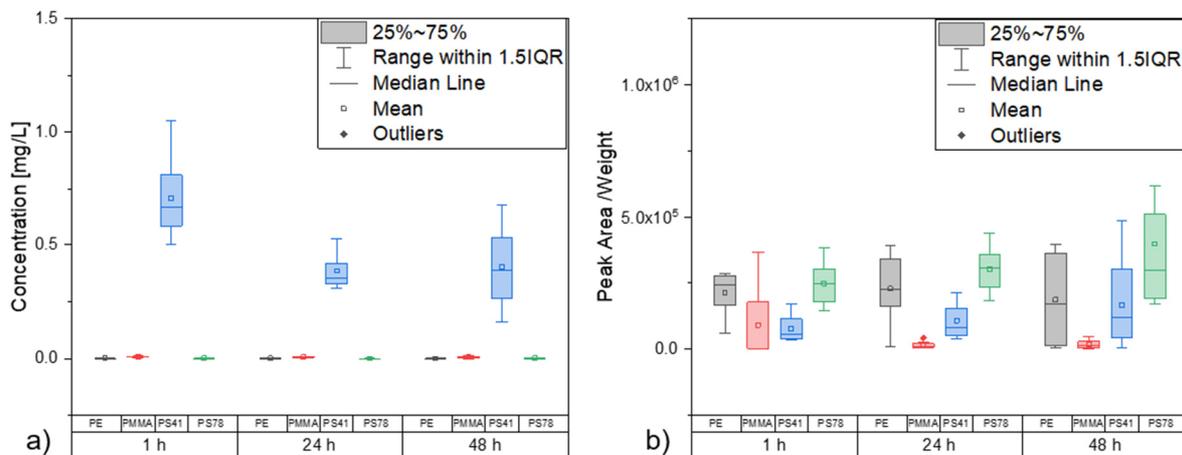


Abbildung 40: Phenanthrenkonzentration auf Mikro- und Nanoplastikpartikel (PE (48 µm), PMMA (48 µm), PS41 (41 µm) und PS78 (78 nm) in der a) wässrigen Phase und b) auf den Partikeln

Betrachtet man die Sorption von Phenanthren basierend auf den Daten der wässrigen und partikulären Phase über einen Zeitraum von 48 h, so folgt die Sorption der folgenden Reihenfolge: PS 41 µm < PE 48 µm < PS 78 nm. PMMA bildet hier eine Ausnahme, was auf die Bedeutung der Analyse beider Phasen hinweist. Weder in der wässrigen Phase, noch auf den Partikeln sind wesentliche Mengen an Phenanthren sichtbar. Eine Möglichkeit hier könnte die Bildung von 9-

(Phenanthyl)methylmethacrylat sein, das unter der Erhitzung in der TD bzw. Pyr entstanden ist [100].

Die Analyse der wässrigen Phase von Triclosan zeigt eine Reihenfolge von PMMA 48 μm < PS 41 μm < PE 48 μm < PS78 nm. Wird nur die Partikelphase betrachtet, ergibt sich folgende Reihenfolge: PMMA 48 μm = PS 41 μm < PE 48 μm < PS78 nm. Allerdings sind die Konzentrationen in der wässrigen Phase bei PMMA 48 μm und PS 41 μm von großen Schwankungen begleitet. Vergleicht man die verschiedenen Partikelgrößen des Polymers PS, so zeigt sich eine deutlich höhere Sorption an den Nanopartikeln.

Für α -Cypermethrin ist die Konzentration in der wässrigen Phase für alle Polymere ungefähr gleich. Da der deuterierte Standard Cypermethrin-(Phenoxy-d5) als Referenz in der wässrigen Phase verwendet wurde, könnte dies die Messungen aufgrund der Anwesenheit von vier Isomeren beeinflusst haben. Betrachtet man die Sorption an den Partikeln, so ist die Sorption nach 48 h an allen Polymeren ungefähr gleich. Allerdings zeigen die PS 78 nm Partikel große Abweichungen. Innerhalb der ersten 24 h ergibt sich ein anderes Bild. Die Sorption an den PS-Partikeln ist am höchsten: PE 48 μm = PMMA 48 μm < PS 41 μm < PS 78 nm.

Nach der theoretischen Berechnung des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen für alle benutzen Referenzpolymere und Spurenstoffe ist dieses für die Nanopartikel am geringsten. Experimentell konnte das mit den drei Spurenstoffen bestätigt werden, da die schnellste und höchste Sorption jeweils auf die PS 78 nm Nanoplastikpartikel passierte.

Ein wichtiger Punkt des Projekts ist die Quantifizierung von sorbierten Spurenstoffen mit TD-Pyr-GC/MS. Dies wurde ebenfalls mit den drei ausgewählten Spurenstoffen und einer Analyse der wässrigen und der Partikelphase untersucht. Beispielhaft ist hier die Sorption von Phenanthren in den Konzentrationen 1 mg/L, 5 mg/L und 10 mg/L auf PS 78 nm Partikel (1 g/L) gezeigt, Abbildung 41.

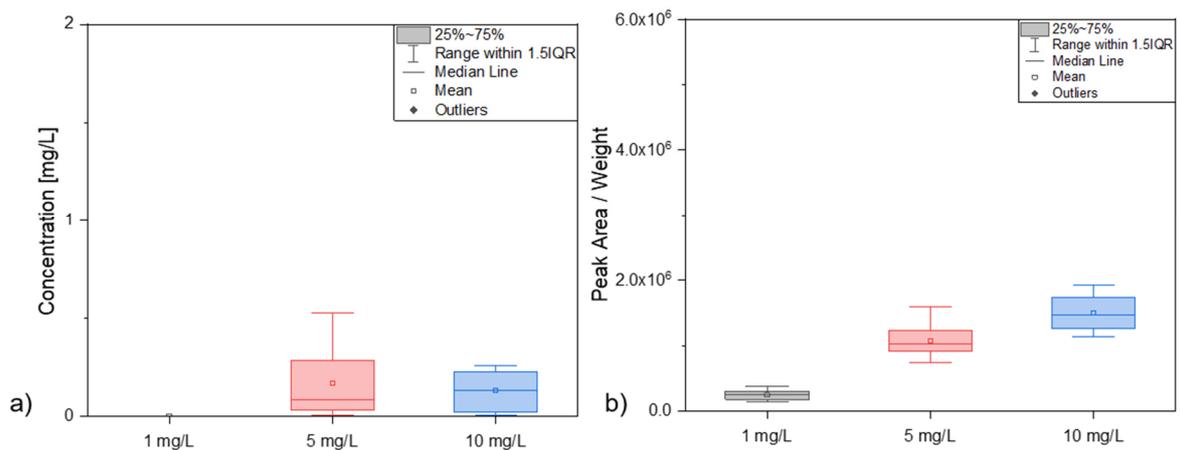


Abbildung 41: Analyse der Phenanthrenkonzentrationen 1 mg/L, 5 mg/L und 10 mg/L für Phenanthren mit a) TD-GC/MS für die wässrige Phase und b) mit TD-Pyr-GC/MS für die Partikel

Abbildung 41 a) zeigt die Phenanthrenkonzentration in der wässrigen Phase. Für die Anfangskonzentration von 1 mg/L ist nach einer Inkubationszeit von 1 h kein Phenanthren mehr nachweisbar; auch für 5 mg/L und 10 mg/L sind nur noch Konzentrationen unter 0,5 mg/L zu finden. In der TD-Pyr-GC/MS-Analyse in Abbildung 41 b) ist ein deutlicher Anstieg des sorbierten Phenanthrens zu erkennen. Eine Quantifizierung des Spurenstoffs sollte daher möglich sein.

Die Ergebnisse von Phenanthren werden mit denen von Triclosan und α -Cypermethrin unterstützt. Auch hier ist nach der Erstellung einer Kalibrierungsgerade eine Quantifizierung möglich. Die Bestimmung der Nachweisgrenzen ist spurenstoffabhängig und sollte in Folgeprojekten bestimmt werden.

Bisherige Studien zeigen vor allem die Bestimmung von Einzelsubstanzen [66,101–104]. Allerdings ist nicht zu erwarten, dass Spurenstoffe in der Umwelt einzeln auftreten, vielmehr ist ein Substanzgemisch wahrscheinlich [90,105]. Ein Substanzgemisch kann die individuelle Sorptionskapazität eines Spurenstoffs beeinflussen. Daher wurden die drei Spurenstoffe Phenanthren, Triclosan und α -Cypermethrin gleichzeitig in den Konzentrationen 1 mg/L und 10 mg/L an die Polymere PS 78 nm und PE 48 μ m (je 1 g/L) für 1 h sorbiert. Es wurden die wässrige Phase (TD-GC/MS) und die Partikel (TD-Pyr-GC/MS) analysiert.

Für PS 78 nm und einer Spurenstoffkonzentration von 10 mg/L wurden keine Unterschiede im Vergleich zu den Einzelsubstanzmessungen beobachtet. Betrachtet man die Sorption an den PE 48 μ m Partikeln mit einer Spurenstoffkonzentration von

1 mg/L, so ergeben sich für die Substanzen α -Cypermethrin und Triclosan keine Unterschiede im Vergleich zu den Einzelsubstanzen. Phenanthren hingegen sorbiert als Einzelsubstanz besser. Hier könnten antagonistische Effekte eine Rolle spielen [86]. Im direkten Vergleich der Sorption des Substanzgemisches (1 mg/L) an die PE 48 μm und die PS 78 nm Partikeln ist die Sorption an den Nanopartikeln deutlich höher. Dies lässt sich durch das größere Oberfläche zu Volumen-Verhältnis der PE Partikel erklären. Da die Sorptionsanalysen mit TD-Pyr-GC/MS an Nanopartikeln gut funktionieren, wäre für zukünftige Versuche ein Vergleich verschiedener Polymere denkbar.

Anwendung des Systems zur Analyse wässriger Proben in toxikologischen Untersuchungen

Aquatische Organismen (Gammariden) wurden am TUM Lehrstuhl für Aquatische Systembiologie jeweils mit dem Spurenstoff Phenanthren, Phenanthren mit Sediment und Phenanthren mit PMMA-Plastikpartikeln versetzt. Für die Analyse wurden die PMMA-Partikeln abfiltriert und die wässrige Phase wurde untersucht. Proben für die Analyse mit TED-GC/MS wurden nach 0 h und 48 h genommen, Abbildung 42. Zu diesem Zeitpunkt war eine Quantitative Auswertung der sorbierten Spurenstoffe nicht möglich.

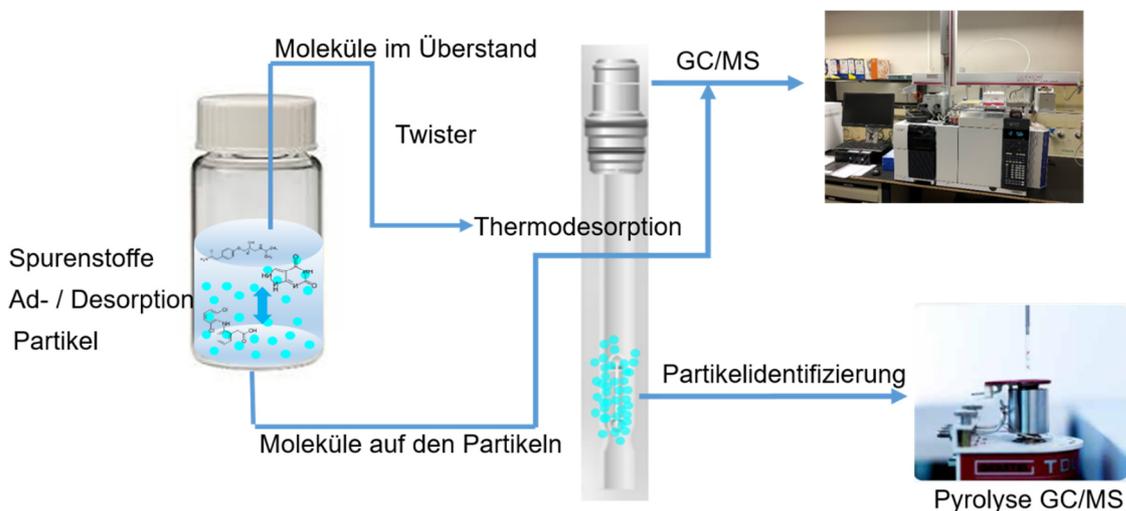


Abbildung 42: Identifizierung und Quantifizierung von Spurenstoffen auf den Partikeln und Identifizierung der Polymere mit TD-Pyr-GC/MS; Identifizierung von Spurenstoffen in wässriger Lösung mit Gerstel Twister © und TD-GC/MS

Die höchste Phenanthrenkonzentration nach 48 h befindet sich in dem Assay, in dem Phenanthren alleine appliziert wurde. Durch die Anwesenheit von PMMA-Partikeln bzw. Sediment scheint eine Sorption des Spurenstoffes an das Material stattzufinden.

Untersuchungen zur Alterung von Mikroplastikpartikeln

In einer Kooperation mit dem Mikroplastikprojekt MiPAq wurden die Polymere PE, PLA, PET und PP mit der etablierten TD-Pyr-GC/MS Methode untersucht [30]. Dabei wurden die Partikel sowohl ungealtert als auch nach einer Behandlung mit Fenton-Reagenz bzw. Wasserstoffperoxid untersucht. Betrachtet man die Polymere PA und PS wurde die thermische Stabilität nach einer Behandlung mit Fenton-Reagenz und H₂O₂ erhöht. Das Verhältnis der flüchtigen Pyrolyseprodukte, die bereits während des thermischen Desorptionsschritts bei 200 °C detektiert wurden, verringerte sich zur Pyrolyse bei 800 °C, insbesondere bei PA. Dies bedeutet, dass die Menge der Pyrolyseprodukte, die bei 200 °C flüchtig waren, nach Anwendung der Behandlungen reduziert wurde und mehr Pyrolyseprodukte blieben bis zum zweiten Pyrolyseschritt bei 800 C stabil.

Schlussfolgerung und Perspektiven

Im Rahmen des SubµTrack Projekts konnte eine Methodenentwicklung und Validierung der TD-Pyr-GC/MS sichergestellt werden. Erstmals konnte eine Analyse Spurenstoffe in der wässrigen Phase und auf den Partikeln gezeigt werden. Potentielle Anwendungen dieser zweifachen Analytik sind ökotoxikologische Proben. Durch die Analyse beider Phasen kann eine Massenbilanz erstellt werden, die die realen Mengen in beiden Phasen zeigt. Verluste oder mögliche Kontaminationen, wie z.B. durch eine Sorption auf Glaswände können so gezeigt und eliminiert werden. Außerdem konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass eine Quantifizierung der sorbierten Spurenstoffe, insbesondere auf Nanopartikel, mittels TD-Pyr-GC/MS möglich ist. Weitere Analysen anderer Nanopolymerarten wäre somit machbar und sinnvoll. Bislang wurden die Versuche mit Leitungswasser als wässriges Medium durchgeführt. Weitere mögliche Applikationen liegen in der quantitativen Analyse von sorbierten Spurenstoffen unter dem Einfluss von verschiedenen Faktoren wie pH-Wert, Temperatur oder Salzgehalt. Auch die Sorption auf gealterte Partikel im Vergleich mit unbehandelten Referenzpartikeln kann so leicht untersucht werden.

Untersuchung der Spurenstoffsorption von Mikroplastik während des Klärverlaufs

Partner: LfU & TUM-SWW

Einleitung

Kläranlagen stellen eine große Immissionsquelle für organische Spurenstoffe, wie Pharmazeutika, Industriechemikalien oder Personal Care Products, in die aquatische Umwelt dar. Ebenfalls werden Kläranlagen als Quellen für Mikroplastik in die aquatische Umwelt diskutiert [106–109]. Somit könnte es in Kläranlagen auf Grund der erhöhten Spurenstoffkonzentrationen zu einer Sorption auf die Mikroplastikpartikel kommen, sodass diese später Vektoren für toxikologisch aktive Spurenstoffe darstellen könnten. Ökotoxikologische Studien mit Mikroplastik und Spurenstoffen zeigen häufig einen positiven Effekt des Mikroplastiks durch die Sorption der Spurenstoffe [110,111]. Jedoch werden auch andere Mechanismen durch die Polymerpartikel, wie lediglich eine Effekt-Verzögerung, diskutiert [112].

Ziel

Durch gezielte Versuche in Laborkläranlagen mit konstanten Bedingungen sollen Kenntnisse gewonnen werden, ob organische Spurenstoffe während der biologischen Abwasserbehandlung in Kläranlagen an Mikroplastik gebunden und über diese in die aquatische Umwelt ausgetragen werden.

Durchführung

In den hier dargestellten Laborkläranlagenversuchen (vgl. AP 4) wurden der Beitrag einer Mikroplastikdosierung zur Spurenstoffentfernung betrachtet und Veränderungen der biologischen Prozesse anhand von Ablaufparametern wie CSB oder Gesamtstickstoff überwacht.

Insgesamt wurden sechs Laborkläranlagen betrieben, von denen eine als Prozessblindwert, zwei als Spurenstoffkontrollen ohne Mikroplastikdosierung und drei als Versuchsanlagen mit Spurenstoffen und Mikroplastikdosierung dienten. Eine ausführliche Beschreibung der Laborkläranlagen sowie deren Betrieb ist auf Seite 90f gegeben.

Der Versuch gliederte sich in drei zweiwöchige Phasen bestehend aus der Equilibrierung des Belebtschlammes aus einer realen Kläranlage an die Laborbedingungen (u. a. synthetisches Abwasser, 20 °C), der Adaptation des Belebtschlammes an die dosierten Spurenstoffe (je 500 ng/L: 4- und 5-Methylbenzotriazol, Candesartan, Carbamazepin, Citalopram, Diclofenac, Metoprolol, Primidon, Sulfamethoxazol, Tramadol, Venlafaxin) mit Coffein als Abbaukontrolle, und dem eigentlichen Versuch mit semikontinuierlicher Mikroplastikdosierung (30.000 PS-Partikel je 12 h).

Die wässrige Phase wurde in dieser Untersuchung mittels LC-MS/MS auf die verbleibende Konzentration der dosierten organischen Spurenstoffen untersucht.

Ergebnisse

Die Parameter im Kläranlagenablauf (CSB, BSB, DOC, N-gesamt, Ammonium, Nitrat) und Belebtschlamm (TS-Gehalt, Glühverlust) zur Überwachung des biologischen Abbaus wiesen keine Unterschiede zwischen Blindwert, Spurenstoffkontrollen und Versuchsanlagen auf (Abbildung 43). Die Spurenstoffkonzentrationen, die so gewählt wurden, dass sich Konzentrationsänderungen in Gegenwart von Mikroplastik messtechnisch erfassen lassen sollten, waren zu niedrig, um messbare Veränderungen der biologischen Prozesse zu verursachen. Die Mikroplastikdosierung der 40- μ m-PS-Partikel lässt sich sowohl im Ablauf als auch im Belebtschlamm anhand der FTIR-Messungen beobachten.

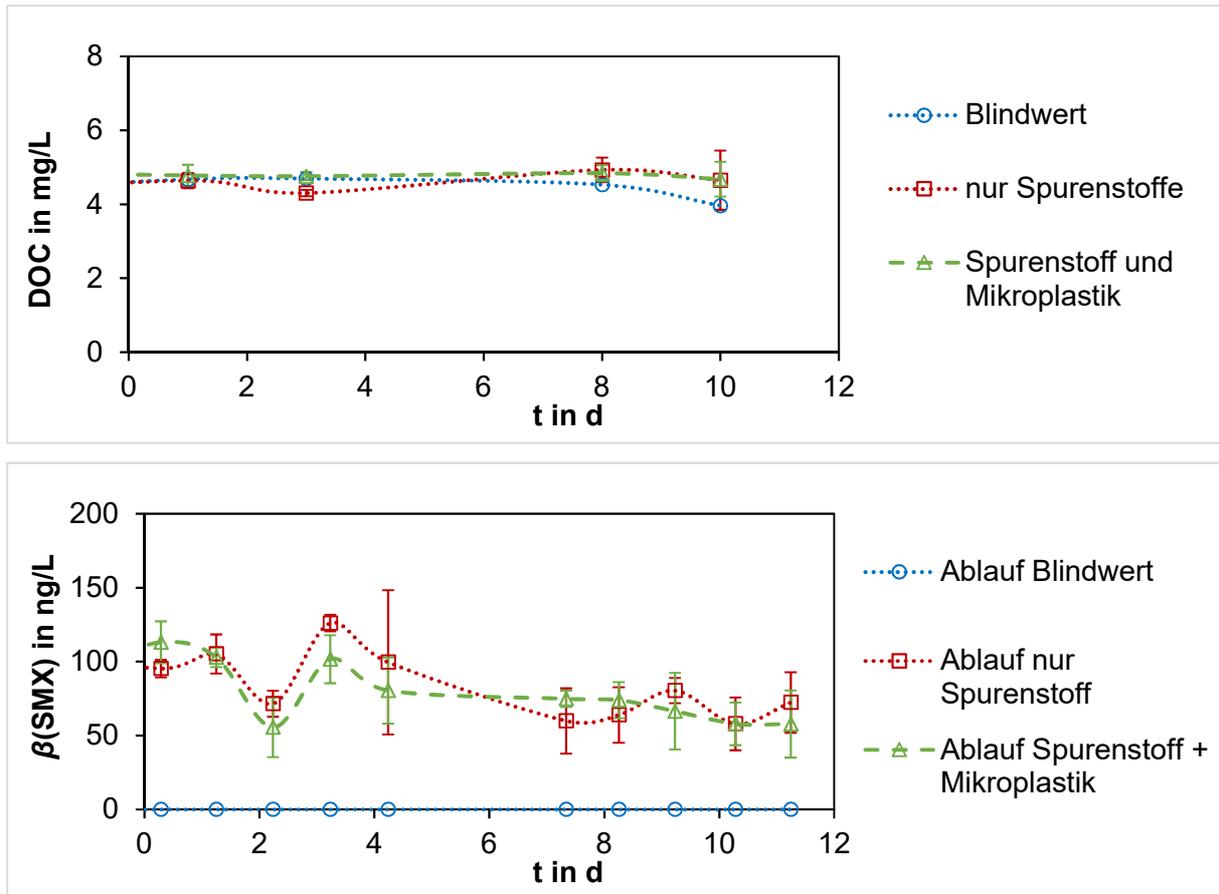


Abbildung 43: Vergleich der DOC-Konzentration (oben) und Sulfamethoxazol- (SMX) Konzentration (unten) im Ablauf der Laborkläranlagen von Blindwertanlage (n=1), Anlagen mit Spurenstoffdosierung (n=2) und zusätzlicher Mikroplastikdosierung (n=3)

Insbesondere Sulfamethoxazol wurde als Sorptiv für PS beschrieben [113], sodass eine vollständige Entfernung oder zumindest deutliche Konzentrationsabsenkung nach PS-Dosierung erwartet wurde. Zwar erfolgte eine Konzentrationsabnahme um etwa 80% ausgehend von 500 ng/L im Zulauf, allerdings sowohl in den Spurenstoffkontrollanlagen als auch während des Mikroplastikversuchs (Abbildung 43). Es ist davon auszugehen, dass ein ggf. biologischer Abbau des Sulfamethoxazols erfolgt. Für eine Sorption an Mikroplastik finden sich hingegen keine Hinweise. Ein ähnliches Bild ergab sich für die anderen untersuchten Spurenstoffe, die sich lediglich hinsichtlich ihrer mittleren oder geringen Abbaubarkeit in den Laborkläranlagen unterscheiden. Erklären würde dies die Sorption der im Überschuss vorliegenden gelösten natürlichen organischen Moleküle an Mikroplastik. Eine in Kläranlagen stattfindende Anreicherung von Spurenstoffen auf Mikroplastik als Risikofaktor für Umwelt und Organismen ist damit zumindest kritisch zu hinterfragen. Diese Erkenntnis stützt die Modellierungen von Koelmans et. al., bei denen Mikroplastik zwar als eine

stark sorbierender Vektor betrachtet wurde, jedoch die Anwesenheit anderer partikulärer Materie und die damit zusammenhängenden Sorptionsprozesse in der Umwelt den Einfluss von Mikroplastik überlagert [73]. Eine Untersuchung zur Beladung der eingesetzten Mikroplastik-Partikel war nicht möglich, da für eine Trennung der PS-Partikel von der organischen Matrix die Behandlung nach der Fenton-Methode einen zu großen Einfluss auf die sorbierten org. Spurenstoffe gehabt hätte und diese Untersuchung somit nicht repräsentativ gewesen wäre.

Schlussfolgerung

Ein eindeutiger Einfluss einer erhöhten Mikroplastikkonzentration auf die Konzentration von Spurenstoffen in der Kläranlage konnte nicht beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass hier keine wesentliche Beladung und anschließende Vektor-Effekte des Mikroplastiks, auch auf Grund der Einbindung in den Klärschlamm (Ergebnisse AP4), zu erwarten sind. Dies entspricht den Modulierungen von Koelmans et al., nach denen Mikroplastikpartikel auf Grund der geringen Abundanz im Vergleich zu anderer partikulärer Materie nur eine geringe Rolle für die Sorption und Verteilung hydrophober organischer Spurenstoffe in der aquatischen Umwelt spielen [114]. Einen bisher wenig betrachteten Aspekt stellt hingegen der Verbleib ursprünglicher Additive in sekundärem Mikroplastik und in Umweltsystemen dar. Darüber konnte auch in dieser Untersuchung keine Informationen gewonnen werden. Da Additive je nach Polymertyp und Anwendung einen hohen Massenanteil des ursprünglichen Plastiks, , ausmachen können [115], sind hier weitere Untersuchungen notwendig.

AP 4: Untersuchungen zum Eintragspfad Kläranlage und prozesstechnische Bewertung

Leitung: LfU

Partner: TUM-SWW, IUTA

Einleitung

Ein großer Teil des weltweit produzierten Plastiks ist für einmalige oder kurzfristige Nutzung vorgesehen und endet nach Gebrauch, u. a. durch Littering oder fehlende Entsorgungsstrukturen, in der Umwelt [116]. Ein weiterer, häufig diskutierter Eintragspfad sind Kläranlagen. Diese können jedoch durch die verschiedenen klassischen Abwasserreinigungsstufen (mechanisch / biologisch / chemisch) Mikroplastik anteilig entfernen [107,117–119].

Die ersten Studien, die Kläranlagen als wesentliche Mikroplastikeintragspfade in die Umwelt identifizierten, beschränkten sich auf einfache, stark fehleranfällige Analysemethoden (Lichtmikroskopie ohne Überprüfung der Partikelzusammensetzung [120–122]) und größere Partikel (> 300 µm [123]). Die Zuverlässigkeit der Analysen verbesserte sich durch den Einsatz von FTIR-Analysen an den vorausgewählten Partikeln durch Vermeidung falsch positiver Ergebnisse [124], während falsch negative Ergebnisse erhalten blieben. Bis dato (Projektstart) veröffentlichte Partikelzahlen zum Mikroplastikeintrag in die Umwelt sind daher kritisch zu betrachten. Die Studien, in denen eine Polymerzuordnung erfolgte, fanden überwiegend PE, PP oder Polyester bzw. PET [125], sowie meist steigende Partikelzahlen bei sinkender Partikelgröße [126].

Während bei Schlammentnahmen nach verschiedenen Reinigungsstufen (primär/sekundär/tertiär) für die Partikelfracht keine Unterschiede festgestellt wurden [126], zeigten vorangegangene Untersuchungen unabhängig von den eingesetzten Analysemethoden für die Wasserphase sinkende Partikelfrachten mit zunehmender Anzahl an Behandlungsstufen [120]. Dennoch schwanken die Angaben zur Rückhalteeffizienz, die für einzelne Stufen ermittelt wurden, stark [106,121] und lassen so kaum Rückschlüsse auf zugrundeliegende Mechanismen zu.

Moderne Kläranlagen nutzen zusätzlich tertiäre Behandlungsstufen wie die Filtration, bspw. mit Sandfiltern. Diese dient allgemein u. a. dem Rückhalt von Feststoffen. Durch

Sandfiltration sollte daher Mikroplastik zurückgehalten werden [107,127]. Beim Sandfilter schwanken bisher ermittelte Entfernungsraten zwischen 15 und 100% [121,122,125,128]. Primpke et al. [129] wiesen dabei auf eine Verringerung der Entfernungsleistung mit sinkender Partikelgröße im Bereich kleiner 100 µm hin, sodass dieser Submikro-Bereich einer näheren Betrachtung bedarf.

Insgesamt werden große Mengen gereinigtes Abwasser in die Vorfluter abgegeben, die zwar im Vergleich zum Kläranlagenzulauf wenig, insgesamt jedoch eine signifikante Menge Mikroplastik enthalten, sodass Kläranlagen eine potentielle Quelle für Mikroplastik in Oberflächengewässern darstellen könnten [108,109,130].

Für die Bewertung und Planung von Anlagen muss der vorhandene Wissensstand wesentlich erweitert werden, damit Wirkungsgrade für typische Behandlungsstufen, wie die biologische Reinigungsstufe oder etablierte Nachbehandlungsstufen wie Sandfilter ermittelt und valide Aussagen zur von Kläranlagen emittierten Partikel- und Polymerfracht getroffen werden können.

Gesamtziel

Das übergeordnete Ziel des Arbeitspaketes war die prozesstechnische Bewertung der Abwasserbehandlungsschritte in Kläranlagen und deren Einfluss als Eintragspfad für Mikroplastik.

Zum Verständnis grundlegender Prozesse während der biologischen Abwasserbehandlung erfolgten systematische Untersuchungen in Laborkläranlagen. Parallel sollten im Feld die Effizienz tertiärer Behandlungsstufen wie Sandfilter ermittelt und typische Ablaufwerte für Kläranlagen bestimmt werden. Dies diente zugleich der Validierung und der Gegenüberstellung der in AP 2 entwickelten Methoden. Abschließend sollte eine Beurteilung von Kläranlagen als Mikroplastikquellen durch Vergleichsmessungen von Mikroplastikkonzentrationen im Vorfluter einer Kläranlage erfolgen.

Aufklärung von Rückhaltemechanismen für Mikroplastik in Kläranlagen im Labormaßstab (LfU)

Einleitung

Laborkläranlagen bilden die biologische Stufe einer kommunalen Kläranlage ab und bestehen im Wesentlichen aus Denitrifikations-, Nitrifikations- und Absetzbecken. Sie bieten den Vorteil, dass die wesentlichen Stoffströme (Zulauf, Ablauf, Belebtschlammabzug) überwacht werden können. Dies sollte die Aufstellung einer Mikroplastikbilanz für die biologische Reinigungsstufe ermöglichen.

Dennoch können so nicht alle Reinigungsmechanismen einer mechanisch-biologischen Reinigung abgebildet werden. Während in Grob- und Feinrechen ein maßgeblicher Rückhalt suspendierter Partikel der untersuchten Größen (0,5 – 300 µm) nicht zu erwarten ist, wäre im Fettabscheider ein Aufschwimmen von Partikeln geringer Dichte wie bspw. PE denkbar. In den Laborkläranlagen wird daher durch die Wasserführung zwischen den Becken weit unterhalb der Oberfläche ein Transport schwimmender Partikel vermieden und der Effekt des Fettabscheiders indirekt berücksichtigt. Auch der Sandfang ist nicht separat verbaut, sodass im Absetzbecken ein Absinken von Partikeln hoher Dichte wie bspw. PVC lediglich grundsätzlich möglich ist.

Die Betrachtung der chemischen Abwasserreinigung durch (Phosphat-)Fällung wurde bei den Untersuchungen nicht berücksichtigt, da sie auch bei kommunalen Kläranlagen nur optional erfolgt.

Zwischen der Beantragung des Projektes und dessen Fertigstellung wurden zwei Studien zu Mikroplastik in Laborkläranlagen veröffentlicht. Kalcikova et al. [131] verwendeten ausschließlich PE mit einer Größe um 70 µm in einem einstufigen Reaktor und fanden entsprechend schwimmende, nicht-suspendierte PE-Partikel im Ablauf. Eine Auswirkung auf die biologischen Prozesse durch PE war nicht erkennbar. Dies lässt weder Rückschlüsse auf mehrstufige Reaktorsysteme noch auf andere Partikelgrößen oder Polymere zu.

Frehland et al. [132] verwendeten im Gegensatz zu den Untersuchungen am LfU kleinere Partikel (ca. 200 nm) aus PS mit Palladiumkern sowie Indiumoxid-dotierte PET-Fasern (> 500 µm). Auch diese Studie lässt keine Rückschlüsse auf andere Partikelgrößen eines Polymers oder verschiedener Polymere einer Größe zu, während

durch die Metall-(oxid-)Dotierung eine Veränderung der Dichte der Partikel nicht ausgeschlossen werden kann.

Ziel

Die systematischen Untersuchungen in Laborkläranlagen sollten ein Verständnis grundlegender Prozesse während der biologischen Abwasserbehandlung ermöglichen. Dafür wurden u. a. verschiedene Polymere und mehrere Partikelgrößen im Submikrometer-Bereich (0,05 - 100 µm) untersucht.

Durchführung

Aufbau und Betrieb der Laborkläranlagen

Am LfU standen bis zu sechs baugleiche Anlagen zur Verfügung, von denen eine als Prozessblindwert diente, während in den anderen fünf Anlagen gezielt Mikroplastik hinzugegeben wurde. Die Laborkläranlagen bestehen im Wesentlichen aus Denitrifikations-, Nitrifikations- und Absetzbecken (Abbildung 44).

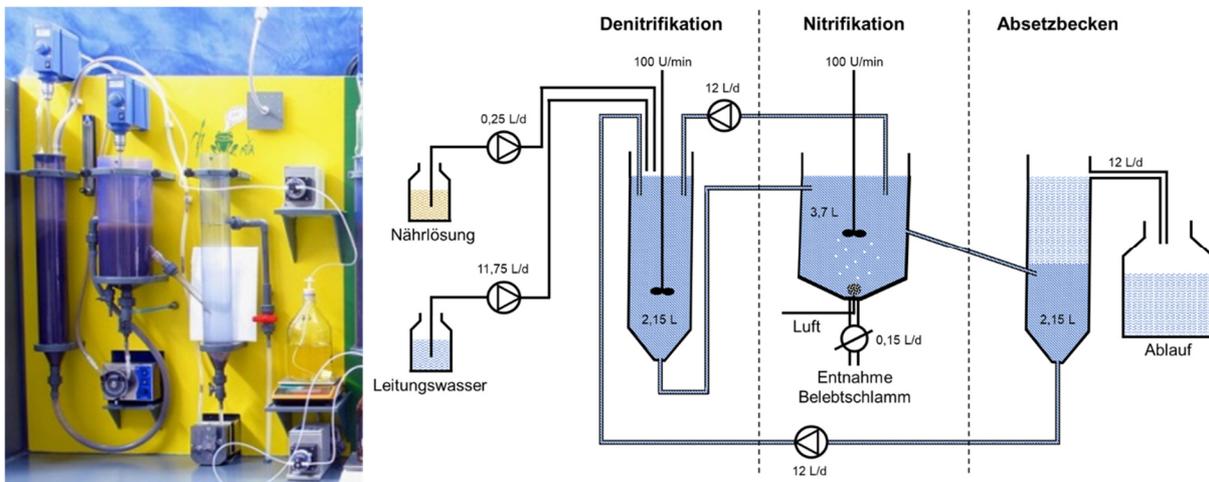


Abbildung 44: Foto und schematischer Aufbau einer der 6 baugleichen Laborkläranlagen des LfU

Für die Mikroplastikversuche wurden in den Laborkläranlagen alle Verbindungsstücke und Schläuche durch Materialien ersetzt, die eine Mikroplastikbestimmung mittels FTIR-Spektroskopie nicht stören oder bei der Analyse nicht erfasst werden (bspw. Edelstahl, Silikon oder Teflon). Die Hauptbecken der Laborkläranlagen und deren Anschlüsse bestanden aus Hart-PVC, dessen Austausch somit nicht möglich war. Dennoch zeigte die Blindwertuntersuchung, dass die Partikelanzahl im untersuchten Größenbereich im Vergleich zu den geplanten Partikeldosierungen vernachlässigbar war. Zudem konnten nur vereinzelt PVC-Partikel nachgewiesen werden. Dies

ermöglichte die Durchführung von Versuchen mit verschiedenen Polymeren (PS, PE, PET, PMMA, PVC) und Größen (0,5 - 220 µm).

Die Inbetriebnahme erfolgte mit Belebtschlamm aus einer kommunalen Kläranlage, der im auf 20 °C temperierten Labor als künstliches Abwasser eine konzentrierte Nährlösung erhielt, die mit Leitungswasser verdünnt wurde. Die Zugabe der Nährlösung sowie ggf. anderer Substanzen erfolgte im Denitrifikationsbecken. Sauerstoff wurde mittels Druckluft mit 2 mg/L im Nitrifikationsbecken zur Verfügung gestellt.

Als Routinekontrollen erfolgen zweimal wöchentlich Analysen des Ablaufs (CSB, BSB, DOC, N-gesamt, Ammonium, Nitrat), sowie einmal wöchentlich des Belebtschlammes zur Wachstumskontrolle (Trockensubstanz (TS), Glühverlust) und Anpassung des TS-Gehaltes auf 2,5 g/L. Die Anlagen wurden aller zwei Tage mit Naturhaar-Bürsten so gereinigt, dass eine Verstopfung der Verbindungsstücke und Schläuche vermieden wurde. Als Nebeneffekt wurde auch das Anhaften von Schlammflocken an den Wänden der Becken minimiert.

Die Mikroplastikzugabe als wässrige Suspension erfolgte jeweils mit einem Polymer in einer Größe pro Versuch als Stoßdosierung, sodass ein Mikroplastikpool generiert wurde. Dieser entsprach einer kommunalen Kläranlage, in der sich Mikroplastik im Belebtschlamm anreichert und war die einzige Möglichkeit die vollständige Überführung der Partikel in die Laborkläranlage zu gewährleisten. Die Bestimmung der zugegebenen Mikroplastikmenge erfolgte über die eingewogene Masse (Partikel >10 µm) oder das Volumen einer stabilen Suspension (Partikel <10 µm). Bei der Mikroplastikdosierung wurde außerdem darauf geachtet, dass die Doppelbestimmung möglichst in zwei verschiedenen Laborkläranlagen und mit zwei verschiedenen Belebtschlammchargen durchgeführt wurde, um Einflüsse durch potentielle Verschleppung oder die Zusammensetzung der Belebtschlammcharge zu minimieren.

Während des Versuchs wurde innerhalb der ersten 36 h nach Mikroplastikzugabe der gesamte Kläranlagenablauf in vier Teilproben (2 - 10 L) aufgefangen. Während der folgenden mindestens drei Wochen fand die Beprobung einmal wöchentlich statt und lieferte eine Abklingkurve. Die Proben zur Untersuchung des Belebtschlammes (100 mL) wurden ebenfalls einmal wöchentlich, möglichst vor der Einstellung des TS-Gehaltes auf 2,5 g/L durch manuellen Schlammabzug entnommen.

Eingesetzte Partikel

Tabelle 8 liefert einen Überblick über die einzeln eingesetzten Polymere, Partikelgrößen, Konzentrationen und Partikelformen. Die Partikel wurden überwiegend von verschiedenen Projektpartnern (BS-Partikel, TUM, LfU) hergestellt, oder im Rahmen des BMBF-Förderschwerpunkts „Plastik in der Umwelt“ zur Verfügung gestellt (BAM, LfU-Parallelprojekt MicBin). Während die kugelförmigen Mikroplastikpartikel sehr nah an ihrem nominellen Durchmesser lagen, wiesen die fragmentierten Partikel eine eher breite Größenverteilung auf. Ergänzend wurde eine Mischung aus je 35.000 PS-Kugeln der Größen 40, 80, 140 und 220 µm eingesetzt.

Tabelle 8: Übersicht der eingesetzten Modellpartikel

Polymer	Größe in µm	Partikelzahl	Form	Fluoreszenz	Herkunft
PS	220	35.000	Kugel	-	BS-Partikel
	140	35.000	Kugel	-	BS-Partikel
	80	35.000	Kugel	-	BS-Partikel
	40	35.000	Kugel	-	BS-Partikel
		140.000	Kugel	-	BS-Partikel
		280.000	Kugel	-	BS-Partikel
	10	450.000	Kugel	ja	BS-Partikel
	1	3.500.000	Kugel	ja	BS-Partikel
	0,5	7.000.000	Kugel	ja	BS-Partikel
	50...150	35.000	Fragment	ja	TUM
PMMA	50...150	35.000	Kugel	-	BS-Partikel
PE	50...150	35.000	Fragment	-	MicBin
PVC	50...150	35.000	Fragment	-	LfU
PET	50...200	35.000	Fragment	-	BAM

Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung für den Ablauf der Laborkläranlagen erfolgte mit Hilfe eines pH- und temperaturkontrollierten Fenton-Aufschlusses (Abbildung 45 links), der außerdem keine mittels FTIR erkennbaren Veränderungen an den eingesetzten Partikeln hervorrief.



Abbildung 45: Optimierte Probenaufbereitung für Ablauf und Belebtschlamm

Während der Aufbereitung von Belebtschlamm (Abbildung 45 rechts) wurde der überwiegend organische Rückstand über eine Fenton-Reaktion mit stufenweiser Reagenziodosierung nahezu vollständig entfernt. Die Abtrennung verbliebener anorganischer Rückstände erfolgte durch Dichtentrennung mit Kaliumformiatlösung ($\rho = 1,6 \text{ g/cm}^3$). Während so aufbereitete Proben mittels Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie nach Filtration direkt analysierbar waren, wurden für die Untersuchung mittels FTIR zusätzliche Waschschrte mit Reinstwasser zur Entfernung des Kaliumformiats benötigt. In den Proben können so u. a. PE, PS, PP, PA sowie die in Laborkläranlagen untersuchten PET-Partikel ($> 50 \mu\text{m}$) zuverlässig identifiziert werden, während insbesondere bei Acrylaten und kleineren PET-Partikeln störende Signale die Zuordnung erschweren.

Mikroplastikanalytik

Die Analyse erfolgte bei den Laborkläranlagenversuchen partikelabhängig mit Lichtmikroskopie (Kugeln aus PS $\geq 40 \mu\text{m}$, PMMA), Fluoreszenzmikroskopie (fluoreszenzmarkiertes PS) oder FTIR (PE, PET, PVC).

Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Eingesetzt wurde am LfU ein Zeiss Axio Imager.Z2m-Mikroskop, das licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der gesamten Filterfläche ($d = 47 \text{ mm}$) durch Abrastern größerer Flächen mit parallelen optischen Schnitten (mehreren Fokusebenen) ermöglichte. Für Lichtmikroskopie-Aufnahmen erfolgte die Auswertung der Partikelzahl manuell anhand von Größe (40, 80, 140 bzw. 220 μm) und Form

(Kugel). Für die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen kam die geräteeigene Software (ZEN 2.6) zum Einsatz, bei der die Identifikation der Partikel anhand der Fluoreszenzintensität oder mit Hilfe eines Maschinenlern-Ansatzes erfolgte.

Fourier-Transformations-Infrarot- (FTIR-)Spektroskopie

Am LfU wurde ein Bruker Hyperion 3000 FTIR-Mikroskop mit 64x64 FPA (focal plane array) Detektor und Bruker Tensor 27 FTIR-Spektrometer genutzt. Nach Schulungen bei und persönlicher Kommunikation mit den Mikroplastikarbeitsgruppen von/um Martin Löder (Universität Bayreuth), Jes Vollertsen (Aalborg University) und Sebastian Primpke (AWI Helgoland) wurden Anpassungen im Bereich der Gestaltung des Messraums (Luftfilter, Klimaanlage, automatisiertes Flüssigstickstoffkühlsystem) und der Grundeinstellungen für Messungen ($1250\text{...}3600\text{ cm}^{-1}$; 8 cm^{-1} Auflösung, 6 Scans), sowie für die halbautomatische Auswertung mit MPhunter [133], MPAPP [134], siMPle [135] oder MicroplasticsFinder [136] vorgenommen.

Die Grenzen des Messgerätes wurden hinsichtlich maximaler Probengröße (gemessene Teilprobe: 100% (4x4 binning); min. Partikeldurchmesser: $20\text{ }\mu\text{m}$) und maximaler Auflösung (gemessene Teilprobe: 25%; min. Partikeldurchmesser: $10\text{ }\mu\text{m}$) für die Verwendung von Aluminiumoxidfiltern (Anodisc[®], Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$, $d = 25\text{ mm}$ mit PP-Ring) im Transmissionsmodus bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Vergleich Auswerte-Methoden für die FTIR-Messungen

Ein Vergleich der eingesetzten Auswerteansätze zeigte grundsätzlich Ergebnisse in der gleichen Größenordnung hinsichtlich Partikelzahl und Polymerzuordnung. Die Software siMPle bietet die Möglichkeit der flexiblen Anpassung und Erweiterung der eingesetzten Datenbank in Abhängigkeit von der gewählten Matrix, während eine Erweiterung für den Endnutzer in MPAPP oder MicroplasticsFinder nicht ohne weiteres möglich ist. Durch die umfangreiche Datenbank ist siMPle bei der Ergebnisermittlung mit einigen Stunden etwas langsamer als MPAPP und deutlich langsamer gegenüber MicroplasticsFinder mit wenigen Minuten. Letztere Software nutzt für den Datenbankabgleich lediglich einzelne Banden und ist so im Idealfall weniger anfällig für matrixbedingte Schwankungen des Hintergrunds, enthält jedoch fast ausschließlich synthetische Polymere als Referenz, sodass eine erhöhte Gefahr falsch positiver Ergebnisse besteht. Durch den direkten Vergleich zwischen visuellem Bild und

Hyperspektralaufnahme ist nur mittels MicroplasticsFinder eine exakte Partikelgrößenbestimmung und Fasererkennung möglich. Diese Software ist jedoch im Gegensatz zu den anderen Ansätzen kostenpflichtig.

Untersuchung des Rückhalts von Plastikpartikeln unterschiedlicher Größe

Die Untersuchungen zum Einfluss der Partikelgröße wurden mit dem Polymer Polystyrol durchgeführt, da dieses eine sehr ähnliche Dichte im Vergleich zu Wasser aufweist und eines der meistproduzierten Materialien darstellt. Die Untersuchungen wurden in folgenden vier Schritten durchgeführt:

- (1) Einfluss der Partikelgröße bei gleicher Konzentration im mittleren Mikroplastik-Größenbereich (40 - 220 μm),
- (2) Einfluss der Form (Kugel, Fragment) bei vergleichbarem Partikelvolumen,
- (3) Einfluss der Konzentration (35.000 - 350.000) bei gleicher Größe (40 μm) und
- (4) Einfluss der Partikelgröße mit steigender Konzentration im Submikro-Bereich (0,5 - 10 μm).

Bei keinem der Versuche mit Polystyrol waren Veränderungen der Ablaufparameter (CSB, BSB, Gesamtstickstoff, Ammonium, Nitrat) oder des Belebtschlammwachstums (TS, Glühverlust) zu beobachten. Die Mikroplastikdosierungen hatten somit keine erkennbaren Auswirkungen auf die biologischen Prozesse in der Laborkläranlage.

Im ersten Schritt wurden die Laborkläranlagen mit je 35.000 PS-Partikeln verschiedener Größen (40 / 80 / 140 / 220 μm) versetzt. Mit sinkender Partikelgröße erhöhte sich die Anzahl der Partikel, die bis in den Ablauf gelangten (Abbildung 46). Insbesondere bei den kleinsten hier betrachteten Partikeln (40 μm) trat kurz nach der Dosierung ein Peak auf, der jedoch im Vergleich zur dosierten Partikelzahl klein ausfiel. Über die gesamte Versuchsdauer betrug der Rückhalt in der Laborkläranlage für Partikel $\geq 40 \mu\text{m}$ mehr als 90%.

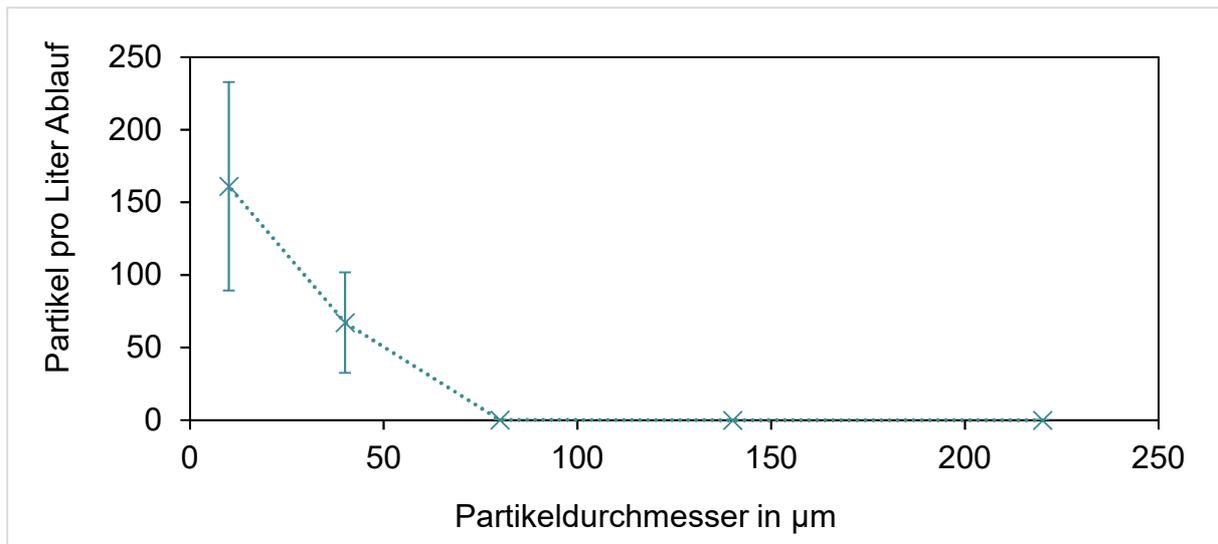


Abbildung 46: PS-Partikelkonzentration im Ablauf der Laborkläranlagen in Abhängigkeit von deren Größe

Während für die 40 µm-Partikel die Bilanz über die Laborkläranlage unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten der Probenaufbereitung nahezu geschlossen werden konnte, stieg der Anteil in der Bilanz fehlender Partikel mit steigender Partikelgröße (Abbildung 47). Eine Untersuchung der Reinigungslösung nach dem Versuch zeigte, dass Anhaftung an den Laborkläranlagenwänden keine Rolle spielte. Vielmehr neigten die großen nativen PS-Partikel dazu, trotz ihrer gegenüber Wasser höheren Dichte auf der Wasseroberfläche zu schwimmen. Da sie weder in der Wasserphase suspendiert vorlagen, noch in größeren Mengen an den Schlammflocken oder an den Wänden hafteten, wurde vermutet, dass sie sich während des gesamten Versuchs überwiegend an der Wasseroberfläche des ersten Beckens (Denitrifikation) befanden. Dies konnte in einem Versuch mit gleichzeitiger Dosierung der 4 Partikelgrößen mit je 35.000 Partikeln und gezielter Beprobung der Wasseroberfläche der ersten beiden Becken jedoch nicht bestätigt werden.

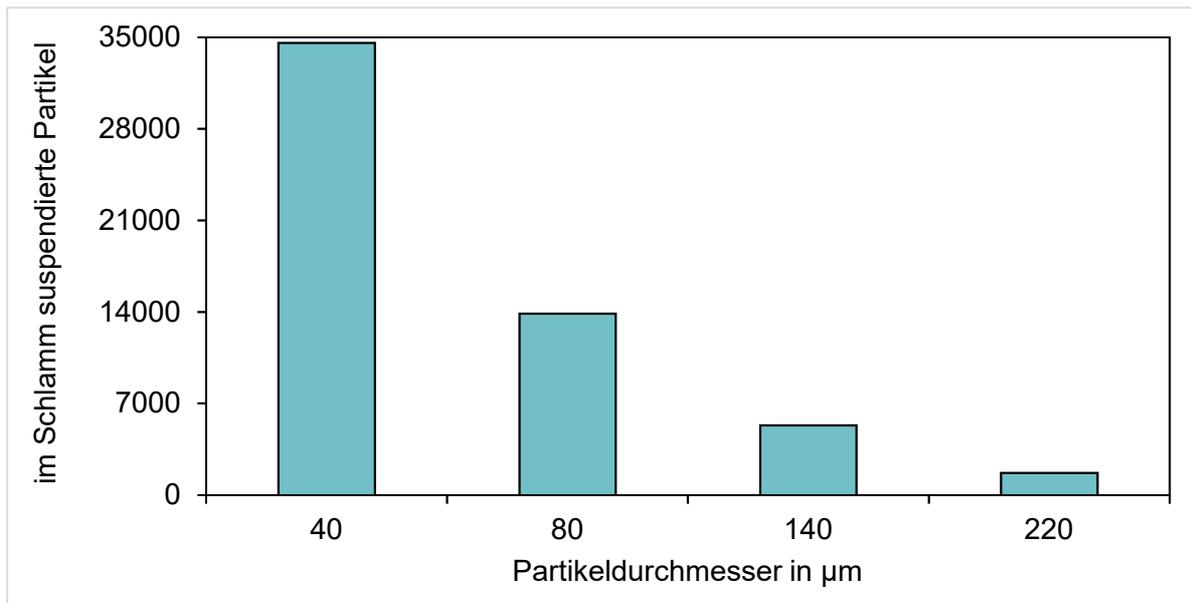


Abbildung 47: Suspendierbarkeit von je 35.000 PS-Partikeln unterschiedlicher Größe im Belebtschlamm

Die Partikelform (Kugel bzw. Fragment) wirkte sich hingegen nicht signifikant auf den Rückhalt von Mikroplastikpartikeln aus. Zwischen PS-Kugeln von 40 µm Durchmesser und PS-Fragmenten vergleichbaren Volumens waren keine Unterschiede in den Laborkläranlagen zu beobachten.

Ergänzend wurde für 40 µm-PS-Kugeln der Einfluss der dosierten Partikelzahl (35.000 / 140.000 / 350.000) untersucht. Erwartungsgemäß erhöhte sich der Partikelaustrag mit steigender Partikelzahl. Dennoch zeigte eine Normierung der Partikelkonzentration im Kläranlagenablauf, dass stets der gleiche Prozentsatz der Partikel ausgetragen wurde. Diese Erkenntnis ist entscheidend für die Versuche mit kleineren Partikeln in höherer Konzentration.

Entsprechend wurden Stoßdosierungen mit höherer Partikelzahl (350.000 / 3.500.000 / 7.000.000) in den Laborkläranlagen für die Untersuchung von fluoreszenzmarkierten PS-Kugeln im Subµ-Bereich (10 / 1 / 0,5 µm) eingesetzt. Die Analytik erfolgte dabei mittels Fluoreszenzmikroskopie und Partikelerkennungssoftware, wobei mit sinkender Partikelgröße (0,5...1 µm) die Anzahl der Hintergrundsignale so stark zunahm, dass eine belastbare Quantifizierung im Belebtschlamm nicht mehr realisierbar war. Mit sinkender Partikelgröße stieg auch hier die Wahrscheinlichkeit, dass die Partikel bis in den Ablauf gelangen. Wie bei den 40 µm-Partikeln trat kurz nach der Dosierung ein Peak auf, der im Vergleich zur

dosierten Partikelzahl klein ausfiel. Der Rückhalt im Belebtschlamm für Partikel kleiner als $40\ \mu\text{m}$ scheint stark mit dem Gehalt der abfiltrierbaren Stoffe (AfS) im Laborkläranlagenablauf zu korrelieren.

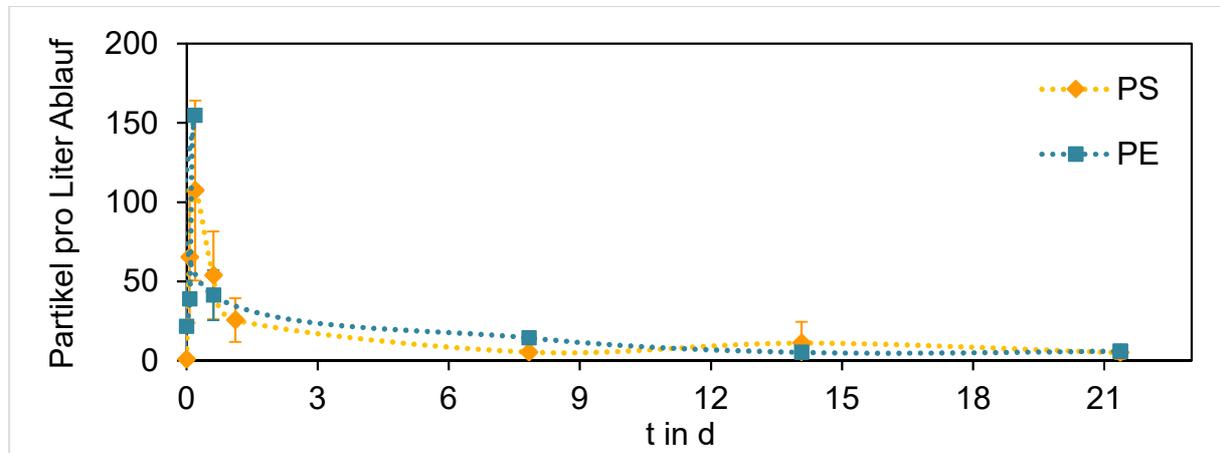


Abbildung 48: Abklingkurven von PE und PS im Ablauf der Laborkläranlagen nach Stoßdosierung von 35.000 Partikeln mit Emissionspeak kurz nach Dosierung

Der Einfluss der AfS im Ablauf wurde durch das Einbringen eines Blattrührers (H 13 mm, B 32 mm) in das Absetzbecken näher untersucht. Durch Erhöhung der Rührgeschwindigkeit (0 / 50 / 75 / 100 U/min) konnte eine Verschlechterung des Absetzverhaltens simuliert werden. Nach der Adaptationszeit der Laborkläranlagen von 2 Wochen erfolgte die Mikroplastikdosierung mit $1\text{-}\mu\text{m}$ -PS-Kugeln. Nach einer Woche, in der der PS-Emissionspeak abklang, wurden arbeitstäglich eine Rührgeschwindigkeit eingestellt, für 60 min equilibriert und anschließend 1,5 L Probe für AfS-Analytik und Fluoreszenzmikroskopie aufgefangen. Nach der Probenahme wurde der Rührer gestoppt, um den Austrag von Belebtschlamm über Nacht zu minimieren. Die Zwischenregion (10 - 80 mg/L AfS) ließ sich über dieses experimentelle Setup nicht einstellen, da an der Oberfläche des Absetzbeckens ein schlammflockenfreier Wasserfilm ausgeprägt war, der erst bei 100 U/min verschwand. Ein Zusammenhang zwischen AfS und Mikroplastikkonzentration wurde dennoch deutlich (Abbildung 49). Die Erhöhung des Hintergrunds durch falsch positiv gewertete, etwa ein Mikrometer große Fluoreszenzsignale fiel mit steigenden AfS gegenüber der Gesamtzahl an Fluoreszenzsignalen klein aus. Während etwa 4.000 Partikel je Liter Probe in der Wasserphase suspendiert vorlagen, stieg der Anteil schlammflockengebundener Partikel mit etwa 238 Partikeln je mg AfS deutlich an.

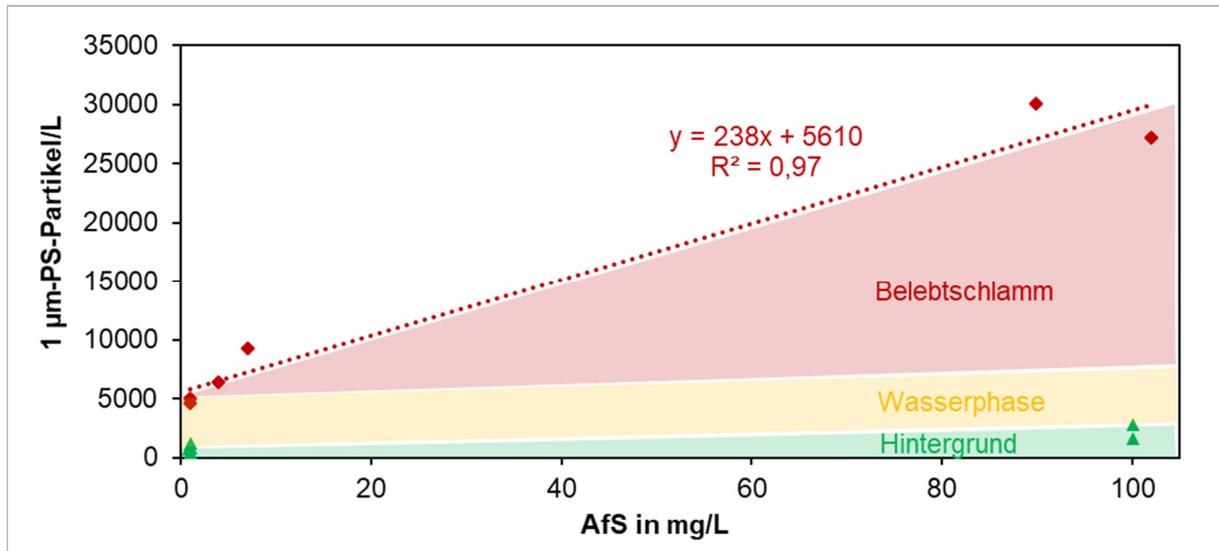


Abbildung 49: Verteilung von 1 µm-PS-Partikeln in Abhängigkeit von der AfS-Konzentration im Vergleich zu anderen fluoreszierenden Partikeln im gereinigten Abwasser der Laborkläranlage

Eine Verringerung des Eintrags von SubµPlastik in Kläranlagen durch Sandfilter oder andere Maßnahmen zur Feststoffreduktion wäre entsprechend zu erwarten. Eine vollständige Entfernung dieser kleinen Partikel ist durch deren gute Suspendierbarkeit in der Wasserphase nicht wahrscheinlich.

Untersuchung des Rückhalts von Plastikpartikeln unterschiedlichen Materials

Der Rückhalt der Mikroplastikpartikel wurde für fünf verschiedene Polymere (PS, PE, PVC, PET, PMMA) mit je ca. 35.000 Partikeln mit einer ungefähren Größe von 50 - 150 µm untersucht. Wie bei den oben für Polystyrol unterschiedlicher Größen dargestellten Versuchsreihen traten im Vergleich zum Blindwert auch bei den anderen untersuchten Polymeren keine messbaren Unterschiede in den Standardparametern für Ablauf und Belebtschlamm durch die Mikroplastikdosierung auf.

In den verwendeten Laborkläranlagen wurde das gereinigte Wasser über einen Überlauf abgeführt. Je geringer die Dichte des untersuchten Polymers ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es aufschwimmt und den Überlauf erreicht (PE, PS). Insbesondere Polymere mit deutlich höherer Dichte als Wasser wie PET oder PVC sind hingegen im Ablauf nur stark vereinzelt anzutreffen. Dies deckte sich mit den Erfahrungen aus den Kläranlagenbeprobungen (AP 4.5), bei denen v. a. PE, PP und PS in größeren Mengen nachgewiesen werden konnten. Dennoch gilt für alle Polymere ein Rückhalt im Belebtschlamm über den Versuchszeitraum von mindestens 90%.

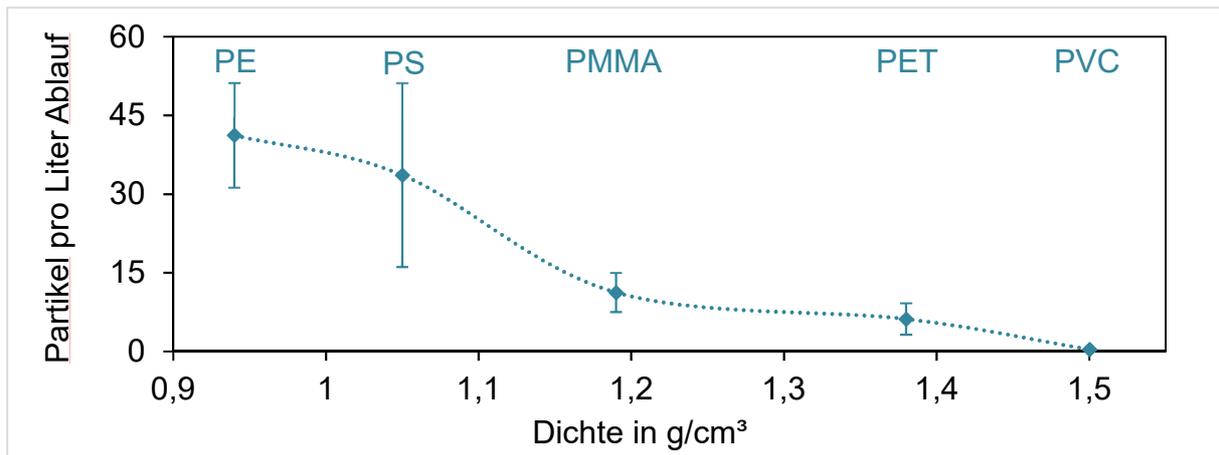


Abbildung 50: Dichteabhängiger Austrag von Mikroplastikpartikeln unterschiedlicher Polymere aus den Laborkläranlagen über den Ablauf (Stoßdosierung von ca. 35.000 Partikeln)

Zusammenfassung

Insgesamt lassen sich drei wesentliche Erkenntnisse hinsichtlich des Verhaltens von Mikroplastik während der biologischen Reinigungsstufe ableiten. Große Partikel eines Polymers oder gleicher Dichte werden stärker zurückgehalten als kleine. Liegen unterschiedliche Polymere in ähnlicher Partikelgröße vor, gelangen vor allem Partikel geringer Dichte in den Kläranlagenablauf. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen Schwebstofffracht und Partikelzahl im Ablauf der (Labor-)Kläranlagen erkennbar, kann aber nicht eindeutig mathematisch beschrieben werden.

Emission von realen Kläranlagen und Prozessbewertung für tertiäre Filtrationsstufen

Partner: TUM-SWW, IUTA, LfU, TUM-IWC

Einleitung

Für die Bewertung und Planung von Anlagen musste der vorhandene Wissensstand (vgl. S. 87) wesentlich erweitert werden, damit Wirkungsgrade für etablierte Nachbehandlungsstufen wie Sandfilter ermittelt und valide Aussagen zur von Kläranlagen emittierten Partikel- und Polymerfracht getroffen werden können.

Ziel

Im Rahmen der gemeinsamen Untersuchungen sollten Mikroplastikeinträge durch kommunale Kläranlagen quantifiziert werden. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Bestimmung der Rückhalteeffizienz von Sandfiltersystemen gelegt und anhand dieser die in vorangegangenen Arbeitspaketen etablierten Analyseverfahren für Mikroplastik gegenübergestellt. Abschließend sollte der Einfluss des Eintrags von Mikroplastik durch kommunale Kläranlagen durch Vergleich mit der Mikroplastikbelastung eines lokalen Vorfluters ermittelt werden.

Durchführung und Methodik

Die Untersuchung des Eintrags von Mikroplastik durch Kläranlagen (KA) in Oberflächengewässer erfolgte vorrangig anhand des gereinigten Abwassers an drei Standorten. Beprobte wurden die kommunalen Kläranlagen Gut Marienhof (München, DE), Hochfeld (Duisburg, DE) und Wolfratshausen (DE), die unterschiedliche Kapazitäten und tertiäre Behandlungsstufen aufweisen. Die Probenahmen fanden zwischen August 2019 und April 2021 bei trockenen Wetterbedingungen statt (Tabelle 9). Die Anzahl der geplanten Probenahmen wurde von 3 auf 13 erhöht um aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen.

Die KA Gut Marienhof hat eine Kapazität von einer Million Einwohnergleichwerten (EGW) und bei Trockenwetterbedingungen einen Abwasserzulaufstrom von $1,63 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. Etwa 21% des Abwasserzulaufes stammen aus verschiedenen gewerblichen und industriellen Quellen, während der Rest aus privaten Haushalten stammt. Die Endreinigungsstufe der KA nutzt einen diskontinuierlich gespülten Sandfilter, der aus 24 Sandfilterzellen, mit einem gemeinsamen Zulauf und Ablauf

besteht. Die Probenahmen dienten der Untersuchung der Mikroplastik (MP)-Gehalte sowohl vor als auch nach der gesamten Sandfilteranlage (gemischtes Abwasser aller aktiven Zellen).

Tabelle 9: Volumina der Probenahmen bei KA Gut Marienhof (A), Wolfratshausen (B), und Hochfeld (C) für die jeweilige KorbfILTERgröße. Dargestellt sind die gefilterten Volumina vor dem Sandfilter und nach dem Sandfilter für die KA Gut Marienhof und Wolfratshausen sowie der Ablauf der alten Sandfilterzelle und der neuen Sandfilterzelle der KA Gut Marienhof.

KA	Probenahme Ort	Datum	Probenahme	Korbsiebfilter		
				100 µm	50 µm	10 µm
A	Vor Sandfilter	5.8.19	1	4.0 m ³	4.0 m ³	0.2 m ³
		17.2.20	2	3.1 m ³	3.1 m ³	0.2 m ³
		8.9.20	3	2.6 m ³	2.6 m ³	0.2 m ³
		13.4.21	4	2.9 m ³	2.9 m ³	0.5 m ³
A	Nach Sandfilter	5.8.19	1	7.0 m ³	7.0 m ³	0.2 m ³
		17.2.20	2	8.2 m ³	8.2 m ³	0.2 m ³
		8.9.20	3	10.1 m ³	10.1 m ³	0.3 m ³
		13.4.21	4	6.4 m ³	6.4 m ³	0.8 m ³
A	Alte Sandfilterzelle	18.2.19	1	5.7 m ³	5.7 m ³	0.3 m ³
	Neue Sandfilterzelle	18.2.19	1	6.1 m ³	6.1 m ³	0.5 m ³
B	Vor Sandfilterzelle	20.2.20	1	4.3 m ³	4.3 m ³	0.3 m ³
		9.9.20	2	3.8 m ³	3.8 m ³	0.3 m ³
B	Nach Sandfilterzelle	20.2.20	1	9.5 m ³	9.5 m ³	0.4 m ³
		9.9.20	2	8.7 m ³	8.7 m ³	0.5 m ³
C	Ablauf	8.4.19	1	3.5 m ³	3.5 m ³	0.2 m ³
		17.7.20	2	3.0 m ³	3.0 m ³	0.2 m ³
		31.7.20	3	3.1 m ³	3.1 m ³	0.2 m ³

Während der Projektlaufzeit wurden die Medien der Sandfilter erneuert, welche sieben Jahre in Gebrauch waren, und die Rückspühdüsen in den Sandfilterzellen ausgetauscht. Dieser Umstand ermöglichte die Beprobung des Abwassers einzelner Sandfilterzellen. Während die Probenahme im Jahr 2019 den Ausgangszustand abbilden sollte, waren zur Probenahme im Februar 2020 acht von vierundzwanzig Zellen und im September 2020 zwei Wochen vor der Probenahme weitere acht der Zellen, erneuert worden.

Die KA Wolfratshausen hat eine Kapazität von 120.000 EGW mit einem Abwasserzulaufstrom von $0,12 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ bei Trockenwetterbedingungen. Ein Drittel des Abwasserzulaufstroms stammt aus industriellen und gewerblichen Quellen. Die KA verfügte über 24 kontinuierlich rückgespülte Sandfilter, die in drei parallele Stränge unterteilt sind, die je nach Zulaufbelastung zu- oder abgeschaltet werden können. Wie bei der KA Gut Marienhof wurden Proben vor und nach der gesamten Sandfilteranlage entnommen.

Die KA Hochfeld hat eine Kapazität von 92.000 EGW bei einer Zulaufmenge von $0,10 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. Der Zulauf besteht primär aus kommunalen Abwässern. Die KA verfügte über eine konventionelle primäre und sekundäre Behandlung ohne zusätzliche Endreinigungsstufe; daher wurde in der KA Hochfeld nur der sekundäre Abwasserablauf beprobt.

Um zu bestimmen in welchen Mengen und Größenklassen Mikroplastik in den Kläranlagenabläufen vorkommt, wurde die kaskadische Mikroplastikfiltration, wie in AP2, Seite 21ff beschrieben, eingesetzt. Mit der Filtration wurden drei Größenbereiche ($100 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$ und $10 \mu\text{m}$) separiert und deren Menge im Kläranlagenablauf bestimmt.

Die Hochrechnung der gesamten, jährlichen Mikroplastikfracht erfolgte unter Berücksichtigung der mittels TED-GC-MS gemessenen durchschnittlichen Mikroplastikmengen pro Kubikmeter und den Trockenwetter-Zuflussraten der einzelnen KA.

Probenahme Isar

Neben dem gereinigten Abwasser der KA Gut Marienhof wurden auch Abschnitte der Isar vor- und nach dessen Einleitung beprobt. Das Ziel der Probenahmen war die Gegenüberstellung der über den Abwasserpfad eingetragenen Mikroplastikmenge und der Belastung der Isar vor- bzw. nach der Kläranlageneinleitung gegenüberzustellen. Hierzu wurde eine weitere und zeitnahe Probenahme an der KA Gut Marienhof durchgeführt, um die aktuelle MP-Emission festzustellen. Die Daten der Probenahmen sowie die Koordinaten der Flussabschnitte sind in der folgenden Tabelle 10 dargestellt. Die zweite Probenahmestelle in der Isar wurde 1 km nach der Klarwasser-Einleitung gewählt, um eine ausreichende Durchmischung im Fluss sicherzustellen. Beide Probenahmen wurden aufgrund des Anlagengewichtes in Ufernähe durchgeführt.

In Abbildung 51 (a) ist zu erkennen, dass aufgrund der vorliegenden Bebauung die Probenahme nicht mittig im Fluss stattfinden konnte, dafür jedoch in einem gut durchmischten Bereich. In Abbildung 51 (b) ist die Probenahme 1 km nach der KA Gut Marienhof abgebildet. Hier lag eine Kiesbank vor, die eine Probenahme in Nähe der Flussmitte, unterhalb einer Schwelle erlaubte. Ein Vergleich der Strömungsverhältnisse zeigt, dass an der Probenahmestelle unterhalb der Einleitung der KA der Fluss langsamer floss.

Tabelle 10: Daten der Probenahme Kampagne für die Isar Bewertung. Das Datum, die Koordinaten der Fluss Probenahmestellen an der Isar sind gezeigt, sowie die jeweiligen Filtrationsvolumina für die jeweiligen Filter. Am Vortag der Isarprobenahme wurde an der Kläranlage Gut Marienhof (KA A) eine MP Probenahme durchgeführt. Diese Filtrationsvolumina sind auch tabelliert.

Probenahme Ort	Probenahme- stelle	Datum	Koordinaten	Korbsiebfilter		
				100 μ m	50 μ m	10 μ m
Isar	Vor KA	14.04.21	48.294, 11.698	3.3 m ³	3.3 m ³	0.2 m ³
KA A	Einleitung	13.04.21	-	6.4 m ³	6.4 m ³	0.8 m ³
Isar	Nach KA	13.04.21	48.314, 11.700	3.2 m ³	3.2 m ³	0.3 m ³

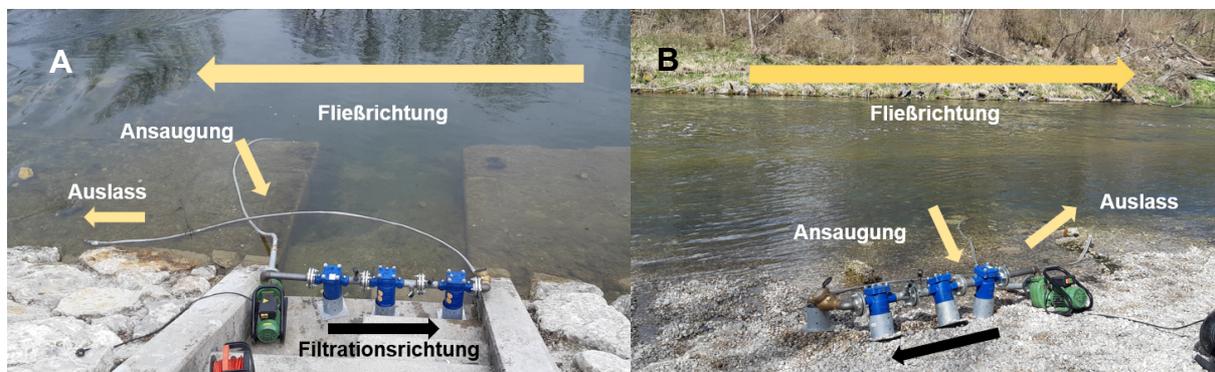


Abbildung 51: Isar Probenahmestelle vor (a) und nach (b) Einleitung der KA Gut Marienhof. Die MP-Kaskadenfiltration ist aufgebaut. Fließrichtung des Flusses, Ansaugung der Pumpe, sowie Auslass des filtrierten Wassers und die Filtrationsrichtung sind im Bild markiert.

Probenaufbereitung

Die Partikel auf den Siebfiltern der Kaskade wurden im Labor mit Hilfe von Reinstwasser und einer Metallbürste in ein Becherglas überführt. Anschließend wurden Aliquote für jede Messmethode (FTIR, RM, TED-GC-MS) entnommen und auf Cellulosenitratfilter überführt (45 mm Durchmesser, 0,2 μ m Porengröße, Sigma-Aldrich, ST. Louis, Missouri, U.S.A.).

Proben für die TED -GC-MS konnten nach Überführung in ein Glas-Vial mit Hilfe von 60 µL Tween 20 (1 g/L), gemessen werden.

Für die spektroskopischen Methoden erfolgte eine weitere Aufbereitung. Der Filtrerrückstand wurde mit Hilfe von 1 mL Tween 20 (0,1%; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), welches das Ablösen der Partikel vom Filter unterstützt, in ein zweites Becherglas überführt. Anschließend erfolgte ein Fenton-Aufschluss [30], wie in AP 2, S. 25ff beschrieben. Die Proben wurden als Suspension verschickt und vor Ort für die mikrospektroskopische Messung auf Aluminiumoxidfilter (FTIR) oder Au-beschichtete PC-Filter (RM) filtriert.

Analytik

Bei den Beprobungen kam für alle Größenbereiche (10 -50 µm, 50 - 100 µm, >100 µm; siehe AP2) die TED-GC-MS zum Einsatz. Die zweite Teilprobe wurde entweder mittels FTIR- (50 - 100 µm, >100 µm; vgl. S. 93ff) oder RM (10 - 50 µm; siehe 31ff) untersucht.

Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich lediglich auf die Polymere PE, PP, PS und PET, da nur diese mit allen drei Methoden quantitativ erfasst werden konnten.

Ergebnisse & Diskussion

Jährliche Mikroplastik-Emission der beprobten Kläranlagen

Die vier Polymere PE, PS, PP und PET wurden in den Abwässern aller Kläranlagen mittels der TED-GC-MS nachgewiesen. In Tabelle 11 sind eine allgemeine (kg Jahr⁻¹) und eine normalisierte Jahreshochrechnung (kg EGW⁻¹ Jahr⁻¹) für die Mikroplastikmassen im Sandfilter-Zulauf (V.SF.) und im Sandfilter-Ablauf (N.SF.) der KAs Gut Marienhof, Wolfratshausen und Hochfeld angegeben.

Während die über das gesamte Jahr freigesetzten Mengen mit abnehmender Kläranlagengröße tendenziell sinken, ergibt sich unter Berücksichtigung der Ausbaugröße ein umgekehrtes Bild. Für die KA Gut Marienhof konnte eine normalisierte jährliche Mikroplastikfracht (PE, PS, PP und PET summiert) von insgesamt 1,2 mg im Sandfilterablauf nachgewiesen werden, für die KA Wolfratshausen eine Mikroplastikfracht von 2,1 mg und für die KA Hochfeld 4,5 mg.

Tabelle 11: Gesamte jährliche emittierte Polymerfracht (mg Jahr⁻¹ EGW⁻¹ und kg Jahr⁻¹) aufgeteilt in PE; PS, PP und PET für die einzelnen KA. Die Werte wurden auf der Grundlage der MP Konzentrationen und der Zulaufmenge bei Trockenwetter berechnet. Die Ergebnisse werden für die KA Marienhof und Wolfratshausen vor und nach dem Sandfilter (V.SF. und N.SF.) angegeben.

Kläranlage	Gut Marienhof		Wolfratshausen		Hochfeld
Probenahmeort	V.SF.	N.SF.	V.SF.	N.SF.	Ablauf
normierte jährlich emittierte Masse in mg Jahr⁻¹ EGW⁻¹					
PE	8.38	0.7	4,42	1,52	2.76
PS	0,76	0,1	0,5	0,15	0.83
PP	0.54	0.08	0,92	0,07	0,58
PET	1,32	0,31	1,44	0,37	0,37
jährlich emittierte Gesamtmasse in kg Jahr⁻¹					
PE	8.38	0,7	0,53	0,18	0,25
PS	0,76	0,1	0,06	0,02	0,07
PP	0,54	0,08	0,10	0,01	0,05
PET	1,32	0,31	0,17	0,045	0,03

Ein Vergleich der Sandfilter von der KAs Gut Marienhof und Wolfratshausen zeigt, dass bis zu 75% PE, 77% PS, 96% PP und 89% PET aus dem Sandfilterzulauf zurückgehalten wurden.

Effizienz von Sandfiltern: Synergien zwischen den Analysemethoden TED-GC-MS, FTIR und RM

Neben der Bestimmung der Massenkonzentrationen mit TED-GC-MS sollten ausgewählte Proben auch mittels FTIR und RM auf ihre Partikelzahl untersucht werden. Die Ergebnisse werden im Folgenden zur Einschätzung der Effizienz der Nachbereitungsstufe Sandfiltration gegenübergestellt.

Mittels TED-GC-MS lagen alle Labor- und Feldblindwerte unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die empfindlicher auf kleine, einzelne Partikel reagierenden mikrospektroskopischen Verfahren zeigten ebenfalls weitestgehend Mikroplastik-arme Laborblindwerte, unter Ausnahme einer PP-Kontamination in der Probenaufbereitung der Probenahme 2021 und Partikelnachweisen in den Feldblindwerten. Insbesondere die Generierung der Feldblindwerte war noch nicht ideal und muss für zukünftige Untersuchungen mit mikrospektroskopischer Analytik weiter optimiert werden. Bei der Auswertung wurden daher v. a. die Labor- und Prozessblindwerte berücksichtigt.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der drei Methoden von Proben aus den Abläufen der KA Gut Marienhof, sowie die Analyseergebnisse der alten und neuen Sandzelle der KA Gut Marienhof, dargestellt. Da mittels TED-GC-MS lediglich die Polymere PE, PS, PP und PET quantifiziert werden konnten, erfolgt die Gegenüberstellung anhand dieser vier Polymere, auch wenn mittels FTIR und RM weitere Polymere (diverse Lacke, PUR, PMMA, PA, PC, PLA, EVA, PTFE) v. a. vor dem Sandfilter nachgewiesen werden konnten.

Die ersten vergleichenden Untersuchungen erfolgten im Rahmen der Herbst-Probenahme 2019 an der KA Gut Marienhof, deren Ergebnisse in Abbildung 52 dargestellt sind. Nach dem Sandfilter konnte mittels RM und TED-GC-MS in der 10- μm -Filterfraktion eine höhere Polymerkonzentration als vor dem Sandfilter festgestellt werden. Dies traf auch auf die 50- μm -Fraktion bei FTIR-Analytik zu. Alle drei Methoden identifizierten PE als Ursache der Erhöhung, während für andere Polymere durchaus eine Abnahme nach dem Sandfilter zu beobachten war. PE hatte bei diesem Sandfilter-Ablauf einen Anteil von knapp 99%, im Vergleich zu den anderen Polymeren PS, PP, und PET. Obwohl alle drei Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern, konnten weitere Probenahmen dieses Ergebnis nicht reproduzieren, sodass diese Probenahme als Ausreißer betrachtet werden musste.

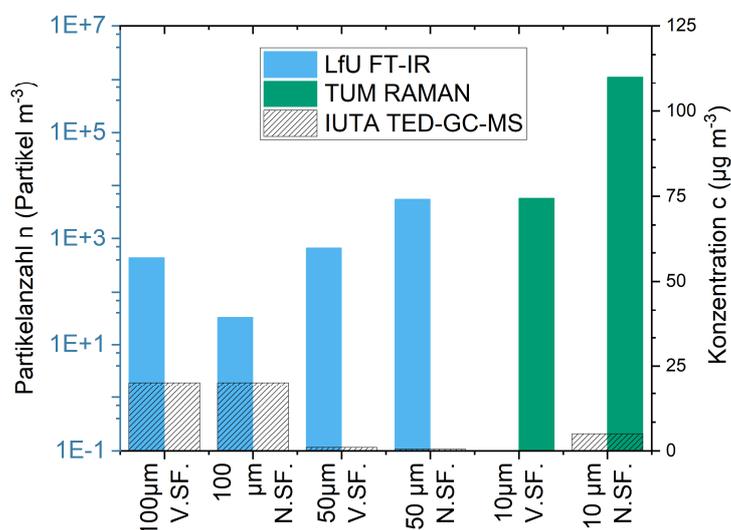


Abbildung 52: RM, FTIR und TED-GC-MS Analyseergebnisse der Probenahme an der der KA Gut Marienhof im August 2019 (s. Tabelle 1). Die Polymere PE, PS, PP und PET sind für die jeweiligen Methoden zusammengefasst. RM und FTIR Daten sind als Partikelzahl m^{-3} dargestellt, während die TED-GC-MS Ergebnisse als Konzentration $\mu\text{g m}^{-3}$ angegeben sind.

In Abbildung 53 sind die Ergebnisse der zweiten Probenahme im Februar 2020 dargestellt. Sowohl die Partikelzahl als auch die Massenkonzentration werden durch

die Sandfiltration verringert. Da die Messkapazitäten begrenzt waren und die Konzentrationen für PE, PS, PP und PET unterhalb der Nachweisgrenze der TED-GC-MS-Methode lagen, wurde auf die RM-Analyse der kleinsten Fraktion (10 - 50 µm) im Sandfilterablauf verzichtet.

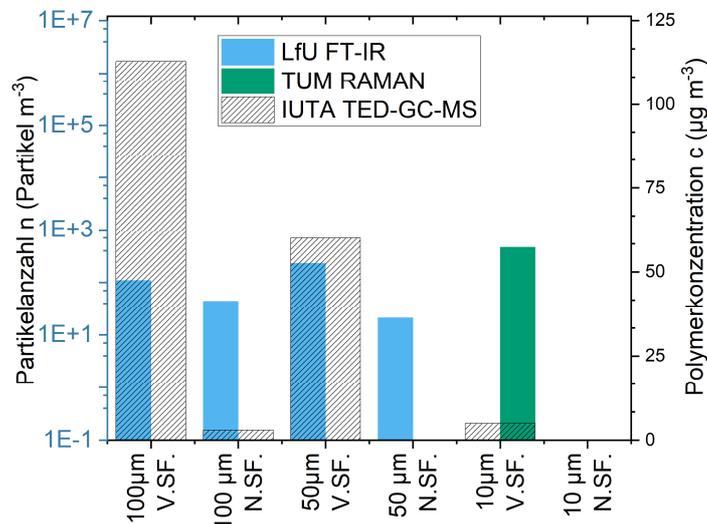


Abbildung 53: RM, FTIR und TED-GC-MS Analyseergebnisse der Probenahme an der der KA Gut Marienhof im Februar 2020 (s. Tabelle 1). Die Polymere PE, PS, PP und PET sind für die jeweiligen Methoden zusammengefasst. RM und FTIR Daten sind als Partikelzahl m^{-3} dargestellt, während die TED-GC-MS Ergebnisse als Konzentration $\mu g m^{-3}$ angegeben sind.

Neben der allgemeinen Beurteilung des Beitrags des Sandfilters bestand die Möglichkeit einzelne Filterzellen vor und nach der Wartung zu untersuchen. Die Ergebnisse der Probenahme aus den einzelnen Sandfilterzellen mit alten (7 Jahre Betrieb) und gereinigten Medien (2 Wochen Betrieb) sind in Abbildung 54 dargestellt. Die Sandfilterzelle mit altem Sandmedium wies im Vergleich zur Sandfilterzelle mit neuem Medium eine um bis zu einer Größenordnung höhere Rückhalteleistung für die Polymere PE, PS, PP und PET auf. Diese Beobachtung ist bei den Analyseergebnissen von TED-GC-MS und RM deutlicher als bei den FTIR-Ergebnissen. Ein Grund für den Unterschied könnten Fasern gewesen sein, welche als einzelner Partikel in der Darstellung vorkommen, aber im Verhältnis zu einem sphärischen Partikel eine höhere Masse aufweisen. Eine Wiederholung der Probenahme zu den gleichen Bedingungen war nicht möglich, da die „alte“ Sandzelle noch am selben Tag abgeschaltet und darauffolgend erneuert wurde. Daher können die Ergebnisse nicht als statistisch signifikant angesehen werden. Eine Erklärung für den höheren Rückhalt durch altes Medium könnte sein, dass Sandfilter mit der Zeit durch den Aufbau von Biofilmen und die Veränderung der Porenverteilung „reifen“ und

somit die Rückhalteeffizienz verbessern. Im Vergleich dazu könnten frisch wiederhergestellte Sandfilter einige Wochen benötigen, um einen ähnlichen Zustand zu erreichen, was anhand von *Escherichia Coli* durch Napotnik et al. 2017 [137] gezeigt wurde.

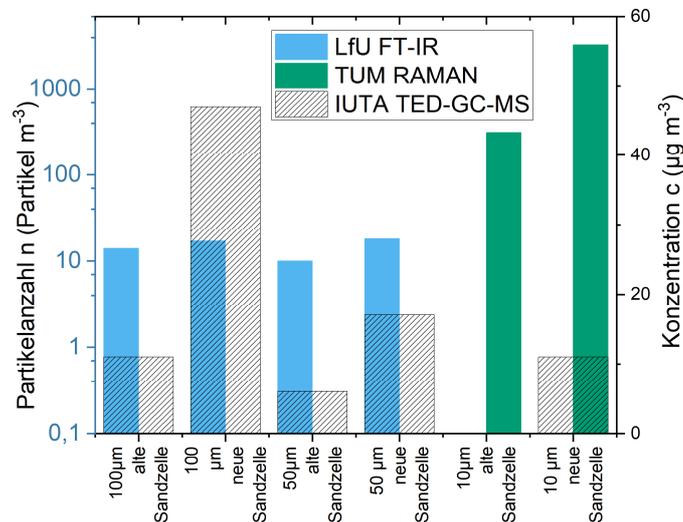


Abbildung 54: RM, FTIR und TED-GC-MS Analyseergebnisse der Probenahme an einer alten und neuen Sandzelle der KA Gut Marienhof im Februar 2020 (s. Tabelle 1). Die Polymere PE, PS, PP und PET sind für die jeweiligen Methoden zusammengefasst. RM und FTIR Daten sind als Partikelzahl m⁻³ dargestellt, während die TED-GC-MS Ergebnisse als Konzentration µg m⁻³ angegeben sind.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der TED-GC-MS-, FTIR- und RM-Messungen gleiche Trends. Alle Methoden bestätigen einen Mikroplastikrückhalt von etwa einer Größenordnung im Sandfilter.

FTIR und RM ergänzen sich dadurch, dass mittels FTIR gut Partikel auf den 100-µm- und 50-µm-Filtern gemessen werden konnten, sodass die zeitlich aufwendigere, höher aufgelöste Messung der Partikel auf dem 10-µm-Filter mittels RM realisiert wurde.

Die TED-GC-MS eignet sich als Methode zur Berechnung und Bewertung von Mikroplastikfrachten, da sie massenbasierte Ergebnisse liefert. Darüber hinaus kann sie dazu dienen, interessante Proben zu identifizieren, welche detailliert je nach Fragestellung mittels FTIR und RM untersucht werden könnten.

Mikroplastik Belastung des Flusses Isar im Bereich der Einleitung der KA Gut Marienhof

Um einen Zusammenhang zwischen der Mikroplastikkonzentration im Fluss Isar und der Einleitung durch die KA Gut Marienhof herzustellen wurden die Probenahmeorte (Isar, Kläranlage) an aufeinanderfolgenden Tagen aufgesucht, während die Probenahmestellen an den gleichen Tagen beprobt wurden (Tabelle 10). Die Ergebnisse dieser Probenahme sind in Tabelle 12 dargestellt. In keiner der Proben konnte PS mittels TED-GC-MS detektiert werden und auch in FTIR-Analysen fanden sich nur vereinzelt PS-Partikel. Im Weiteren sind die Ergebnisse der KA-Beprobung sehr gut mit den Stichproben aus den vorherigen Probenahmen vergleichbar.

Die Analyseergebnisse für die Isar zeigten an beiden Stellen Messwerte in etwa der gleichen Größenordnung. Da die Konzentration im gereinigten, mit Sandfiltern nachbehandelten Abwasser um etwa eine Größenordnung darunter lag und auch der Abwasseranteil am Isarwasser nach Einleitung nur gering ausfällt, ist ein signifikanter Anstieg der Konzentration nach der Einleitung nicht zu erwarten.

Tabelle 12: Die Ergebnisse der Stichprobe an der KA Gut Marienhof nach Sandfilter, sowie an der Isar vor und nach Einleitung für PS, PE; PET und PP sind in $\mu\text{g m}^{-3}$ dargestellt. Polymerkonzentrationen, welche kleiner als die Bestimmungsgrenze sind ($< \text{BG}$) wurden entsprechend gekennzeichnet.

Objekt	Probenahme Stelle	Filtergröße	Polymer			
			PS / $\mu\text{g m}^{-3}$	PE / $\mu\text{g m}^{-3}$	PET / $\mu\text{g m}^{-3}$	PP / $\mu\text{g m}^{-3}$
Isar	vor Einleitung	100 μm	< 1	54	33	27
		50 μm	< 1	17	20	16
		10 μm	< 1	< 4	< 1	< 3
	nach Einleitung	100 μm	< 1	1,2	25	6
		50 μm	< 1	18	13	3
		10 μm	< 1	< 4	< 1	< 3
Gut Marienhof	nach Sandfilter	100 μm	< 1	12	5	2
		50 μm	< 1	2	1	< 0,4
		10 μm	< 1	< 4	< 1	< 3

Vor der Einleitung durch die KA Gut Marienhof sind die Massenkonzentrationen für PE, PET und PP in allen Fraktionen etwas höher als nach der Einleitung, was mittels FTIR für die Partikelzahlen ebenfalls bestätigt wurde. Berücksichtigt man die in Abbildung 51 dargestellten hydrologischen Bedingungen, sind Unterschiede aufgrund ungleicher Vermischung denkbar. Die Probenahmestelle nach der Einleitung zeigte auf Grund des engeren Fließbettes eine höhere Fließgeschwindigkeit und durch eine

Sohlschwelle eine turbulenterer Strömung als vor der Einleitung, was die These einer besseren Durchmischung stützt. Des Weiteren konnte im Projektzeitraum nur eine Probenahme durchgeführt werden, sodass die Absicherung der Messergebnisse durch weitere Probenahmen nötig ist.

Schlussfolgerung

Kommunale Kläranlagen tragen bei Trockenwetter wenige Kilogramm Mikroplastik pro Jahr in die aquatische Umwelt ein. Dabei reduziert die Nachklärung mittels eines Sandfilters die Mikroplastikemission aus KA um eine weitere Größenordnung. Das tertiär gereinigte Abwasser einer kommunalen KA trug messbar Mikroplastik ins Gewässer ein, trug aber dennoch nicht entscheidend zur Mikroplastik-Belastung des Gewässers bei.

Dies lässt sich unabhängig von den eingesetzten Analyseverfahren (TED-GC-MS, FTIR, RM) beobachten, die insgesamt gut vergleichbare oder sich ergänzende Ergebnisse lieferten.

Prozesstechnische Einordnung

Partner: IUTA, LfU, TUM-SWW

(1) Zusammenfassung Erkenntnisse:

Die Versuche in den Laborkläranlagen lieferten drei wesentliche Erkenntnisse bzgl. des Partikelverhaltens während der biologischen Reinigung. Die Partikel wurden besser zurückgehalten je größer deren Volumen oder höher deren Dichte ist, während eine erhöhte Schwebstofffracht im Ablauf einen erhöhten Partikelaustrag mit sich bringt.

Während die ersten beiden Erkenntnisse im Ablauf der realen Kläranlagen nur schwer überprüfbar sind, da sich die Produktionsmengen und Einsatzzwecke der Polymere stark unterscheiden, lieferte die Untersuchung der Sandfilter die Bestätigung des Zusammenhangs mit der Schwebstofffracht auch für größere Partikel. Die Sandfilter dienen der Reduktion der Schwebstofffracht, halten dabei jedoch Partikel aller analysierten Größenbereiche zurück und senken die Mikroplastikemission um etwa eine Größenordnung. Das geht über einen reinen Rückhalt aufgrund der Partikelgröße hinaus und bestätigt, dass Mikroplastik zumindest partiell gebunden an

Schlammflocken vorliegt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass länger in Betrieb befindliche, gereifte Sandfilter gegenüber frisch gereinigten einen höheren Mikroplastikrückhalt aufweisen.

(2) Einordnung der Jahresfrachten (Masse) gegenüber anderen Publikationen:

Bisher sind noch keine Publikationen zur Emission von Mikroplastik mit einer Quantifizierung via TED-GC-MS aus Kläranlagen in wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht. Somit sind auch noch keine aus tatsächlich gemessenen Massenwerten ermittelten Jahresfrachten für die Emission von Mikroplastik aus Kläranlagen verfügbar. Es gibt lediglich Hochrechnungen aus Partikelzahlen. Diese liegen mit den Schätzungen im Bereich von 0,5 g Mikroplastik/(EW*a) [133,138] und somit 1-2 Größenordnungen über den in diesem Projekt ermittelten jährlich emittierten Polymergesamtfrachten von 3,9 - 12,3 mg Jahr⁻¹ EGW⁻¹.

Schmidt et al. [139] stellten Studien zu Kläranlagenablauf weltweit zusammen und ermittelten so einen Median von etwa 6.400 Mikroplastikpartikeln je m³ bei einer Schwankungsbreite zwischen 4 und 450.000 Mikroplastikpartikeln je m³ ohne Nachreinigung durch Sandfilter. Die in dieser Studie gemessenen Ergebnisse (Summe aus RM- und FTIR-Analysen) liegen mit zwischen 1268 und 7635 Mikroplastikpartikeln je m³ (Sandfilterzulauf, Probenahmen 2019 und 2020) in einer ähnlichen Größenordnung.

(3) Einordnung Kläranlagenablauf gegenüber Gewässerkonzentrationen

Nach dem Sandfilter reduziert sich die Partikelfracht um etwa eine Größenordnung auf einige hundert Mikroplastikpartikel je m³. Diese Werte der bayerischen Kläranlagen Gut Marienhof und Wolfratshausen liegen damit etwas oberhalb der Konzentrationen, die an der Wasseroberfläche der regionalen Fließgewässer mit 8 – 151 Mikroplastikpartikeln je m³ [140] und der Wassersäule der Seen mit 0 – 44 Mikroplastikpartikeln je m³ [141] bestimmt wurden. Die bei diesen beiden Studien eingesetzten Probenahme-Methoden erfassten die Partikelzahl unterhalb von 300 µm jedoch nur semiquantitativ, fanden aber eine ähnliche Polymerverteilung. Dass für die Isar innerhalb des Projektes etwas höhere Partikelzahlen detektiert wurden, ist damit ebenfalls plausibel.

(4) Einordnung Kläranlagenablauf gegenüber anderen Eintragspfaden in aquatische Umwelt

Die Untersuchungen dieses Forschungsvorhabens als auch die Ergebnisse weiterer Kläranlagenuntersuchungen in diesem BMBF-Forschungsschwerpunkt zeigen deutlich auf, dass die Einleitung von gereinigtem Abwasser durch kommunale Kläranlagen nur einen geringen Beitrag zur Mikroplastikbelastung in Oberflächengewässern darstellt.

Wichtigere Eintragspfade sind in diesem Forschungsvorhaben nicht betrachtete Mischwasserentlastungen und diffuse Quellen, wie Littering und Reifenabrieb [142]. Eine mit Sandfiltern ausgerüstete, kommunale Kläranlage der Größenklasse 5 emittiert nach unseren Untersuchungen etwa 0,25 - 1,2 kg Mikroplastik jährlich. Diese Menge ist in etwa vergleichbar mit dem für Deutschland ermittelten jährlichen pro-Kopf-Eintrag von Makroplastik durch Littering ($1,405 \text{ kg EW}^{-1} \text{ a}^{-1}$) oder dem jährlich pro Kopf anfallenden Reifenabrieb ($1,229 \text{ kg EW}^{-1} \text{ a}^{-1}$) [142]. Bei einem Vergleich dieser berechneten pro-Kopf Werte und den EGW, läge der Eintrag von Mikroplastik in die aquatische Umwelt über kommunale Kläranlagen bei Trockenwetter etwa um den Faktor 100.000 geringer als über Littering oder anfallenden Reifenabrieb. Ein direkter Vergleich ist jedoch mit Vorsicht zu genießen und bedarf weiterer detaillierteren Untersuchungen.

AP5: Auswirkung auf aquatische Umwelt und menschliche Gesundheit

Partner: TUM-LAS, HMGU, TUM-LTI

Neben der Entwicklung neuer Nachweisverfahren für den Submikro-Bereich ist ein vertieftes Verständnis der (öko)toxikologischen Bedeutung von Mikroplastik für die Bewertung ein entscheidender Faktor. Hierzu wurden neben der ökotoxikologischen Untersuchung der Auswirkungen von Submikroplastik auf aquatische mikrobielle Lebensgemeinschaften (HMGU-IGÖ) und aquatische Invertebraten (TUM-LAS), auch Untersuchungen zur Auswirkung auf die menschliche Gesundheit (TUM-LTI) in drei Unterkapiteln des AP5 durchgeführt.

Auswirkungen auf aquatische mikrobielle Lebensgemeinschaften

HMGU-IGÖ

Einleitung

Mikroorganismen sind die zahlenmäßig abundanteste Organismengruppe in limnischen Ökosystemen. Sie sind in alle wichtigen Stoffkreisläufe involviert (z.B. Kohlenstoff-, Stickstoff-, und Phosphorkreislauf) und spielen als Destruenten eine essentielle Rolle im Abbau von gelöstem und partikulärem organischem Material. Sie bilden die Basis der limnischen Nahrungsnetze. In Bezug auf Plastik in der aquatischen Umwelt, stellt sich demzufolge die Frage ob Mikro- und Submikro-Kunststoffpartikel - in der Folge als MP (Mikroplastik) und NP (Nanoplastik) bezeichnet - auf mikrobielle Gemeinschaften und Prozesse wirken. Beeinflussen sie das mikrobielle Wachstum, mikrobielle Stoffwechselaktivitäten und die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften? Und in welcher Weise; hemmend, neutral oder stimulierend? Wirken kleinere Partikel (NP) anders als größere (MP)? Wichtig ist auch die Frage, ab welchen Konzentrationen können wir in Laborexperimenten einen Effekt feststellen und was heißt das für die Situation wie wir sie heute in der aquatischen Umwelt vorfinden.

Das Leben in der Plastiksphäre (orig. ‚life in the plastisphere‘) titelte eine Veröffentlichung in einer renommierten Fachzeitschrift [143] und unterstricht damit die Bedeutung von Plastik in der aquatischen Umwelt und dessen vielfältige Interaktionen mit Mikroorganismen. Mikroben sind Besiedler von allen Oberflächen und somit auch von Plastikteilchen. Kunststoffe sind neue Oberflächen und Nischen [144] und die Mikroben

sind potentiell am Abbau von verschiedenen Kunststoffen beteiligt [145,146]. Plastikteilchen stellen womöglich ein (selektives) Habitat für einzelne Mikroorganismen dar [147–149], sind Vektoren für die Verbreitung einzelner Mikroorganismen und potentiell auch Viren (inklusive pathogener Vertreter) [143,145,146,150,151] und möglicher Schauplatz von Mikroben-Mikroben und Mikroben-Viren Interaktionen [152]; wie beispielsweise horizontalem Gentransfer [151,153,154]. Plastik kann Mikroorganismen nicht nur als Aufwuchsfläche dienen [155], und als Quelle für gelöste organische Verbindungen die durch Leaching frei gesetzt werden [156–158], sondern kleinste Kunststoffpartikel können von Mikroben direkt aufgenommen werden zusammen mit anderen Nahrungspartikeln (bei Filtrierern) oder weil sie mit Nahrung verwechselt werden (z.B. bei der Phagozytose) [159]. Dies kann als Start für den Transfer und die Akkumulation von Kunststoffpartikeln in der Nahrungskette angesehen werden [160]. In vielen Fällen werden die ‚inerten‘ und nicht verdaubaren organischen Partikel auch einfach wieder ausgeschieden [161].

Zum Zeitpunkt der Projektantragstellung gab es zwar bereits zahlreiche Arbeiten die auf die Problematik der Verschmutzung von aquatischen Lebensräumen mit Kunststoff und Mikroplastik im Speziellen hinwiesen und auch mögliche negative Effekte auf Organismen hervorhoben [162]. Die Belastung von marinen Lebensräumen mit kleinen Plastikteilchen wurde beispielsweise schon vor 50 Jahren thematisiert. Carpenter und Kollegen berichten von kleinen Plastikpartikeln in Küstengewässern [163] und in der Sargasso See [164]. Sie berichten ferner, dass diese Partikel von Mikroben, Algen und anderen Organismen besiedelt sind, von Fischen und Invertebraten aufgenommen werden und als mögliche Quelle von polychlorierten Biphenylen in Frage kommen, welche in Fischen gefunden wurden. Bis ins Jahr 2017 (Antragstellung von SubuTrack) folgten einige Arbeiten zu Mikroplastik, kaum jedoch zu Submikro- bzw. Nanoplastik und nur wenige Arbeiten befassten sich mit der mikrobiellen Komponente der Lebensgemeinschaften. Hier stand vor allem die mikrobielle Besiedelung von Plastikoberflächen im Fokus [143,146,147,150,165–168]. Im Jahr 2011 erschien ein Opinionpaper von Harrison et al. (2011) in dem spezifisch darauf hingewiesen wurde, dass es bis dato kaum Untersuchungen zu den Interaktionen von Mikroplastik und mikrobiellen Gemeinschaften gibt [145]. Untersuchungen zur Bildung, Struktur und Aktivität mikrobieller Biofilme auf Mikroplastik seien dringend notwendig, so fordern die Autoren, um die Rolle von Plastikpartikeln in biogeochemischen Kreisläufen und mikrobiellen Interaktionen besser zu verstehen. Ein umfassender Überblicksartikel im

Jahr 2014 wies zudem darauf hin, dass gerade Arbeiten zu limnischen Lebensräumen nach wie vor fehlten [162]. Unzureichend untersucht waren die mögliche Auswirkungen von MP und NP auf die Aktivität und das Wachstum von Mikroorganismen. Die wenigen vorhandenen Arbeiten kamen aus dem terrestrischen [156,157] oder dem marinen Bereich [162,169].

Eine Ausnahme bilden Arbeiten zur Aufnahme von Plastikpartikeln durch Einzeller (Protozoen). Bereits in den frühen 70er und 80er Jahren des 19ten Jahrhunderts hatten Protozoologen die Idee Flagellaten, Ciliaten und Amöben kleine fluoreszierende Kunststoffkügelchen (zumeist Polystyrol Beads) in einer Größe vergleichbar den natürlichen Bakterien als Futter anzubieten um Fraßraten (Grazingraten) zu bestimmen [170–174]. In verschiedenen Untersuchungen wurde das Aufnahmeverhalten der Beads untersucht [161,175–177]. Es stellte sich dabei heraus, dass manche Arten durchaus in der Lage sind zwischen echten Bakterien und Kunststoffpartikeln zu unterscheiden, während andere während der Partikelaufnahme nicht zwischen verschiedenen Partikelqualitäten diskriminierten [161]. Es zeigte sich auch, dass die aufgenommenen Beads in vielen Fällen wieder teilweise oder gänzlich ausgeschieden werden und nicht zwangsweise in den Organismen verblieben und somit in der Nahrungskette weitergegeben werden. Zur Aufnahme von Mikro- und Nanoplastik durch Bakterien und Pilzen gab es vor Antragsstellung keine Arbeiten.

Projektziele

Ziele im Arbeitspaket 5.1. waren einzelne Aspekte zur Auswirkung von Mikro- und Submikro-Kunststoffpartikeln auf Mikroorganismen in der limnischen Umwelt zu evaluieren. Im Detail ging es um Fragen der Stimulation bzw. Hemmung (Toxizität) von mikrobieller Aktivität (metabolischer Aktivität und Wachstum) bei Bakterienkulturen und natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften in und aus verschiedenen Gewässertypen (See-, Fluss-, Grund-, und Abwasser) durch die Anwesenheit von MP und NP. Ein weiterer Fokus lag bei der Aufnahme von Mikro- und Nanoplastik durch Protozoen und Pilze.

Planung und Durchführung

Die Arbeiten im AP 5.1 können in 3 Themenbereiche unterschieden werden:

1. Effekte von MP und NP auf das Wachstum, die Aktivität und Biomasse von Mikroorganismen
2. Aufnahme von MP und NP durch Einzeller
3. Ingestion von MP und NP durch aquatische Pilze

Ad 1. In **kleinskaligen Batchexperimenten** (Multi-Well Plates) wurde der Einfluss (hemmend, neutral oder stimulierend) von MP und NP in unterschiedlicher Größe und Dichte auf das Wachstum (maximale Wachstumsrate ermittelt über die OD), die Biomasse (maximal produzierte Biomasse als maximaler OD Wert) und die mikrobielle Aktivität (intrazelluläre ATP Konzentration) von natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften aus Grund- und Trinkwasser (gesammelt am Standort HMGU in Neuherberg). Zudem wurde der Bakterienstamm *Pseudomonas fluorescence*, in vergleichbaren Versuchen, in steril-filtrierte Wasserproben aus vier Gewässern (Seewasser [See in Riem], Flusswasser [Isar bei München], Grundwasser [vom Standort HMGU in Neuherberg], Abwasser [Kläranlage Fröttmaning]) zusammen mit MP und NP inokuliert. Um den Effekt von Leaching/Adsorption mit in die Versuche einzubauen, wurde *P. fluorescence* entweder gleichzeitig zusammen mit MP und NP inokuliert („Effekte ohne Partikelvorinkubation“) oder erst zwei Wochen nach Zugabe der Kunststoffpartikel in die unterschiedlichen Wassertypen inokuliert („Effekte nach Partikelvorinkubation“).

Das Design der Inkubationsversuche in den 96-Well Plates ist in Abbildung 55 vereinfacht dargestellt. Jedes Well enthielt 333 μ L Flüssigkeit, zusammengesetzt aus der Wasserprobe, den MP oder NP Partikeln und Spuren von Ethanol; *i.e.* die Beads wurden in EtOH gelagert. Die Konzentrationen an zudosierten MP und NP Partikeln umspannten einen Bereich von 1 bis 10^5 Partikel in 333 μ L und entspricht somit einer Konzentration von 3 - $3 \cdot 10^5$ MP oder NP Teilchen je mL. Für die Versuche mit *P. fluorescence* wurden die verschiedenen Wässer steril-filtriert (0,22 μ m Spritzenvorsatzfilter). Für die Versuche mit den natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften wurden die verschiedenen Wässer vorfiltriert um Protisten und höhere Organismen zu entfernen (5 μ m Spritzenvorsatzfilter). Alle Filter wurden zuvor ausgiebig gespült um keinen gelösten organischen Kohlenstoff in unbekannter Konzentration einzutragen. In den Wachstumsversuchen mit *P.*

fluorescence wurde Glukose (15 mM Glukose = 6 mM DOC = 72 mg/L DOC) als leicht verfügbare Kohlenstoffquelle zugesetzt. Die Versuche wurden mit vier unterschiedlichen Partikelgrößen durchgeführt, Polystyrol MP Partikel (9,6 µm und 1,4 µm) und NP Partikel (504 nm und 107 nm). Die Inkubationszeit in den Versuchen variierte zwischen 6h und 48h. In einem Plate-Reader wurde in regelmäßigen Abständen die optische Dichte (OD 595 nm) gemessen um Wachstum und Biomasse zu monitoren. Für jede Partikelkonzentration wurden 10 Parallelen (Replicate Wells) vermessen. Zusätzlich gab es zehn Kontrollproben (Wasserproben ohne Partikel) und eine Proben je Partikelkonzentration als Nullprobe (Partikel in sterilem MQ Wasser) (Abbildung 55). In Parallelversuchen (eigene 96-Well Platten) wurden in regelmäßigen Abständen einzelne Wells besammelt um die Konzentration von ATP als Maß für die mikrobielle Aktivität zu bestimmen. Die Inkubation von Grund- und Trinkwasser fand bei 12°C statt im Dunkeln statt. Die Inkubation von *P. fluorescence* in den unterschiedlichen steril-filtrierten Wässern fand bei Raumtemperatur (ca. 25°C) im Dunkeln statt.

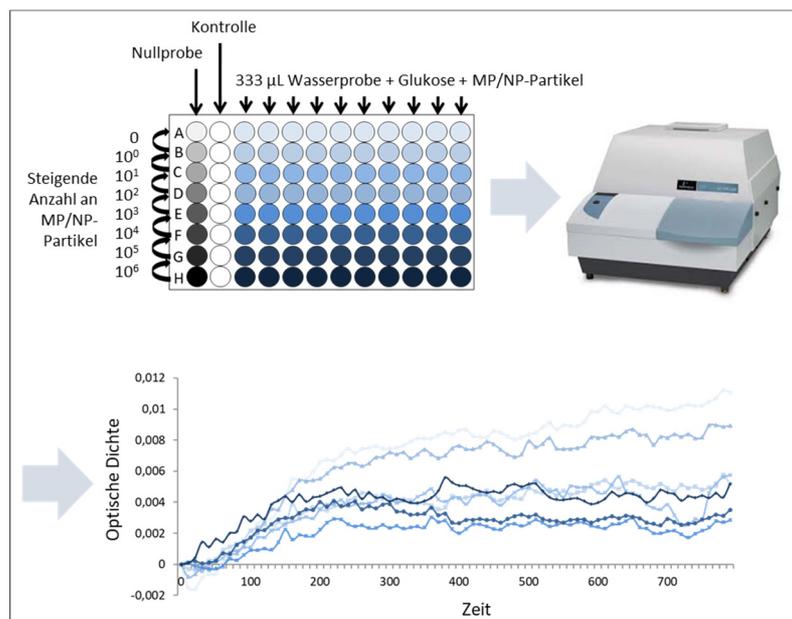


Abbildung 55: Versuchsdesign Batchversuche. Erklärung siehe Text.

Ad 2. In **Fraßversuchen** wurden **Flagellaten** im Abwasser und ausgewählten **Ciliatenkulturen** die MP und NP Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen als Bakterienersatz (Beute) angeboten. Die aktive Aufnahme der Kunststoffpartikel wurde mikroskopisch überprüft. Versuche am HMGU-IGÖ wurden mit Abwasser (aus der Kläranlage Fröttmaning) durchgeführt das natürlicherweise eine hohe Anzahl an Protozoen und im Speziellen heterotrophen Nanoflagellaten enthält. Experimente mit Ciliaten wurden in Kooperation mit Dr. Bettina Sonntag am Limnologischen Institut

Mondsee (Universität Innsbruck, Österreich) durchgeführt. Die Versuche wurden exemplarisch mit den beiden Stämmen *Paramecium* sp. und *Laurentiella* sp. durchgeführt. In Multi-Well Platten wurden die Ciliaten (eine Zelle je Well) über einen Zeitraum von mehreren Stunden zusammen mit den MP (9,6 µm und 1,4 µm) und NP Partikel (504 nm und 107 nm) inkubiert. In halbstündigen Abständen wurden einzelne Exemplare für die mikroskopische Untersuchung entnommen und die aufgenommenen Partikel quantifiziert.

Ad 3. In den **Pilz-Ingestionsversuchen** (Kooperation mit Dr. Dietmar Schlosser, UFZ Leipzig) wurden drei Stämme getestet, *Trametes versicolor* (DSM 11269; Basidiomycet, Holzbesiedler; Weißfäule), *Phoma* sp. UHH 5-1-03 (DSM 22425; Ascomycet; aquatisches Isolat aus Saale bei Halle), *Gloeophyllum trabeum* (DSM 1398; Basidiomycet, Holzbesiedler; Braunfäule). Die Pilze wurden auf 2 Typen von Agarplatten gezogen; (A) Malzextraktagar (1% (w/v) Malzextrakt; 1,5% Agar; pH 5,7) und (B) Wasseragar (Leitungswasser; 1,5% Agar; pH 5.7). Je Stamm wurden jeweils zwei Platten eines Typs (A bzw. B) angesetzt. Ein gut bewachsenes Agar-Stanzstück (0,5 – 0,8 mm Kantenlänge) welches in der Mitte jeder Platte positioniert wurde diente zur Animpfung. Inkubiert wurde bei 20°C im Dunkeln. Auf jeder Platte befand sich zudem ein Deckgläschen und ein Glas-Objektträger für spätere mikroskopische Untersuchungen. Als NP Partikel wurden 20 nm große fluoreszierende Beads (Polystyrol, Molecular Probes/Invitrogen, 50 µL 2% wässrige Lösung mit 2 mM NaN₃; 20g/L NPs, 4,55*10¹⁵ P/mL) verwendet. Die Ausgangslösung wurde 1:100 verdünnt (0,02% wässrige Lösung mit 1,3 mg/L NaN₃ = 200 mg/L NPs und 4,55*10¹³ p/L). Je Platte wurden 3x 20 µL (1x direkt auf Agar-Oberfläche, 1x auf Deckgläschen für die Mikroskopie; 1x auf Glas-Objektträger für die Mikroskopie) aufgetragen. In 20µL waren errechnet 9,1*10⁸ NPs enthalten.

Nach 13 Tagen Inkubation wurden die Pilzkulturen untersucht. Aus Kapazitätsgründen wurden nur die Ansätze mit *Phoma* sp. UHH 5-1-03 (DSM 22425) detaillierter mikroskopiert.

Ergebnisse und Diskussion

Das Thema ‚Verunreinigung der aquatischen Lebensräume mit Mikroplastik‘ hatte zum Zeitpunkt der Projektantragstellung bereits ein starkes Momentum aufgenommen, jedoch waren viele Aspekte zur Wirkung von Mikro- und Submikro (= Nano) Plastik auf

mikrobielle Gemeinschaften noch wenig beforscht (Harrison et al. 2011). Ein Großteil der Arbeiten konzentrierte sich auf die vergleichende Zusammensetzung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften auf Kunststoffoberflächen [143,146,150,165]. Nur wenige Studien, vorwiegend aus dem terrestrischen Bereich, hatten sich bis dato mit der möglichen stimulierenden oder hemmenden Wirkung von MP auf die mikrobielle Abundanz, Aktivität und mikrobielle Prozesse konzentriert [156,178].

Die Effekte von unterschiedlichen Konzentrationen an MP und NP auf mikrobielle Gemeinschaften (Eubakterien und Archaea) wurde in unseren Versuchen anfangs in natürlichem Grundwasser und im Leitungswasser untersucht. Hier zeigte sich bereits, wie auch in den nachfolgenden Versuchen, eine große Variabilität in den Ergebnissen. Wie exemplarisch in Abbildung 5.1.2. für Experimente mit 1,4 µm Partikeln (MP) dargestellt, wurde in manchen Ansätzen ein durchgehend negativer Einfluss auf den Aufbau von Biomasse beobachtet, während es in anderen vergleichbare Experimenten zu einer Steigerung (kurzfristig oder durchgehend) des mikrobiellen Wachstums kam. Die getesteten Grundwasserproben stammten alle aus dem selben Aquifer, wurden lediglich zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. In Versuchen mit Grundwasser A, lagen alle Wachstumskurven unter jener der Kontrolle, die maximal erreichten Wachstumsraten lagen jedoch in den meisten Ansätzen mit MP etwas über der Kontrolle. Je höher die Partikelbeladung war, je weniger mikrobielle Biomasse wurde aufgebaut. Im Fall von Grundwasser B kam es nicht nur zu höheren maximalen Wachstumsraten in den Ansätzen mit MP sondern auch zu einer höheren Gesamtbiomasseproduktion mit Ausnahme jeder Versuchsreihe mit der höchsten Partikelbeladung (Abbildung 56). Im dritten Beispiel (Grundwasser C), führte die Anwesenheit von MP bei geringen und mittleren Konzentrationen zu einer Stimulation des Wachstums. Nach etwa sechs Stunden Inkubation nahm die Biomasse in diesen Ansätzen und auch in anderen die zuvor keine Stimulation zeigten wieder ab. Zu Versuchsende, nach 18 h, hatte nur der Ansatz mit der geringsten Partikelbeladung (1 Partikel in 333 µL) eine höhere Biomasse als die Kontrolle.

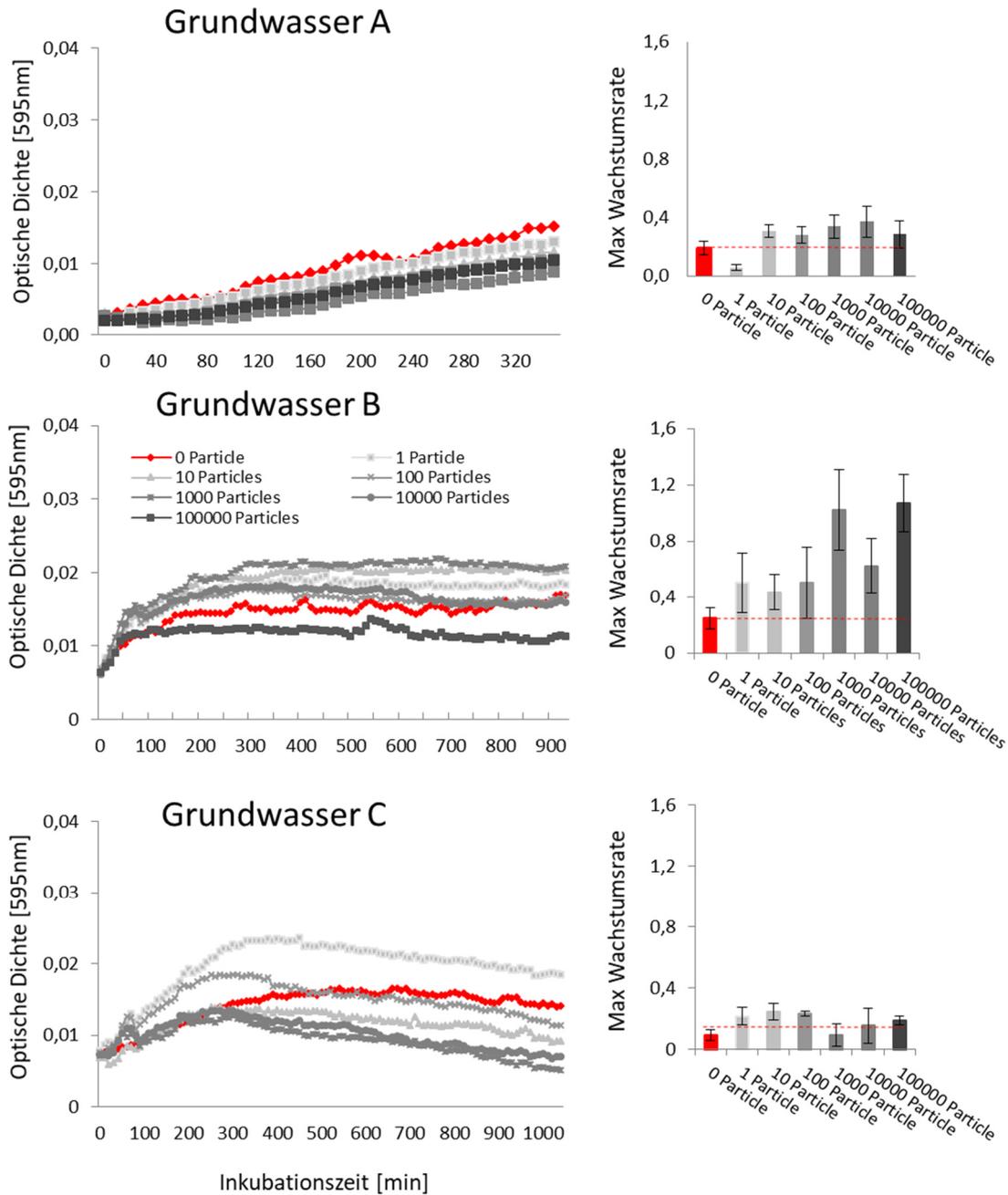


Abbildung 56: Verlauf der optischen Dichte (links) und Mittelwerte zur maximalen Wachstumsrate (rechts) als Maß für das Wachstum in drei Grundwasserproben die mit einer steigenden Konzentration (0 bis $1 \cdot 10^5$) an MP Partikeln ($1,4 \mu\text{m}$) dotiert wurden. Inkubation bei 12°C im Dunkeln. Werte sind Mittelwerte aus $n=10 \pm \text{StdAbw}$.

Vergleichbare Tests wurden mit einer Reihe von weiteren Grundwasserproben und Trinkwasserproben unter Einsatz von vier unterschiedlichen Partikelgrößen (MP $9,6 \mu\text{m}$ und $1,4 \mu\text{m}$; NP 504 nm und 107 nm) durchgeführt. In den Abbildungen 5.1.3. und 5.1.4. sind wiederum exemplarisch Ergebnisse zu allen MP und NP Größen dargestellt. Gezeigt sind der maximal erreichte Biomassewert (maximale OD; Abbildung 56) und die maximalen Wachstumsraten (errechnet aus dem Abschnitt mit

maximaler OD Zunahme; Abbildung 58) für je eine Grundwasser und eine Leitungswasserprobe. Wie aus den Ergebnissen zu den Biomassewerten ersichtlich unterscheiden sich bereits die Werte für die Kontrolle der zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Wasserproben. Signifikanztests ergaben, dass bei Versuchen mit 1,4 µm kleinen Partikeln alle maximalen Biomassewerte im Leitungswasser höher lagen als die Kontrolle (Abbildung 56). Beim Einsatz von 9,6 µm großen Partikeln ergab sich ein ähnliches Bild für das Grundwasser (Abbildung 56). Bei den Versuchen mit Nanoplastik wurden für diese beiden Wassertypen kaum signifikante Unterschiede für die maximal erreichte Biomasse festgestellt (Abbildung 56).

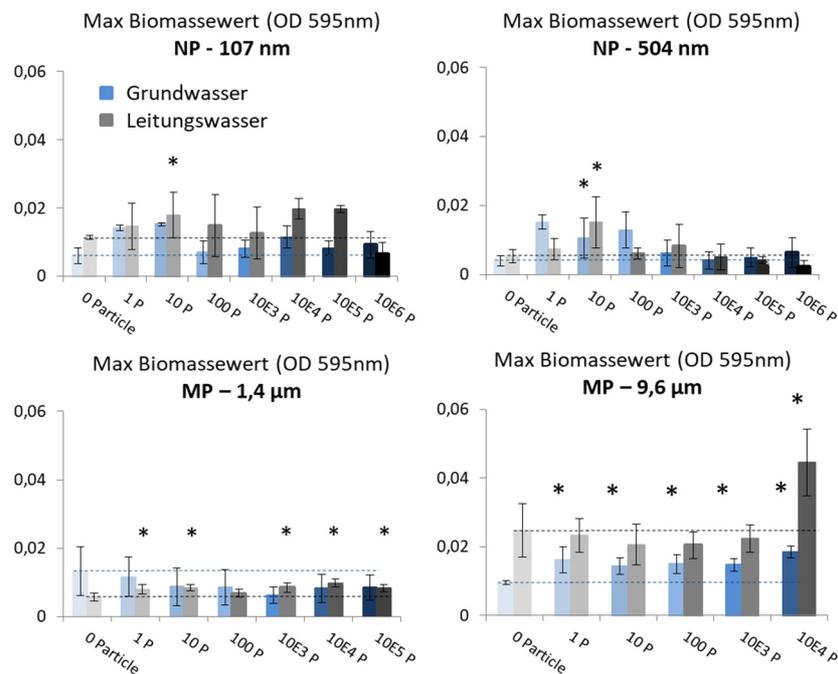


Abbildung 57: Maximal erreichte OD Werte (Mittelwert aus n=10 ± StdAbw) in Grundwasser und Leitungswasser welches mit steigenden MP und NP Partikelkonzentrationen inkubiert wurden. Inkubation über 15h bei 12°C im Dunkeln. Sterne bezeichnen Versuchsreihen die sich statistisch signifikant von der jeweiligen Kontrolle unterscheiden.

Auch die Ergebnisse zu den maximalen Wachstumsraten zeigen bereits Unterschiede bei den Kontrollproben für Wasserproben die zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt wurden (vgl. Startwerte der Kontrollen). Signifikanztests ergaben hier, dass bei Versuchen mit den 504 nm kleinen Partikeln die größten Unterschiede für sowohl Grundwasser und Leitungswasser vorhanden waren (Abbildung 58). Fürs Grundwasser ergaben sich Unterschiede auch bei den 1,4 µm Partikeln. Die Partikelzugabe wirkte sich in den meisten Fällen stimulierend auf die maximal erreichte

Wachstumsrate aus, in manchen Fällen neutral. Negative (hemmende) Effekte waren nicht zu beobachten.

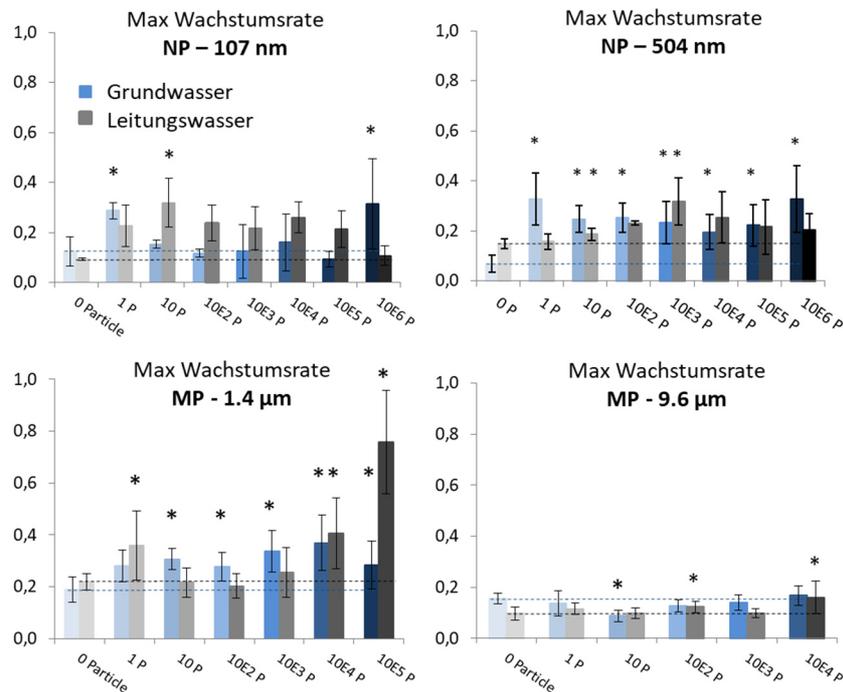


Abbildung 58: Maximal erreichte Wachstumsraten (Mittelwert aus $n=10 \pm \text{StdAbw}$) in Grundwasser und Leitungswasser welches mit steigenden MP und NP Partikelkonzentrationen inkubiert wurden. Inkubation über 15h bei 12°C im Dunkeln. Sterne bezeichnen Versuchsreihen die sich statistisch signifikant von der jeweiligen Kontrolle unterscheiden.

Es soll hier angemerkt sein, dass sowohl das Leitungs- bzw. Trinkwasser (entspricht unbehandeltem Grundwasser aus dem Süden von München) als auch das in Neuherberg gesammelte Grundwasser als Beispiele für ein sehr energie- und nährstoffarmes Wasser dienen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus verschiedenen Experimenten mit Grundwasser ist in Abbildung 59 dargestellt. Unterschieden wird in negative (Werte lagen unter dem Kontrollwert) und positive (Werte lagen über dem Kontrollwert) Effekte. Wie aus der Abbildung gut ersichtlich, überwiegen mit wenigen Ausnahmen die stimulierenden ‚positiven‘ Effekte. Das heißt, in diesen Versuchsreihen kam es mehrheitlich durch die Zugabe von MP und NP Partikeln zu einer Steigerung der mikrobiellen Biomasseproduktion im nährstoff- und energiearmen Grundwasser. Und auch die maximal erreichten Wachstumsraten waren in >67% der Fällen höher als die Kontrolle ohne MP und NP. Allein beim Einsatz von 1,4 μm kleinen MP Partikeln dominierten die negativen Effekte über die positiven bei der Biomassebildung. Im Fall der 9,6 μm großen MP Kügelchen glichen sich negative und positive Effekte aus (Abbildung 59).

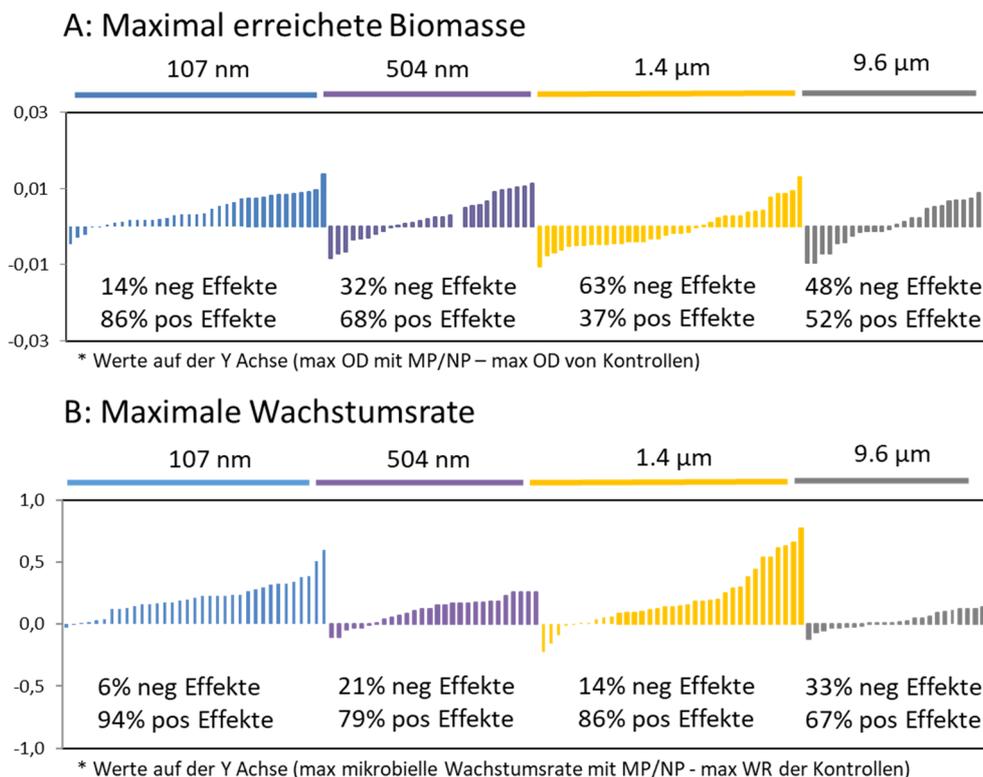


Abbildung 59: Abweichung zweier Messgrößen (maximal erreichte Biomasse und maximal beobachtete Wachstumsrate) von der Kontrolle. Zusammenstellung aus mehreren Versuchsreihen mit Grundwasser.

Während die Arbeiten zu SubµTrack liefen, erschienen weltweit hunderte Artikel zu Mikroplastik in der Umwelt, einige beschäftigten sich auch mit den Effekten von Mikroplastik auf mikrobielles Wachstum, mikrobielle Aktivitäten und spezifischen mikrobiellen Prozessen. Die Ergebnisse dieser Studien waren unseren Ergebnissen nicht unähnlich, heißt teilweise auch sehr widersprüchlich.

Liu et al. (2017) berichten in ihrer Studie einen Nährstoffanstieg im gelösten organischen Material eines Lössbodens verursacht durch die Zugabe von MP (PP Partikel < 180 µm) der seinerseits zu einer Erhöhung verschiedener Enzymaktivitäten (FDA Hydrolase und Phenol Oxidase) führte [157]. Die Partikelkonzentrationen waren jedoch extrem hoch (7% und 28% w/w). Keinen negativen Einfluss auf mikrobielle Aktivitäten und die Funktionalität hatte Mikroplastik auch in einer Studie von Blöcker et al. (2020) in der Böden mit unterschiedlichem organischen Gehalt untersucht wurden [179]. Jedoch zeigte die Zugabe von PP Partikeln eine Reduktion der mikrobiellen Biomasse. Eine Stimulation der mikrobiellen Aktivität im Boden durch MP beobachteten auch Lin et al. (2020) [180]. Die Zugabe von LDPE wirkte sich nachweislich negative auf die Arthropodenfauna im Boden aus, stimulierte jedoch die

Mikroben. Fei et al. (2020) beobachteten nach Zugabe von PE und PVC Mikropartikel zu Bodenproben eine Reduktion der FDA Hydrolase-Aktivität bei gleichzeitiger Stimulation der Urease und Phosphatase-Aktivität. Die Effekte waren ausgeprägter bei Anwesenheit von Polyethylen [181].

Neben diesen Arbeiten zu MP Effekten in Böden, gibt es eine kleine Zahl an Studien in aquatischen Systemen. Eine Zunahme des DOC durch Zugabe von HDPE, PE und PP in Meerwasser stimulierte das mikrobielle Wachstum [158]. Miao et al. (2019) berichten von einer veränderten Kohlenstoffverwertung in Fließwasser-Biofilmen durch die Zugabe von Nanoplastik (100 nm PS Partikel) bei steigenden Konzentrationen (von 1–10 mg/L) [149]. Allerdings waren auch in diesen Versuchen die getesteten Partikelkonzentrationen unrealistisch hoch. Xiong et al (2021) zeigten in ihrer Arbeit zur Ultrafiltration von Oberflächenwasser, dass PE einen Einfluss auf die mikrobielle Aktivität im Wasser hat und auf die Struktur und Funktion des Biofilms auf den Filtermembranen [182]. Eine Stimulation der mikrobiellen Aktivität und vermehrte Produktion von EPS (extracellular polymeric substances) wurde festgestellt. Liu et al. (2019) untersuchten die Wirkung von PES, PE und PVC Partikeln (100–1.200 µm; 50–10.000 Partikel/L) auf die Aktivität verschiedener physiologischer Gruppen innerhalb der Prokaryonten, i.e. Ammonium-oxidierende Bakterien [AOB], Nitrit-oxidierende Bakterien [NOB] und Denitrifizierer [183]. In dieser Studie hatte das MP auch bei vergleichsweise hohen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die getesteten Aktivitäten.

Unsere Versuche mit einer *Pseudomonas fluorescence* Kultur die zusammen mit MP oder NP Partikeln in steril-filtriertes Grund- und Leitungswasser inokuliert wurde, zeigten unerwartete Resultate. Die Form der Wachstumskurven der Kontrollproben unterschieden sich in den meisten Fällen deutlich von den Wachstumskurven der Versuchsreihen mit MP oder NP (Abbildung 60). Spuren von Ethanol (die Beads waren original in EtOH suspendiert um Aggregation zu verhindern) die wir versucht haben auch für die Kontrollen zu berücksichtigen und andere Einflüsse der Manipulation (Pipettieren, etc.) scheinen dafür verantwortlich zu sein. Wir konzentrieren uns daher bei diesen Daten im Folgenden auf den Vergleich der Effekte durch unterschiedlich hohe Partikelbeladungen ($3 \cdot 10^3$ bis $3 \cdot 10^8$ L⁻¹) und unterschiedliche Partikelgrößen. Vergleicht man die vorhandenen Effekte, ergibt sich weder fürs Grundwasser noch fürs Leitungswasser ein konsistentes Bild. Bei den Grundwasseransätzen wurde die

höchste Biomasse in den Versuchen mit den 1,4 µm kleinen Beads beobachtet. In allen Fällen zeigten die Wachstumskurven in Ansätzen mit MP oder NP eine anfängliche Verzögerung (Akklimatisierungsphase) des Wachstums, gefolgt von einem steilen Anstieg der Biomasse (exponentielle Phase) und einem Biomasse-Plateau (stationäre Phase) bzw. in manchen Fällen gefolgt von einem langsamen Biomasserückgang (Decay Phase). In allen Kontrollansätzen waren, wie schon darauf hingewiesen, geringere Wachstumsraten in der exponentiellen Phase zu beobachten. Am Ende der Inkubation war jedoch in fast allen Ansätzen die Biomasse vergleichbar. Einzig im Ansatz mit den 1,4 µm Teilchen unterschieden sich die OD Werte mit geringeren Biomassen bei höheren Partikelzahlen (Abbildung 60). Bei den Ansätzen mit Leitungswasser wurden die höchsten Biomassen in den Versuchen mit NP 107 nm und MP 1,4 µm beobachtet (Abbildung 61). In beiden Fällen erreichten die mit Beads versetzten Versuchsreihen geringere Biomassen. Die Versuche mit NP 504 nm und MP 9,6 µm zeigten ähnliche Muster wie die Versuche mit Grundwasser, i.e. eine anfängliche Akklimatisierungsphase, gefolgt von einer (exponentiellen) Wachstumsphase und einer stationären Phase bzw. einem Biomasserückgang (decay) (Abbildung 61).

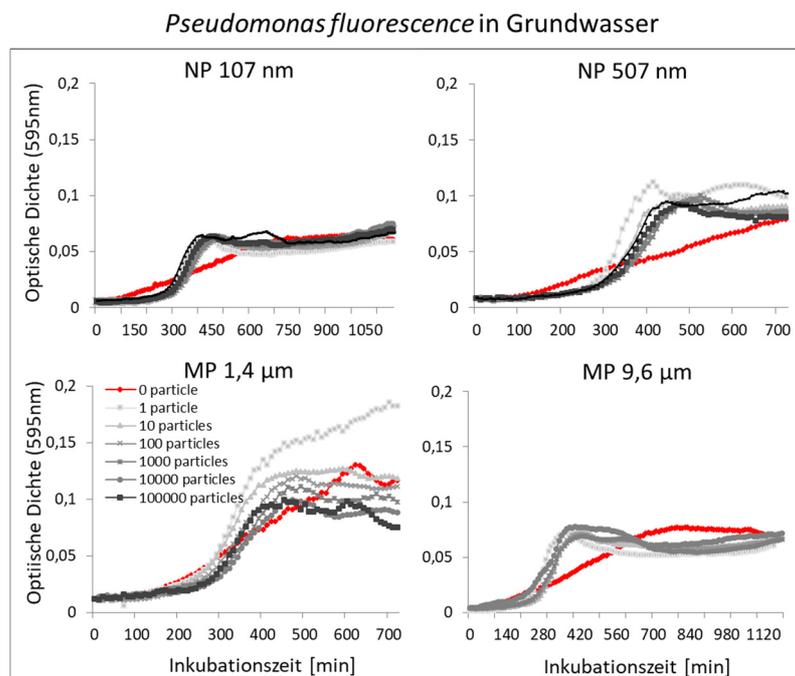


Abbildung 60: Verlauf der optischen Dichte als Maß für das Wachstum in Grundwasserproben die mit einer steigenden Konzentration (0 bis $1 \cdot 10^5$) an MP und NP Partikeln unterschiedlicher Größe dotiert wurden. Inkubation zwischen 12 und 21 h bei 12 °C im Dunkeln. Werte sind Mittelwerte aus $n=10 \pm \text{StdAbw}$.

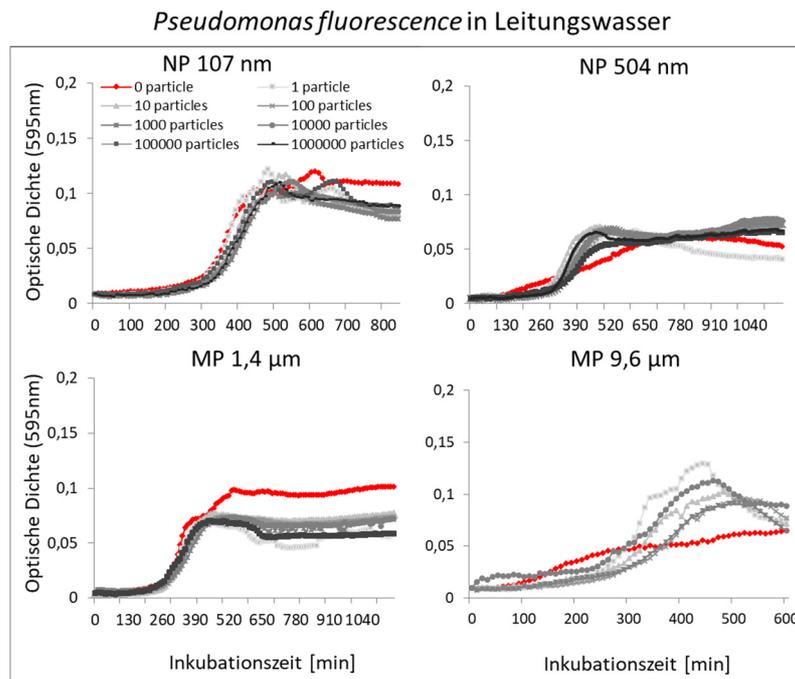


Abbildung 61: Verlauf der optischen Dichte als Maß für das Wachstum in Leitungswasserproben die mit einer steigenden Konzentration (0 bis $1 \cdot 10^5$) an MP und NP Partikeln unterschiedlicher Größe dotiert wurden. Inkubation zwischen 10 und 20 h bei 12 °C im Dunkeln. Werte sind Mittelwerte aus $n=10 \pm \text{StdAbw}$).

In weiteren Versuchsreihen wurde *P. fluorescens* zu verschiedenen (steril-filtrierten) Wässern (Grundwasser, Seewasser, Flusswasser und Abwasser) zudotiert, entweder zusammen mit den MP oder NP Partikeln unterschiedlicher Konzentration, oder mit einer Verzögerung von 14 Tagen nach Zugabe der Kunststoffpartikel (in den Abbildungen als ‚pre-inkub‘ oder ‚Partikelvorinkubation‘ bezeichnet). Die zweiwöchige Vorinkubation mit den Partikeln sollte ein Leaching von löslichen Partikelinhaltsstoffen ermöglichen so wie die Adsorption von im Wasser gelösten organischen Verbindungen in die Polystyrolpartikel. Die Leaching und Adsorptionsprozesse wurden als Black-Box behandelt, d.h. eine Bestimmung einzelner organischer Spurenstoffe wurde nicht durchgeführt. Vergleicht man die Ergebnisse zu den Wachstumsraten, mit und ohne Partikelvorinkubation (Leaching/Adsorption), zeigen sich deutlich stärkere Effekte für die Versuchsreihen wo die Partikel bereits 2 Wochen in den Versuchsansätzen vorgelegt wurden bevor die Bakterien hinzukamen (Abbildung 62).

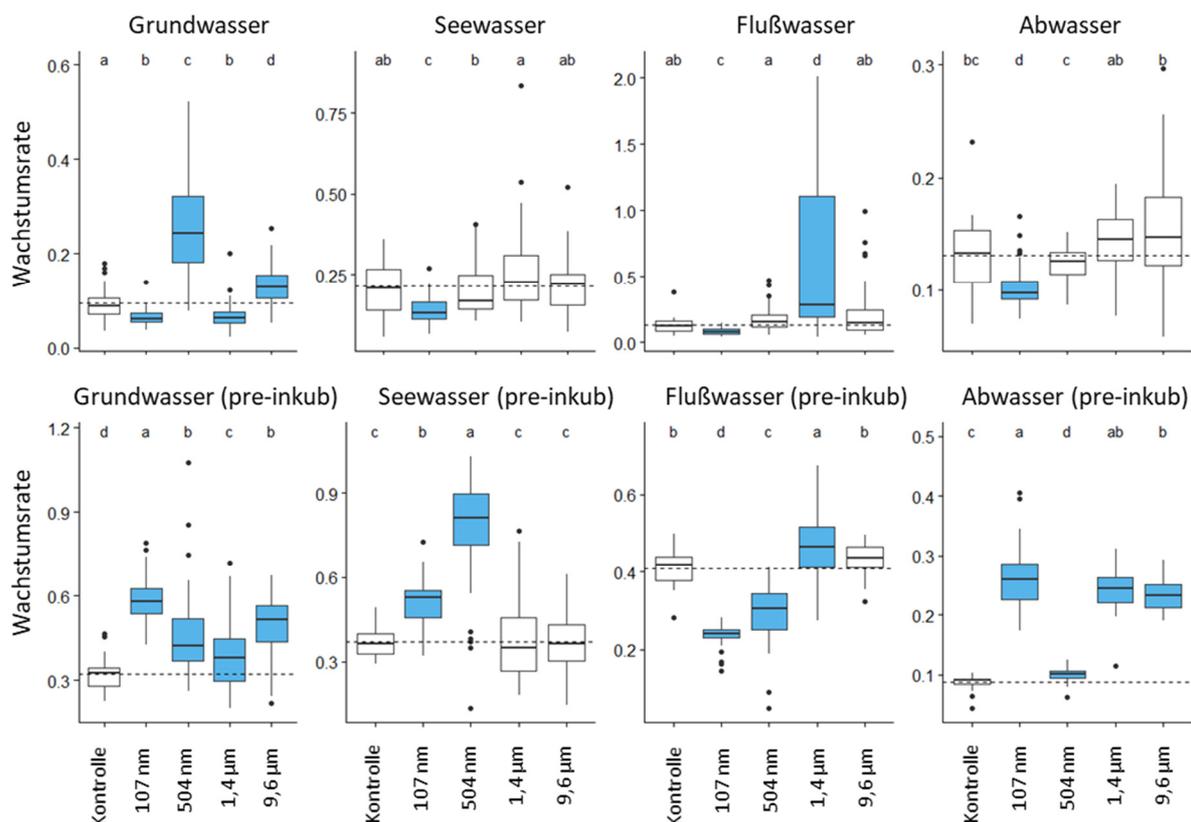


Abbildung 62: Maximal erreichte Wachstumsraten für *P. fluorescens* in vier unterschiedlichen Wassertypen welche mit steigenden MP und NP Partikelkonzentrationen inkubiert wurden. Werte zu den einzelnen Partikelkonzentrationen wurden gepoolt ($n=60 \pm \text{StdAbw}$).

Die NP Partikel verursachten im Allgemeinen etwas stärkere Effekte als das MP. Klare Muster für einen Zusammenhang mit der Partikelgröße sind nicht zu erkennen. Die Effekte der MP und NP Partikel auf die Wachstumsrate nach Vorinkubation waren durchwegs ‚stimulierend‘, aber auch hier gab es Ausnahmen (Abbildung 62). Bei gleichzeitiger Zugabe von MP/NP und Bakterien waren nur in wenigen Fällen statistische Unterschiede zu den Kontrollen zu beobachten.

Poolt man alle im Projektzeitraum gesammelten Ergebnisse zu den Inkubationsversuchen mit *P. fluorescens*, den unterschiedlichen Partikelgrößen, den unterschiedlichen Gewässertypen, und der Vorinkubation mit Partikeln, ergeben sich für die Biomasseproduktion die größten negativen Auswirkungen für das Abwasser (Abbildung 63). 60-87% aller Messungen zeigten eine Reduktion der Werte im Vergleich zu Kontrollen die kein MP und NP enthielten, gefolgt von Flußwasser (57-65% negative Effekte), und Seewasser (34-49% negative Effekte). Den geringsten negativen Einfluß auf die Biomasseproduktion zeigten die Kunststoffpartikel im Grundwasser (20-24% negative Effekte). Anders herum betrachtet, führte die Zugabe

von Kunststoffpartikeln im nährstoff- und energiearmen Grundwasser in 76-80% der Fällen zu einer Erhöhung der Biomasseproduktion (Abbildung 63).

Einige wenige Arbeiten untersuchten die Auswirkung von MP und NP auf einzelne Bakterienstämme. Casado et al. (2013) untersuchte mögliche toxische Effekte von verschiedenen Nanopartikeln, unter anderem auch PS-PEI, auf Organismen aus unterschiedlichen trophischen Ebenen [178]. Darunter auch *Vibrio fischeri*, ein Bakterienstamm der häufig bei Ökotoxtests zum Einsatz kommt. Bei Partikelkonzentrationen von 0,4 mg/L bis 416,5 mg/L wurden toxische Effekte für alle getesteten Organismen beobachtet, die geringste Wirkung zeigte sich jedoch für *V. fischeri*. Die 110 nm NP zeigte stärkere Effekte als das noch kleinere (55 nm) NP. Nicht jedoch für *V. fischeri*. Im Vergleich dazu zeigten Quarzkügelchen derselben Größe keine toxischen Effekte für die getesteten Organismen. Sun et al. (2018) untersuchten die Toxizität von Polystyrol MP und NP Partikel für das marine Bakterium *Halomonas alkaliphila* [184]. Sowohl MP als auch NP hemmten in hohen Konzentrationen das bakterielle Wachstum wobei NP einen stärkeren Effekt zeigte. Auch in unseren Versuchen fanden sich vermehrt Hinweise auf stärkere Effekte durch NP. Ähnlich zur Studie von Xiong et al. (2021) zeigte sich auch in dieser Arbeit von Sun et al. (2018) eine vermehrte Produktion von EPS, die in diesem Zusammenhang als Stressreaktion von *H. alkaliphila* interpretiert wurde [182]. Sun et al. (2018) unterstreicht auch einen Einfluss des MP/NP auf den Stickstoffkreislauf (Ammonium Umsätze) [184].

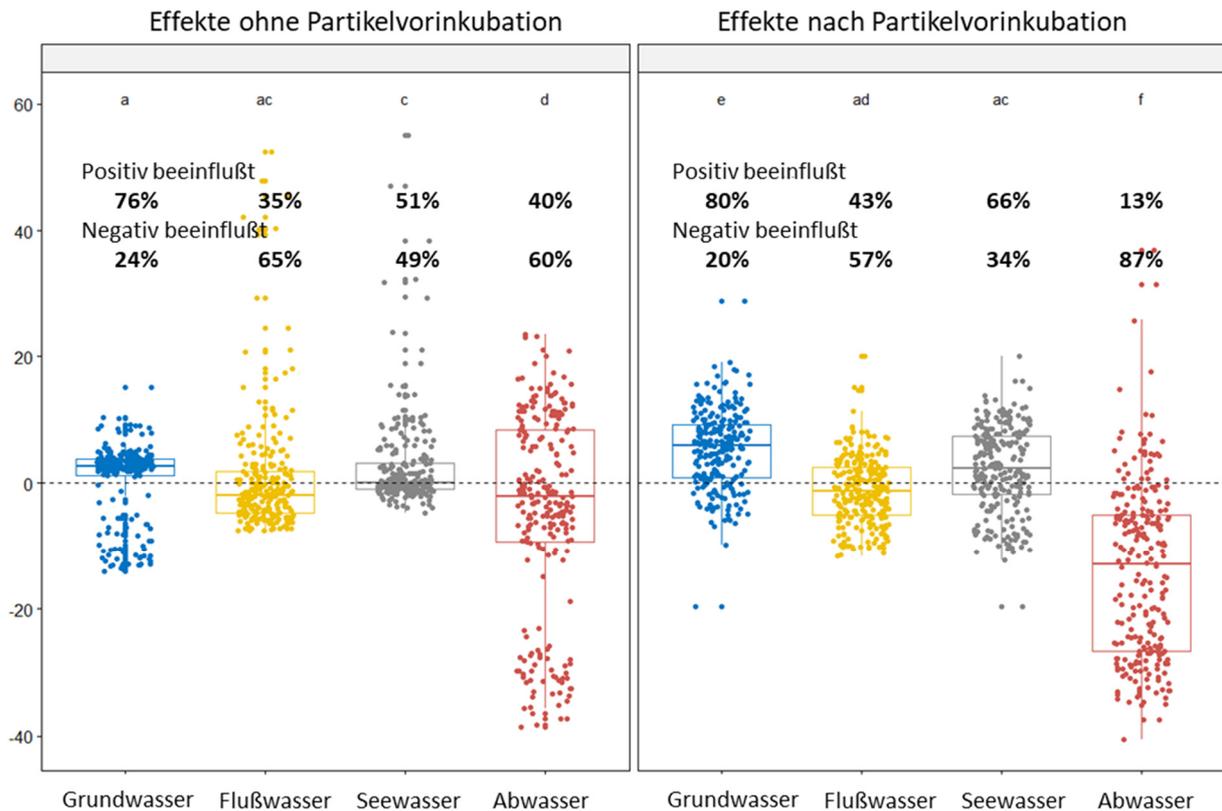


Abbildung 63: Positive vs. negative Wirkung der Zugabe von MP oder NP Partikel auf die Biomasseproduktion (maximal erreichte OD) von *P. fluorescence* in vier unterschiedlichen Wassertypen. Daten zu unterschiedlichen MP und NP Partikelkonzentrationen wurden gepoolt.

In einem eigenen Set von Versuchen wurde die Auswirkung von MP und NP Partikel auf die Aktivität (zellinterner ATP Gehalt) von *P. fluorescence* Populationen untersucht wenn diese zusammen mit den Kunststoffpartikel oder 14 Tage nach den Partikeln zu den vier verschiedenen Wassertypen zudosiert wurden. In Abbildung 64 ist gut zu erkennen, dass es im ersten Versuchsansatz (gleichzeitige Zugabe von MP/NP und Bakterien) zu keinen messbaren negativen oder positiven Effekten auf die bakterielle Aktivität kam. Wurden die Wässer 2 Wochen vorher mit den Partikeln versetzt und inkubiert, waren Unterschiede zu den Kontrollmessungen feststellbar, die mit wenigen Ausnahmen (siehe NP 107 nm) eine Verringerung der Aktivität zeigten. In manchen Fällen erholte sich die Aktivität im Verlauf der 14-stündigen Inkubation wieder.

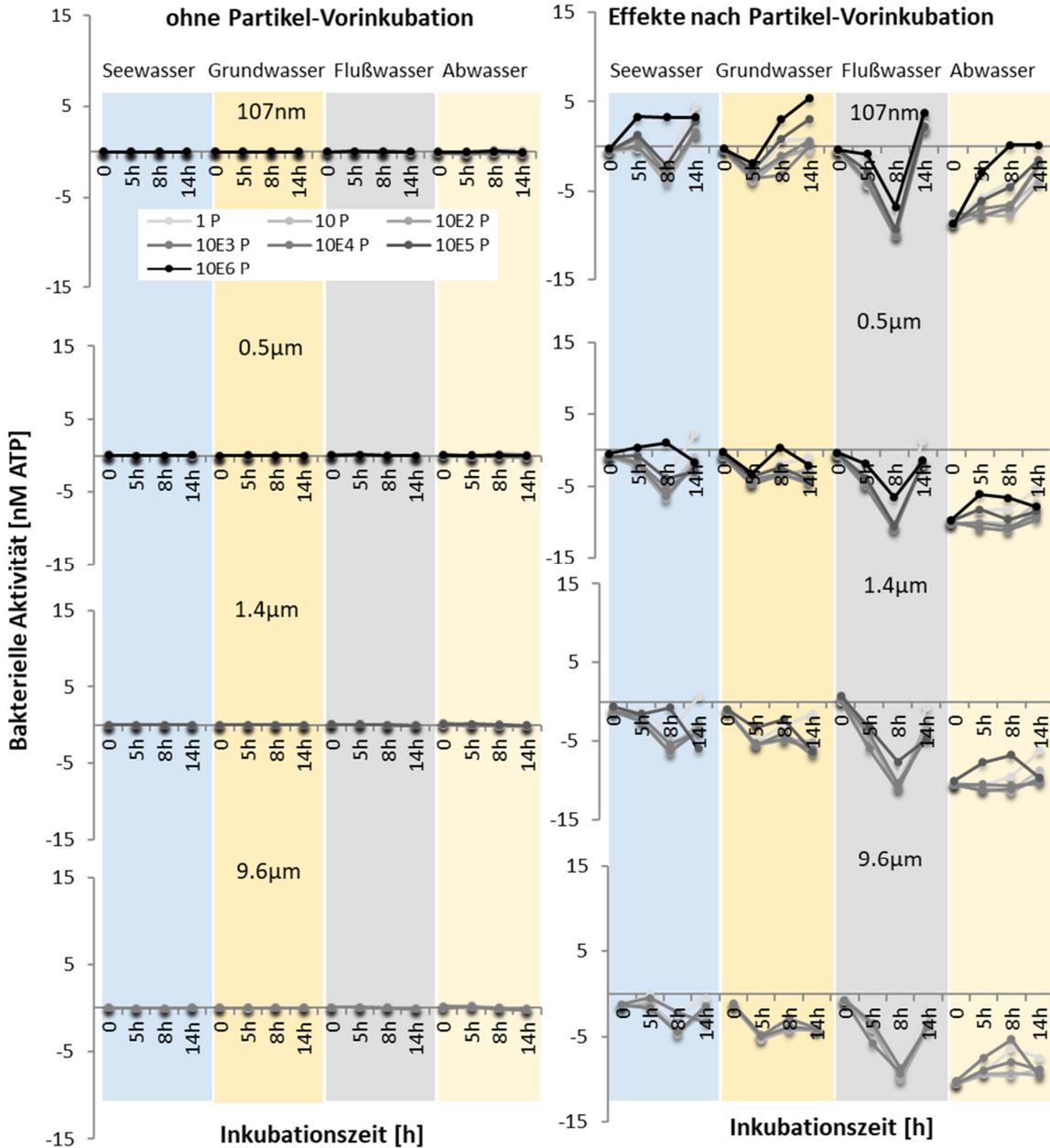


Abbildung 64: Zellinternes ATP von *P. fluorescence* als Maß der bakteriellen Aktivität. ATP Werte über Zeit in 4 unterschiedlichen Wassertypen bei unterschiedlicher Partikelbeladung ohne (links) und mit (rechts) Partikelvorinkubation. Erläuterung siehe Text. Werte sind Mittelwerte von Doppelmessungen.

Experimente zur Partikelaufnahme durch heterotrophe Flagellate im Abwasser zeigten, dass sowohl NP als auch MP Partikel durch Flagellaten aktiv aufgenommen wurden (Abbildung 65). Die Partikelaufnahme wurde in diesen Versuchen nur qualitativ untersucht.

Partikelaufnahme durch *heterotrophe Nanoflagellaten*

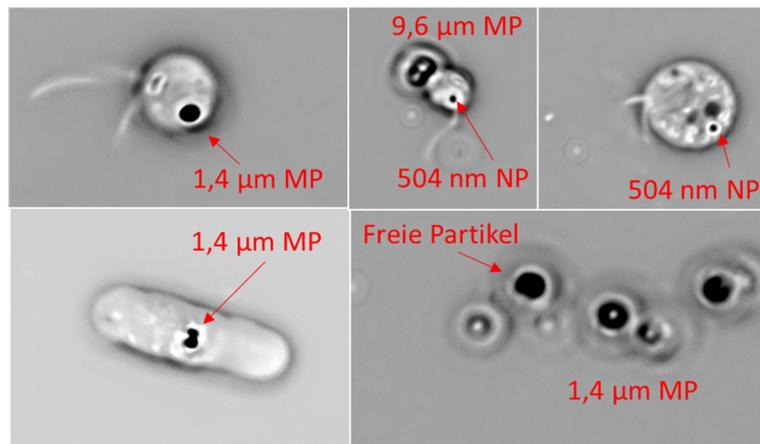


Abbildung 65 Aufnahme von NP und MP Polystyrolpartikel durch heterotrophe Flagellaten im Abwasser der Kläranlage Frötmaning. Phasenkontrastaufnahmen. Fotos: Yuixiang Zhou.

Experimente zur Partikelaufnahme mit den beiden Ciliaten *Laurentiella* sp. und *Paramecium* sp. Ergaben ähnlich wie für die Flagellaten im Abwasser eine aktive Aufnahme für MP (Abbildung 66).

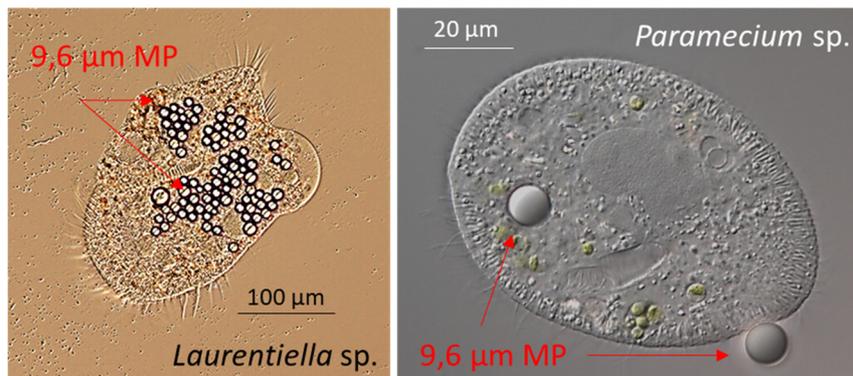


Abbildung 66: Aufnahme von MP Polystyrolpartikel durch zwei Ciliaten. Phasenkontrastaufnahmen. Fotos: Bettina Sonntag, Universität Innsbruck.

In einer systematischen Versuchsreihe mit *Paramecium* sp. zeigte sich, dass die größten MP Partikel (9,6 µm) offensichtlich nach anfänglicher Aufnahme wieder ausgeschieden wurden (Abbildung 67). Kleinere Partikel wurden sichtlich kontinuierlich aufgenommen und ausgeschieden, worauf die schwankenden Partikelzahlen hinweisen. Während von den großen Partikeln (9,6 µm) nur einige wenige in den Ciliaten zu beobachten waren, wurden die Partikel < 1,4 µm in sehr großen Mengen (35 bis 430) aufgenommen (Abbildung 67).

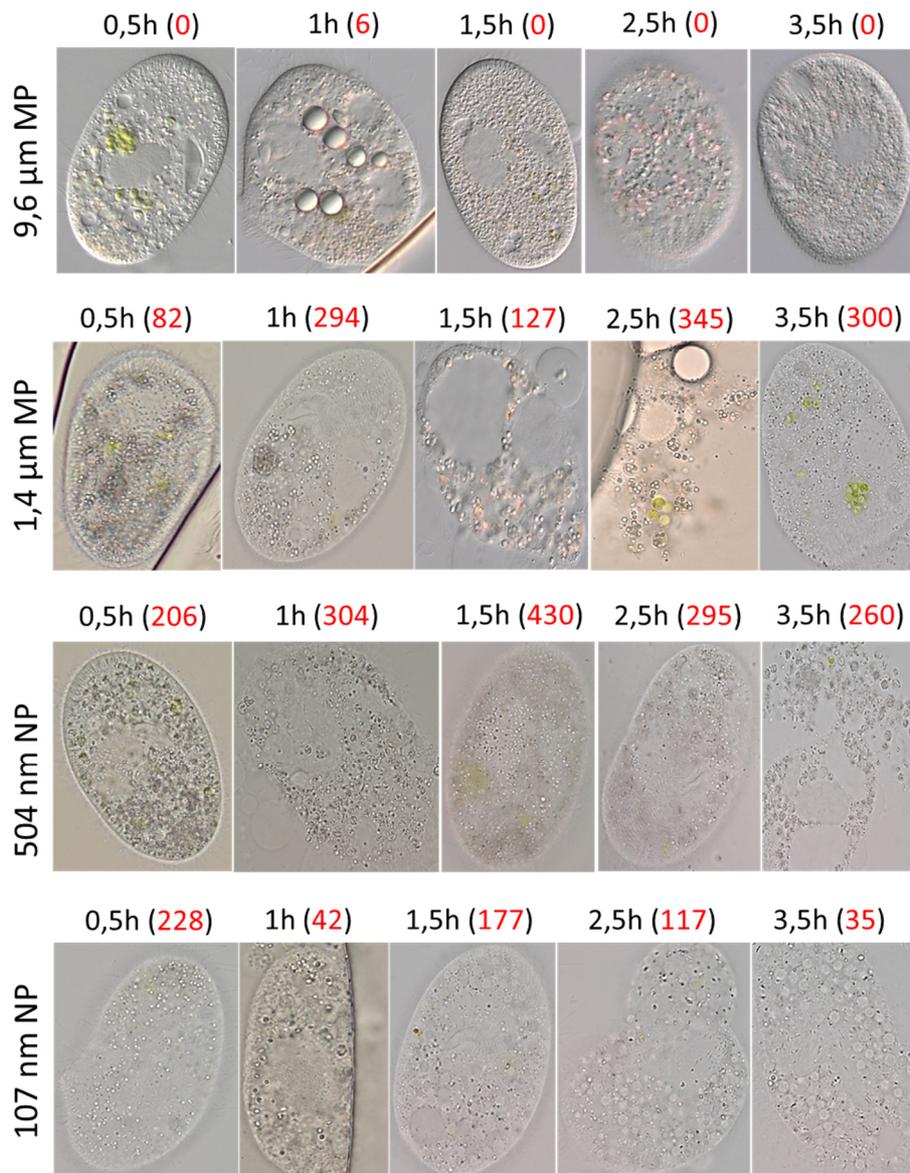
Partikelaufnahme durch *Paramecium* sp.

Abbildung 67: Zeitserie zur Aufnahme von NP und MP Polystyrolpartikel durch *Paramecium* sp.. Phasenkontrastaufnahmen. Fotos: Bettina Sonntag, Universität Innsbruck.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurden erste Versuche zur Aufnahme von Kunststoffpartikeln durch Mikroorganismen bereits vor 60 Jahren durchgeführt [170,185]. Pace und Bailiff (1987) beobachtete, dass die sehr häufige Ciliatenart *Cyclidium* sp. beim Grazing nicht zwischen Bakterien und kleinen Latexpartikeln (PS) unterscheiden konnte, während die Flagellaten offensichtlich zwischen den Partikelqualitäten diskriminierten [174]. Die Aufnahme von Fluoreszenzpartikeln wurde als Methode zur Quantifizierung von Grazingraten vorgeschlagen. Weiterführende Arbeiten wurden von Fenchel [172,173] durchgeführt. Vierzehn Ciliatenarten diskriminierten die Latexkügelchen hauptsächlich in Zusammenhang mit der Größe

(0,09 to 5,7 μm), was durch die unterschiedliche Größe der Mundöffnung der einzelnen Arten erklärt wurde. In einer aktuellen Studie mit dem marinen Ciliaten *Uronema marinum* zeigten Zhang et al. (2021) eine aktive Aufnahme von MP und dass die Exposition mit steigenden Konzentrationen von PS Partikeln Durchmesser (0,5, 1,07, 2,14, and 5 μm) für 96h zu einer Abnahme der Abundanz, Körpergröße und Biomasse führte [186]. Auch Kong et al. (2021) fanden eine signifikante Reduktion der Abundanz und der Grazingraten (ermittelt über die Clearance Rate) mit zunehmender MP Partikelzahl (0, 0,4, 0,8, 1,6, and 2,0 mg/L) und –größe (0.07 and 3 mm) für den mixotrophen Flagellaten *Ochromonas gloeopara* [187].

Vergleichbare Studien mit Flagellaten wurden von Hahn and Höfle (1999) und Boenigk et al. (2001) durchgeführt. Boenigk et al. (2001) kamen zu dem Schluss das nicht die Aufnahme sondern die Verarbeitung (Verdauung) der Partikel entscheidend ist. Gerade Protozoen die einzelne Partikel selektiv aufnehmen hätten einen entscheidenden Nachteil durch die Aufnahme von Kunststoffpartikel. Die Aufnahme von MP/NP durch Flagellaten ist zudem art-spezifisch und auch abhängig vom Ernährungsstatus der Individuen. [161,176,177]

Neben Arbeiten zu Ciliaten und Flagellaten, gibt es auch eine Handvoll Studien zu Amöben. Die Aufnahme von PS und PVT Kügelchen durch Acanthamoeben [171,188–190]. Es wurde gezeigt, dass Amöben, vor allem auch vor der Enzystierung, die aufgenommenen Kunststoffteilchen auch wieder ausscheiden (Exozytose).

Die Autoren verschiedener Protozoenstudien kommen zu dem Schluss, dass sich die zunehmende Verunreinigung der Gewässer durch Mikroplastik auf den Nährstoff- und Kohlenstoffkreislauf in aquatischen Systemen auswirken wird, da die Aufnahme von MP/NP zu einer Reduktion des Grazings führt. Die Aufnahme von Plastik anstatt von Bakterien führt zu einem Verlust bei der Nährstoff- und Kohlenstoffaufnahme mit Auswirkungen auf die Physiologie der Protozoen und möglichen Kaskadeneffekten [186]. Zu einem ähnlichen Schluss kommen auch andere Arbeiten zu MP/NP und mikrobiellen Gemeinschaften in aquatischen Systemen [151]. Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang aber auch der Umstand, dass es kaum Arbeiten zur aktiven Ausscheidung von MP und NP durch Mikroorganismen gibt [191,192].

In den Arbeiten zu MP/NP und mikrobiellen Gemeinschaften wurden vor allem die Pilze bislang wenig berücksichtigt [148,149]. Einige wenige Arbeiten untersuchten den

Aufwuchs von Pilzen auf Kunststoffoberflächen [166,167]. Studien zur Aufnahme von Plastikpartikel durch Pilze fehlen. In unseren Versuchen mit Pilzhyphen des Ascomyzeten *Phoma* sp. die über eine Agaroberfläche bedeckt mit 20 nm PS-Partikel wuchsen, zeigten erste sehr spektakuläre Ergebnisse. Die NPs scheinen an die Hyphen/Zellwände zu binden. Möglicherweise kleben sie an extrazellulären Polysacchariden. Auf diese Weise werden die NP Partikel bioakkumuliert und eventuell sogar entlang der Hyphen weiter transportiert. Ob NP-Partikel auch quantitativ ins Zellinnere aufgenommen werden, können diese ersten Ergebnisse nicht zweifelsfrei beantworten. Einzelne leuchtende Partikel, die sich scheinbar im Hypheninneren befinden, könnten auch an der Zelloberfläche sitzen (Abbildung 68). Wasser-Agar erwies sich in den Versuchen als am geeignetsten, da auf Malz-Agar ein zu starkes Wachstum die nachfolgende Mikroskopie erschwerte. Die NP-Applikation auf den Deckgläschen führte zu den aussagekräftigsten Bildern; nicht zu viele Hyphen auf den Deckgläschen und somit nicht zu starke Überlagerung mehrerer Bildebenen.

Es wurde bereits in mehreren Fachartikeln kritisch darauf hingewiesen dass die Partikeldichte wie sie in der Mehrzahl der experimentellen Arbeiten zum Einsatz kam und kommt, um ein Vielfaches höher ist als die realen Konzentrationen wie man sie in der aquatischen Umwelt antrifft [192–194]. Aufgrund unserer Entscheidung für Batchversuche in 96-Multi-Well Platten, die einen hohen Probendurchsatz und viele Parallelen erlaubten, definierte sich unsere niedrigste Partikelkonzentration mit einem Partikel je 333 μL , was einer Konzentration von 3.000 Partikeln pro Liter entspricht. Diese Konzentration wird in der Umwelt nur in Ausnahmefällen erreicht.

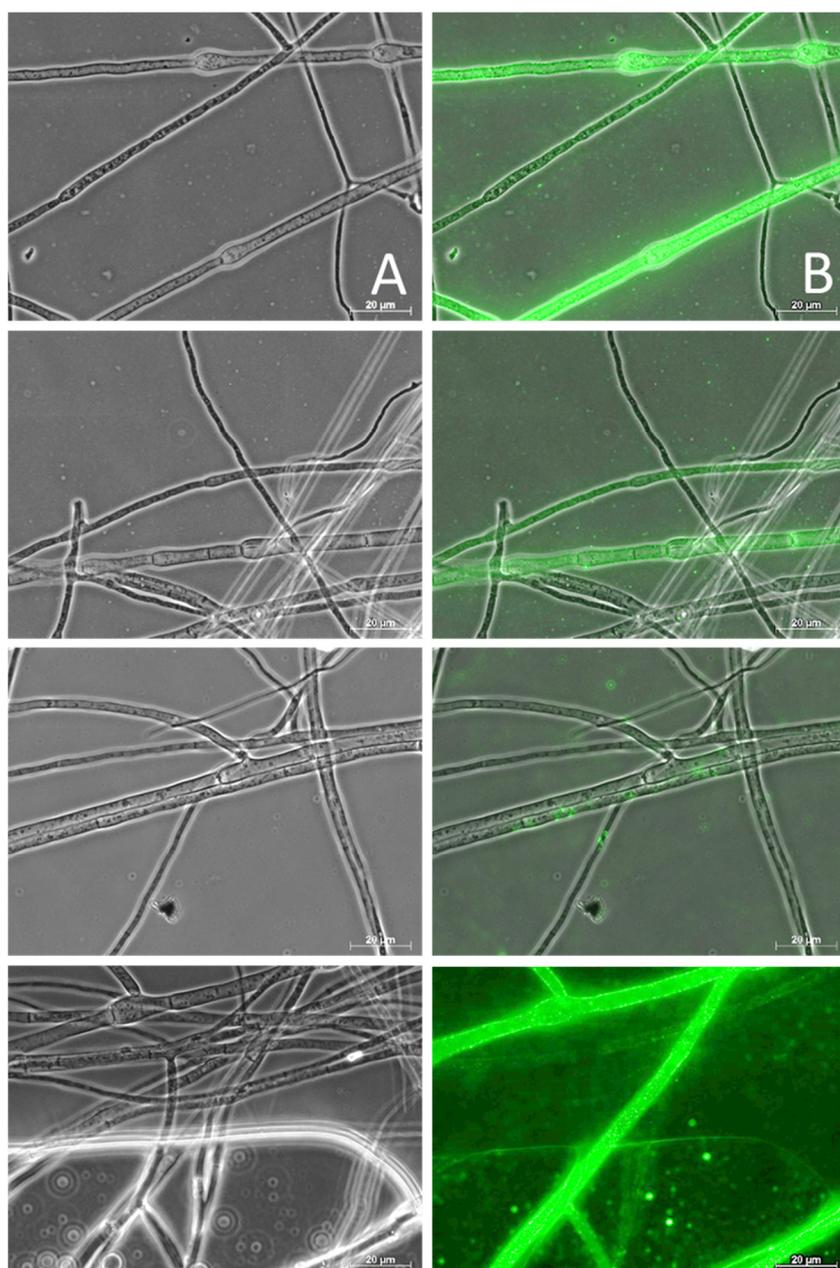


Abbildung 68: Bioakkumulation von fluoreszierenden 20 nm PS Nanopartikel an den Hyphen des Askomyceten *Phoma* sp. Überlagerung von (A) Phasenkontrast- und (B) Fluoreszenzaufnahmen. Fotos: Dietmar Schlosser, UFZ Halle

Koelmans und Koautoren berichten in ihrem aktuellen Überblicksartikel von einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 10^8 Partikel/ m^3 für verschiedenste Binnengewässer [114]. Die Autoren merken jedoch kritisch an, dass nur 4 von 50 Studien wichtige Qualitätskriterien bei der Quantifizierung erfüllten. Hitchcock (2020) zeigt beispielweise einen dramatischen Anstieg der MP Partikelkonzentration in aquatischen Ökosystemen in Zusammenhang mit hydrologischen Extremereignissen [195]. Konzentrationen von etwa 400 Partikel/ m^3 stiegen auf über 17.000 Partikel/ m^3 Oberflächenwasser an nach einem Starkregen. Dazu im Vergleich, die niedrigste von uns getestete

Partikelkonzentration 3 Mio Partikel/m³, zwei Größenordnungen höher. In vier Schweizer Flüssen und in der Donau wurden Konzentrationen von 0 bis 141 Partikel/m³ gefunden [196]. Konzentrationen wie sie in unserem Teilprojekt zum Einsatz kamen reflektieren am ehesten noch die Situation in einer Kläranlage [114,197]. MP in Karst- und Grundwasser kommt meist in noch weitaus niedrigeren Konzentrationen vor als in Oberflächengewässern. Mintenig et al. (2019) berichten über 0 bis 7 MP Partikel/m³ in Rohwasser (Grundwasser) und Trinkwasser [198]. Panno et al. (2019) fanden jedoch eine Konzentrationen von MP Fasern bis 15,2 Partikel/L in Quellwasser und Karstwasser aus Beobachtungsbrunnen in einem Karstsystem in Illinois, USA [199].

Weitere Aspekte die in unserer aktuellen Arbeit leider keine Berücksichtigung gefunden haben, sind (1) dass Versuche mit PS Kügelchen die Situation in aquatischen Lebensräumen nur unzureichend widerspiegeln. Vielkantige Fragmente und Fasern dominieren und Kügelchen bilden eine nur kleine Fraktion [114,192]. Die hier verwendeten Polystyrol Partikel repräsentieren auch nicht die dominantesten Kunststoffarten in der Umwelt (PE = PP > PS > PVC > PET) [114,200].

Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die Zugabe von MP und NP Polystyrol-Partikel zu natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften in Grund- und Trinkwasser, als auch zu verschiedenen steril-filtrierte Wässern (Grundwasser, Seewasser, Flusswasser, Abwasser) die mit *P. fluorescence* inokuliert wurden, zeigten in einer Vielzahl der Ansätze fördernde oder hemmende Effekte auf das mikrobielle Wachstum (beobachtete maximale Wachstumsrate), die Biomasseproduktion (maximal erreichte optische Dichte) und die mikrobielle Aktivität bzw. die aktive Biomasse (intrazelluläre ATP Konzentration). Aus den durchgeführten Tests können mit aktueller Datenlage leider keine ‚verlässlichen‘ und ‚systematischen‘ Trends abgeleitet werden. Die Ergebnisse zeigten eine sehr große Streuung. Während es in einigen Versuchsreihen durch die Anwesenheit von MP oder NP Partikeln zu einer signifikanten Stimulation mikrobieller Prozesse kam, zeigten sich in vergleichbaren Versuchen zu einem späteren Zeitpunkt im Jahr oder in Versuchen mit einem anderen Gewässertyp negative Effekte. Will man die Beobachtungen zu den Batchversuchen mit den vorwiegend prokaryontischen Gemeinschaften im Grund- und Leitungswasser und den Inkubationen mit *P. fluorescence* kurz zusammenfassen, so ergibt sich folgendes Bild:

- Im nährstoff- und energiearmen Grund- und Trinkwasser führte die Zugabe von MP und NP Partikel in der Mehrzahl der Versuche zu einer Stimulation des Wachstums und der Biomasseproduktion.
- Eine Vorinkubation der Wässer mit den MP und NP Partikeln steigerte die positiven Effekte auf Wachstumsraten und Biomasseproduktion, mit Ausnahme für das getestete Abwasser (nährstoff- und energiereich) wo es zu einer Reduktion der Biomasseproduktion kam. Auf die mikrobielle Aktivität (ATP Konzentration) wirkte sich eine Vorinkubation mit Partikeln größtenteils negativ aus.
- In der Mehrzahl der Versuche führte die Zugabe von NP zu deutlicheren Effekten als MP.
- In der Mehrzahl der Versuche führte eine höhere Partikeldotation zu stärkeren Effekten.

Es soll jedoch bereits hier kritisch angemerkt sein, dass wir auf Basis dieser Ergebnisse sichere Vorhersagen nicht treffen können.

Als weiterer wesentlicher Unsicherheitsfaktor muss die Partikelkonzentration beachtet werden. In allen Versuchen kamen aufgrund der technischen Rahmenbedingungen Partikelkonzentrationen zum Einsatz die so in der aquatischen Umwelt oder im Abwasser nur in Ausnahmefällen vorhanden sind. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse wäre daher ohnehin nur sehr eingeschränkt möglich gewesen. Unser ursprüngliches Ansinnen, mit diesem Versuchsdesign einen Grenzwert bzw. einen Grenzbereich zu bestimmen ab welchen Partikelkonzentrationen und bei welchen Partikelgrößen mikrobielle Prozesse und Gemeinschaften beeinflusst werden, negativ oder positiv, konnte aufgrund der sehr streuenden Ergebnisse nicht verwirklicht werden.

Es soll hier auch nochmal angemerkt werden, dass durch den frühzeitigen Weggang der Projekt-Hauptbearbeiterin Fr. Dr. Zhou und dem Arbeitsplatzwechsels des Projekt PI am HMGU-IGÖ nach Wien (Österreich) einige ursprünglich geplante Aspekte nicht mehr untersucht werden. Dazu gehören (1) die Interaktion zwischen MP/NP und Viren, (2) der Einfluss von MP/NP auf die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften in unterschiedlichen Gewässern, (3) das Transportverhalten von MP und NP durch aquatische Sedimente.

Auswirkungen auf aquatische Invertebraten und organismische Effekte

TUM-LAS

Einleitung

Zu Beginn der Projektlaufzeit 2018 verdeutlicht die verfügbare wissenschaftliche Literatur die Notwendigkeit einheitlicher Vorgehensweisen zur Ermittlung potentieller Risiken von Mikro-, Submikro- und Nanoplastik. Aufgrund fehlender Analysemethoden und toxikologischer Daten ist daher eine Bewertung der Submikropartikel hinsichtlich ihres Eintrags, Verbleibs, Abbaus und potentieller Toxizität nicht möglich. Zu den möglichen Auswirkungen dieser Partikel auf die aquatische Umwelt, aber auch den Menschen lagen kaum Untersuchungen und Daten vor. Einige Studien deuteten darauf hin, dass diese Partikel Einfluss auf die Physiologie von aquatischen Organismen und das Immunsystem haben sowie in das menschliche Verdauungssystem gelangen und dort Entzündungsreaktion auslösen können [10,12,201,202]

Bis dato zeigten Untersuchungen, dass Kunststoffpartikel über einen langen Zeitraum in der Umwelt verbleiben und es dabei zu einer Anreicherung der Partikel und der darauf adsorbierten Schadstoffe in Organismen kommen kann [74,203]. Allerdings gab es bislang nur wenige Studien zur Aufnahme solcher Mikro- und Submikropartikel durch Süßwasserorganismen sowie die damit verbundenen physiologischen Auswirkungen. Ebenso fehlten bislang Untersuchungen zur mechanistischen Grundlage potentieller Toxizität. Dies ist auch auf eine fehlende Standardisierung der Partikeltoxizitätstests zurückzuführen, da die herkömmlichen ökotoxikologischen Tests für aquatische Organismen auf löslichen Chemikalien basieren. Dies führte dazu, dass es vor allem ökotoxikologische Studien im höheren Submikro-Bereich gab, in welchen zudem sehr wahrscheinlich die umweltrelevanten Konzentrationen der Plastikpartikel stellenweise weit überschätzt wurden. Die Ergebnisse der Studien zeigen stellenweise kontroverse Effekte, da in einigen Fällen toxische Effekte durch Partikel nachgewiesen werden und in anderen Fällen nicht [204–207]. Heutigen Einschätzungen zufolge liegt dies in der unzureichenden Charakterisierung der Partikel begründet und der uneinheitlichen experimentellen Ansätze, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit publizierter Ergebnisse oftmals nicht möglich ist [208,209].

Zu Beginn des Projektes wurde angenommen, dass Nanopartikel auf Grund ihrer Zellgängigkeit wesentlich toxischer sein könnten also Mikropartikel. Außerdem standen Plastikpartikel auf Grund ihrer Eigenschaften in Verdacht, Schadstoffe wesentlich besser zu binden als natürliche Partikel und diese als Vektoren oder Carrier in die Organismen zu bringen und damit Schadstoffexpositionen zu verstärken. Je kleiner der Partikel, desto größer ist die Oberfläche, an der ein Schadstoff sorbieren kann. Daher wurde auch hier angenommen, dass Nanopartikel auch als Vektoren/Carrier fungieren.

In einem integrativen Ansatz sollten daher in verschiedenen Bioassays sowohl die Aufnahmemechanismen als auch die Wirkungen der Partikel in aquatischen Organismen (in vivo) untersucht werden. *In vitro* Modelle erweitern diesen Ansatz zur Effektermittlung auf zellulärer und molekularer Ebene (siehe AP 5.3), um ein mechanistisches Verständnis partikelinduzierter Stressreaktionen zu schaffen und potentielle Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit ableiten zu können.

Ziele

Ziel des Teilprojektes AP 5.2. ist es, das Verhalten und die Wirkung von Plastikpartikeln zwischen 50 nm und 100 µm in der aquatischen Umwelt zu evaluieren. Speziell von Interesse ist die Aufnahme und Verteilung der Partikel in Organismen und Zellkulturen sowie verschiedene nicht-letale Endpunkte je nach Versuchsmodell. Im Wesentlichen wurden folgende Ziele angestrebt:

1. Anpassung der Bioassays auf Submikropartikel
2. Definition artspezifischer Aufnahmeraten anhand markierter Referenzpartikel
3. Etablierung molekularer Marker basierend auf *in vitro* Ergebnissen
4. Toxizitätstests anhand verschiedener bereitgestellter Partikelarten (Polymertyp)
5. Definition der Selektivität (Vergleich Partikelgröße/ Artspezifität)
6. Toxizitätstests Schadstoffassoziation – Bioverfügbarkeit
7. Langzeittests Reproduktion/Artengemeinschaft
8. Testabgleich biologischer Marker in *vivo/in vitro*

Plan/Durchführung

Um die oben aufgelisteten Ziele zu erreichen, sollten zwei aquatische Organismen unterschiedlicher Ernährungsweise (benthische Filtrierer und benthische Detritivore)

mit verschiedenen Partikelarten, -größen und -formen ohne Additive exponiert werden. Dafür lag vorerst das Hauptaugenmerk auf der Etablierung standardisierter Bioassays für beide Organismen (Punkte 1 und 3). Nach Bereitstellung der verschiedenen Partikel seitens der Projektpartner sollten die ersten Versuche zur Aufnahme und Selektivität (Punkt 2 und 5) und anschließend Toxizitätstests mit und ohne Schadstoff (Punkt 4 und 6) durchgeführt werden. Zum Abschluss waren Langzeittests inklusive Reproduktion und Artgemeinschaft geplant.

Ergebnisse und Diskussion

Etablierung standardisierter Bioassays für zwei aquatische Organismen und Anpassung der Bioassays auf Submikropartikel

Die Entwicklung von Bioassays wurde schwerpunktmäßig für die Testorganismen *Gammarus roeseli* und *Dreissena polymorpha* untersucht. Beide Testsysteme konnten erfolgreich etabliert und weitgehend harmonisiert werden (Abbildung 69). Für beide Organismen konnten in Folge der standardisierten Durchführung der Bioassays valide Endpunkte etabliert werden, um mögliche Effekte nachzuweisen. Neben der Mortalität und dem Fraß-/bzw. Filtrierverhalten konnten ebenso Veränderungen im Schwimmverhalten und den Energiespeicherstoffen gemessen werden (Abbildung 70). Zum Zeitpunkt der Berichterstellung werden die Endpunkte um die Messung des Darmmikrobioms und verschiedener molekularer Marker erweitert.



Abbildung 69: Beispielhafter Versuchsaufbau für Bioassays mit *Gammarus roeseli* (links) und *Dreissena polymorpha* an Sensoren (rechts) in der Klimakammer. Bild: A. Götz, TUM.

Die Etablierung der Messung der Endpunkte Lipid, Glukose und Glykogen wurde auf Grund der Arbeiten von Charron et al. (2014) und van Handel (1985) durchgeführt

[210–212]. Die Proteinmessung basiert auf den Ergebnissen von Bradford (1976) und Walker (2002) [213,214]. Die Messung des Schwimmverhaltens der Gammariden basiert auf dem Programm Ethovision XT 11 von der Firma Noldus, wobei der Aufbau und die Durchführung im Labor entwickelt wurden.

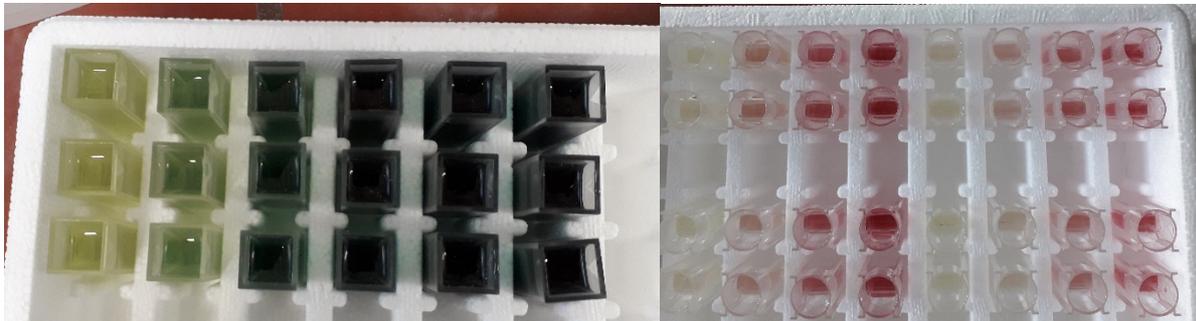


Abbildung 70: Beispiel Messung der Speicherstoffe. Färbung anhand der Konzentration von Glucose oder Lipid in der Probe.

Neben der Etablierung der Bioassays stand die Optimierung der Expositionsszenarien für das Testsystem für *G. roeseli* mittels der Validierung der Partikelverteilung in standardisierten Futtertabs (DECOTABs) im Vordergrund. Ebenfalls konnte durch fluoreszenzmikroskopische Nachweise eine Bilanzierung der Aufnahme und Ausscheidung von Mikropartikeln (10-65 μm) durch die Organismen erbracht und wichtige Erkenntnisse zur Aufnahmekinetik beider Organismen gewonnen werden.

Expositionstool zur oralen Verabreichung von partikulären Substanzen

Für das Testsystem *Gammarus* wurde ein Futtertool zur gezielten oralen Dosierung von Partikeln etabliert, welches auf jeden Shredder oder Grazer Organismus erweitert werden kann. Dafür wurde ein Futtertab aus Agar-Zellulose Gemisch (DECOTAB) basierend auf der Rezeptur von Kampfraath et al. (2012) verwendet und speziell für *Gammarus roeseli* mit Nahrungsergänzungsmitteln angepasst [215]. Anschließend wurden die Tabs während des Herstellungsprozesses gezielt mit Partikeln beladen. In Abbildung 3 ist eine Verteilung der Partikel im DECOTAB exemplarisch dargestellt. Die bisherigen Ergebnisse bestätigen eine gleichmäßige Verteilung und keine Agglomeration der Partikel in vertikal durchgeführten 50 und 10 μm dicken Kryotomschnitten durch den Futtertab. Die Visualisierung gelingt derzeit für Partikel der Größenordnung 500 nm, 1 μm und > 1 μm . Lediglich Partikel mit < 150 nm können noch nicht nachgewiesen werden, da die Eigenfluoreszenz der übrigen Bestandteile

des DECOTAB die Partikelfluoreszenz überstrahlt und die lichtmikroskopische Auflösung unterschritten wird.

Eine Agglomeration und inhomogene Verteilung sowie Dichte-bedingtes Aufschwimmen oder Absinken der Partikel im Testmedium wird dadurch umgangen und erlaubt eine nachvollziehbare Einstellung der Testkonzentrationen für die toxikologische Bewertung. Zusätzlich kann durch die optimierte Zusammensetzung der Nährstoff-Additive der DECOTAB auch als Futtermittel und für Langzeitexpositionen eingesetzt werden.

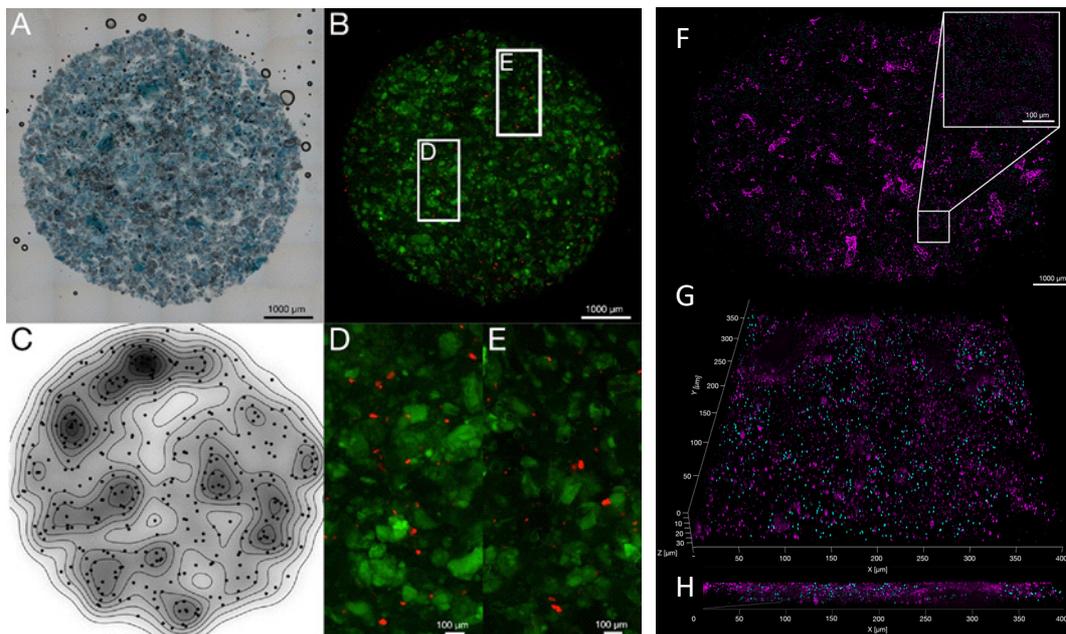


Abbildung 71, übernommen aus Götz et al. (2021) [216]: Einbettung von fluoreszierenden Partikeln in DECOTABs. Die homogene Verteilung der Partikel im DECOTAB erlaubt eine gezielte orale Exposition bei Gammariden. Abbildung links: (A) Lichtmikroskopische Aufnahme eines DECOTAB-Querschnitts. (B) Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme (GFP-Anregung für Grün-Fluoreszenz und Rhod-Anregung für 134 ms für Rot-Fluoreszenz mit rot fluoreszierenden PS Partikeln (10-65 μm)). (C) Contour-Plot zur Verteilung der Partikel basierend auf Nearest Neighbor Analyse: Punkte zeigen die Partikelposition, Graustufen die Partikeldichte. (D,E) Ausschnittsvergrößerung aus (B). Abbildung rechts: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines horizontalen Schnitts (10 μm) durch einen mit 1000-nm Partikeln beladenen DECOTAB. (F) Übersichtsdarstellung mit $\times 20$ HC PLAPO CS2 20 \times /0.75 IMM UV Objektiv. Der Bildausschnitt zeigt einen vergrößerten Auszug mit 2×2 Kacheln dargestellt mit $\times 63$ HC PL FLUOTOAR 63 \times /1.10 IMM und 81 Z-Ebenen. (G,H) Volumenvisualisierung (3D) einer 2×2 Fläche des Schnitts dargestellt mit $\times 63$ HC PL FLUOTOAR 63 \times /1.10 IMM und 81 Z-Ebenen.

Definition Artspezifischer Aufnahmeraten anhand markierter Referenzpartikel

Aufnahmekinetiken mit fluoreszierendem PS in *Gammarus roeseli*

Die Aufnahme und Ausscheidung bei Gammariden wurde mittels Messung der spezifischen In- und Egestionsraten ermittelt und mit Partikelzählungen in Darmpräparaten abgeglichen. Es ergab sich ein Gleichgewicht innerhalb weniger Stunden und eine deutlich höhere Aufnahme von Partikeln über den oralen Expositionspfad im Vergleich zu im Wasser suspendierten Partikeln. Demnach ergibt sich für Gammariden über einen Versuchszeitraum von 2 Wochen eine mittlere Fraßrate von $1.3 \pm 0.7 \mu\text{g}/\text{Individuum} \cdot \text{Tag}$.

Die Fraßraten der Gammariden zeigten keine Unterschiede zwischen DECOTABs mit oder ohne zugesetzten Partikeln. Ferner zeigten die Fraßraten keine statistisch signifikanten Unterschiede über die Versuchszeit von 2 Wochen (Abbildung 4). Im Abgleich mit den im Darmpräparat nachgewiesenen Partikelzahlen wurde eine deutliche Korrelation zu den Partikelzahlen im DECOTAB deutlich ($p < 0,001$, $r = 0,33$), eine höhere Dosierung der Partikel im DECOTAB war anhand erhöhter Partikelzahlen im Darm der Gammariden nachweisbar. Damit steht für das Testsystem Gammariden ein Expositionssystem zur Verfügung, welches eine gezielte und exakt dosierbare Applikation über den Nahrungspfad erlaubt [216].

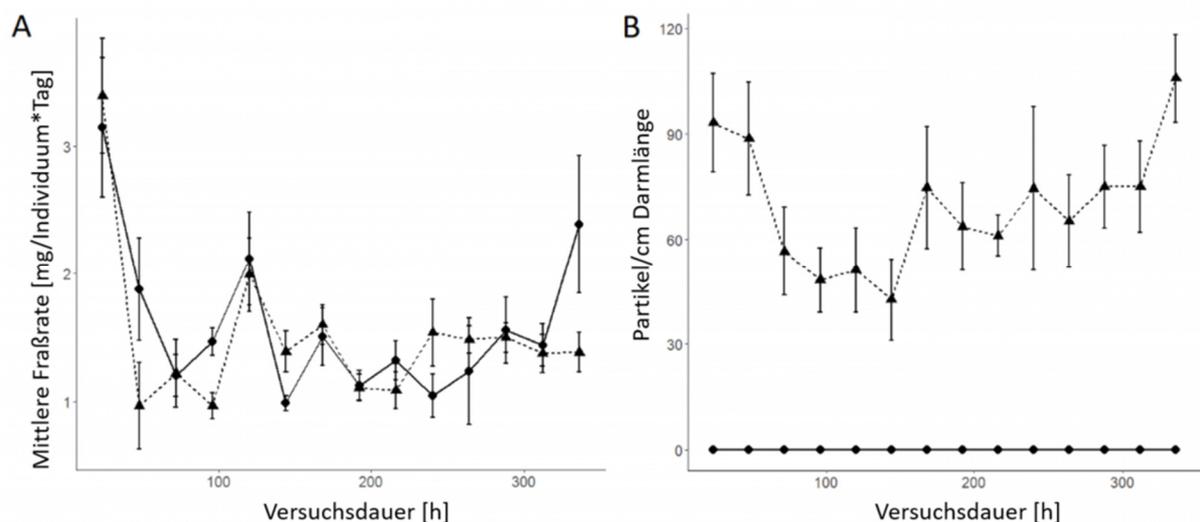


Abbildung 72: Abbildung modifiziert nach Götz et al. (2021) [216]: Langzeitversuch zur Ermittlung der Fraßrate bei *G. roeseli* an DECOTABs mit (-▲-) und ohne (-●-) Partikelbeladung (Größenbereich 10 - 65 μm). (A) Mittlere Fraßrate pro Gammarid und Tag und (B) mittlere Partikelanzahl pro cm Darmlänge.

Aufnahmekinetiken mit fluoreszierendem PS in *Dreissena polymorpha*

Im Gegensatz zu Gammariden ist eine Anwendung der DECOTABs für filtrierende Organismen nicht geeignet. Die Exposition erfolgt hierbei ausschließlich über die im Wasser suspendierte Fraktion der Partikel. Für das Testsystem Muschel (*Dreissena polymorpha*) wurde im Berichtszeitraum die In- und Egestion zweier verschiedener Partikel-Größenklassen ($< 40 \mu\text{m}$ und $40\text{-}63 \mu\text{m}$) exemplarisch untersucht. Ein entsprechendes Protokoll zur Aufbereitung von Biota-Proben zum Nachweis von Mikropartikeln in Organismen wurde im Rahmen eines weiteren Kooperationsprojekts am Lehrstuhl etabliert und steht für die Untersuchung von Submikropartikeln zur Verfügung.

Generell wurde bislang eine positive Korrelation zwischen Partikeldosierung und Aufnahme in *D. polymorpha* nachgewiesen. Für die getesteten Partikelfractionen war keine selektive Aufnahme erkennbar, es zeigte sich eine konzentrations- und größen-unabhängige Aufnahme der Größenklasse $10\text{-}65 \mu\text{m}$ (Abbildung 73). Im Gegensatz zu Gammariden erfolgte jedoch keine messbare Egestion der Partikel im 24h Expositionszeitraum und einer anschließenden 24h Depurationsperiode, was auf eine mögliche Akkumulation der Partikel in Muscheln hindeutet. Durch diese verlängerte Aufenthaltszeit im Körper der Muscheln könnte auch die Vektoreigenschaft von Partikeln für Schadstoffe bedeutend sein.

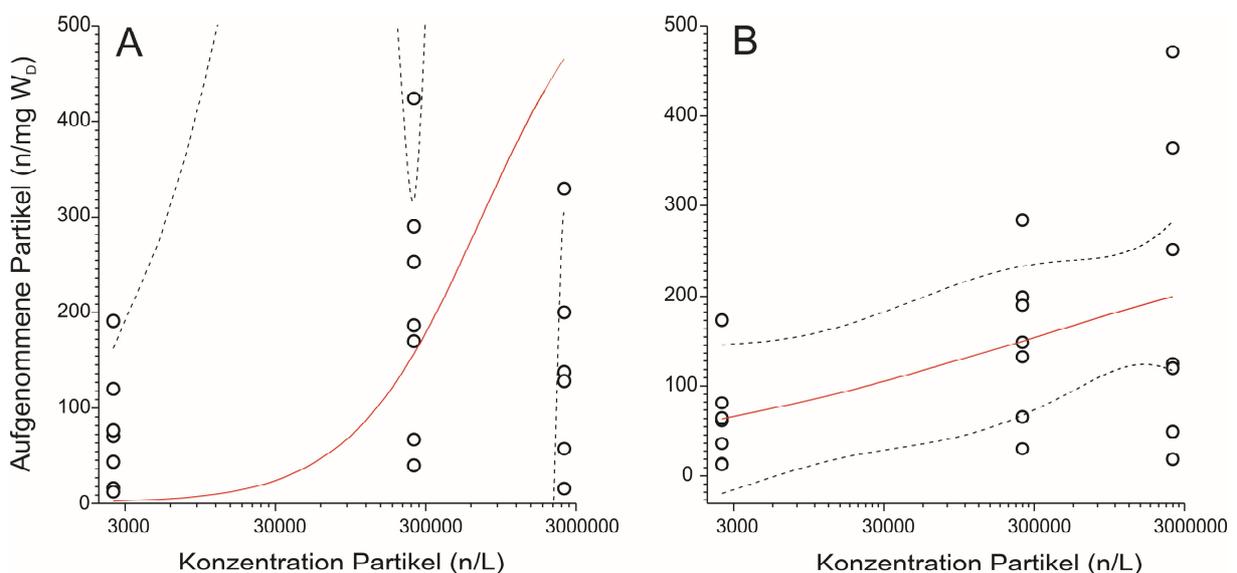


Abbildung 73: Ingestion und Nachweis der Partikel in *D. polymorpha*. Anzahl der in *D. polymorpha* enthaltenen MP-Partikel normiert pro mm Schalenlänge der drei Testkonzentrationen ($2,5 \times 10^5$, 1×10^6 und 4×10^6 Partikel/L). A: Größenspezifische Ingestion nach 24 h Exposition ohne Depuration für Partikel $< 40 \mu\text{m}$. B: Partikel $40\text{-}60 \mu\text{m}$.

Etablierung molekularer Marker zur Messung von Transkriptomantworten

Zeitlich sind zelluläre und molekulare Wirkungen die ersten Reaktionen auf toxische Substanzen und können sehr sensitiv Schadstoffeffekte abbilden. Zusätzlich können spezifische Wirkungsweisen anhand der betroffenen biochemischen Pathways identifiziert werden. Quantitativ lassen sich molekulare Reaktion, wie hier verwendet, anhand der Gentranskription messen. Voraussetzung dazu ist die genaue Kenntnis der codierenden Gensequenzen und die Anpassung der Primer zur Quantifizierung der Gentranskription mittels qPCR. Es wurden für die Testspezies *Dreissena polymorpha* Gene untersucht, welche hauptsächlich Marker für oxidativen Stress, generelle Stressantwort und Detoxifikation darstellen. Primer für die Gene Pgp, EF, CAT, GST, GPx, HSP70, SOD und MT sowie Act und Tub als sehr geeignet zur weiteren Anwendung herausgestellt. Die Anwendung der Marker aus dem unter Punkt 4 beschriebenen Expositionsversuchen steht zum Zeitpunkt der Berichterstellung noch aus.

Tabelle 13: Liste der Markergene und validierten Primersequenzen für *D. polymorpha*.

Primer Name	Name Genabschnitt	Forward/Reverse	Sequence	NCBI accession number
EF	Elongation Factor 1 alpha	F	TTTCTGGATGGCACGGAGAC	AJ250733
		R	CCTGTTTCGAGGCTTTGACT	
MT	Metallothionein	F	CCAGACTCCGACAACCTGAC	U67347
		R	CTTGACAGTTGGAACAGTCGC	
AH-R	Aryl-Hydrocarbon Rezeptor	F	CAGGCACTGTACGGTTTCT	DQ159188
		R	CACGCTCTGGTGGATGATGT	
CAT	Katalase	F	ACCGCCAAATGAACGGCTAT	EF681763
		R	CATCGCATAGTCGGGGTCAC	
SOD	Superoxiddismutase	F	TTGACAACAGTGCCGTGTGA	AY377970
		R	CGTAACGACACCATCGCCTT	
GPx	Glutathion-Peroxidase	F	GTGGAGTTGACGAACGGTCT	EF194204
		R	CACGGGATCGTACAGGATGG	
PiGST	Glutathion S-Transferase	F	ACATCCTGTGCGTGCTATCC	EF194203
		R	GTTACTGCTTGCCGTTTCCG	
HSP70	Heat Shock Protein	F	GGAACGGAAGCGAGCATAGA	EF526096
		R	CCACCGACCAACTACTACTC	
P-gp	Permeability Glykoprotein	F	ATACTGAAGGGGCTCGACCT	AJ506742
		R	CCAGGCTCACAATTCCGTCT	
PP2A	Protein-Phosphatase	F	CGAATGTTTGCGGAAGTACGG	AF508223
		R	TATGGATGGTGACAGACCACC	
Act	Aktin	F	TTCGTACGTTGAGTCGGACA	AF082863
		R	GCATCGTCTCCTGCAAAACC	
Tub	Tubulin	F	CTGAAATCACCAACGCCTGC	AF508224
		R	CGTCCTTGGGGACAACATCA	

Toxizitätstests anhand verschiedener bereitgestellter Partikelarten (Polymertyp)

Zu Beginn des Projektes standen verschiedene Polymerarten in Form von fragmentierten Mikropartikeln zwischen 10 - 65 µm durch eine Kooperation mit dem Lehrstuhl für Verpackungstechnik (TU München) zur Verfügung. *Gammarus roeseli* wurden sowohl Sediment-, Quarz- als auch Polyamid- sowie Polysytrolmikropartikeln dieser Größenfraktion über die beiden zuvor beschriebenen Expositionspfade (oral und via Wasserphase) ausgesetzt. Im weiteren Verlauf des Projektes konnte zusätzlich auf sphärische Silica-, Polystyrol- und Polylactidpartikel der Größen 1-2 µm,

500 nm, 100 nm und 30 nm aus industrieller Herstellung (BS Partikel GmbH, micromod GmbH) in Suspension zugegriffen werden.

Es konnte anhand der verwendeten Endpunkte im Versuchszeitraum kein negativer Einfluss durch Partikel festgestellt werden. Sowohl die Referenzpartikel, als auch die verschiedenen Plastiktypen veränderten weder Überlebenschance, Fraßverhalten oder Schwimmverhalten noch die Einlagerung und den Verbrauch der Speicherstoffe. Auch die Plastikform (fragmentiert oder sphärisch) oder die Konzentration und Menge der aufgenommenen Partikel verursachten keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abbildung 74 & Abbildung 75).

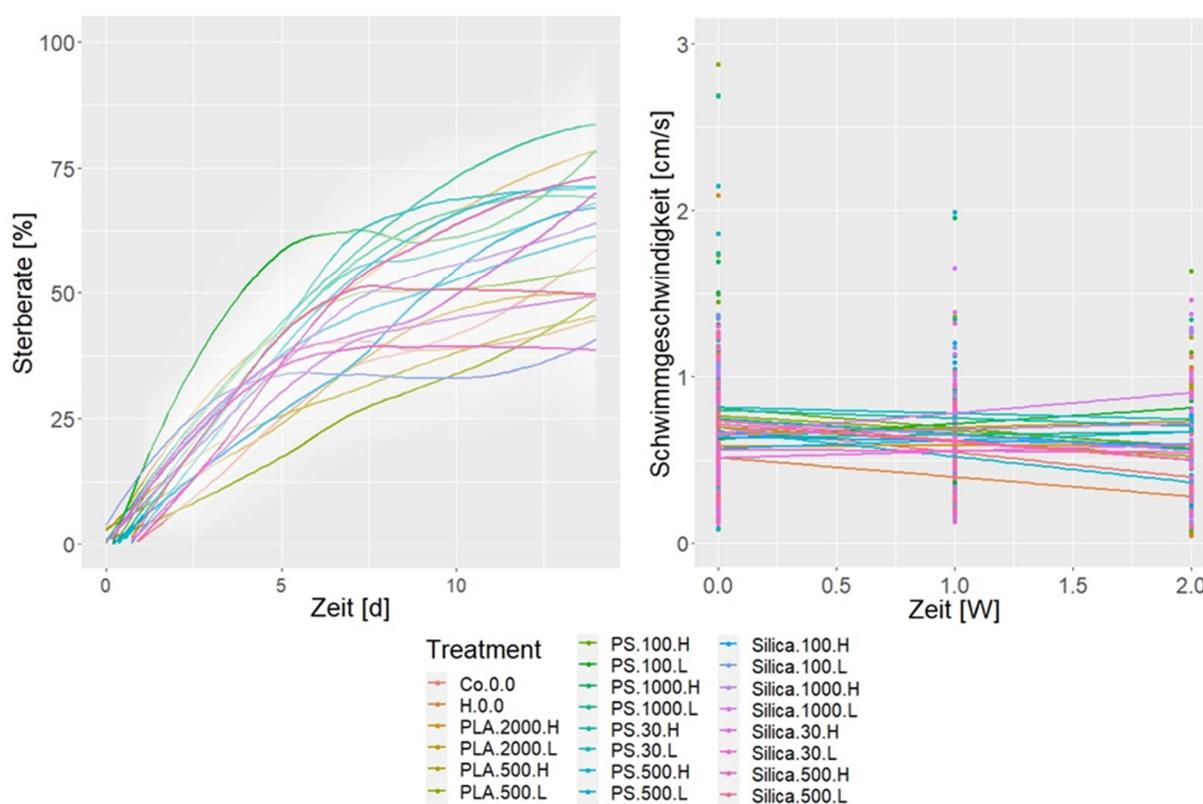


Abbildung 74: Gesammelte Ergebnisse zur Sterberate und der Schwimmgeschwindigkeit einer zwei wöchigen Exposition von *Gammarus roeseli* mit drei verschiedenen Polymerarten (PLA = Polylactid, PS = Polystyrol und Silica) in verschiedenen Größen (1-2 μm , 500 nm, 100 nm und 30 nm) eingebettet in zwei verschiedenen Konzentrationen in den Futtertab (L = Low, H = High). Um eine vergleichbare Partikelmenge zu gewährleisten wurden die Expositionskonzentrationen gemäß Dichte angepasst, dies entspricht Konzentrationen von 4,31 ng PS/mg, 4,19 ng PLA/mg und 8,38 ng silica/mg (L) bzw. 431 ng PS/mg, 419 ng PLA/mg und 838 ng silica/mg (H) bezogen auf Trockenmasse. Es konnte für keinen der betrachteten Endpunkte ein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Auch die zwei unterschiedlichen Konzentrationen lieferten keine Veränderung.

Erste Analysen legen die Annahme nahe, dass auch die zweite untersuchte Spezies *Dreissena polymorpha* nicht durch die Exposition mit den sphärischen Silica-,

Polystyrol- und Polyactidpartikel zwischen 2 µm bis 30 nm Größe beeinflusst wird (Abbildung 76).

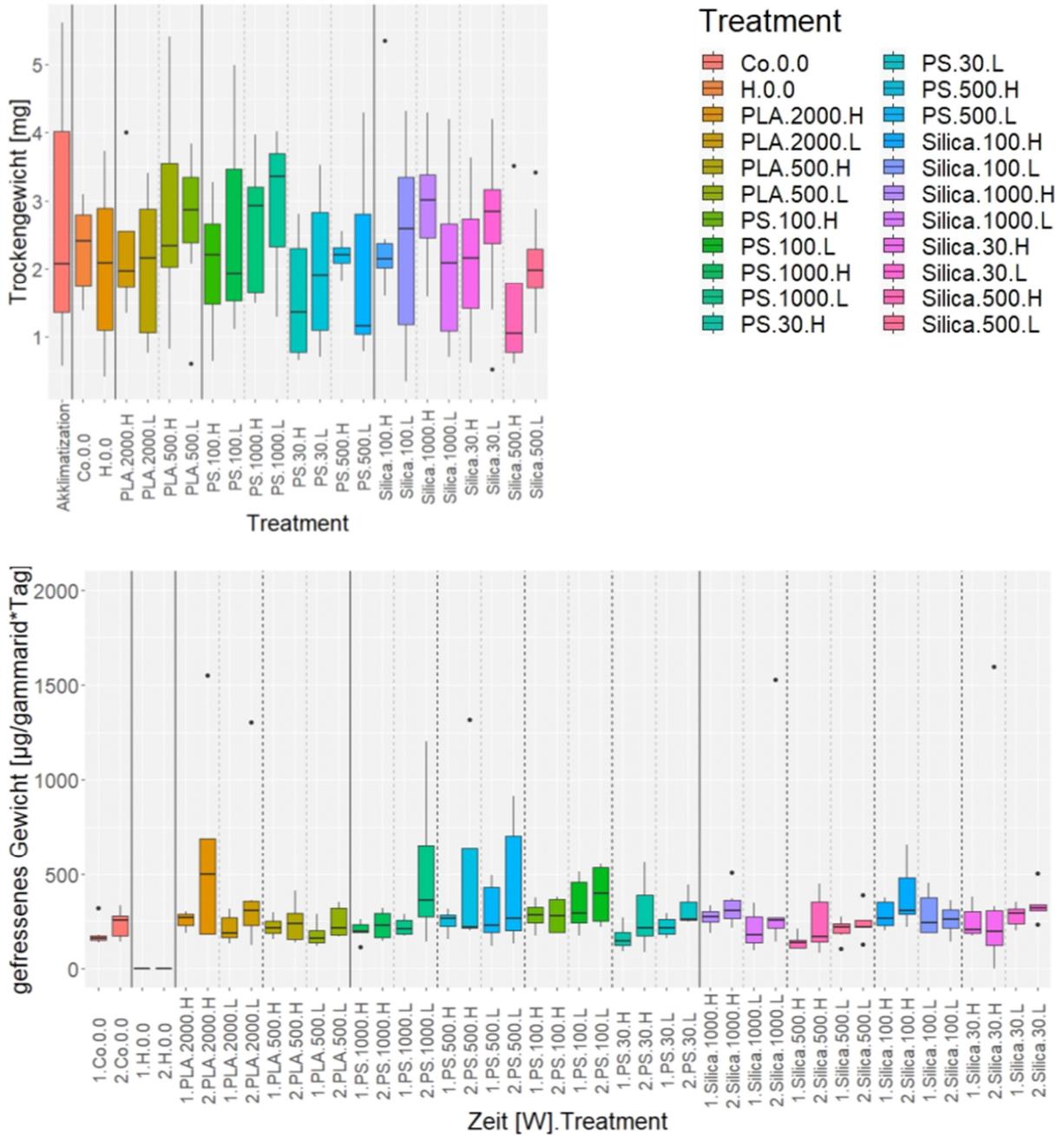


Abbildung 75: Gesammelte Ergebnisse bzgl. Fraß, Gewicht und Speicherstoffe einer zwei wöchigen Exposition von *Gammarus roeseli* mit drei verschiedenen Polymerarten (PLA = Polylactid, PS = Polystyrol und Silica) in verschiedenen Größen 1-2 µm, 500 nm, 100 nm und 30 nm eingebettet in zwei verschiedenen Konzentrationen in den Futtertab (L = Low, H = High). Um eine vergleichbare Partikelmenge zu gewährleisten wurden die Expositionskonzentrationen gemäß Dichte angepasst, dies entspricht Konzentrationen von 4,31 ng PS/mg, 4,19 ng PLA/mg und 8,38 ng silica/mg (L) bzw. 431 ng PS/mg, 419 ng PLA/mg und 838 ng silica/mg (H) bezogen auf Trockenmasse. Es konnte für keinen der betrachteten Endpunkte ein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Auch die zwei unterschiedlichen Konzentrationen lieferten keine Veränderung der Reaktionen.

Einige der Ergebnisse zu den Untersuchungen mit Mikropartikeln wurden zusammen mit einer Schadstoffassoziationsstudie (Bartonitz et al. 2020) [110] sowie der Studie zur Etablierung eines oralen Expositionstools (Götz et al. 2021) [216] veröffentlicht. Eine detaillierte Untersuchung der sphärischen Nanopartikel von 1 µm bis 30 nm mit *Gammarus roeseli* und *Dreissena polymorpha* wird voraussichtlich im dritten Quartal 2021 eingereicht.

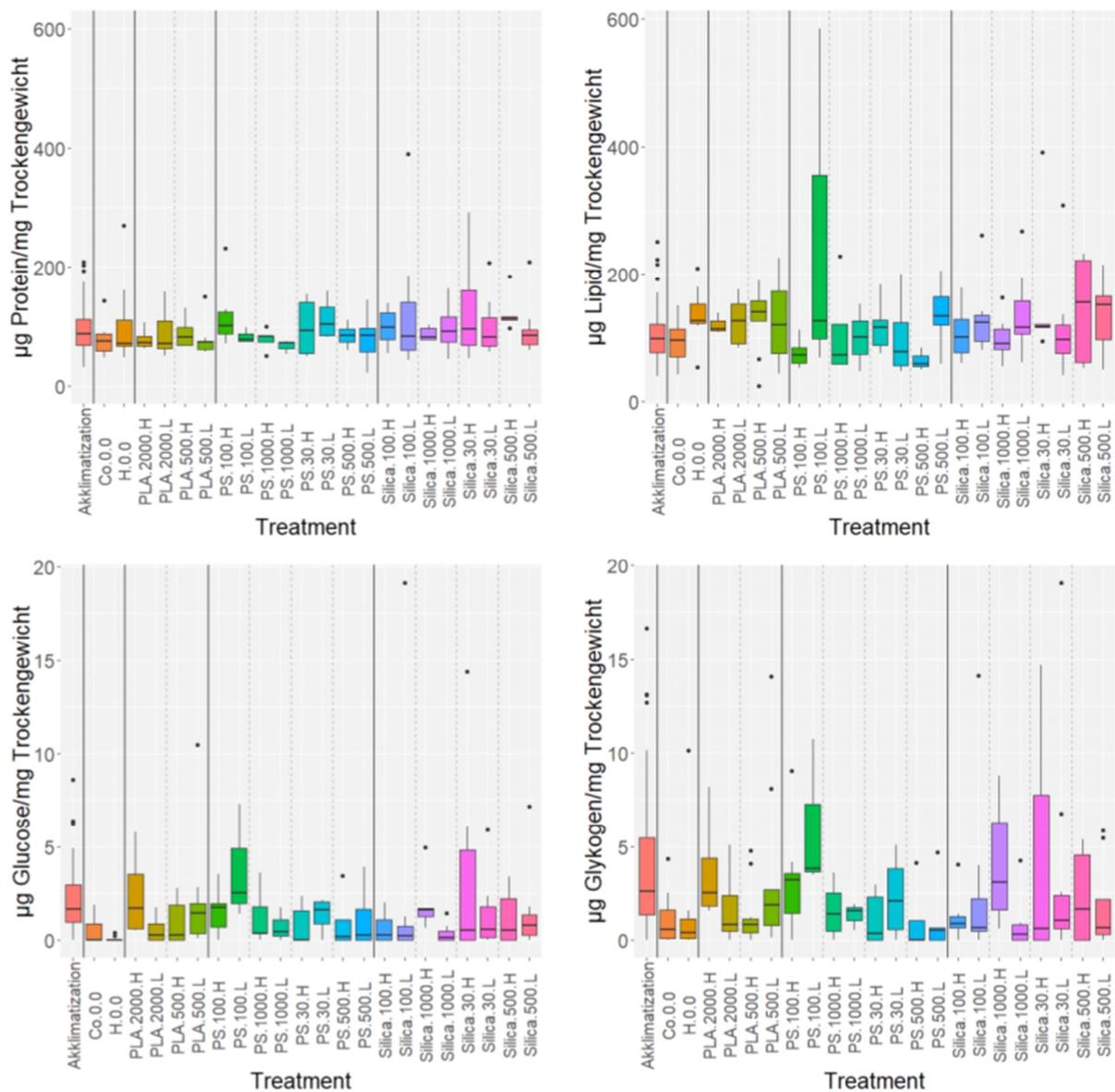


Abbildung 76: Erste Ergebnisse einer zwei wöchigen Exposition von *Dreissena polymorpha* mit drei verschiedenen Polymerarten (PLA = Polylactid, PS = Polystyrol und Silica) in verschiedenen Größen 1-2 µm, 500 nm, 100 nm und 30 nm in zwei verschiedenen Konzentrationen über die Wasserphase. Es konnte für keinen der betrachteten Endpunkte ein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Auch die zwei unterschiedlichen Konzentrationen lieferten keine messbare Veränderung der Reaktionen. Dargestellt sind (oben) die Sterberate und (unten) die Filtrieraktivität in Form der Clearance (Veränderung der Trübung im Wasser durch das Futter).

Definition der Selektivität

Die Ergebnisse der Toxizitätstests lassen auch darauf schließen, dass sowohl *Gammarus roeseli* als auch *Dreissena polymorpha* kein selektierendes Verhalten gegenüber den getesteten Partikelarten, -größen und -formen aufweisen, da keine Veränderung des Fraßverhaltens oder der Filteraktivität in Abhängigkeit der Partikelgröße festgestellt werden konnte. Ausgeschlossen sind hierbei solche Partikel, die durch die Morphologie des Organismus nicht aufgenommen werden können, weil sie zu groß sind.

Toxizitätstests Schadstoffassoziation – Bioverfügbarkeit

Durch die Adsorption von Schadstoffen an partikuläre Fraktionen wurde allgemein ein Vektor-Effekt von Mikro- und Nanoplastik angenommen. Am Beispiel des hydrophoben Schadstoffs Phenanthren (CAS: 85-01-8; Log KOW 4,52) konnte gezeigt werden, dass die Bioverfügbarkeit und somit Toxizität gegenüber Gammariden durch fragmentierte Partikel (Polyamid und Sediment, Größenklasse 45 – 63 µm, 500 µg/L) stark reduziert wird [110]. Dieser Effekt konnte sowohl auf letaler als auch auf subletaler Ebene detektiert werden. Hervorzuheben ist dabei, dass kein Unterschied zwischen den verwendeten Partikelarten nachweisbar war und eine reine Partikeltoxizität über die Exposition in der Wasserphase im Versuchszeitraum nicht festgestellt werden konnte. Somit konnte nachgewiesen werden, dass eine relevante Adsorption an die hier verwendeten PA-Mikropartikel stattfindet, diese sich aber wahrscheinlich nicht von den, in natürlichen Gewässern überwiegenden, natürlichen Sedimentmikropartikeln unterscheidet.

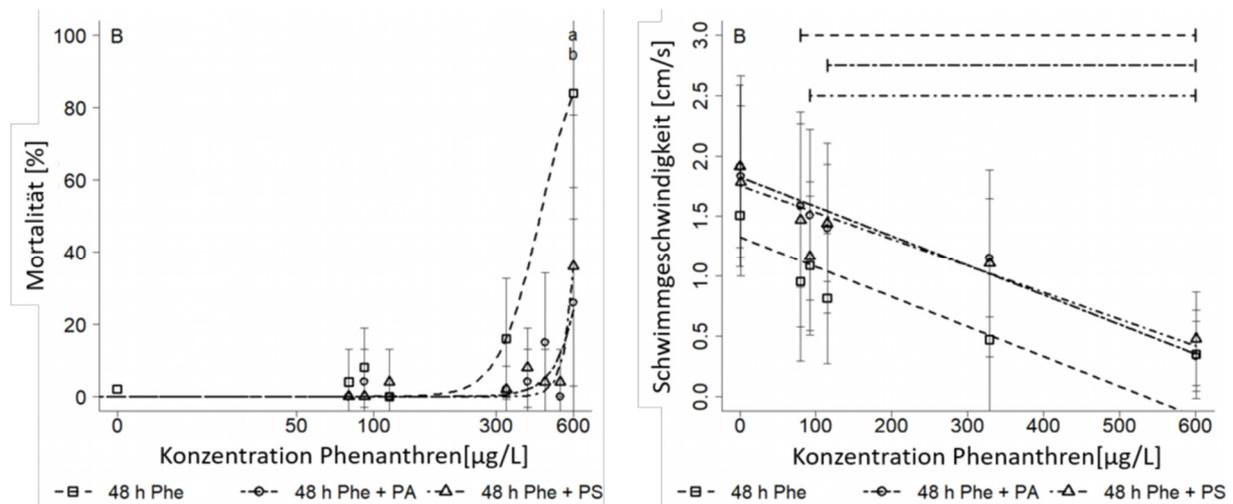


Abbildung 77: Abbildung modifiziert nach Bartonitz et al. (2020): Mittlere Mortalität (Mittelwert \pm Standardabweichung) von *G. roeseli* nach 48h (A) und Schwimmverhalten (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach 48h (B) Phenanthren Exposition ohne sowie in Kombination mit Polyamid (PA) oder Sedimentpartikeln (SP) der Größenfraktion 40-65 μm . Regressionsmodelle der Dosis-Wirkungsbeziehungen sind durch Linien gekennzeichnet. Labels a (Phe), b (Phe + PA) und c (Phe + SP) markieren signifikante Unterschiede zur Lösemittelkontrolle.

Als weitere Modellsubstanz wurde im Berichtszeitraum das Pyrethroid-Insektizid α -Cypermethrin (CAS: 67375-30-8; Log KOW 6,94) untersucht. Für die Effektbewertung wurden neben der Mortalität die subletalen Endpunkte Schwimmverhalten und Fraßrate bei *Gammarus roeseli* bestimmt. Zur Untersuchung der Interaktion mit Polystyrolmikropartikeln (Größenklasse 10-65 μm) wurden eine umweltrelevante Konzentration von 0,18 $\mu\text{g/L}$ und die Maximalkonzentration von 100 $\mu\text{g/L}$ verwendet. Beide Stressoren wurden über die Wasserphase eingesetzt. Die letale Effektkonzentration nach 24 h Exposition zeigte mit einem LC_{50} von 0,020 $\mu\text{g/L}$ eine hohe Sensitivität von *G. roeseli* gegenüber diesem Schadstoff auf. Eine signifikante Änderung der Cypermethrin-Toxizität konnte bei umweltrelevanten Partikelkonzentrationen nicht beobachtet werden. Die Partikeldosierung von 100 $\mu\text{g/L}$ führte zu einer leicht reduzierten Toxizität (24h LC_{50} : 0,026 $\mu\text{g/L}$ α -Cypermethrin), dieser Effekt war jedoch nicht signifikant (Abbildung 78). Eine reine Partikeltoxizität über die Exposition in der Wasserphase konnte anhand keiner der verwendeten Endpunkte festgestellt werden.

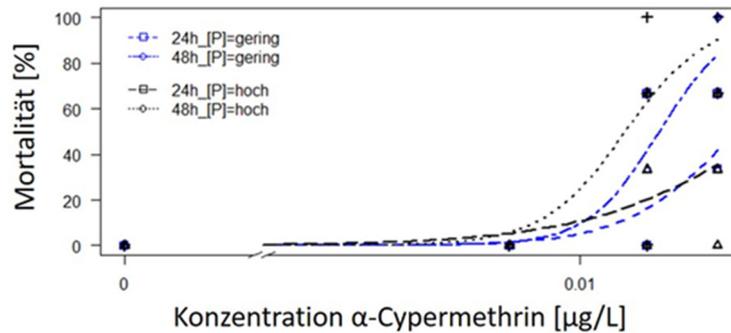


Abbildung 78: Dosis-Wirkungs-Beziehung zur Abhängigkeit der Mortalität [%] zur Konzentration des Insektizids α -Cypermethrin. Blau dargestellt sind die Verläufe bei geringer Partikelkonzentration für 24 h und 48 h. Schwarz dargestellt sind die Verläufe bei hoher Partikelkonzentration für 24 h und 48 h.

Anschließend wurden sphärische Polystyrolpartikel (PS) der Größenklasse 500 nm ebenfalls in Kombination mit α -Cypermethrin getestet. Die eingesetzte Menge der PS-Partikel von 17 ng/mL (Becherglas BG) bzw. 250.000 Partikeln/BG (500 nm, $\varnothing = 0,065 \mu\text{m}^3$; Dichte 1.030 kg/m³) entspricht dem theoretischen Zerfall von ca. 4 sphärischen Mikropartikeln mit einem Durchmesser von 20 μm . Dies liegt im Bereich umweltrelevanter Konzentrationen [217]. Um die gleiche Oberfläche für mögliche Interaktionen zwischen Partikel und Schadstoff bereit zu stellen, wurden 33 ng/mL bzw. 250.000 Partikeln/BG (500 nm, $\varnothing = 0,065 \mu\text{m}^3$; Dichte 2000 kg/m³) der Silica-Nanopartikel eingesetzt.

Alpha-Cypermethrin wurde in einer Verdünnungsreihe Konzentrationen von 1 bis 50 ng/L, sowie einer Kontrolle ohne Schadstoff eingesetzt. Die Untersuchungen wurden (I) mit α -Cyp, (II) mit α -Cyp und PS-Nanopartikeln und (III) mit α -Cyp und Silica-Nanopartikeln durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen bilden damit umweltrelevante Szenarien ab.

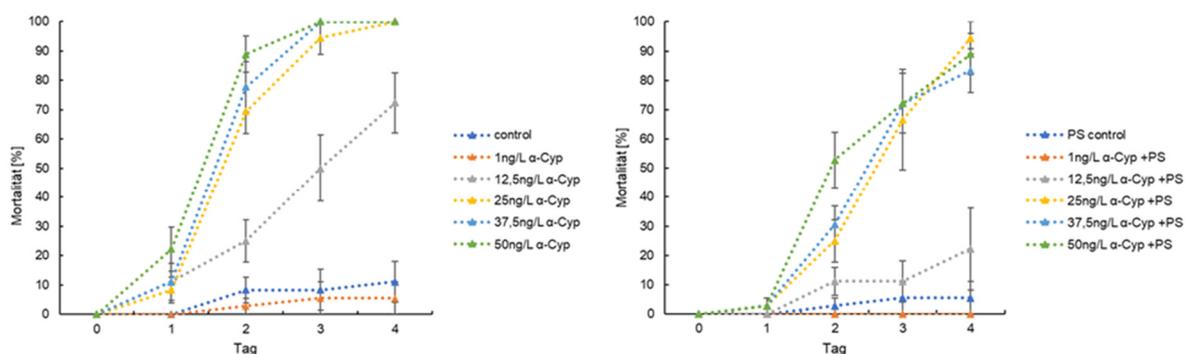


Abbildung 79: Links: Mortalität von *G. roeseli* bei α -Cyp (Tage 0-2) und Recovery ohne Schadstoff (Tage 3-4). Rechts: Mortalität von *G. roeseli* durch α -Cyp in Anwesenheit von PS-Nanopartikeln (Tage 0-2) und Recovery ohne Schadstoff und Nanopartikel (Tage 3-4).

Es konnte gezeigt werden, dass auch α -Cyp an die partikulären Bestandteile im Testsystem bindet und dadurch die Bioverfügbarkeit und somit die toxische Wirkung für *G. roeselii* reduziert (Abbildung 79). Die Toxizität von α -Cyp in Anwesenheit von PS Partikeln zeigte sich weniger reduziert gegenüber einer Exposition von α -Cyp mit Silica-Partikeln, jedoch ohne Signifikanz. Eine analytische Validierung der eingesetzten α -Cyp Effektkonzentrationen steht zum Zeitpunkt der Berichterstellung jedoch noch aus. Wie bereits aus vorausgegangenen Partikelexpositionen zu erwarten zeigt die eingesetzte Dosis PS-Nanopartikel ohne Schadstoff keinen signifikanten Effekt auf die Testorganismen.

Dadurch kann, wie bei der Exposition mit Phenanthren und Partikeln, kein Vektoreffekt durch Schadstoff-assoziierte Partikel in die Organismen belegt werden.

Langzeittests Reproduktion/Artengemeinschaft

Zur Überprüfung der Auswirkung von Plastikpartikeln auf die Reproduktion und somit auch das Fortbestehen einer Spezies wurden weibliche *Gammarus roeselii* zwei verschiedenen Konzentrationen von sphärischen 500 nm Partikeln der Art Polystyrol, Polylactide und Silica als auch den Hormonen 17β -Estradiol ($\geq 98\%$, CAS number: 50-28-2), 17α -Methyltestosteron ($\geq 97.0\%$, CAS number: 85-18-4) und 20-Hydroxyecdysen ($\geq 93\%$, CAS number: 5289-74-7) als Positivkontrolle ausgesetzt.

Tabelle 14: Nanoplastik- und Hormonkonzentrationen

Konzentration	PS (500nm)	PLA (500nm)	Silica (500nm)	17β - Estradiol	17α -Methyl testosteron	20-Hydroxy ecdysen
1) Umweltrelevant	320000 Partikel/L	320000 Partikel /L	320000 Partikel /L	10 ng/L	10 μ g/L	2 μ g/L
2) Erhöht	64000 Partikel /L	64000 Partikel /L	64000 Partikel /L	100 ng/L	100 μ g/L	-

Für jeden Gammariden wurden Überlebensdauer und Körperlänge aufgenommen. Nach jeweils 13 und 23 Tagen wurden biologische Parameter als Indikatoren für verschiedene Stadien des Reproduktionszyklus aufgenommen: Körperfärbung, Augenfärbung, Anzahl der Ovarien, Stadium und Anzahl der Embryonen und die ersten Pteropoden [218]. Zusätzlich wurden das Trockengewicht und die Speicherstoffe aller Gammariden am Ende des Versuchs bestimmt.

Die verschiedenen Partikelsorten haben auch auf die Reproduktion bezüglich Oocyten- oder Embryonenanzahl keinen Effekt, während die Hormone die Embryonenanzahl deutlich veränderten. Gleiches wurde bei der Entwicklung der Embryos beobachtet: Die Partikel beeinflussten diese nicht, während es eine deutliche Verzögerung bei Embryonen gab, deren Mütter unter Hormoneinfluss standen. Die Speicherstoffe wurden im Allgemeinen nicht beeinflusst.

Schlussfolgerungen und Perspektiven

In keinem der Versuche konnten negative Effekte auf eine der beiden untersuchten Arten durch die eingesetzten Plastikpartikel verschiedenster Größen festgestellt werden. Auch gab es keine nachweisbaren Unterschiede in der organismischen Reaktion auf natürliche Partikel im Vergleich zu Plastikpartikeln. Die Erkenntnis, dass jeder Effekt, der durch Plastikpartikel hervorgerufen wird auch mit dem durch natürliche Partikel verglichen werden muss, ist für die weitere Forschung ein wichtiger unverzichtbarer Aspekt. Nur so können partikelspezifische Effekte von plastikspezifischen Effekten unterschieden werden.

Des Weiteren ist auch ein ausbleibender Effekt durch die untersuchten Plastikpartikel Polystyrol, Polylactide und Polyamid ein Hinweis, dass sich der prognostizierte Schaden durch diese Plastik Submikro- und Nanopartikel nicht auf organismischer Ebene auswirkt. Da sich bei den hier vorgestellten Ergebnissen die maximale Expositionsdauer auf ca. 2-3 Wochen beschränkt, ist eine chronische Toxizität für höhere Expositionszeiträume jedoch nicht auszuschließen und sollte weiterführend überprüft werden.

Ein weiterer untersuchter Aspekt war die Vektoreigenschaft von Plastikpartikeln, die mit abnehmender Größe sogar erhöht werden sollte. Während der Projektlaufzeit entwickelte sich auch in anderen Forschungsgruppen die Annahme, dass Plastikpartikel nicht als Vektoren/Carrier fungieren, sondern den Schadstoff nahezu irreversibel binden und nicht an den Organismus abgeben. Diese Annahme konnte auch in diesem Projekt etabliert werden, da die Bioverfügbarkeit der zwei untersuchten Schadstoffe deutlich herabgesetzt wurde, wenn Plastikpartikel mit in der Lösung waren. Dies gilt auch für die natürlichen Referenzpartikel, die sich in der Eigenschaft nicht von den Plastikpartikeln unterscheiden. Dies gilt einschränkend für die untersuchten Schadstoffe mit hydrophober Charakteristik, weshalb hier mit dem

Vorbehalt gearbeitet werden muss, dass hydrophile Schadstoffe ein anderes Adsorptionsverhalten ausweisen und daher andere Ergebnisse hervorrufen könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die generellen Annahmen zu Projektbeginn nicht bestätigt werden konnten. Sortenreine Plastikpartikel im Größenbereich 30 nm bis 60 µm scheinen weder allein noch in Interaktion mit den eingesetzten hydrophoben Schadstoffen eine akut-toxische Wirkung auf die hier verwendeten Testorganismen *Dreissena polymorpha* und *Gammarus roeseli* zu haben, wenn eine umweltrelevante Partikelkonzentration zu Grunde gelegt wird. Allerdings ist durch die Komplexität der möglichen Partikelcharakteristika, ihrer Eigenschaften und Expositionspfade weiterhin großer Forschungsbedarf vorhanden.

Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit - In vitro Modelle und molekulare Effektermittlung

TUM-LTI

Einleitung und Ziele

Ein möglicher und wahrscheinlicher Expositionsweg von Nanoplastik gegenüber Lebewesen ist die orale Aufnahme von Nanoplastik. So ist beispielsweise Nanoplastik bereits in Tee nachgewiesen worden [219], es ist außerdem davon auszugehen, dass bei einem Auftreten von Mikroplastik auch Nanoplastik auftritt. Mikroplastik ist beispielsweise in Salz nachgewiesen worden [220,221]. Da zugleich für verschiedene Partikelarten im Nanometer Bereich, die Aufnahme in verschiedene Zellarten gezeigt wurde [222], ist es notwendig eine mögliche Toxizität von Nanoplastik auf den menschlichen sowie tierischen Organismus zu prüfen, um eine Gefährdung durch Nanoplastik besser beurteilen zu können. Da der Umgang mit Nanoplastik Herausforderungen mit sich bringt, so zum Beispiel die Arbeit mit möglichst partikelfreien Materialien und der Problematik des Nachweises und der Beurteilung von Nanopartikeln, welcher nur mit speziellen Geräten erfolgen kann (beispielsweise dem ZetaView, einem Nano-Partikel-Tracker), wird dabei oft auf Partikel im μm Bereich ausgewichen. Dabei ist zu beachten, dass in den Studien, die (auch) mit Nanopartikeln arbeiten unter anderem festgestellt wurde, dass es starke Differenzen von sowohl Toxizität als auch Aufnahme von verschiedenen Partikeln in Bezug auf gewählte Organismen gibt – hier von Relevanz: in Bezug auf verschiedene Zelllinien gibt [13]. Für die Erfüllung der gewählten Ziele in Arbeitspaket 5, wurde, um das Risiko einer Exposition mit Nanoplastik bestmöglichst zu beurteilen, eine Zelllinie gewählt, die einer „unveränderten“ Dünndarmepithelzelle am nächsten kommt: IPEC-J2 J2 (RRID:CVCL_2246). Es ist davon auszugehen, dass bei einer oralen Exposition von Nanoplastik die stärkste Aufnahme im Dünndarm, erfolgt, da hier im Regelfall auch der größte Teil der Nahrung in den Körper aufgenommen wird. Die Zelllinie IPEC-J2 zeichnet sich dabei vor allem dadurch aus, dass sie als spontan infinite Zelllinie ein besonders gutes Modell für einen nicht tumorös entarteten Dünndarm darstellt. Da es sich um Schweinedarmzellen handelt, ist aufgrund der Ähnlichkeit, auch ein Rückschluss auf den menschlichen Darm, zu großen Teilen, möglich. Eine Aufnahme von Nanoplastik in diese Art der Zellen könnte damit als mögliche Eintrittspforte von Nanoplastik in den Körper dienen. Diese Aufnahme zu bestätigen oder abzulehnen

war dementsprechend das primär gestellte Ziel der Arbeitsgruppe. Gleichzeitig wurde die Toxizität von Nanoplastik auf die genutzte Zelllinie geprüft, um mögliche Einflüsse von Nanoplastik auf die primär exponierten Zellen in dem gewählten Modell, der oralen Aufnahme (Dünndarmepithelzellen), zu beurteilen.

Zur Feststellung, ob eine Aufnahme in die Dünndarmzelllinie vorliegt wurden Konfokalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und ausgewertet. Außerdem wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) das Vorhandensein der Nanopartikel im Zellinneren bestätigt, um auszuschließen, dass die gemessenen Fluoreszenzmikroskopischen Werte aus einer reinen Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoff stammen. Mittels einfacher Fluoreszenzmikroskopie wurde das Aufnahmeverhalten der Partikel weiter beurteilt. Zur toxikologischen Beurteilung wurden zusätzlich Electric Cell Substrate Impedance Sensing (ECIS) Wachstumskurven der behandelten Zellen ausgewertet, als auch Wundheilungsassays durchgeführt. Zusätzlich wurden Next-Generation-Sequencing (NGS) Versuche durchgeführt, zur Beurteilung, ob bestimmte Prozesse in den Zellen unter Behandlung mit Nanoplastik verändert werden. Beurteilt wurde dabei die zelluläre mRNA. Auch wurde mittels Nanopartikeltracking (NTA) eine Quantifizierung von organischen Partikeln unter dem Einfluss von Nanoplastik vorgenommen, um mögliche Auswirkungen auf die Vesikelproduktion der Zelllinie zu beurteilen. Alle Versuche (außer dem bestätigenden Wundheilungsassay) wurden zusätzlich mit Silica-Nanopartikeln als Vergleichsgruppe durchgeführt, um auszuschließen, dass gemessene Effekte von einem rein partikulären Effekt herrühren.

In Kooperation mit TUM-LAS wurde außerdem an einem Assay zum Nachweis von Stress in der Süßwassermuschel *A. anatina* gearbeitet. Ein solcher Assay hätte die Beurteilung von möglichen Stressoren, wie beispielsweise Nanoplastik, erleichtern können.

Zusätzlich wurden, im Rahmen des Projektes, Ergebnisse der Fachöffentlichkeit zur Verfügung gestellt, die sich auf die Bewertung von ECIS-Wachstumskurven im Allgemeinen beziehen und unter anderem ein Softwareskript in der open-source Software R beinhalten. Das Skript wurde dann im weiteren Verlauf, und nach einem Peer-Review Verfahren zu seiner Prüfung, zur Auswertung von ECIS Wachstumskurven mit und ohne Behandlung von Nanopartikeln, verwendet.

Partikel und Materialauswahl

In einem ersten Schritt wurden, in Zusammenarbeit mit den weiteren Arbeitsgruppen, Partikelart, und -größe angepasst, die Versuchsbedingungen wurden festgesetzt, partikelarme Arbeitsmethoden wurden etabliert und partikelarme Arbeitsmaterialien für die entsprechenden Versuche wurden ausgewählt. Dafür wurde, insbesondere im Rahmen der Zellkulturversuche sowie bei Erstellung von Partikelsuspensionen, auf eine Laminar Flow Arbeitsbank zurückgegriffen, um einen Eintrag von Partikeln über die Luft zu reduzieren. Auch wurden vorgemischte, partikelhaltige Suspensionen, die in laufenden Versuchen eingesetzt wurden, in gespülten Glasgefäßen gelagert um ein zusätzliches Herauslösen von Nanoplastik aus Plastikgefäßen zu verhindern. Die zur Lagerung verwendete Laborware wurde in Vorversuchen auf Partikelfreiheit unter der Konzentration von 10.000 Partikeln pro ml (E5 Partikeln) mittels ZetaView geprüft.

Für alle Versuche wurden, nach Rücksprache mit den weiteren Projektpartnern, Polystyrolnanopartikel (PS-NP) beziehungsweise Silicananopartikel (Silica-NP als partikuläre Kontrolle) ab dem Bereich 100nm bis zu 1000nm verwendet. Für berechnete Konzentrationen in Versuchen wurden Messungen, die mittels NTA durchgeführt wurden, herangezogen nicht die Herstellerangaben, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Verwendet wurden dabei BS-Partikel (Projektpartner, insbesondere 100 nm nicht fluoreszierend, Polystyrol (PS). In Vorversuchen wurden auch Tests mit größeren PS Partikeln verwendet)

Zusätzlich wurden Micromod Partikel verwendet (100nm Polystyrol (PS), fluoreszierend und nicht fluoreszierend sowie 100nm Silica Partikel, fluoreszierend und nicht fluoreszierend (als Größen- und Partikelreferenzmaterial))

Für folgende toxikologische Versuche, sowie Partikelaufnahmeversuche wurde entschieden mit Partikeln im Bereich 100 nm zu arbeiten. Für diese Größe an Partikeln ist bereits in der Literatur beschrieben worden, dass eine Behandlung mit diesen Partikeln, aus verschiedenen Materialien, zu einer Aufnahme in Zellen führen kann [223]. Kleinere Partikel hingegen stehen im Verdacht vor allem in die Lipidmembran von Zellen eingelagert zu werden [224,225] so dass hier unter Umständen eher der partikuläre Effekt zu tragen kommt – eventuell abhängig von der Ladung. In älteren Veröffentlichungen wurden kaum materialabhängige Unterschiede in der Aufnahme von Nanopartikeln im Größenbereich 100 nm -200 nm gefunden [226,227]. Um den spezifischen, nicht partikulären Effekt von Nanoplastik besser beurteilen zu können

wurden darum in unseren Versuchen PS-NP im Größenbereich 100 nm beurteilt und mit dem Effekt von Silica-NP in der gleichen Größe verglichen.

Ergebnisse

Aufnahme von PS-NP sowie Silica-NP in IPEC-J2 Zellen

Um zu beurteilen, ob mögliche Reaktionen von IPEC-J2 Zellen, in weiteren Versuchen, tatsächlich darauf basieren, dass PS-NP in die Zelle aufgenommen wurde, musste zuerst die Aufnahme der Partikel geprüft werden. Obgleich bereits nachgewiesen wurde, dass prinzipiell Partikel aus verschiedenem Material in Zellen aufgenommen werden kann, muss dies trotzdem für die hier benutzten spezifische Darmepithelzellen unabhängig festgestellt werden [13,228,229]. Aufnahmeversuche wurden mit einer Konzentration von gerundet $5E+11$ Partikeln pro ml durchgeführt. Die Zellen wurden 5 Stunden auf Objektträgern anwachsen gelassen, die Behandlung fand dann für die 6 folgende Stunden statt. Die Aufnahme zuerst mittels einfacher Fluoreszenzmikroskopie (Leica DMI8) durchgeführt. Anschließend wurde die Aufnahme noch mittels Konfokalmikroskopie (LEICA SP8), für sowohl PS-NP (Abbildung 81 links) als auch Silica-NP (beides: mircomod) nachgewiesen. Für beide Fluoreszenzversuche wurden bewachsene Objektträger mit einer Dapi-Zellkern Färbung untersucht. PS-NP wurden dabei insbesondere um den Zellkern herum angelagert, das optische Bild wurde dabei noch mittels Fluoreszenzstärkemessung (Abbildung 80, Image J, Fiji; [230]) bestätigt. Die Aufnahme der Partikel war dabei nicht in allen Zellen gleich stark. Eine Behandlung der Zellen während verschiedener Wachstumsphasen (mittels Fluoreszenzmikroskopie), gab außerdem Hinweise darauf, dass die Aufnahmestärke über verschiedene Wachstumsphasen möglicherweise variiert. Im Gegensatz dazu wurden die Silica-NP eher verstreut im Zytoplasma der Zellen angelagert.

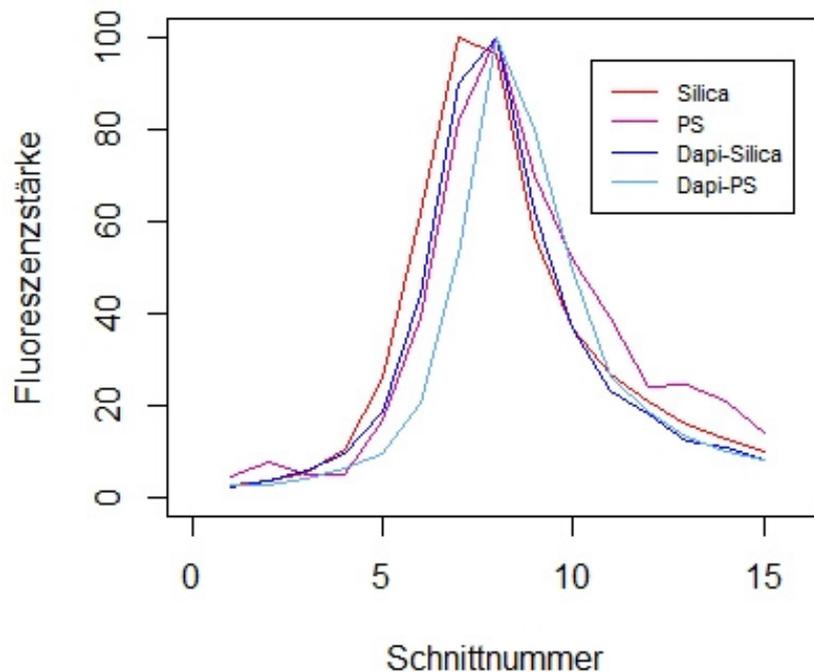


Abbildung 80: Beispiel (n=1) für die Auswertung der Fluoreszenzstärke in einer Reihe von konfokalen, optischen Schnitten (entweder mit dem Treatment „Silica“ oder mit dem Treatment „PS = Polystyrol“). Es wurde jeweils auf den Wert der stärksten Fluoreszenz normalisiert (= 100%). Gleichzeitig wurde dargestellt, wie der Wert der Zellkernfluoreszenz (DAPI) sich über die Schnitte verändert. Wie man sehen kann, ist die Fluoreszenz etwa auf Höhe der Zellkernfärbung am stärksten. Wäre die Fluoreszenz nur auf der Zelle und nicht in der Zelle sichtbar, wäre beispielsweise eine zweigipflige Kurve zu erwarten, weit weg vom Gipfel der DAPI Kurve. Es ist zu beachten, dass das Bild ein aussagekräftiges Beispiel ist, die Werte bei einer größeren Population an Zellen hierdurch im Mittel etwas abweichen können.

Um die Aufnahme der eigentlichen Partikel zu bestätigen und auszuschließen, dass in den Fluoreszenzversuchen die Fluoreszenz unabhängig von den Partikeln gemessen wurde [231], wurden außerdem noch TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) Aufnahmen von trypsinisierten Zellen untersucht (Abbildung 81, rechts). Die Aufnahme der Partikel konnte in den Präparaten bestätigt werden.

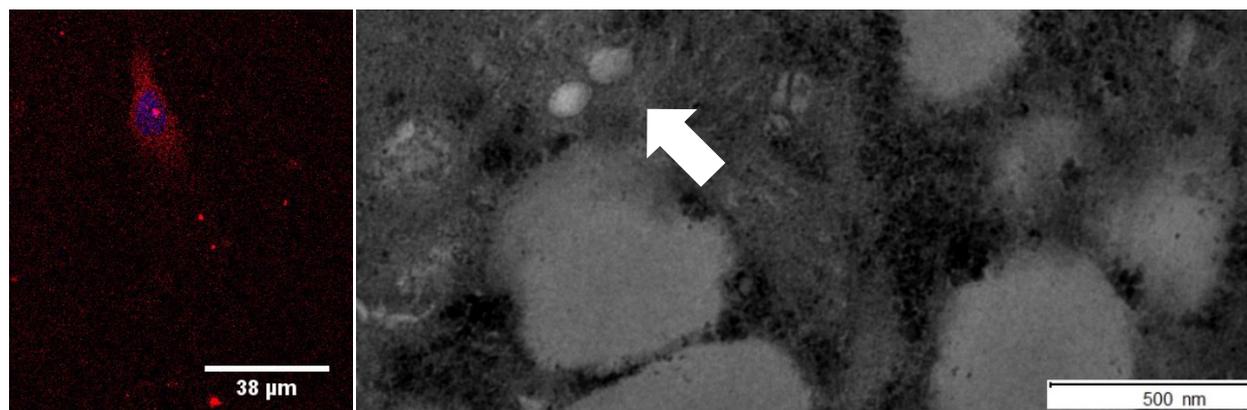


Abbildung 81: Links: Übersicht einer Zelle (Fluoreszenzaufnahme), blau = DAPI (Zellkernfärbung), rot= Nano-PS (Anlagerung der Fluoreszenz um den Zellkern herum), das Zytoplasma ist nicht angefärbt; Rechts: ein Blick in die TEM Aufnahme einer Zelle (Pfeil = 100nm PS Partikel)

ECIS Wachstumskurvenversuche

Die Konfluenz der Zellen wurde anhand ECIS Versuchen beurteilt. Diese wurde mit dem oben genannten R Software Script ausgewertet.

Anhand der Auswertungen wurden unter anderem die Beprobungszeitpunkte für weitere Versuche festgelegt, als auch mögliche Unterschiede im Wachstumsverhalten von PS-NP beziehungsweise Silica-NP im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Es konnten keine direkten Unterschiede zwischen dem Wachstum von PS-NP, Silica-NP und der Kontrollgruppe festgestellt werden, bis zu einer Konzentration von $3E+11$ pro ml. Darüber hinaus (ab etwa $5E+11$ pro ml) wurde festgestellt, dass es nach etwa 20h zu Veränderungen der IPEC-J2 Zellen bei einer Behandlung mit Silica-NP kam. Alle weiteren Versuche wurden darum mit einer Konzentration kleiner $3E+11$ Partikel pro ml durchgeführt, um den PS Effekt mit dem Silica Effekt vergleichen zu können. Die Aufnahmeversuche hingegen wurden mit einer größtmöglichen Konzentration an Partikeln durchgeführt um eine Aufnahme zweifelsohne und auch bei leichter Fluoreszenz nachweisen zu können, darum wurde hier eine Konzentration von $5E+11$ Partikeln pro ml gewählt und die Behandlungszeit auf 6h festgesetzt, so dass etwaige zytopathische Effekte der Silica-NP nicht eintreten konnten. Es erscheint nicht sinnvoll mit Nanoplastik in Konzentrationen zu arbeiten, die größer sind als die Konzentration, die bei der partikulären Kontrolle zytopathische Effekte auslösen. Eine vollständige Auswertung der Daten steht noch aus und wird mithilfe des beschriebenen ECIS R-Skriptes durchgeführt.

Für den Bereich $\sim 5E+9$ Partikel pro ml bzw. $5E+10$ Partikel pro ml (ausschließlich für PS-NP) pro ml wurde außerdem zur Bestätigung ein Wundheilungsassay

durchgeführt, der als ein zusätzliches Verfahren bestätigte, dass in diesem Partikel-Konzentrationsbereich keine messbaren zytopathischen Effekte bei einer PS-NP Behandlung auftraten. Für diesen Versuch wurden Zellen in vorgefertigten Einsätze ausgesät (Ibidi). Nach Entfernung der Einsätze blieb zwischen zwei konfluenten Zellpopulationen ein immer gleichartig großer Spalt zurück. Durch mehrere fotografische Aufnahmen unter dem Mikroskop ließ sich schließlich der Schluss der Zellverbände über die Zeit auswerten. Eine Verzögerung in der Zellteilung in Kombination mit der Zellmigration würde sich dabei in der Schlussrate des zellfreien Spaltes niederschlagen. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungen mit PS-NP feststellen.

Nanopartikeltracking von IPEC-J2 Zellen, behandelt mit PS-NP oder Silica-NP

Extrazelluläre Vesikel (EVs) liegen im Größenbereich 50 nm – 500 nm [232]. Zahlreiche Studien belegen, dass EVs unter anderem der Interaktion von Zellen dienen, wodurch sie für die Wissenschaft auch als Biomarker nutzbar werden [233–235]. Somit bestände die Möglichkeit, bei einer erhöhten Produktion von organischen Nanopartikeln im passenden Größenbereich, unter PS-NP oder Silica-NP Behandlung, eine genauere Qualifizierung der organischen Nanopartikel vorzunehmen, um herauszufinden ob es sich dabei um EVs handelt. Im positiven Falle wäre eine Biomarker Etablierung für Nanopartikel oder Nanoplastik denkbar gewesen. Mittels NTA wurde darum gemessen, ob ein signifikanter Anstieg in der Nanopartikelproduktion zwischen Kontrollgruppe und den beiden behandelten Gruppen (PS, Silica) feststellbar wurde. Vorerst konnte keine signifikante Steigerung festgestellt werden, der Ansatz wurde darum, nach ersten Ergebnissen, nicht weiter verfolgt. Es ist nicht völlig auszuschließen, dass die hohe Anzahl von zugesetzten PS/Silica Nanopartikeln eine etwaige erhöhte Produktion an organischen Nanopartikeln überdeckte, abschließende Analysen stehen noch aus.

Next Generation Sequencing (NGS) Versuche

Um einen besseren Überblick zu bekommen, ob im Rahmen einer Behandlung bestimmte Prozesse in den Zellen hoch oder runterreguliert werden, kann auf Transkriptionsanalysen mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) zurückgegriffen werden. Hierbei werden beispielsweise die transkribierten mRNA Sequenzen von behandelten Zellen mit denen von nicht behandelten Zellen in ihrer Konzentration und

in ihrem Muster verglichen. Wenn eine Regulierung, eine Induktion oder Repression der mRNA Familien, aufgrund der Behandlung stattfand, so lässt sich diese oft mittels einer sogenannten Pathway Analyse auswerten und zu bestimmten zellulären und metabolischen Regelkreisen zuordnen.

Mit IPEC-J2 Zellen wurde ein NGS Versuch in Triplikaten mit einer Konzentration von gerundet $5E+10$ pro ml (PS-NP sowie Silica-NP) durchgeführt. Wobei sich die Zellen 5 Stunden absetzen und anwachsen konnten. Danach wurde im Rahmen eines Mediumwechsels die Behandlung mit Silica oder PS gestartet. Die Vergleiche der mRNA Sequenzen fanden dann über drei verschiedene Zeitpunkte nach der Behandlung (Punkt 1 nach einer Stunde, Punkt 2 nach 31 Stunden, Punkt 3 nach 55 Stunden) sowie über die verschiedenen Behandlungsarten (PS-NP, Silica-NP, Kontrolle) statt. Die optimalen Beprobungszeitpunkte wurden in Abhängigkeit von ECIS-Wachstumskurven gewählt, Punkt 2 entspricht in etwa dem Punkt des stärksten Wachstums (Maximum der 1. Ableitung), an Punkt 3 besteht bereits eine 100% Konfluenz. Der gesamte Versuchsansatz wurde dreimal unabhängig wiederholt, beprobt und quantifiziert.

Die Auswertung der mRNA Expressionsprofile und auch die Pathway Analyse erfolgten mithilfe von etablierten R Software Paketen (unter anderem DESeq2 Package [236] sowie einem hausintern etablierten R-Skript). Die Zuordnungen der signifikant regulierten mRNAs zu den entsprechenden Pathways erfolgten schließlich über reactome (<https://reactome.org/>). Das holistische Sequenzieren aller mRNAs bietet die Möglichkeit einen genauen Überblick über die akuten zellulären und metabolischen Vorgänge in einer Zelle bzw. des Gewebes vor und nach der Behandlung zu bekommen.

Der gefundene größte Einfluss auf die Änderung der mRNA Expression war der Zeiteffekt (1. vs. 2. vs. 3. Zeitpunkt). Der zweitgrößte Effekt war der batch Effekt, insbesondere, da die Zellen, entsprechend der guten wissenschaftlichen Praxis, an verschiedenen Tagen gesät wurden. Dies hatte auch einen großen Einfluss auf das Zellwachstum. Die Behandlung durch PS-NP oder Silica-NP hatte nur minore Einflüsse auf die Genexpression. Da der Wachstumseffekt im Vergleich zu dem Effekt der Behandlung mit Plastik/Silica sehr viel größer war, musste zur Auswertung ein Verfahren gewählt werden, bei dem die (auf den batch Effekt normalisierten) mRNA Sequenzen pro Treatment jeweils auf den Zeitpunkt der ersten Beprobung

abgeglichen wurden. Die übrig gebliebenen regulierten mRNAs wurden schließlich in Gruppen unterteilt, die nur in den Silica bzw PS Behandlungen vorhanden waren oder aber in beiden (=partikulärer Effekt). Es konnten pro Beprobung im Mittel ~170 signifikant regulierte, spezifische mRNAs ($p < 0.05$) pro Behandlung identifiziert werden. Die gewonnenen mRNA Sequenzen wurden in die genannte Pathway Analyse Tools eingelesen und die relevanten Regelkreise konnten identifiziert und miteinander verglichen werden. Die daraus gewonnenen Schlussfolgerungen sind vorsichtig zu betrachten, da beachtet werden muss, dass alle Effekte von über,- oder unter-exprimierten mRNA Sequenzen wesentlich schwächer waren, als der Effekt des reinen Wachstums der Zellen. Eine vollständige statistische Auswertung der Genexpressionmuster und der zugrundeliegenden Regelkreise steht wegen ihrer Komplexität noch aus. Finale und wissenschaftliche tragbare Resultate werden im Herbst 2021 erstellt.

Etablierung eines möglichen Assays zum Nachweis von externem Stress bei Süßwassermuscheln (*A. anatina*) in Zusammenarbeit mit TUM-LAS

Es konnte aus diesem Ansatz kein Biomarker etabliert werden, der plastikspezifischen Stress nachweisen konnten, gleichzeitig ließen sich einige grundlegende Feststellung zur Biodistribution von Cortisol in Süßwassermuscheln (*A. anatina*) machen, dementsprechend wurden die Daten der (Fach)Öffentlichkeit in Form eines Papers zur Verfügung gestellt.

Der open access Artikel ist nachzulesen: 2019, Binder et al., *Does environmental stress affect cortisol biodistribution in freshwater mussels?*, *Conserv Physiol*, doi: 10.1093/conphys/coz101 [237].

Etablierung eines R-software Scriptes zur Auswertung von Electric Cell Substrate Impedance Sensing (ECIS)-Wachstumskurven

Mittels der sogenannten Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing (ECIS) Technologie ist es möglich das Wachstum von Zellen zu messen. Mittels Impedanzmessung werden dabei kleinste Veränderungen im Zell-Zell Verband registriert (beispielsweise Wachstumsverhalten der Zellen, zytopathische Effekte, oder ähnliches). Dafür werden die Zellen in spezielle Zellkulturgefäße mit eingelassenen Goldelektroden ausgesät und werden dann – anders als bei einigen herkömmlichen

Verfahren – weder durch eine ständige Bewegung der Zellkulturschale noch anderweitig in ihrem Wachstum beeinflusst.

ECIS Wachstumskurven wurden im weiteren Verlauf verwendet um den Zeitpunkt der Beprobung der behandelten Zellen festzulegen. Mithilfe eines von uns etablierten Skriptes wurde es außerdem möglich die Wachstumskurven objektiv miteinander zu vergleichen und das Wachstum von behandelten Zellen besser zu beurteilen [238].

Schlussfolgerungen

Es ergaben sich weder in den Wachstumsversuchen (mittels ECIS) noch in den Wundheilungs-Assays Hinweise darauf, dass PS-NP eine größere akute Zytotoxizität aufweisen als die Silica-NP. Im Gegensatz dazu, wiesen Darmepithelzellen in vitro (Schweine IPEC-J2 Zellen), die mit Silica-NP behandelt wurden in den ECIS Versuchen sogar, ab einer Konzentration von etwa $5E+11$ pro ml, zytopathische Effekte auf, diejenigen, die mit PS-NP behandelt wurden, nicht. Auch bei der Produktion von möglichen extrazellulären Vesikeln konnten vorerst keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen festgestellt werden.

Alle Auswertungen aus den Next Generation Sequencing Versuchen sind bis dato sehr vorsichtig zu betrachten, da alle Partikel-induzierten Effekte deutlich schwächer waren als die Einflüsse bedingt durch Zellwachstumsphasen. Eine vollständige statistische Analyse steht, wie beschrieben, noch aus.

Da bei den PS-NP, trotz der fehlenden zytopathischen Effekte, eine Aufnahme in die Zellen festgestellt wurde, sind von Seiten des AP-5 mögliche Gesundheitsrisiken nicht vollständig auszuschließen. Insbesondere da nur ein einziger Plastiktyp, in einer einzigen Größe getestet wurde. Außerdem sollte in anschließenden Projekten abgeklärt werden, wie sich die langfristigen Wirkungen von aufgenommenem PS-NP auf Zellen darstellt. Dabei sollte im Weiteren auf eine mögliche Abgabe der vorher aufgenommenen PS-NP aus den Zellen, einer möglichen Akkumulationen im dahinterstehenden Organismus, sowie möglicher Eliminationswege aus den Zellen und dem Organismus eingegangen werden.

AP 6: Soziale, politische und rechtliche Dimensionen

TUM-MCTS & UBA

AP 6 war in drei Unterprojekte gegliedert: AP6.1. (TUM-MCTS) fokussiert auf die Analyse der sozialen und politischen Dimensionen der Problemstellung (Sub)Mikroplastik in der Umwelt. AP6.2. (UBA) untersucht parallel die rechtlichen und regulatorischen Dimensionen und im AP6.3 (UBA) wurden Normungsaspekte im Bereich Mikroplastik beobachtet und aktiv begleitet.

Soziale und politische Dimensionen

TUM-MCTS

Einleitung

Der Eintrag von Mikroplastik in die Umwelt wurde gegenwärtig zunehmend als gesellschaftliche und politische Herausforderung erkannt. Bis zu Projektbeginn gab es allerdings kaum Analysen zur gesellschaftlichen Problemwahrnehmung sowie nur wenig Dialog zwischen relevanten Stakeholdern zur Frage, wie der Plastik- und (Sub)Mikroplastikeintrag in die Umwelt verringert werden kann. Für Deutschland gab es zu Projektbeginn keine relevanten Studien dazu, wie verschiedene gesellschaftliche Stakeholder – wie etwa Wissenschaftler*innen, die Medien oder zivilgesellschaftliche Akteur*innen – das Problem wahrnehmen und wie sie Lösungswege imaginieren. Solche gesellschaftlichen Dimensionen sind allerdings zentral für die Entwicklung und Implementierung von sozialen und technischen Innovationen zur Problemlösung. Deshalb wurde es als notwendig erachtet, diese gesellschaftlichen Dimensionen durch einen interdisziplinären Ansatz parallel zur naturwissenschaftlichen Problembestimmung zu erforschen. Dadurch werden im Sinne eines „Responsible Research and Innovation“ (RRI) Ansatzes gesellschaftliche Aspekte nicht nachgelagert betrachtet, sondern in den Prozess der Problembestimmung selbst eingebracht.

Ziele

Mittels sozialwissenschaftlicher Methoden werden sowohl das Problemverständnis also auch Visionen für Lösungsansätze unterschiedlicher Stakeholder in Bezug auf das Thema (Submikro)Plastikpartikel in der Umwelt empirisch erhoben. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf Stakeholdern in der Wissenschaft, im Bereich

NGOs und zivilgesellschaftlicher Aktivismus sowie in den Medien in Deutschland. Mittels partizipativer Methoden des „Public Engagements“ werden darüber hinaus unterschiedliche Stakeholder miteinander in den Dialog gesetzt. Dadurch soll proaktiv zur Entwicklung von belastbaren Analysen und Formaten für gesellschaftliche Veränderungsprozesse beigetragen werden.

Planung und Durchführung

Die Untersuchung der sozialen und politischen Dimensionen von Plastik und Mikroplastik in der Umwelt, wurde am Munich Center for Technology in Society (MCTS), TU München durchgeführt. Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurde zeitgleich ein Querschnittsthema gegründet, QST4, welches sich konsortiumsübergreifend mit den sozialen, politischen und rechtlichen Dimensionen von Plastik in der Umwelt befasst hatte. Prof. Dr. Ruth Müller war hier die Initiatorin und in Kollaboration mit Dr. Thomas Decker, Stadt Straubing, als Kümmerin im Einsatz. Am MCTS fanden in der Folge 3 Workshops zur Vernetzung und zum bilateralen Austausch mit den anderen gesellschaftswissenschaftlichen Projektpartner*innen statt. Im April 2020 erschien ein erstes Positionspapier, in dem vor allem auf die gesellschaftswissenschaftlichen Problematisierungen von Plastik in der Umwelt aufmerksam gemacht wurde. Ein zweites Positionspapier soll noch Mitte 2021 veröffentlicht werden. Dieses wird sich konkret mit Handlungsoptionen und Lösungsmöglichkeiten beschäftigen.

Analyse medialer Berichterstattung (AP 6.1.1)

Im ersten Arbeitspaket wurde eine qualitative Medienanalyse in sieben deutschen Tages- und Wochenzeitschriften durchgeführt. Die Datensammlung erstreckte sich auf die gesamte Zeit der Mikroplastikdarstellung, angefangen mit der ersten Erwähnung von Mikroplastik in 2004 bis zum Ende der Datensammlung, Mai 2018. Die für die Sammlung verwendeten Suchbegriffe umfassten folgende Schlagworte: Mikroplastik, Plastikpartikel, Mikroartikel, Plastik Pellet, Plastikfaser, synthetische Faser, Microbead, Mikromüll, Mikrogranulat oder Mikroperle. Die Datensammlung und die nachfolgende Analyse erfolgte mittels eines Grounded Theory Ansatzes und mithilfe des Computerprogramms atlas.ti. Im Rahmen der Datensammlung konnten wir in dem oben genannten Zeitraum mehr als 410 Artikel identifizieren, die sich thematisch mit dem Eintrag von Mikroplastik in die Umwelt beschäftigten. 195 dieser 410 Artikel wiesen einen ausschließlichen Fokus auf die möglichen Effekte des Eintrags von

Mikroplastik in die Umwelt auf. Dieser Datensatz wurde im nachfolgenden Projektzeitraum kontinuierlich erweitert. Zusätzlich wurden offizielle Bekanntmachungen der deutschen Presseagentur (dpa) mit in das Datenmaterial aufgenommen.

Analyse zivilgesellschaftlicher und politischer Initiativen (AP 6.1.2)

Im zweiten Arbeitspaket lag der Fokus auf einer Analyse von zivilgesellschaftlichen Akteur*innen und NGOs, die (Sub)Mikroplastik adressieren. Des Weiteren fand die Datensammlung über den gesamten Zeitraum des Projektes statt und wurde kontinuierlich erweitert.

Im Rahmen der Datensammlung wurden zwölf qualitativ sozialwissenschaftliche Interviews mit öffentlichen Vertreter*innen eines plastikfreien bzw. „Zero Waste“ Lebensstils aus Deutschland durchgeführt. Die Interviews dauerten zwischen 50 und 90 Minuten und wurden entweder telefonisch oder an einem öffentlichen Ort durchgeführt (z. B. Kaffeehaus). Die Interviews wurden anschließend mit dem Programm F4 transkribiert und sicher auf dem Universitätsserver gespeichert. Die Interviews waren biographisch angelegt und beschäftigten sich zuerst mit den ersten Schritten, die in Richtung eines plastikfreien bzw. müllfreien Lebens unternommen wurden; in einem zweiten Teil fokussierten die Interviews auf die Veränderungen, die im Alltag erlebt und eingeführt wurden; und schließlich wurde im dritten Teil noch einmal über die sozialen, politischen und ökonomischen Dimensionen sowie die gesellschaftlichen Verantwortungszuschreibungen von Plastik in der Umwelt gemeinsam mit den Interviewten reflektiert. Alle interviewten Personen waren weiblich und hatten Kinder. Während diese Gegebenheit kein Auswahlkriterium darstellte, ist es wichtig festzuhalten, dass der öffentliche Diskurs in Deutschland, der sich mit einem plastikfreien Leben beschäftigt, sehr homogen und vor allem weiblich dominiert ist.

Als zusätzliche Datensammlung wurden sieben Vorträge, so genannte „TED-Talks“, von öffentlich bekannten Zero Waste Aktivist*innen transkribiert und in die anschließende Analyse miteinbezogen. Des Weiteren wurden 9 qualitativ sozialwissenschaftliche Interviews mit Vertreter*innen von Nicht-Regierungsorganisationen (NGO) durchgeführt. Auch diese Interviews dauerten zwischen 50 und 90 Minuten und wurden entweder telefonisch oder vor Ort am MCTS durchgeführt. Ebenso wie die vorherigen Interviews wurden diese anschließend mit dem Programm F4 transkribiert und sicher auf dem

Universitätsserver des LRZ gespeichert. Die Expert*inneninterviews orientierten sich zunächst am professionellen Werdegang der interviewten Personen und ihrem professionellen Eintritt in die jeweilige Organisation. In den darauffolgenden Teilen wurde auf die jeweilige Ausrichtung der NGO eingegangen und abschließend über die sozialen, politischen und ökonomischen Dimensionen von Plastik und Mikroplastik in der Umwelt gemeinsam reflektiert.

Öffentliche Gruppendiskussionen (AP 6.1.3)

Um Perspektiven von Bürger*innen in die Analyse miteinzubeziehen, haben wir im Rahmen einer öffentlichen Veranstaltung Gruppendiskussionen mit interessierten Bürger*innen durchgeführt. Diese Veranstaltung war auch ein Begegnungsraum für Wissenschaftler*innen und Bürger*innen, um gemeinsam über (Sub)Mikroplastik in der Umwelt zu diskutieren. Konkret fanden die Gruppendiskussionen im Rahmen der Veranstaltung „Mikroplastik: ersetzbar aber unzersetzbar“, die wir in Kooperation mit Acatech organisiert haben, an der Bayrischen Akademie der Wissenschaften im Januar 2020 statt. Die Gruppendiskussionen umfassten jeweils fünf bis acht Bürger*innen sowie eine/n Wissenschaftler*in, die die Diskussion angeleitet hat, und dauerten durchschnittlich 20-25 Minuten. Sie fanden im Anschluss an Eingangsvorträge von Sozial- und Naturwissenschaftler*innen zum gegenwärtigen Wissensstand zu Plastik in der Umwelt statt. Die Ergebnisse der Diskussionen in den einzelnen Gruppen wurden anschließend im Plenum vorgestellt und diskutiert. Alle Teilnehmer*innen stimmten der Audioaufnahme der Diskussionen und der anschließenden Transkription und Datenspeicherung zu. Die Daten wurden ebenso wie die Interviews transkribiert und sicher auf dem LRZ Server gespeichert.

Begleitung und Analyse eines Multi-Stakeholder-Workshops des Forschungsverbunds (AP 6.1.4)

Da der Stakeholder-Workshop in der angedachten Form nicht stattgefunden hat, wurde die Begleitung und Analyse nicht durchgeführt. Stattdessen wurde ein zusätzliches Arbeitspaket durchgeführt: AP 6.1.4.1. Analyse wissenschaftlicher Interpretationen von Mikroplastik. Dieses wird im folgenden Absatz kurz skizziert.

Analyse wissenschaftlicher Interpretationen von Mikroplastik (AP 6.1.4.1)

Im Zuge der Datensammlung und -analysen der vorherigen Arbeitspakete wurde deutlich, dass Wissenschaftler*innen eine zentrale Rolle im öffentlichen Diskurs um Mikroplastik spielen. Daher wurde eine Reihe von Interviews mit Wissenschaftler*innen im Arbeitsbereich Mikroplastik anberaumt, die ihre Wahrnehmung des Problems sowie ihre Wahrnehmung des öffentlichen Diskurses erheben sollten.

Für die Datensammlung haben wir 15 qualitative sozialwissenschaftliche Interviews mit Wissenschaftler*innen aus unterschiedlichen Konsortien der Förderinitiative „Plastik in der Umwelt“ durchgeführt. Die Interviews dauerten zwischen 60 und 90 Minuten und wurden entweder telefonisch oder vor Ort durchgeführt. Die Interviews wurden anschließend mit dem Programm F4 transkribiert und sicher auf dem Universitätsserver des LRZ gespeichert. In diesen Expert*innen-Interviews wurde der professionelle Werdegang der Wissenschaftler*innen, der sie zur Arbeit mit Mikroplastik geführt hat, diskutiert, ihre aktuelle Forschung sowie ihre Wahrnehmung der gesellschaftlichen Dimensionen und des gesellschaftlichen Diskurses um Mikroplastik in der Umwelt.

Ergebnisse und Diskussion

Analyse medialer Berichterstattung (AP 6.1.1)

Unsere Analyseergebnisse lassen sich in zwei Hauptdimensionen gliedern: Risikointerpretation (1) und Übertragung von Verantwortung (2).

(1) Die Berichterstattung hinsichtlich eines potentiellen Risikos durch den Eintrag von Mikroplastik in die Umwelt, z.B. als Gesundheits- oder Umweltgefahr, lässt sich in drei Phasen teilen. In der ersten Phase zwischen 2004 und 2010 war die Berichterstattung neutral, das heißt nicht notwendigerweise mit einer konkret benannten Auswirkung verbunden. In der zweiten Phase der Berichterstattung, 2010 bis 2015, wurde Mikroplastik vermehrt mit möglichen vor allem für den Menschen gesundheitsrelevanten Risiken in Zusammenhang gebracht. In der dritten Phase ab 2015 wurde das Risiko schließlich sowohl attestiert wie auch kontestiert, je nach Einschätzung der in den Medienartikeln miteinbezogenen Gruppen. Abschließend zur Risikodimension ist es wichtig zu erwähnen, dass eine frühe Attestierung eines Mikroplastik-Risikos stattfand, trotz geringem damaligen wissenschaftlichem Forschungsstand zu den Umwelt- und Gesundheitsgefahren von Mikroplastik. Hier stellt sich in weiterer Folge konkret die Frage nach der Verantwortung der Medien in

Bezug auf die Darstellung von Forschungsergebnissen. Wie sollen die Medien z. B. mit unklaren wissenschaftlichen Daten umgehen und wer soll in den medialen Diskurs miteinbezogen werden? Zudem war die Interpretation des so genannten Mikroplastik-Risikos variabel und abhängig von den miteinbezogenen gesellschaftlichen Stakeholdern. Die Auslegung des Risikos reichte daher von einem als bedrohlich eingestuft bis zu einem für die menschliche Gesundheit und die Umwelt vernachlässigbaren Risiko.

(2) Entlang der drei Phasen der Berichterstattung konnten wir eine stetig wachsende Verantwortungszuschreibung an Konsument*innen für die Vermeidung eines Eintrags von Mikroplastik in die Umwelt beobachten. Gleichzeitig wurden die Politik in geringerem Ausmaß und die Industrie kaum als verantwortliche gesellschaftliche Stakeholder benannt. Der mediale Diskurs zielt also primär auf eine Individualisierung von Verantwortung ab und rückt kollektive Verantwortungsdimensionen in den Hintergrund. Anzumerken ist, dass der Eintrag von Mikroplastik in die Umwelt nur in geringem Maße von individuellen Bürger*innen in ihrer Rolle als Konsument*innen beeinflusst werden kann: Dieses Ziel könnte wesentlich effektiver durch politische Regulation und industrielle Wandlungsprozesse erreicht werden. Bürger*innen werden hier mit einer Verantwortung überladen, die sie nicht erfüllen können. Dies kann zu Handlungsverdruss in Bezug auf Umweltthemen führen.

Ein erster Artikel zu den Ergebnissen dieser Medienanalyse wurde im wissenschaftlichen Journal mit Expert*innenbegutachtung *Science Communication* publiziert [239]. Nachfolgende Projekte könnten die Ergebnisse der Analyse der Mediendiskussion in Deutschland mit Daten aus anderen Ländern vergleichen, bzw. auch stärker den Diskurs in regionalen Medien einbeziehen.

Analyse zivilgesellschaftlicher und politischer Initiativen (AP 6.1.2)

Die qualitative Analyse der Interviews mit Zero Waste Aktivist*innen und Vertreter*innen von NGOs fokussierte auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Problembeschreibungen und Lösungsvorstellungen der beiden Gruppen:

Beide Gruppen betonten, dass es eine größere Aufmerksamkeit für Plastik in der Umwelt als ökologisches wie gesellschaftliches Problem braucht. Für Zero Waste Aktivist*innen stehen dabei Konsum und Konsument:innen als wichtiges Vehikel für die Generierung öffentlicher Aufmerksamkeit im Mittelpunkt. Hier wird vor allem auf einen individuellen

Lösungsweg abgezielt, auch wenn politische Arbeit und politisches Engagement in Einzelfällen vorkommt. Im gesellschaftlichen Plastikvermeidungsdiskurs wird zudem die Verantwortung für Plastikvermeidung mehrheitlich Frauen zugeteilt, die aufgrund normativer gesellschaftlicher Erwartungen vermehrt in Nachhaltigkeits- und Fürsorgearbeit eingebunden sind. Dabei ist der Einstieg von Zero Waste Aktivist*innen in ein plastikfreies Leben oft eng mit der eigenen Biographie und der Sorge um den Nachwuchs verflochten. Allerdings muss diese individuelle Verantwortungsübernahme auch im Kontext anderer Einflussfaktoren, wie z. B. einer passiven Haltung der deutschen Industrie hinsichtlich der freiwilligen Selbstverpflichtung zur Plastikvermeidung, betrachtet werden.

Im Gegensatz zu diesem individuell-konsumorientierten Ansatz von Zero Waste Aktivist*innen setzen NGOs den Schwerpunkt auf politische und teilweise auch wirtschaftliche Veränderungen als Lösungsvorstellung zur Plastikvermeidung. Die konkrete thematische Schwerpunktsetzung ist dabei im Kontext der jeweiligen NGO zu sehen.

Auf der Basis dieser Analysen ist es essentiell, über den gesellschaftlichen Diskurs von Plastik in der Umwelt als vornehmlich konsumorientierten Diskurs mit individualisierter Verantwortungsverteilung und starker Geschlechterdimension zu reflektieren. Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass eine derartige Überladung von Bürger*innen mit Verantwortung einer potentiellen Handlungsbereitschaft im Weg stehen kann. Gleichzeitig kann eine Ausblendung sozio-ökonomischer Realitäten negative Auswirkungen auf die soziale Kohäsion und Partizipation haben. Der Diskurs um die Handhabung von Mikroplastik muss sich also von einem individualisierten zu einem ressourcenorientierten, kollektiven Diskurs ändern, um eine breit gefächerte Verantwortungsverteilung sicherzustellen, und dabei synergistisch mit Fragen sozialer Gerechtigkeit und politischer Faktoren des Plastikkonsums gedacht werden: Wer kann sich ein (mikro)plastikfreies Leben leisten? Welche Ressourcen braucht es für ein (mikro)plastikfreies Leben? Wer soll nachhaltige Fürsorgearbeit leisten? Welche Fragen der sozialen Gerechtigkeit bleiben unbesprochen (z. B. internationale Verteilung von Plastik/Mikroplastik)?

Die Ergebnisse dieser und weitergehender Analysen sind Gegenstand von geplanten und bereits veröffentlichten Artikeln und Kommentaren (siehe unten).

Analyse wissenschaftlicher Interpretationen von Mikroplastik (AP 6.1.4.1)

In der anschließenden Datenanalyse wurde vor allem das schwierige Verhältnis zwischen Wissenschaft und den Medien deutlich. Während eine erhöhte mediale Aufmerksamkeit zwar den Vorteil bringt z. B. besser Forschungsgelder beantragen zu können, wurde ebenso deutlich, dass die medial verstärkte Darstellung eines möglichen Mikroplastikrisikos Forschungsergebnisse potentiell verzerrt. Durch diese verzerrte Darstellung wissenschaftlichen Wissens, z. B. eine übermäßige Betonung des Risikos für die menschliche Gesundheit, kann sich die weitere Kommunikation zwischen Wissenschaftler*innen und Medienvertreter*innen oft schwierig gestalten. Dies spiegeln Ergebnisse der Medienanalyse wider, in welcher wir unter anderem den medialen Hype um Mikroplastik thematisieren. Ein Hype um ein potentielles und nicht notwendigerweise wissenschaftlich bestätigtes Risiko kann zu einer Unterwanderung der wissenschaftlichen Glaubwürdigkeit von Wissenschaften führen. Um hier einen konstruktiven Dialog zu ermöglichen, muss die Beziehung der Wissenschaft zu den Medien und vor allem die Verantwortung der Medien in der Berichterstattung über Risiko stärker thematisiert und kritisch reflektiert werden.

Die weitere Datenanalyse dieser Datensammlung befindet sich noch in Arbeit.

Schlussfolgerungen und Perspektiven

Analyse der medialen Berichterstattung in Deutschland (1):

Die Einschätzung des Risikos in der medialen Berichterstattung in Deutschland zeigt einen großen interpretativen Spielraum abhängig von der Einbindung unterschiedlicher Akteur*innen (z.B. Wissenschaftler*innen, NGO Vertreter*innen, Politiker*innen). Die Interpretationen reichten dabei von einem großen bis zu einem vernachlässigbaren Mikroplastik-Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt. Neben der Frage des Risikos werden auch Zuschreibungen von Verantwortung für die Vermeidung von Mikroplastik in den Medien verhandelt. Hier fällt auf, dass Verantwortung häufig individualisiert an Konsument*innen zugeschrieben wird, die Mikroplastik durch ihr Kaufverhalten vermeiden sollen, während Diskurse um kollektive politische Verantwortung und die Verantwortung der Industrie wesentlich seltener sind.

Analyse zivilgesellschaftlicher Initiativen (2):

NGO Vertreter*innen und Zero Waste Aktivist*innen, die wir beispielhaft für den zivilgesellschaftlichen Diskurs analysieren, stellen Beispiele für unterschiedliche Verantwortungszuschreibungen dar. Während NGOs Konsument*innen zwar als wichtiges Vehikel für die öffentliche Aufmerksamkeitsgenerierung sehen, setzen NGOs einen großen Schwerpunkt auf politische Regulierung und teilweise auch Eigeninitiative aus der Industrie. Im Gegensatz dazu fokussieren Akteur*innen im Bereich Zero Waste Aktivismus vor allem auf Möglichkeiten zu und Verantwortung für individuelles Handeln. Hier ist es wichtig anzumerken, dass es sich bei den Aktivist*innen hauptsächlich um Frauen handelt, und häufig auch jene Personen in Haushalten gezielt angesprochen werden, die sich um Kinder kümmern – und das sind heute auch noch tendenziell häufiger Frauen als Männer. Hier wird argumentiert, dass sie Mikroplastikeintrag in ihren eigenen Körper und in die Körper ihrer Kinder vermeiden sollen, um ihre intergenerationale und reproduktive Verantwortung adäquat wahrzunehmen. Neben dieser Gender-Dimension zeigt sich auch, dass der Diskurs der Zero-Waste Bewegung häufig eher die Lebensrealitäten der Mittelschicht widerspiegelt und adressiert, als jene von sozio-ökonomisch benachteiligten Gruppen.

Politische Kernaussagen zu (1) und (2):

- ➔ **Die Verantwortung für die Handhabung** (d.h. Entsorgung, Vermeidung, Reduktion) von Plastik/Mikroplastik wird medial aber auch im Rahmen zivilgesellschaftlicher Diskurse **oftmals Individuen zugeschrieben, die vorwiegend als Konsument*innen gerahmt werden (im Gegensatz zu Bürger*innen, Wähler*innen)**. Konsument*innen können das Problem des Plastikeintrags in die Umwelt allerdings nicht lösen, dazu braucht es politisches und industrielles Handeln. Leser*innen werden also auf eine überfordernde Weise adressiert, was zu Ermüdung der Aufmerksamkeit und des Engagements für Umweltthemen führen könnte.
- ➔ Frage der Vermeidung von Plastik/Mikroplastik müssen mit Fragen von sozialer Gerechtigkeit zusammengedacht werden: **Wer kann sich ein (mikro)plastikfreies Leben leisten?** Welche Ressourcen braucht es für ein (mikro)plastikfreies Leben? Welche Fragen der sozialen Gerechtigkeit bleiben im gegenwärtigen Diskurs unbesprochen (sozio-ökonomischer Status, Gender, internationale Dimension)?

- Es wäre daher wichtig, dass sich **sowohl der mediale als auch der zivilgesellschaftliche Diskurs hin zu Fragen der kollektiven Verantwortung bewegt und verstärkt Politik und Industrie adressiert**. Dort gibt es die längsten Hebel, um den Eintrag von (Mikro-)Plastik in die Umwelt zu verringern und die Rahmenbedingungen zu schaffen, die eine **Plastikreduktion im Alltag von Menschen in der Gesellschaft ohne soziale Hürden und Verschärfung von Geschlechterungerechtigkeit ermöglichen**.

Analyse wissenschaftlicher Akteursgruppen (3):

In der Analyse der dritten Akteursgruppe, den Wissenschaftler*innen, wurde das schwierige Verhältnis zwischen Wissenschaft und Medien deutlich. Während eine erhöhte mediale Aufmerksamkeit zwar den Vorteil bringt, dass das Thema (Mikro)Plastik als relevantes Forschungsthema gilt, wurde ebenso deutlich, dass die Berichterstattung in den Medien dem Forschungsstand zum Thema Mikroplastik nicht gerecht wird, mit potentiell weitreichenden Effekten für das Verhältnis zwischen Wissenschaft und Gesellschaft. Vor allem zwischen 2010 und 2015 wurde in den Medien oft kommuniziert, dass Mikroplastik ein wissenschaftlich erwiesenes Risiko für Umwelt und Gesundheit darstellt. Seit 2015 wird nun auch berichtet, dass dieses Risiko nicht belegt ist – während gleichzeitig aber auch weiter alarmistische Artikel publiziert werden. Die frühe mediale Affirmierung von Risiko ohne Diskussion des vorläufigen Charakters dieser Ergebnisse kann dazu führen, dass die Wissenschaft als unzuverlässige Evidenzquelle erscheint.

Politische Kernaussagen zu (3):

- **Der mediale Hype um Mikroplastik kann zu einer Unterwanderung von wissenschaftlicher Glaubwürdigkeit führen**, vor allem die frühe mediale Affirmierung eines Risikos für Gesundheit und Umwelt, die **nicht** dem wissenschaftlichen Konsensus entspricht. **Die Rolle und Verantwortung der Medien für das Verhältnis zwischen Wissenschaft und Gesellschaft muss verstärkt thematisiert und kritisch reflektiert werden**.

Analyse und Bewertung der rechtlichen Rahmenbedingungen

UBA

Einleitung

Im Rahmen des vom BMBF geförderten Projektes „Tracking von (Sub)Mikroplastik unterschiedlicher Identität – Innovative Analysetools für die toxikologische und prozesstechnische Bewertung“ hat das Umweltbundesamt die Aufgabe, relevante Bereiche z.B. Rechtssetzungen oder Normung zu analysieren, um die im Vorhaben bzw. darüber hinausgehenden Untersuchungsmethoden in die Praxis zu überführen, um damit Maßnahmen zur Reduktion von Mikroplastik bzw. Submikroplastikpartikeln zu stützen, einzuordnen und bewerten zu können.

Zu Beginn des Projektes war unklar, welche der zahlreichen Rechtsakte sich für eine Regulation von Kunststoffen eignen. Ein Ziel des Teilprojektes war dementsprechend, diesbezüglich Klarheit zu schaffen. Die Arbeiten im Bereich der Normung befanden sich zu Projektbeginn ebenfalls noch am Anfang. Unklar war hier, in welchem der zahlreichen potenziellen Normungsgremien die Arbeiten angesiedelt werden. Thematisch stand die Entwicklung von Untersuchungsmethoden im Vordergrund. Nur durch die Normierung robuster Methoden können Gehalte aber auch Partikelzahlen und -größen in der Umwelt sicher nachgewiesen werden und induzierte Effekte durch die Implementierung entsprechender Maßnahmen (auch freiwillige) bewertet werden.

Nachfolgend wird zunächst die Frage beantwortet, welche Rechtsakte prinzipiell dazu geeignet sind, den Eintrag von Kunststoffen in die Umwelt zu minimieren. Anschließend wird darauf eingegangen, welche Maßnahmen aus Sicht des Umweltbundesamtes und der anderen Ressortforschungseinrichtungen (RFE) besonders sinnvoll erscheinen bzw. in der jeweiligen Zuständigkeit liegen. Zuletzt werden die bisherigen Entwicklungen im Bereich der nationalen, europäischen und internationalen Normung aufgezeigt und einen Ausblick zu den zentralen, noch offenen Punkten und zur zukünftigen Zusammenarbeit der Gremien gegeben.

Einordnung der Kunststoffthematik in die unterschiedlichen Rechtsbereiche

Am Anfang steht die prinzipielle Einordnung der Thematik in die unterschiedlichen Rechtsetzungsbereiche. Diese stehen an unterschiedlichen Phasen des

Lebenszyklus‘ von Kunststoffprodukten oder Produkten mit Kunststoffen (im Folgenden werden beide Griffe unter Kunststoffprodukte subsumiert).

Abbildung 82 zeigt schematisch diesen Lebenszyklus. Nach der Produktion werden Kunststoffprodukte genutzt und nach der Nutzung ggf. entsorgt oder durch ein stoffliches Recycling dem Kreislauf wieder zugeführt. Die einzelnen Abschnitte teilen sich in zahlreiche Unterabschnitte auf, in denen Steuerungs- und Regulierungsmöglichkeiten existieren bzw. geschaffen werden können. Grundsätzlich bieten sich aus rechtlicher Sicht das Gebot, die Erlaubnis, das Verbot oder die Freistellung als mögliche Steuerungsinstrumente an.

Durch diesen Fokus auf den Lebenszyklus von Kunststoffprodukten wird deutlich, wie die unterschiedlichen Rechtsakte die einzelnen Phasen beeinflussen. Zusätzliche Kriterien für das Produktdesign beeinflussen das Inverkehrbringen von Kunststoffen, Maßnahmen auf z.B. Kläranlagen regeln vor allem den Eintrag in die Umweltmedien. An welcher Stelle Maßnahmen besonders effizient wirken, ist produkt- und auch polymerabhängig. Während sich Kunststoffpartikel in Reinigungsgels verhältnismäßig einfach ersetzen lassen, sind Alternativen für die Minimierung des Reifenabriebs nur begrenzt sinnvoll.

Die Betrachtung und Analyse der Rechtsakte umfasst neben den nationalen Rechtsakten auch internationale und europäische Rechtsakte. Die europäische Ebene ist deshalb relevant, da ein Großteil der Umweltgesetzgebung auf dieser Ebene erarbeitet wird und durch die europäische Kunststoffstrategie (Europäische Kommission 2018) ein umfangreiches Strategiepapier entwickelt wurde, das Maßnahmen in unterschiedlichen Phasen beinhaltet.

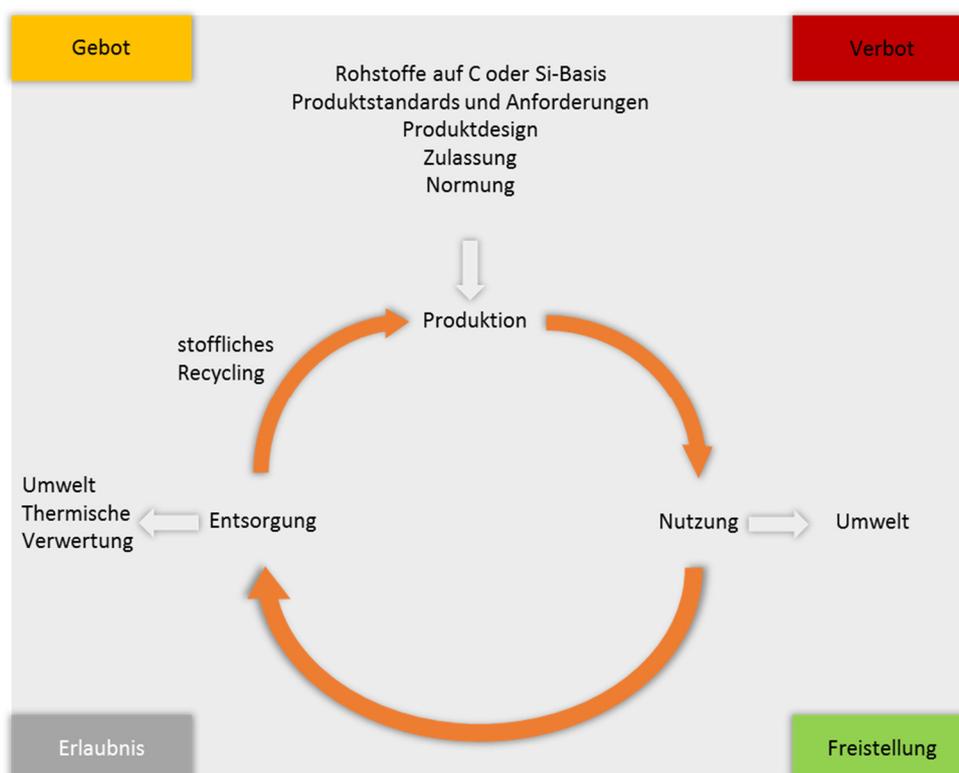


Abbildung 82: Lebenszyklus der Kunststoffe und Wege in die Umwelt (eigene Darstellung)

Die einzelnen Aspekte der Kunststoffstrategie wurden in der Analyse der Rechtsakte eingearbeitet. Die internationale Ebene spielt auf Grund des globalen Charakters der Kunststoffthematik eine entscheidende Rolle.

Abbildung 83 stellt eine Auswahl relevanter Rechtsbereiche und zugehörige Verordnungen und Richtlinien dar. Es zeigt sich, dass mögliche Maßnahmen zur Reduktion von Kunststoffeinträgen in einer Vielzahl von Rechtsgebieten thematisiert werden könnten. Dazu zählen u.a. das Stoffrecht, das Wasserrecht, das Abfallrecht, das Verbraucherschutzrecht und das Produktrecht.

Eine mögliche Regulation in bestimmten Rechtsbereichen beeinflusst darüber hinaus die Entwicklung in anderen Rechtsbereichen. Die Verordnungen im Bereich des Verbraucherschutzes und des Produktrechts wirken sich somit auf mögliche Immissionen in die Umweltmedien aus und sind entsprechend von Bedeutung, sollten weiterführende Maßnahmen im Wasserrecht diskutiert werden. Im Rahmen einer detaillierten Analyse existierender Quellen wurden zunächst Beurteilungen zu möglichen Einhakpunkten in den unterschiedlichen Rechtsakten zusammengefasst und bewertet. Nachfolgend werden diese für eine Reihe der in Abbildung 83 dargestellten Rechtsakte aufgeführt:

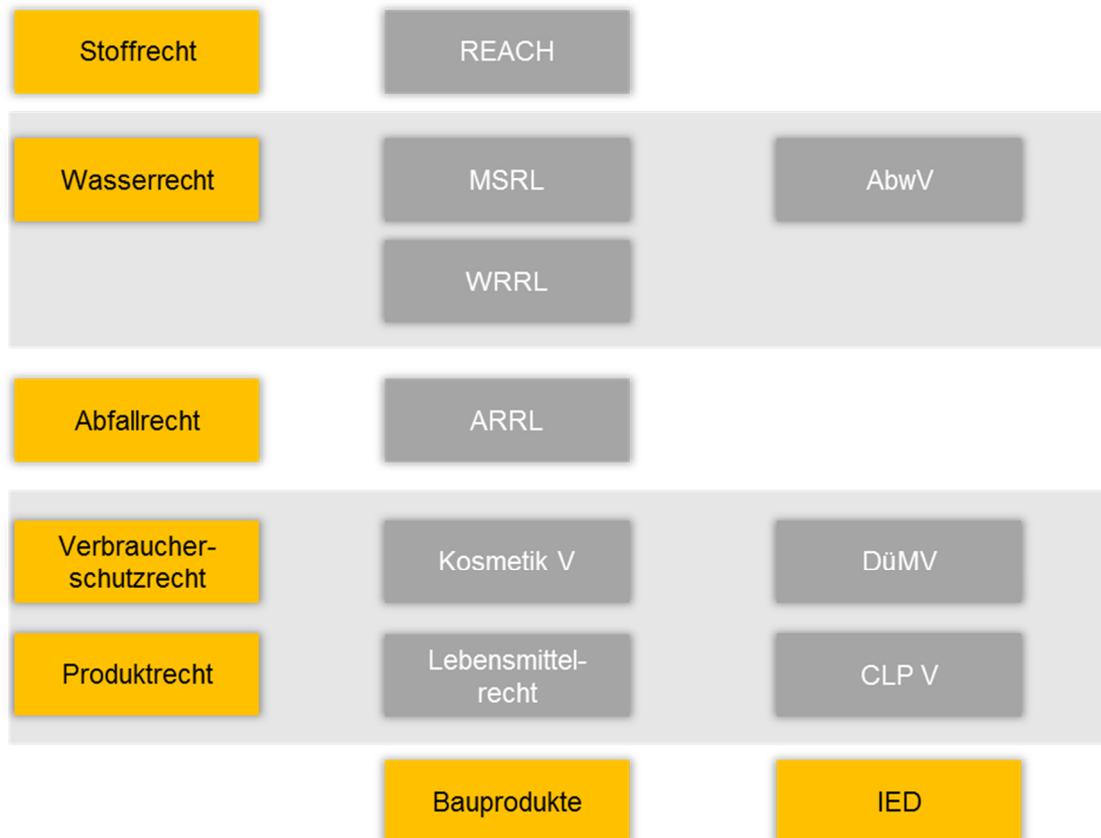


Abbildung 83: unterschiedliche Rechtsbereiche und eine Auswahl relevanter Verordnungen und Richtlinien in diesen Bereichen

REACH

Die Verordnung für Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals regelt das Inverkehrbringen von chemischen Stoffen. Zu klären ist, ob Mikroplastik einen chemischen Stoff im Sinne der Verordnung darstellt und welche möglichen Maßnahmen in diesem Zusammenhang getroffen werden können. Dazu müssen insbesondere folgende Punkte berücksichtigt werden:

- Mikroplastik fällt grundsätzlich unter den in Art. 3 Nr. 1 definierten Stoffbegriff der Verordnung: „chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen (...).“
- Bestimmte Eigenschaften von Stoffen, wie Größe oder Form, werden nicht vorausgesetzt
- Verbots- und Beschränkungsmöglichkeiten der REACH-Verordnung zielen auf die Verhinderung von Risiken, die sich aufgrund gefährlicher

Stoffeigenschaften bei Exposition von Mensch oder Umwelt gegenüber dem jeweils zu regelnden Stoff ergeben können

- Mikroplastik fällt als Polymer unter die REACH-Verordnung. Nach Art. 2 Abs. 9 REACH sind Polymere von den Vorschriften über die Registrierung und Bewertung ausgenommen (da bisher nicht ermittelbar)
- REACH regelt die Verwendung von Mikroplastik als Polymer. Es besteht ein Zulassungssystem, das insbesondere auch PBT- und vPvB-Stoffe einschließt.
- eine Veränderung nach einer Harmonisierungsmaßnahme kann nur auf Grund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse erfolgen, unklar ist jedoch, ob die Vorgaben zu Polymeren eine Harmonisierungsmaßnahme darstellen oder nicht.

Generell gibt es mit Bezug auf die Auslegung von REACH zur Regulation von Polymeren wenig Rechtssicherheit, da richtungsweisende Urteile fehlen. REACH reguliert darüber hinaus nur Chemikalien, und keine Produkte (wie z.B. Reifen) bzw. Chemikaliengemische. Die Verordnung fokussiert also vor allem auf das Inverkehrbringen und nicht auf die Nutzung und die Entsorgung. Eine Regulierung von Kunststoffen innerhalb von REACH hätte dementsprechend keine Auswirkung auf die Entstehung von Mikroplastikpartikeln durch die Nutzung unterschiedlicher Produkte.

Während der Projektlaufzeit erarbeitete die Europäische Chemikalienagentur (ECHA) einen Vorschlag, Mikroplastik durch die REACH Verordnung zu regulieren. Dieser Vorschlag wird im nächsten Abschnitt kurz beschrieben.

ECHA Vorschlag zur Regulation von primärem Mikroplastik durch REACH

Die ECHA wurde im Rahmen der Kunststoffstrategie dazu beauftragt, das Verbot von Mikroplastik nach REACH zu untersuchen. Nachfolgend werden die wichtigsten Ergebnisse dieses Prozesses aufgezeigt, da der Berichtsentwurf einen umfassenden Stand des bisherigen Wissens zu Kunststoffen in der Umwelt, insbesondere im aquatischen Bereich, liefert und die Herausforderungen der Regulierung beschreibt (unter anderem auch durch den Einbezug der großen europäischen Forschungsprojekte BASEMAN, EPHEMARE, PLASTOX, WEATHER-MIC). Zunächst erscheint mit Blick auf die Semantik die Größendefinition von Mikroplastik von 1 nm bis 5 mm willkürlich (Fasern ab 3 nm), die Autoren der Studie subsumieren Kunststoffe generell unter diesem Begriff (European Chemicals

Agency 2019). Diese Vorgehensweise mag für ein generelles Verbot von Kunststoffen sinnvoll erscheinen, kann aber nur bedingt auf andere Bereiche übertragen werden. Die Eigenschaften und potenziellen Risiken durch Nanopartikel werden dadurch 5 mm großen Plastikpartikeln gleichgesetzt, die wiederum aquatische Lebewesen anders beeinflussen. Darüber hinaus bleibt der Bereich > 5 mm von der Regulation ausgeschlossen.

Zu den Produkten gehören unter anderen:

- Kosmetikprodukte;
- Detergenzien
- Farben und Lacke
- Chemikalien im Öl und Gas Sektor
- Medizinische Produkte
- Nahrungsergänzungsmittel

Die ECHA gibt außerdem an, dass die bestehenden Daten nicht geeignet sind, um daraus einen PNEC abzuleiten¹ und stützt damit die Aussage von Miklos, Obermaier et al. (2016), die zu einem ähnlichen Ergebnis kamen.

Die Risikobewertung ist für zukünftige Einschränkungen entscheidend, allerdings fokussieren die Veröffentlichungen vor allem das Vorkommen von Mikroplastik, seltener mögliche Gefahren und noch seltener Dosis–Wirkungsbeziehungen (European Chemicals Agency 2019).

Obwohl die Aufnahme und das Vorkommen von Mikroplastik beobachtet werden, gibt es wenige bis keine Hinweise, dass von Mikroplastik ein Risiko ausgeht. Aus diesem Grund, wird auch die Wahrnehmung, dass Mikroplastik eine inakzeptable Gefahr für die Umwelt darstellt in Frage gestellt (European Chemicals Agency 2019). Dem widersprechen die Autoren der ECHA Studie und führen an, dass auf Grund der extremen Persistenz Mikroplastik im Sinne von Annex XIII REACH bewertet werden könnte.

¹ Der genaue Wortlaut ist: “Nevertheless, with reference to applicable ECHA Guidance on the use of SSDs for hazard assessment, the Dossier Submitter notes that the datasets used in this study would not be considered appropriate for PNEC derivation for chemical safety assessment under REACH.” (European Chemicals Agency 2019, S. 55)

Regulierungen im Wasserbereich

Die Regulation von primärem Mikroplastik innerhalb von REACH zielt auf die erste Phase des Kunststoffzyklus, die Produktion, ab. Auch durch die zweite Phase, die Nutzung, kann Mikroplastik in die Umwelt geraten. Dabei sind im Bereich Wasser europäische Richtlinien besonders relevant, die seit 2018 einer Revision (Trinkwasser RL) unterliefen bzw. unterlaufen (Kommunalabwasser RL). In diesen beiden Richtlinien werden Anforderungen an Mikroplastik adressiert bzw. sollen adressiert werden.

In Tabelle 15 werden nachfolgend die analysierten Richtlinien im Bereich Wasser dargestellt. Im Meeresbereich gibt es darüber hinaus eine Reihe relevanter Konventionen und übereinkommen, die in

Tabelle 16 dargestellt wurden.

Tabelle 15: Rechtsakte im Bereich Wasser

Wasser	
UNEP Global Programme of Action for the Protection of the Marine Environment from Land-based Activities (GPA)	Internationales Recht
London Convention on the Prevention of Marine Pollution by Dumping of Wastes and Other Matter, 1972 and 1996 Protocol	Internationales Recht
UN Law of the Sea Convention (UNCLOS) - Resolution A/RES/60/30; Part XII of the Convention (Articles 192-237), centered on pollution prevention and control of sea- and land-based activities, and atmospheric pollution. General Assembly Resolution A/RES/60/30 deals with marine litter	Internationales Recht
Council Directive 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste-water treatment Implementiert in der Kommunalabwasser Richtlinie	Europäisches Recht
Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive) Implementiert in der Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie	Europäisches Recht
Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community	Europäisches Recht

action in the field of water policy (Water Framework Directive) Implementiert in der Wasserrahmenrichtlinie	
Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration Implementiert in der Grundwasserrichtlinie	Europäisches Recht
Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality Implementiert in der Badegewässerrichtlinie	Europäisches Recht
Wasserhaushaltsgesetz	Nationales Recht
Abwasserverordnung	Nationales Recht
Abwasserabgabengesetz	Nationales Recht
Grundwasserverordnung	Nationales Recht
Oberflächengewässerverordnung	Nationales Recht
Trinkwasserverordnung	Nationales Recht

Tabelle 16: Konventionen und Übereinkommen im Bereich Wasser (Meer)

Meer	
MARPOL – International Convention for the Prevention of Pollution from Ships. Annex V “Regulations for Garbage Disposal at Sea” - prevention of pollution by garbage – has been extended to a complete ban on disposal of plastics (into force since Jan 2013). Provide facilities for reception of ship-generated residues and garbage	Internationales Recht
<i>Honolulu Strategy (2011, UNEP/NOAA)</i>	Internationales Recht
Barcelona Convention – Convention for the Protection of the Mediterranean Sea Against Pollution / part of global UNEP Regional Seas Programme. <i>Protocol to address land-based activities and sources of pollution</i>	Internationales Recht
Bucharest Convention – Convention for the Protection of the Black Sea Against Pollution. <i>Protocol to address land-based activities and sources of pollution</i>	Internationales Recht
OSPAR Convention – Convention for the Protection of the Marine Environment of the Northeast Atlantic	Internationales Recht
Helsinki Convention – Convention on the Protection of the Marine Environment of the Baltic Sea	Internationales Recht

Das wichtigste Ergebnis der Analyse ist, dass im Wasserbereich abgesehen von den Abfallentsorgungsverboten im Meeresbereich bisher verpflichtende Maßnahmen fehlen, die einen möglichen Eintrag von Kunststoffen reduzieren. Dieses Fehlen kann auch durch eine nicht existente Überwachungs- und Bestimmungsmethodik begründet werden. Nach der Etablierung standardisierter Verfahren böten sich unterschiedliche Ansatzpunkte an:

- Spezifische Grenzwerte in der AbwV könnten den Eintrag von Kunststoffen aus der Abwasserentsorgung in die Gewässer regulieren. Diffuse Kunststoffeinträge würden diese Maßnahmen wenig beeinflussen.
- Die Aufnahme von Kunststoffen in die Oberflächengewässer Verordnung zeigt den aktuellen Zustand auf und ob die getätigten Maßnahmen zu einer Zustandsverbesserung führen, oder ob ggf. weitere Emittenten berücksichtigt werden müssen (geklärt werden muss, welche Kunststoffe betrachtet werden und ob die Entfernung der Kunststoffe mit wirtschaftlichen Instrumenten wie der Abwasserabgabe unterstützt werden kann).

Für die beiden thematisierten Maßnahmen sind genormte Verfahren notwendig, um zeitliche und räumliche Diskrepanzen zuverlässig bewerten zu können.

Abfallrecht

Im Abfallrecht gibt es zunächst ein Grünbuch in dem eine europäische Strategie für Kunststoffabfälle beschrieben ist. Kunststoffabfälle werden jedoch, trotz ihrer zunehmenden Auswirkungen auf die Umwelt nicht **ausdrücklich** im EU-Recht behandelt.

Die Abfallrahmenrichtlinie beschreibt, dass die schädlichen Auswirkungen der Erzeugung und Bewirtschaftung von Abfällen, darunter auch Kunststoffabfälle, vermieden oder verringert werden sollen und die Effizienz der Ressourcennutzung verbessert werden soll. Zudem regelt die Richtlinie die Abfallhierarchie, wonach der Vermeidung, Wiederverwendung und dem Recycling Vorrang vor der energetischen Verwertung und Beseitigung eingeräumt werden sollen.

Inzwischen wurde von der KOM auf die Revision der Klärschlammrichtlinie initiiert (Juli 2021). Auch hier steht Mikroplastik auf der Agenda.

Kosmetik-Verordnung

Die Kosmetik-Verordnung stellt Mindestanforderungen an die Sicherheit kosmetischer Mittel und dient damit dem Gesundheits- und Verbraucherschutz. Vor Inverkehrbringen eines kosmetischen Mittels muss ein Sicherheitsbericht angefertigt und die Inhaltsstoffe angezeigt werden. Mikroplastik gehört dabei nicht zu den Stoffen, die geprüft werden müssen, allerdings gilt auch im Hinblick auf sie der Grundsatz, dass nur solche Kosmetika auf den Markt gebracht werden dürfen, die für die menschliche

Gesundheit sicher sind. Nach derzeitigem Kenntnisstand stellt die Verwendung von Mikroplastikpartikeln in kosmetischen Mitteln für den Verbraucher kein gesundheitliches Risiko dar.

Düngemittelverordnung (DüMV)

Die DüMV enthält einen Grenzwert für Kunststoffe >1 mm. Dieser beläuft sich auf:

- 0,1% nicht abgebaute Kunststoffe (Folien)
- 0,4% andere Fremdstoffe inkl. Hartplastik

Interessant ist in diesem Zusammenhang insbesondere auch der Eintrag von Kunststoffen <2 mm. Entsprechende Monitoring Vorhaben innerhalb des BMBF Förderschwerpunktes (ENSURE) sollten hier zusätzliche Daten generieren.

Auf Europäischer Ebene wurde inzwischen die EU Düngemittelrichtlinie verabschiedet, die Begrenzungen von Kunststoffen nach deutschem Vorbild beinhaltet. Allerdings beziehen sich die Werte auf die Größenfraktion > 2mm.

Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen CLP V

Die CLP V gibt Vorgaben zur Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen. Für nachfolgend spezifizierte Kunststoffe gilt:

- Gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 sind Partikel aus PE, PP und PU nicht als bioakkumulierend und nicht als ökotoxisch einzustufen
- Die Partikel sind allerdings als schwer abbaubar einzustufen

Die genannten MP sind also keine als „umweltgefährlich“ einzustufenden Chemikalien. Eine Einstufung als langfristig gewässergefährdend – Kategorie Chronisch 4, ist bei Vorlage geeigneter Belege nicht grundsätzlich auszuschließen und muss ggf. fallspezifisch geprüft werden. Ob sich auf dieser Grundlage eine Einstufung als umweltgefährlich durchsetzen ließe, erscheint zurzeit fraglich.

Zusammenfassung und Perspektive

Aus der bisherigen Analyse der jeweiligen Rechtsbereiche ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Die fehlenden Urteile zu unterschiedlichen Fragen, die im Rahmen von **REACH** thematisiert werden müssen, führen zu einer geringen

Rechtssicherheit. Zentral ist in diesem Zusammenhang, ob Harmonisierungsmaßnahmen im MP bereits stattfanden. Feststeht, dass keine langfristigen einzelstaatlichen Lösungen durch Reach ermöglicht werden. Die Diskussion um die Integration von MP in Reach ist abschließend noch nicht diskutiert.

- Im **Wasser- und Bodenrecht** gilt derzeit lediglich die Abwasserverordnung als potenzielle Steuerungsoption. Alle anderen Regelungen im Wasser- und Bodenschutzrecht müssten qualitative Aussagen treffen, deren Ableitung derzeit fachlich nicht möglich ist, da entsprechende Daten und Bewertungsgrundlagen fehlen.
- Das **Verbraucherschutzrecht** ist auf Grund des risikobasierten Ansatzes kaum dazu geeignet, Einschränkungen bzgl. MP zu treffen, da die durch das Verbraucherschutzrecht regulierten Produkte für die menschliche Gesundheit als sicher eingestuft werden.

Neben dieser generellen Bewertung wurden zahlreiche plastikspezifische Umstände identifiziert, die eine eindeutige Rechtsprechung zusätzlich erschweren. Hierzu gehören:

- unterschiedliche Größendefinitionen
- Zusammensetzung von Kunststoffen (z.B. Berücksichtigung der Additive)
- Einsatzmöglichkeiten, -bereiche und somit Pfade
- Verantwortlichkeit für den Eintrag von Kunststoffen (Akteursstruktur)

Der nächste Schritt im Projekt war, die identifizierten Themengebiete mit den jeweiligen Experten im Umweltbundesamt zu diskutieren. Darüber hinaus sollten im Rahmen eines Gutachtens die identifizierten Anknüpfungspunkte bestätigt werden. In diesem Zusammenhang wurden zahlreiche Forschungsvorhaben und Veranstaltungen identifiziert, die im Rahmen eines Konsultationsprozesses die jeweiligen Experten in die Beurteilung miteinbeziehen sollten. Zu den relevanten Vorhaben gehörten:

- Handlungspotentiale, Instrumente und Maßnahmen zur Reduzierung des Litterings
- Technische Potenzialanalyse, Kunststoffrecycling und Rezyklateinsatz
- Kunststoffeinträge in die Umwelt

- Behandlung biologisch abbaubarer Kunststoffe
- Aktivitäten der vom UBA koordinierten IG Plastik
- BMBF Vorläuferprojekte OEMP und MiWa
- BMBF Projekte ENSURE und RUSEKU
- Projekte zum Thema Meeresmüll

In den zahlreichen, im folgenden Kapitel thematisierten Gesprächen wurde deutlich, dass für die Bewertung und Regulierung genormte Analyseverfahren notwendig sind.

Die Europäische Kommission legte in der Kommunikation COM(2021) 400 final² mit der Reduzierung der Kunststoffeinträge in die Meere von 50% und der Reduzierung des Eintrages von Mikroplastik in die Umweltmedien von 30% erstmalig medienspezifische Minderungsziele fest. Weitere Details zu z.B. möglichen Maßnahmen fehlen. Lediglich wird an dieser Stelle auf die unterschiedlichen rechtlichen Regelwerke verwiesen, die sich derzeit in der Revision befinden wie z.B. die Kommunalabwasserrichtlinie oder die Klärschlammrichtlinie und die dazu dienen könnten, die Einträge von Mikroplastik in die Umwelt rechtlich zu regulieren.

Bewertung unterschiedlicher Maßnahmen durch die Ressortforschungseinrichtungen des Bundes

Umweltbundesamt

Neben den rechtlichen Analysen bildeten die Erstellung und die Durchführung von Umfragen sowie Expertenbefragungen weitere Schwerpunkte der Arbeiten. Mit diesen Befragungen und Umfragen sollten die zuvor identifizierten rechtlichen Einhakpunkte und relevante Regelungen validiert werden. Das Umweltbundesamt bietet die entsprechende Branchen Expertise und war dementsprechend der erste Anlaufpunkt.

Darüber hinaus wurden weitere relevante Foren identifiziert. Neben dem Umweltbundesamt bietet sich ein, durch das UBA initiiertes, ursprünglich jährlich

² COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS Pathway to a Healthy Planet for All EU Action Plan: 'Towards Zero Pollution for Air, Water and Soil' {SWD(2021) 140 final} - {SWD(2021) 141 final}

stattfindendes Treffen der RFE an. Hieran nehmen für die rechtliche Bewertung und Regulierung wichtige Bundesbehörden wie die BfR, die BAST und die BAFG teil. Die BfR ist beispielsweise für die Risikobewertung von Kunststoffen zuständig und bewertet die Folgen, die eine Exposition auf den Menschen haben könnte. Eine enge Zusammenarbeit mit diesen Behörden ist dementsprechend für eine ganzheitliche Regulierung der Kunststoffthematik zentral, da die eng abgegrenzten fachlichen Zuständigkeiten nur bedingt mit der übergreifenden Problematik von Kunststoffen in der Umwelt vereint werden können.

Der semi-standardisierte Fragenkatalog für das Umweltbundesamt setzt sich aus 7 Fragen zusammen, die nachfolgend aufgelistet werden. Die Antworten sowie die Antworten auf vertiefende Nachfragen werden ebenfalls dargestellt.

1. Welche Rechtsakte (nationale/europäisch) und internationale Vereinbarungen, die das Thema Kunststoffe/MP direkt oder indirekt beinhalten, werden in Ihrem FG federführend behandelt? Wo sehen sie die besten Chancen, Maßnahmen, die zu einer Reduktion führen, unterzubringen (kurz-, mittel-, langfristig)?

Die Antworten auf diese Frage verdeutlichen abermals die breite Streuung der Kunststoffthematik sowie die themenübergreifenden Aspekte möglicher Regulierungsmaßnahmen.

Interessant ist insbesondere das Fehlen von Rechtsakten im Baubereich. Laut Plastics Europe werden rund 20% der Kunststoffe (bezogen auf den Ausgangsstoff Kunststoffpellets, keine Fasern) im Baubereich verwendet [240]. PVC, EPS und PE sind die mengenmäßig relevanten Polymere. Standards, die einen ressourcenschonenden und umweltschützenden Umgang mit Kunststoffen im Baubereich garantieren, wären hier mögliche Ansatzpunkte.

Im Verpackungsbereich ist das Umweltbundesamt für die Single-Use-Plastics-Directive (2019/904), die Verpackungsrichtlinie (94/62/EG), die Waste Electrical and Electronic Equipment Directive (2012/19/EU) auf der europäischen Ebene zuständig. Darüber hinaus werden das Elektro- und Elektronikgerätegesetz (ElektroG), das Verpackungsgesetz (VerpackG) sowie weitere zahlreiche Rechtsakte im Bereich der Produktverantwortung betreut. In allen existierenden Rechtsakten könnten mit

geringem Aufwand Reduktionsziele für Kunststoffe platziert werden, eine Aussage, die sich mit den Ergebnissen der Rechtsanalyse deckt.

Darüber hinaus betreut das Umweltbundesamt die Düngemittelverordnung, die auch Komposte beinhaltet und dementsprechend für die Reduzierung der Umwelteinträge von Kunststoffen maßgeblich ist. Gleiches gilt für die Klärschlammverordnung.

Im Bereich Boden, Luft und Wasser werden ebenfalls zahlreiche Rechtsakte durch das Umweltbundesamt betreut. Auch hier könnten mit geringem Aufwand Grenzwerte für Kunststoffe in existierenden Rechtsakten implementiert werden.

In keinem der oben genannten Rechtsakte gibt es bisher eine anerkannte Methode zur Bestimmung von MP.

2. Welche freiwilligen Maßnahmen zur Eintragsreduzierung (z. Bsp. Reduktion MP in Kosmetika) existieren bzw. wären in Ihrem Themenbereich vorstellbar

Die zweite Frage zielt auf den nicht durch Rechtsakte regulierten Bereich ab und soll die Entwicklungen in den unterschiedlichen Branchen widerspiegeln.

Im Baubereich sind insbesondere alternative Baustoffe zur Wärmedämmung interessant auch eine „Guideline“ zu einem umweltgerechten Umgang mit Kunststoffen wird als sinnvoll erachtet.

Im Bereich Verkehr gibt es bis zum Zeitpunkt der Umfrage noch keine freiwilligen Maßnahmen.

Umweltkennzeichen wie der Blaue Engel könnten erweitert werden, um Herstellern ein Gütesiegel für ihre Bemühungen zur Verfügung stellen zu können. Im Bereich des Kompostes wird beispielsweise durch das RAL Gütesiegel der Gehalt an Kunststoffen im Kompost auf 1/10 des gesetzlich erlaubten Gehaltes festgeschrieben.

Darüber hinaus können auch aus den unterschiedlichen Branchen heraus spezifische Selbstverpflichtungen vorgeschlagen und umgesetzt werden.

Eine gezielte Öffentlichkeitsarbeit und entsprechende Beratungsleistungen könnten zudem eine Reihe von positiven Effekten auf die Reduktion von Kunststoffen in der Umwelt haben. Dazu gehören eine bessere Trennung der Bioabfälle, Empfehlungen

für die öffentliche Beschaffung (z. Bsp. bzgl. des Einsatzes von Kunststoff-Rezyklaten) sowie freiwillige Mehrwegsysteme, z. B. im Online – Handel.

3. Welche ökonomischen Maßnahmen oder sonstige, nicht rechtlich verbindliche Maßnahmen, die zu einer Reduktion der Kunststoffeinträge führen, existieren in Ihrem Themenbereich?

Neben freiwilligen und rechtlichen Maßnahmen können insbesondere ökonomische Anreize zu einer Verhaltensänderung bei Produzenten und Konsumenten führen. Den Experten im Umweltbundesamt waren hierzu nur wenige, bereits umgesetzte Maßnahmen bekannt. Unstreitig ist das Potential ökonomischer Maßnahmen, die auch konkret im Produktbereich und im Abfallbereich vorgeschlagen wurden.

Im Bereich der Kunststoffprodukte und des Produktrechts wurden die Pfandpflicht und monetäre Abgabe auf Einweggetränkebecher thematisiert. Im Rahmen eines Ressortforschungsplanvorhabens wurde auch die Einführung und Verwendung der Einnahmen in einem sog. „Litteringfond“ thematisiert. Dieser Fond würde auch gem. dem Verursacherprinzip die Hersteller stärker in die Verantwortung nehmen.

Prinzipiell wäre es im Sinne einer echten Kreislaufwirtschaft, Kunststoffe, die sich nicht werkstofflich recyceln lassen, rohstofflich zu verwerten, um daraus neu Kunststoffe bzw. organische Grundchemikalien herzustellen. Technisch ist das möglich, derzeit ist es aber wirtschaftlicher Kunststoffe aus fossilen Rohstoffen (Mineralölen oder Erdgas) herzustellen als aus Kunststoffabfällen. Eine mögliche Maßnahme zur Steuerung könnte eine Besteuerung bzw. Abgabe auf fossile kohlenstoffhaltige Energieträger sein.

4. Welche Normen in ihrem Bereich sind für eine Reduktion von Kunststoffeinträgen geeignet oder müssten erweitert werden?

Bei dieser Frage wurde abermals deutlich, dass für die Erstellung entsprechender Normen Bewertungs- und Messmethoden benötigt werden, die aber im Moment noch nicht existieren. Dementsprechend sind den Experten des Umweltbundesamtes keine Normen bekannt, die zu einer Reduktion der Einträge führen könnten.

5. Was führt nach Ihrer Meinung zur größten Reduzierung der Einträge in Ihrem Bereich (Kombination möglich)?

Mit dieser Frage wurde eine Reihe von Antworten offeriert, eine Kombination der Antworten war möglich. Die Mehrheit der Befragten sahen in einer Mischung aus rechtlichen und gesellschaftlichen Maßnahmen die größten Potenziale zur Eintragsreduzierung. Zu diesen zählen beispielsweise die Aufklärung der Bevölkerung und das Aufzeigen möglicher Alternativen.

Wirtschaftliche Maßnahmen wurden in Zusammenspiel mit rechtlichen Maßnahmen und gesellschaftlichen Maßnahmen ebenso häufig benannt. Vor allem ist im Ergebnis die Kombination der unterschiedlichen Steuerungsmechanismen interessant. Die Herausforderung besteht darin, diese Mechanismen aufeinander abzustimmen und somit eine möglichst effiziente Lösung bereitzustellen.

6. Was sind Ihrer Meinung nach die größten Hemmnisse, um Maßnahmen, die zu einer Reduktion der Kunststoffeinträge führen, umzusetzen (z. Bsp. fehlende Alternativen, fehlende Nachweismethoden zur Einhaltung von Grenzwerten)?

Die Hemmnisse thematisieren nochmals spezifischere Herausforderungen in den einzelnen Branchen. Zum einen wurden bei dieser Frage die Kosten für stärkere Kontrollen (z. B. der Biotonne) aufgeführt. Zum anderen, der unschlagbar günstige Preis von Kunststoffen und die Versatilität des Rohstoffes. Der Einsatz von single-use-plastics und das Aufkommen von Verpackungsmüll ist eng mit gehobenen Lebensstilen verbunden.

Abfall Sammel-, Trenn- und Recyclingsysteme sind wichtige Bestandteile einer Kunststoff Kreislaufwirtschaft und müssen in ihrer Funktionsfähigkeit gestärkt werden, bzw. in manchen Ländern auch erst eingeführt werden.

Ebenfalls wurde deutlich, dass fehlendes Wissen zu Kunststoffen und deren Freisetzung, Exposition und Wirkung die Ableitung sinnvoller Maßnahmen erschwert.

7. Was ist Ihrer Meinung nach die wichtigste Ebene, um die Einträge von Kunststoffen in die Umwelt zu reduzieren? (Kombination möglich)

Mit dieser Frage sollte auf die relevanten Aktionsebenen abgehoben werden. Die Kunststoffproblematik ist grenzüberschreitend. Um in Deutschland Maßnahmen voran zu bringen, gibt es allerdings eine Reihe möglicher Ansatzpunkte: Kommunen, Länder, Bund oder Europa bilden nur eine Auswahl.

Die internationale und europäische Ebene wurde von 80% der Experten als die wichtigste Ebene gesehen. Die nationale und regionale Ebene wurde wenige Male genannt. Die Herausforderung besteht nun hierin, Ansatzpunkte für Maßnahmen und Bestrebungen zur Eintragsreduzierungen in die europäische und internationale Politik einzuspielen, um hier eine möglichst effektive Regulierung dieser grenzüberschreitenden Problematik zu erlangen.

Die Befragung der UBA Experten lieferte eine Reihe wichtiger Erkenntnisse und Sichtweisen, die deutliche Unterschiede zwischen den Branchen aufzeigen und verdeutlichen, dass die Kunststoffe in der Umwelt nicht mit Einzelmaßnahmen angegangen werden müssen, sondern dass vielmehr ein breit angelegter Mix an gesellschaftlichen, rechtlichen und wirtschaftlichen Maßnahmen aufeinander abgestimmt werden muss, um den Eintrag von Kunststoffen in die Umwelt möglichst effizient zu minimieren.

Austausch mit anderen Ressortforschungseinrichtungen

Wegen der Covid-19 Pandemie mussten diverse Veranstaltungen mit den RFE verschoben oder abgesagt werden. Die projektbezogenen Arbeiten des Umweltbundesamtes fokussierten aus diesem Grund insbesondere auf den dialogartigen Austausch mit anderen RFE, mit denen ursprünglich eine Konferenz in 2020 angedacht war.

In der Kommunikation mit den RFE waren die Diskussionspunkte, neben einer grundsätzlichen Einordnung, vor allem Methoden, Referenzmaterialien, Gremienarbeiten und mögliche Maßnahmen. Konkrete Fragen wurden auch in einem an die RFE versandten Fragebogen gestellt. Die Ergebnisse werden im Rahmen des folgenden Treffens der RFE ausführlich präsentiert und diskutiert.

Der Austausch und die Diskussion mit den RFE führt zu einem besseren Verständnis des Gesamtkomplexes Kunststoffe in der Umwelt bei den relevanten Behörden. Darüber hinaus können sowohl Zuständigkeiten, als auch gemeinsame Forschungsinteressen identifiziert werden, die ohne diesen Austausch unklar geblieben wären.

Nachfolgend werden zunächst die Erfahrungen und Erkenntnisse aufgeführt, die durch den Austausch mit den unterschiedlichen RFE zustande kamen. Grundsätzlich

werden dabei die unterschiedlichen Umweltmedien Wasser, Boden und Luft betrachtet.

Eine medienspezifische Eingruppierung der unterschiedlichen RFE wird auf Grund der doch sehr unterschiedlichen Fragestellungen als sinnvoll erachtet.

Wasser

Kunststoffe in wässrigen Medien sind, auch historisch bedingt, im Vergleich zu Kunststoffen in Boden und Luft schon länger Gegenstand der Forschung. Im Rahmen von SubµTrack wurden insbesondere die folgenden Ämter und Anstalten kontaktiert:

Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrologie (BSH)

Das BSH beschäftigt sich nur am Rande mit Kunststoffen in der Umwelt. Durch die in der Meeresstrategierahmenrichtlinie vorgeschriebene chemische Meeresumweltüberwachung wird mit Hilfe von Schleppnetzen die Wasseroberfläche beprobt. Die gefundenen Kunststoffteile können derzeit wegen fehlender analytischer Methoden (am BSH) noch nicht ausgewertet werden.

Bundesanstalt für Wasserbau (BAW)

Die BAW bearbeitet keine Rechtsakte federführend und sieht generell nur bedingtes Reduzierungspotenzial im Bereich der Geotextilien im Wasserbau. Die physikalischen Eigenschaften von Kunststoff führen dazu, dass es in diesem Bereich nur bedingt bzw. kaum Alternativen gibt. Genannt wurde ein Bedarf an Referenzmaterialien, der insbesondere auf Fasern aus Polyester und PP Durchmesser (40-70 µm) fokussiert sowie auf die Materialien für Fender. In der ISO Norm 22182 werden Geotextilien diskutiert.

Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG)

Die BfG betont, dass schnelle, standardisierte Verfahren für ein robustes Monitoring erforderlich sind. Dabei spielen auch unterschiedliche Umweltmatrizes und die Größenfraktionen eine wichtige Rolle. Nicht nur zur Verifizierung dieser Verfahren werden Referenzpartikel der relevanten Polymeren in unterschiedlichen Größen benötigt. Die BfG ist in unterschiedlichen Normungsgremien im ISO/TC 61, dem ISO/TC 147 und dem ISO/TC 38 vertreten.

Als freiwillige Maßnahmen benennt die BfG den Verzicht der WSV auf Polyurethan im küstenschutzbezogenen Wasserbau.

Maßnahmen können im Moment noch nicht abgeleitet werden, da die Identifikation von Quellen und Pfaden nach wie vor schwierig ist. Insbesondere fehlt Wissen bzgl. der Eintragspfade.

Boden

Böden und Sedimente bilden einen weiteren thematischen Schwerpunkt ab, der insbesondere mit Blick auf die Probenaufbereitung deutlich komplexer erscheint, als wässrige Medien. Mit folgenden RFE fand ein Austausch statt:

Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR)

Die Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe forscht sowohl zum Schutz, als auch zur nachhaltigen Nutzung der Georessource Boden. Mit Blick auf Kunststoffe ist vor allem die Beeinträchtigung oder Veränderung der Bodenfunktion relevant. Als mögliche Eintragspfade werden insbesondere landwirtschaftlich verwerteter Klärschlamm und Biokompost hervorgehoben sowie der Einsatz von Gartenbaufolien. Für eine Regulation von Kunststoffen in Böden würden sich das BBodschG, BodSchV und die AbfKlärV eignen.

Es fehlen standardisierte Methoden zur Quantifizierung von Kunststoffen in Böden. Eine besondere Bedeutung hat der transportrelevante Bereich von 10 nm – 100 µm. Insbesondere auch für diesen Bereich gibt es keine Nachweismethoden, Vorsorge-, Prüf- und Maßnahmenwerte können dadurch nicht abgeleitet werden, Bewertungskonzepte fehlen.

Julius Kühn-Institut (JKI)

Das JKI bearbeitet keine Rechtsakte federführend. Die Zentralen Forschungsfragen umfassen die Auswirkungen der Akkumulation von MP auf Bodenorganismen und Pflanzen, die MP Verlagerung in Pflanzen, die Beeinträchtigung der Bodenfunktionen durch Pflanzen und ob bodenbürtige Schadstoffe an MP sorbieren.

In diesem Bereich fehlen sowohl für Nano- als auch Mikroplastik die nötigen analytischen Nachweismethoden. Insbesondere ist auch die Extraktion von MP aus Böden ein zentraler Forschungsgegenstand, für den einheitliche Verfahren benötigt

werden. Eine reproduzierbare, quantitative Abtrennung für unterschiedliche Kunststoffe ist bis jetzt nicht möglich.

Das JKI beschäftigt sich im Rahmen der ISO/DIS 23517-1 mit bioabbaubaren Mulchfolien. In dem EU Projekt Lex4Bio (<https://www.lex4bio.eu/>) werden unter anderem mögliche Kunststoffeinträge durch biobasierte Dünger bewertet.

Das JKI konstatiert, dass in der Landwirtschaft das Fehlen von vergleichbaren, abbaubaren Alternativen zu erdölbasierten Kunststoffen das größte Hemmnis darstellt. Insbesondere auch, weil dadurch gewisse Arbeitsschritte wie z.B. die Bergung neuer und alter Folien eingespart werden könnten. Die Potenziale solcher Alternativen werden dementsprechend hoch angesehen.

Mit Blick auf Referenzmaterialien merkt das JKI an, dass insbesondere Umwelteinflüsse auf Kunststoffe (z. B. Degradation durch UV) eine Rolle spielen und die bisherigen Referenzmaterialien diese nur begrenzt abbilden.

Mit Blick auf freiwillige Maßnahmen sieht das JKI im Verbraucherverhalten (z. B. Fehlwürfe in die grüne Tonne) große Eintragsminderungspotenziale.

Luft

Durch die vergleichsweise wenigen größeren Partikel in der Luft, konzentrieren sich die Untersuchungen vor allem auf Partikel im unteren µm Bereich, die insbesondere auch Herausforderungen an die Analytik stellen.

Deutscher Wetter Dienst (DWD)

Der DWD untersucht mit einer standardisierten Methode (VDI 2119-2013) Luftproben auf Partikel in unterschiedlichen Größenbereichen (coarse mode: 2,5-10 µm, super coarse mode: 10-40 µm). In diese Größenklasse fällt auch Reifenabrieb, der mit Einzelpartikelanalysen untersucht wird. Im genannten Bereich gibt es bislang, nur indirekte Bewertungskonzepte. Die gewonnenen Erkenntnisse können allerdings grundsätzlich für Arbeiten im Regulierungsbereich herangezogen werden. Der DWD betont, dass es derzeit keine Alternative zu Reifen gibt und so auch der Reifenabrieb als zwangsläufige Konsequenz gesehen werden muss.

Medienunabhängig

Neben dem spezifischen Fokus auf gewisse Medien durch die RFE, gibt es RFE, die sich überwiegend mit Produkten, wie z. B. Lebensmitteln auseinandersetzen.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)

Mit Blick auf Kunststoffe und Lebensmittel sieht das BVL nur mittelbar anwendbares Recht, was auch dem Mangel an Informationen zur Toxikologie von Kunststoffen und dem Vorkommen von Kunststoffen in Lebensmittel geschuldet ist.

Es fehlen valide quantitative Analysemethoden, die darüber hinaus vergleichbar und wiederholgenau sind. Referenzmaterialien sollten die spezifischen Belastungssituationen widerspiegeln.

Das BVL betont zudem, dass im Bereich der Verpackungsmittelindustrie kostengünstige Alternativen fehlen und das auch hier die gewünschten physikalischen Eigenschaften der Kunststoffe entscheiden.

Nach zahlreichen bilateralen Gesprächen hatte sich das BVL entschieden, einen Workshop zu Mikroplastik in Lebensmitteln durchzuführen (im Dezember 2020). Das UBA hat auf diesem Workshop vorgetragen.

Ein Ergebnis dieses Treffens war, Methoden zur Bestimmung von Mikroplastik in Wasser in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch einzubringen. Das UBA ist inzwischen vom BVL gebeten worden, eine entsprechende Arbeitsgruppe zu leiten.

Weitere Akteure

Neben den Ressortforschungseinrichtungen wurden weitere Akteure angesprochen, die Ergebnisse werden nachfolgend kurz dargestellt.

Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU)

Die DBU befasst sich im Rahmen der Projektförderung mit der Thematik rund um Kunststoffe in der Umwelt und betont die zentrale Rolle der Kreislaufwirtschaft. Diese bietet ein großes Potenzial für den Umgang mit Kunststoffen und den Konsumenten kommt dabei eine große Rolle zu. Das UBA hatte die DBU mehrfach auf die

Notwendigkeit der Förderung im Kontext Mikroplastik hingewiesen. Im Zuge der Begutachtung spezifischer Projekte durch das UBA sind die Erkenntnisse aus dem BMBF Förderschwerpunkt wegleitend für eine positive Begutachtung.

Normungsaspekte im Mikro- und Nanoplastikbereich

UBA

Für die Setzung von materiellen Anforderungen (Setzung von Werten) in den verschiedenen Rechtsbereichen aber auch im Rahmen der Eigenüberwachung von Prozessen sind entsprechende Untersuchungsmethoden notwendig. Grundsätzlich ergeben sich für die Regelsetzung auf Europäischer oder auch auf nationaler Ebene drei Möglichkeiten:

1. Es werden Normen zitiert
2. Es gibt einen Volltext, z.B. in einem Anhang
3. Es gibt eine Kombination aus 1 und 2 (Zitat einer Norm, die dann eingeschränkt oder ergänzt bzw. ausgeweitet wird).

In jedem Fall wird durch Normungsgremien gute Vorarbeit geleistet, da hier bereits alle Betroffenen (Wissenschaft, Unternehmen, Verwaltung) an den Arbeiten beteiligt sind.

Über das Deutsche Institut für Normung wurden sowohl in ISO (TC 61 Plastics) als auch CEN (TC 249) entsprechende Strukturen etabliert, um entsprechende Normungsarbeiten voranzutreiben. Die Sekretariate wurden und werden weitgehend vom Normenausschuss Kunststoffe (FNK) gehalten unter jeweils deutscher Obmannschaft. Auch auf nationaler Ebene wurde eine entsprechende Gruppe eingerichtet. Die Finanzierung erfolgt über BMU/ UBA. Die ursprüngliche Idee die Standardisierung von Untersuchungsverfahren für Mikroplastik in verschiedenen Matrices zentral (horizontal) im SC 14 Environment des ISO TC 61 Plastics durchzuführen konnte leider nicht umgesetzt werden. In der noch aktiven Arbeitsgruppe 4 wird aktuell noch das BMBF-Statuspapier zur Analytik in eine internationale Norm überführt. Inzwischen konnte ein Draft International Standard verabschiedet werden. Das ist im Ablauf zur Erstellung von Normen die letzte Stufe vor der endgültigen Abstimmung (Final Vote) in der dann nur noch formale Punkte diskutiert werden und keine inhaltlichen Diskussionen mehr stattfinden.

Ein Grund des Scheiterns eines horizontalen Ansatzes im ISO TC 61 lag auch daran, dass der geplante ISO-Workshop zu Mikroplastik nicht durchgeführt wurde. Dies hatte einerseits organisatorische Gründe (Verlegung einer TC 61 Sitzung von Schweden nach China) als auch ISO – Interne Gründe. Normungsgremien (TC's als auch SC's) sind in ihrem jeweiligen Handeln sehr eigenständig, was im Ergebnis dazu geführt hat, dass sich neben der Initiative im TC 61 weitere Initiativen mit Fokus auf MP-Untersuchungen etabliert haben. Insgesamt gab es zwischenzeitlich drei Initiativen mit ähnlicher Themensetzung und methodischen Ansätzen. Zu nennen sind hier die beiden Gremien ISO TC 147 Water Quality sowie ISO TC 38 Textiles.

Inzwischen ist zwischen ISO TC 61 und ISO TC 147 eine gemeinsame Arbeitsgruppe (JWG) gegründet worden. Im Folgenden ist die Ausgangssituation beider Gruppen mit den jeweils geplanten Arbeitsthemen dargestellt (Abbildung 84).

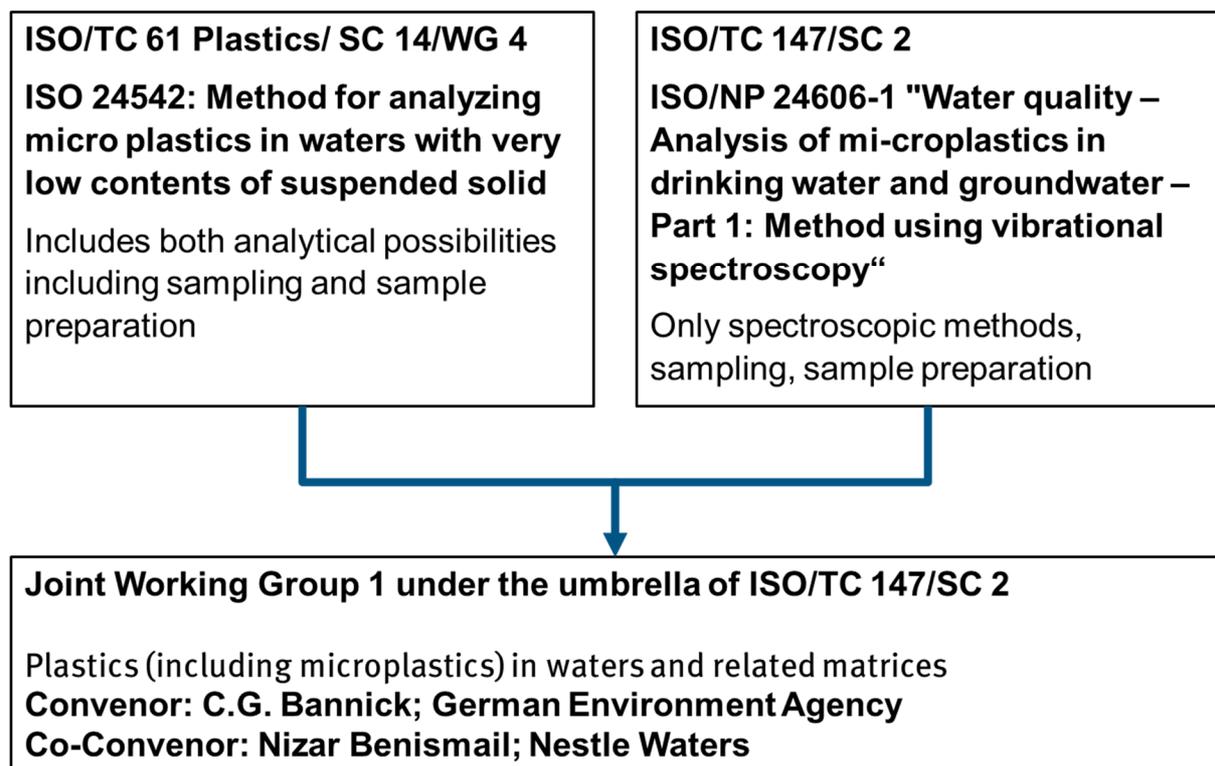


Abbildung 84: Gründung der Joint Working Group durch ISO TC 61 und ISO TC 147

Das Sekretariat der neuen Joint Working Group (JWG) liegt im UBA-finanzierten Normenausschuss Wasserwesen (NAW). Der Convenor der internationalen Arbeitsgruppe als auch des nationalen Spiegelgremiums wird vom UBA gestellt. In der JWG wird nun damit begonnen die spezifischen Methoden zur Mikroplastikanalytik international zu standardisieren. Es liegen Entwürfe zu einem allgemeinen Teil

einschließlich Probenahme, spektroskopischen Verfahren als auch thermoanalytischen Verfahren vor. Die wesentlichen fachlichen Inhalte aller drei Entwürfe stammen aus dem Förderschwerpunkt des BMBF. Forscher und Forscherinnen aus dem Förderschwerpunkt werden aktiv auf nationaler als auch internationaler Ebene eingebunden. Weitere geplante Normen werden sich mit Probenaufbereitung und ökotoxikologischen Verfahren befassen.

Die Arbeiten im ISO TC 38 laufen unabhängig von den eben genannten Arbeiten weiter. Auch in anderen Normungsgremien in ISO und CEN werden Diskussionen zu Normungsprojekten geführt (ISO TC 190 Soil Quality/ CEN TC 444 Horizontal). Die Entwicklung neuer Initiativen bleibt abzuwarten. Vergleicht man den in Abbildung 82 dargestellten Kunststoffkreislauf mit der Gremienstruktur in CEN und ISO sind in beiden Organisationen etwa 40 – 50 Technische Komitees direkt oder indirekt vom Thema Kunststoffe betroffen.

An einer besseren Koordinierung innerhalb ISO und CEN wird weitergearbeitet.

Auswirkungen aktueller Rechtssetzung auf die Normung

Aktuell laufen die Revisionen der Kommunalabwasserrichtlinie als auch der Klärschlammrichtlinie auf Europäischer Ebene an. Mikroplastik ist dort als Thema gesetzt. Über UBA-Stellungnahmen werden Erkenntnisse aus dem BMBF Förderschwerpunkte direkt adressiert. Es finden auch direkte Gespräche zwischen UBA und dem Plastik-Team der EU KOM statt. In diesem Zusammenhang ist UBA durch die enge Verknüpfung mit den Normungsgremien beratend an einem neuen Projekt der KOM zu Kunststoffen in der Umwelt (Schwerpunkt Fasern und Reifenabrieb) beratend beteiligt.

Die Novelle der Trinkwasserrichtlinie wurde Ende 2020 vorgelegt. Sie enthält Hinweise zur Erarbeitung von Methoden zur Untersuchung von Mikroplastik im Trinkwasser bis zum Jahre 2024, damit Mikroplastik in die sogenannte „Watch-List“ aufgenommen werden kann. Auch in der Eco-Design-Richtlinie sollen Anforderungen für den Ablauf von Waschmaschinen ab 2029 greifen. Bis 2025 soll eine Methodik vorgelegt sein. Auf Basis o.g. Arbeiten in ISO und über die sogenannte Wiener Vereinbarung werden diese Verfahrensvorschläge in das Europäische Normenwerk von CEN überführt werden können.

Kernaussagen und Botschaften



**Tracking von (Sub)Mikroplastik unterschiedlicher Identität
– Innovative Analysetools für die toxikologische und
prozesstechnische Bewertung**

Die Kernaussagen und politischen Botschaften, die aus den Arbeiten gemeinsam im Projektkonsortium abgeleitet werden konnten, sind im Folgenden kurz aber prägnant aufgeführt:

Umfassende Analytik von Submikroplastik(partikeln)

Im Rahmen des SubµTrack-Verbundprojektes konnten große **Fortschritte in der Analytik** bezüglich des gesamten analytischen Prozesses zur (Sub)Mikroplastik-Analytik für reale Proben (Validierung, Reproduzierbarkeit, Vergleichbarkeit, Sensitivität) erreicht werden.

So konnten bereits **bekannte Analysemethoden auch für den Submikro-Bereich angewendet und erweitert werden**. Hier sind hervorzuheben:

- Die entwickelte und getestete **Kaskadenfiltration** ist eine **geeignete und statistisch abgesicherte Probenahme-Technik für Wasserproben** für die Mikroplastikanalytik von Partikeln $> 10 \mu\text{m}$ durch die realisierbaren großen Probenvolumina. Die **Probenaufbereitung mittels Fenton-Prozess** erwies sich als geeignet für eine **gute Entfernung** von organischer Materie in der Probe, **bei gleichzeitig geringer Alterung** der Polymerpartikel. Diese konnte **auch für den Submikro-Bereich validiert** werden.
- Die **Teilnahme an Vergleichsversuchen** von BMBF und auf europäischer Ebene (JRC, BAM) führte zu einer erhöhten Vergleichbarkeit innerhalb der Methoden. Die von den Projektpartnern eingesetzten Methoden (RM, FTIR, TED-GC/MS & Pyr-GC/MS) konnten als valide bestätigt werden
- Die **Kombination der Mikroplastik Kaskadenfiltration mit der TED-GC-MS eignete sich für die prozesstechnische Bewertung** und zur Untersuchung von Eintragspfaden für Mikroplastik. Darüber hinaus stellte dies ein relativ schnelles Verfahren zur Bestimmung von Mikroplastik in wässrigen Umweltproben dar, war aber für den Bereich $< 10 \mu\text{m}$ noch nicht sensitiv genug.

- Es konnten **Synergien, Limitierungen und Vorteile der verschiedenen spektroskopischen und thermoanalytischen Analysen-Methoden** aufgezeigt werden.
 - o In den Probenahmekampagnen ergaben **sich für alle Analysemethoden komplementäre Ergebnisse**.
 - o Bei den **spektroskopischen Methoden zeigte sich, dass Partikelanalysen in realen Proben > 20 µm bei FTIR (ca. 11 h) und > 10 µm bei RM zeitlich bedingt sehr gut möglich sind**. Für die zwar noch messbaren Bereiche (FTIR 10 – 20 µm; RM <10 µm) wurde der notwendige Messaufwand jedoch unverhältnismäßig hoch. Aus diesem Grund wurde eine chemometrische Methode für eine repräsentative RM-basierte Analyse von Submikroplastik 1 - 10 µm konzipiert, um den notwendigen Umfang einer Messung besser eingrenzen zu können.
 - o Bei den **thermoanalytischen Methoden** erwies sich die **Pyr-GC-MS** zwar als geeignet für eine Materialcharakterisierung, jedoch als ungeeignet zur **Polymerquantifizierung aus Umweltproben**, da nur geringe Probenmengen appliziert werden können. Dies limitierte die Sensitivität und Handhabung der Methode. Hier konnte die **TED-GC-MS für Wasserproben erfolgreich eingesetzt und validiert werden**, insbesondere auf Grund der höheren absoluten Probenaufgabemenge.

Bei der **Erweiterung des analytischen Spektrums für die Submikroplastikanalytik durch den Einsatz der Feldflussfraktionierung** konnte eine neue analytische Methode für die **Detektion von Nanoplastikpartikeln bis >100 nm** entwickelt werden. Dies ist **einer der ersten Erfolge in Richtung einer Nanoplastik-Analyse**.

In der Kopplung von **FFF-MALS-RM** ermöglichte der MALS-Detektor die physikalische Größencharakterisierung und RM die chemische Identifizierung im Bulk. Hierdurch mussten Partikeln nicht mehr einzeln identifiziert werden, was ein hohes Potenzial für zeit- und kosteneffiziente Messungen bietet. Somit steht hiermit zukünftig eine **zeit-effiziente und automatisierbare High-Throughput Methode** für die Submikroplastik-Analytik zur Verfügung.

Nichtsdestotrotz besteht in der Submikroplastik- und Nanoplastik-Analytik weiterhin ein **unmittelbarer Forschungsbedarf insbesondere in der Entwicklung eines robusten Analysen-Verfahrens für reale Proben**. Insbesondere müssen die Schwerpunkten dabei auf **Aufkonzentrierungsmethoden, Probenvorbereitung und die weitere Verbesserung der Detektionsverfahren** gelegt werden.

Sorption von Spurenstoffen an Mikroplastik

Mikroplastik ist ein Sorbens für organische Spurenstoffe und kann als Vektor für diese dienen, sowie die Bioverfügbarkeit der Spurenstoffe modulieren, ist aber in dieser Eigenschaft vergleichbar mit natürlichen organischen & anorganischen Partikeln.

Ökotoxikologische Studien auf diesem Gebiet zeigen oft eine starke Diskrepanz zwischen in Expositionsversuchen eingesetzten Konzentrationen mit beobachteten Effekten und realen Konzentrationen (Partikel und Spurenstoffe).

- Die Konzentration von natürlichen Partikeln in der Umwelt ist in der Regel wesentlich höher als die von Mikroplastikpartikel.
- Realen Expositionsszenarien und Laborszenarien in Studien sind hinsichtlich Stoffgleichgewichten und Partikeleigenschaften & -Formen meist nicht vergleichbar.
- Die Ad- und Desorption von org. Spurenstoffen konnte in Umweltproben bisher nicht untersucht werden, da durch die gängigen Aufarbeitungsmethoden die potentiell adsorbierten Stoffe verloren gehen.

Neben der Diskrepanz von Laborstudien und Umweltszenarien bezüglich der Effekte, ist über die reale Beladung von Mikroplastikpartikeln in der Umwelt mit organischen Spurenstoffen nur wenig bekannt. Um in diesem Themengebiet neue Erkenntnisse zu erlangen, konnte **eine neuen analytischen Methode** (TD/Pyr-GC/MS) **zur Bestimmung und Quantifizierung von sorbierten Spurenstoffen auf Partikeln entwickelt werden**. Diese Methode kann zukünftig helfen, auch aus der Umwelt isolierte Partikel auf sorbierte Spurenstoffe zu untersuchen.

Die Untersuchungen in Laborkläranlagen konnten **keinen Hinweis** darauf liefern, dass **innerhalb der biologischen Abwasserbehandlung Spurenstoffe verstärkt auf Mikroplastik sorbieren** und in die aquatische Umwelt ausgetragen werden.

Somit **ist derzeit der Beitrag von Mikroplastik als potentieller Vektor für Effekte durch Spurenstoffe in der Umwelt noch nicht aufgeklärt**. Auf Grund der geringen Abundanz im Verhältnis zu anderen natürlichen organischen und anorganischen Partikeln in der aquatischen Umwelt, kann der Beitrag zum Transport von organischen Spurenstoffen jedoch als gering eingeschätzt werden.

Prozesstechnische Bewertung für Kläranlagen

Die Untersuchungen an realen, wie an Laborkläranlagen zeigten, dass **Kläranlagen zwischen 90% und 99% der Mikroplastik-Fracht** bei Trockenwetter aus dem Wasser entfernen. Dabei wird das Mikroplastik **größen- und polymerabhängig über den Fettabscheider oder den Klärschlamm ausgetragen**. Darüber hinaus können **Sandfilter**, als ergänzende Reinigungsstufe, **die Mikroplastikfracht um eine weitere Größenordnung verringern**.

In kontrollierten Untersuchungen an Laborkläranlagen konnten **keine signifikanten Effekte**, selbst nicht durch die Stoßdosierung einer hohen Anzahl an MP-Partikeln, **auf die Reinigungsleistung der (Labor-)Kläranlage**, unabhängig von Größe, Form und Polymertyp beobachtet werden.

Hier konnten für Partikelgrößen **bis 0,5 µm** über den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Partikeln und Fluoreszenzmikroskopie erstmals **Erkenntnisse zum Verhalten von Partikeln dieser Größenordnung in Laborkläranlagen** gewonnen werden. Auch diese Untersuchungen führen zu keiner Änderung der grundlegenden Aussage zur Entfernungsleistung in Laborkläranlagen.

Mithilfe der Kombination von Kaskadenfiltration und TED-GC-MS konnte der Eintrag von Mikroplastik durch Kläranlagen in die aquatische Umwelt ermittelt werden. Allerdings ist die Probenahme nur eine Momentaufnahme (Stichprobe) und es zeigte sich, dass derzeit durch die Funktion und Aufbau dieser Filtrationsanlage nur eine Stichprobe derzeit möglich ist.

Bei den Probenahmen an drei Kläranlagen zeigte sich, dass **Kläranlagen nur wenige mg Jahr⁻¹ EGW⁻¹ an Mikroplastik in die aquatische Umwelt (Trockenwetter) emittieren**. Bisherige Annahmen basierten auf Hochrechnungen aus Partikelzahlen und lagen um bis zum Faktor 100 höher. Im Vergleich zum Eintrag durch Littering und Reifenabrieb [142] kann dieser Eintragspfad für die aquatische Umwelt somit als vernachlässigbar betrachtet werden. Zu Starkregenereignissen und Regenwetter liegen jedoch bisher noch keine Erkenntnisse vor. Auf Grund der veränderten hydraulischen Bedingungen und weiteren Einträgen in die Kanalisation sollte dies in zukünftigen Untersuchungen unbedingt betrachtet werden.

Toxikologische Bewertung

Aquatische Umwelt

Die Ergebnisse gaben keine Hinweise auf toxische Effekte von (Sub)Mikroplastik bei Umweltkonzentrationen, sowie keinen Beleg für eine Bioakkumulation. Verglichen mit den in der Umwelt festgestellten Konzentrationen **von Mikroplastik > 20 µm** weisen darauf hin, dass bei der aktuellen Belastungssituation **keine akuten Effekte/Wirkungen in der aquatischen Umwelt zu erwarten sind**. Für eine Bewertung für **Mikroplastik < 10 µm** fehlen derzeit noch ausreichende Informationen über Umweltvorkommen und -Verhalten.

Eine Schlüsselrolle für die Defizite bei der Bewertung von Mikroplastik spielt die **fehlende Standardisierung und Harmonisierung von toxikologischen Testverfahren und Vorschriften für MP-Partikel**. Hier limitiert z.B. eine fehlende Detailtiefe der Materialcharakterisierung die Vergleichbarkeit von Studien. Es werden derzeit bereits Bestrebungen in der Forschungsgemeinschaft vorgebracht, jedoch besteht weiterhin ein großer Forschungsbedarf für biologische Testverfahren, insbesondere für Partikel-Systeme.

Ein Problem für die Bewertung ist auch durch die meist nur seltene Kommunikation von beobachteten „Nicht-Effekten“ gegeben.

Menschliche Gesundheit

Auch bei den Untersuchungen an Darmzellen konnten keine toxischen Effekte von 100 nm Polystyrol-Partikeln bei Konzentrationen unter 500 Billionen (5×10^{11}) Partikeln pro mL im Testmedium festgestellt werden.

Mit Hilfe des Schweinedarmepithelzellen-Assays (IPEC-J2 Zellen) konnte zwar eine **Aufnahme von 100 nm Partikeln in die Darmzellen nachgewiesen** werden, jedoch sowohl für die **Silica-Referenz als auch für die PS-Partikel**. Es konnten weder zytopathischen Effekte auf die Zellen durch 100 nm PS Partikel beobachtet, noch eindeutige sublethale Effekte identifiziert werden. Basierend auf den Untersuchungen **kann jedoch eine gesundheitliche Gefährdung für den Menschen nicht ausgeschlossen werden**, da eine Aufnahme in die Darmzellen beobachtet und somit ein Transport durch die Darmbarriere nicht ausgeschlossen werden kann. Bezüglich Transport und Effekte auf andere Zellstrukturen und -Typen bedarf es einer weiteren intensiven Forschung. Darüber hinaus kann eine mögliche Vektor-Funktion des

Mikroplastiks für Additive oder andere sorbierte Stoffe hier derzeit nicht bewertet werden.

Soziale & Politische Dimensionen – Politische Botschaften

Die Verantwortung für die Handhabung (d.h. Entsorgung, Vermeidung, Reduktion) von Plastik/Mikroplastik wird medial aber auch im Rahmen zivilgesellschaftlicher Diskurse **oftmals Individuen zugeschrieben, die vorwiegend als Konsument*innen gerahmt werden (im Gegensatz zu Bürger*innen, Wähler*innen)**. Konsument*innen können das Problem des Plastikeintrags in die Umwelt allerdings nicht lösen, dazu braucht es politisches und industrielles Handeln. Leser*innen werden auf eine überfordernde Weise adressiert, was zu Ermüdung der Aufmerksamkeit und des Engagements für Umweltthemen führen könnte.

Die Frage der Vermeidung von Plastik/Mikroplastik muss mit Fragen von **sozialer Gerechtigkeit** zusammengedacht werden: **wer kann sich ein (mikro)plastikfreies Leben leisten?** Welche Ressourcen braucht es für ein (mikro)plastikfreies Leben? Welche Fragen der sozialen Gerechtigkeit bleiben im gegenwärtigen Diskurs unbesprochen? Derzeit gibt es hier z.B. eine starke **Gender-Dimension**, bei der primär die Versorger*innen von Familien und Kindern angesprochen werden. Daneben zeigt sich auch, dass der Diskurs der Zero-Wast Bewegung häufig eher die **Lebensrealitäten der Mittelschicht** widerspiegelt und adressiert, als jene von sozio-ökonomisch benachteiligten Gruppen.

Es wäre daher wichtig, dass sich **sowohl der mediale als auch der zivilgesellschaftliche Diskurs hin zu Fragen der kollektiven Verantwortung bewegt und verstärkt Politik und Industrie adressiert**. Dort gibt es die besten Hebel um den Eintrag von (Mikro-)Plastik in die Umwelt zu verringern und die Rahmbedingungen zu schaffen, um eine **Plastikreduktion im Alltag von Menschen in der Gesellschaft ohne soziale Hürden und Verschärfung von Geschlechterungerechtigkeit** zu ermöglichen.

In der Analyse der wissenschaftlichen Akteursgruppe, wurde das **schwierige Verhältnis zwischen Wissenschaft und Medien deutlich**, denn **der mediale Hype um Mikroplastik kann zu einer Unterwanderung von wissenschaftlicher Glaubwürdigkeit führen**, vor allem die frühe medialen Affirmierung eines Risikos für

Gesundheit und Umwelt, die nicht dem wissenschaftlichen Konsensus entspricht. **Die Rolle und Verantwortung der Medien für das Verhältnis zwischen Wissenschaft und Gesellschaft muss verstärkt thematisiert und kritisch reflektiert werden.**

Rechtsetzung und Normungsvorhaben

Mit der Plastikstrategie steht das Thema „Kunststoffe in der Umwelt“ in der EU oben auf der Agenda. Im Zuge der aktuellen Revisionen von Kommunalabwasserrichtlinie sowie Klärschlammrichtlinie sowie Trinkwasserrichtlinie und dem Vorschlag der ECHA Mikroplastikstoffe unter das REACH-System zu stellen, stehen Mikroplastikstoffe wieder auf der Agenda. Bei den Verhandlungen zur EU-Water-Reuse-Richtlinie war ein **Einbringen von Anforderungen aufgrund fehlender Methoden gescheitert**. Im **Regelungsvorschlag der ECHA zu Mikroplastik sind Anforderungen genannt, die methodisch bislang nicht unterlegt sind (Gesamtgehalte)**.

Für die Rechtssetzung stellt sich ein Hauptproblem heraus: **ohne verlässliche und normierte Verfahren** für die Quantifizierung von Mikroplastikstoffen **gibt es keine materiellen Anforderungen**. Nachweis-Methoden und -Verfahren sind die Basis für die (Grenz-)Wertsetzung. Die entsprechenden Verfahren müssen validiert und damit gerichtsfest sein.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben mit der Standardisierung von Verfahren zur Mikroplastikuntersuchung begonnen. Alle Aktivitäten sind über DIN kanalisiert (Vertrag Bundesrepublik Deutschland mit DIN). **Aktuell wird versucht, die verschiedenen Initiativen in ISO und CEN zusammenzuführen**, damit es zu keiner Methodenvielfalt kommt, welche unterschiedliche Verfahren beschreiben, die sich möglicherweise widersprechen. Die relevanten Gremien werden größtenteils von DIN betreut. Zeithorizont zur Entwicklung eines Standards 3 - 5 Jahre. Submikroplastikpartikel stehen jedoch nicht im Fokus aktueller Normungsprozesse.

Aufgrund der globalen Herausforderungen ist es **notwendig international abgestimmte Verfahren zu entwickeln**, um eine **vergleichbare Datengrundlage** schaffen zu können. Die EU-Kommission akzeptiert i.d.R. nur CEN Normen. Über die Wiener Vereinbarung ist jedoch gewährleistet, dass ISO Normen zu CEN Normen werden. Diese werden dann als DIN/CEN/ISO Verfahren in das nationale Normenwerk übernommen.

Literatur

1. PlasticsEurope. Plastics - the Facts 2017. Available online: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2017/> (accessed on 5 December 2021).
2. PlasticsEurope. Plastics - the Facts 2020. Available online: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2020/> (accessed on 5 December 2021).
3. da Costa, J.P.; Santos, P.S.M.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T. (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. *Sci. Total Environ.* **2016**, *566-567*, 15–26, doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.041.
4. Mattsson, K.; Hansson, L.-A.; Cedervall, T. Nano-plastics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2015**, *17*, 1712–1721, doi:10.1039/c5em00227c.
5. Ivleva, N.P.; Wiesheu, A.C.; Niessner, R. Microplastic in Aquatic Ecosystems. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2017**, *56*, 1720–1739, doi:10.1002/anie.201606957.
6. Caruso, G. Microplastics in Marine Environments: Possible Interactions with the Microbial Assemblage. *J Pollut Eff Cont* **2015**, *03*, doi:10.4172/2375-4397.1000e111.
7. Mattsson, K.; Jovic, S.; Doverbratt, I.; Hansson, L.-A. Nanoplastics in the Aquatic Environment. *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*; Elsevier, 2018; pp 379–399, ISBN 9780128137475.
8. Stephens, B.; Azimi, P.; El Orch, Z.; Ramos, T. Ultrafine particle emissions from desktop 3D printers. *Atmospheric Environment* **2013**, *79*, 334–339, doi:10.1016/j.atmosenv.2013.06.050.
9. Salvati, A.; Aberg, C.; dos Santos, T.; Varela, J.; Pinto, P.; Lynch, I.; Dawson, K.A. Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: toward models of uptake kinetics. *Nanomedicine* **2011**, *7*, 818–826, doi:10.1016/j.nano.2011.03.005.
10. Rossi, G.; Barnoud, J.; Monticelli, L. Polystyrene Nanoparticles Perturb Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 241–246, doi:10.1021/jz402234c.
11. Forte, M.; Iachetta, G.; Tussellino, M.; Carotenuto, R.; Prisco, M.; Falco, M. de; Laforgia, V.; Valiante, S. Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells. *Toxicol. In Vitro* **2016**, *31*, 126–136, doi:10.1016/j.tiv.2015.11.006.
12. Canesi, L.; Ciacci, C.; Bergami, E.; Monopoli, M.P.; Dawson, K.A.; Papa, S.; Canonico, B.; Corsi, I. Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Mar. Environ. Res.* **2015**, *111*, 34–40, doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.008.
13. Xia, T.; Kovoichich, M.; Liong, M.; Zink, J.I.; Nel, A.E. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS Nano* **2008**, *2*, 85–96, doi:10.1021/nn700256c.
14. Ugelstad, J.; Mørk, P.C.; Kaggerud, K.H.; Ellingsen, T.; Berge, A. Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation. *Advances in Colloid and Interface Science* **1980**, *13*, 101–140, doi:10.1016/0001-8686(80)87003-5.
15. Schnurre, S.M. Synthesemethoden für maßgeschneiderte Nanopartikel aus der Gasphase. Available online: <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/giftach.11312> (accessed on 21 October 2021).
16. Hahndorf, M. Erstmals gelingt Erweiterung in die zweite Dimension: Bottom-up-Synthese von kristallinen 2D-Polymeren. Available online: <https://tu-dresden.de/tu->

- [dresden/newsportal/news/erstmal-gelingt-erweiterung-in-die-zweite-dimension-bottom-up-synthese-von-kristallinen-2d-polymeren](https://www.dresden.newsportal/news/erstmal-gelingt-erweiterung-in-die-zweite-dimension-bottom-up-synthese-von-kristallinen-2d-polymeren) (accessed on 21 October 2021).
17. Esch, E. von der; Lanzinger, M.; Kohles, A.J.; Schwaferts, C.; Weisser, J.; Hofmann, T.; Glas, K.; Elsner, M.; Ivleva, N.P. Simple Generation of Suspensible Secondary Microplastic Reference Particles via Ultrasound Treatment. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 169, doi:10.3389/fchem.2020.00169.
 18. Pittroff, M.; Müller, Y.K.; Witzig, C.S.; Scheurer, M.; Storck, F.R.; Zumbülte, N. Microplastic analysis in drinking water based on fractionated filtration sampling and Raman microspectroscopy. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2021**, doi:10.1007/S11356-021-12467-Y.
 19. Funck, M.; Yildirim, A.; Nickel, C.; Schram, J.; Schmidt, T.C.; Tuerk, J. Identification of microplastics in wastewater after cascade filtration using Pyrolysis-GC-MS. *MethodsX* **2020**, *7*, 100778, doi:10.1016/j.mex.2019.100778.
 20. Bannick, C.G.; Szewzyk, R.; Ricking, M.; Schniegler, S.; Obermaier, N.; Barthel, A.K.; Altmann, K.; Eisentraut, P.; Braun, U. Development and testing of a fractionated filtration for sampling of microplastics in water. *Water Res.* **2019**, *149*, 650–658, doi:10.1016/j.watres.2018.10.045.
 21. Braun, U.; Jekel, M.; Gerds, G.; Ivleva, N.P.; Reiber, J. Microplastics Analytics: Sampling, Preparation and Detection Methods. Discussion Paper. Available online: <https://bmbf-plastik.de/sites/default/files/2019-02/Discussion%20Paper%20Mikroplastics%20Analytics%20Nov%202018.pdf> (accessed on 21 October 2021).
 22. Tagg, A.S.; Harrison, J.P.; Ju-Nam, Y.; Sapp, M.; Bradley, E.L.; Sinclair, C.J.; Ojeda, J.J. Fenton's reagent for the rapid and efficient isolation of microplastics from wastewater. *Chem. Commun. (Camb)* **2016**, *53*, 372–375, doi:10.1039/C6CC08798A.
 23. Dehaut, A.; Cassone, A.-L.; Frère, L.; Hermabessiere, L.; Himber, C.; Rinnert, E.; Rivière, G.; Lambert, C.; Soudant, P.; Huvet, A.; et al. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environ. Pollut.* **2016**, *215*, 223–233, doi:10.1016/j.envpol.2016.05.018.
 24. Hurley, R.R.; Lusher, A.L.; Olsen, M.; Nizzetto, L. Validation of a Method for Extracting Microplastics from Complex, Organic-Rich, Environmental Matrices. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52*, 7409–7417, doi:10.1021/acs.est.8b01517.
 25. Karami, A.; Golieskardi, A.; Choo, C.K.; Romano, N.; Ho, Y.B.; Salamatinia, B. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Sci. Total Environ.* **2017**, *578*, 485–494, doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.213.
 26. Munno, K.; Helm, P.A.; Jackson, D.A.; Rochman, C.; Sims, A. Impacts of temperature and selected chemical digestion methods on microplastic particles. *Environ. Toxicol. Chem.* **2018**, *37*, 91–98, doi:10.1002/etc.3935.
 27. Prata, J.C.; da Costa, J.P.; Girão, A.V.; Lopes, I.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T. Identifying a quick and efficient method of removing organic matter without damaging microplastic samples. *Sci. Total Environ.* **2019**, *686*, 131–139, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.05.456.
 28. Sujathan, S.; Kniggendorf, A.-K.; Kumar, A.; Roth, B.; Rosenwinkel, K.-H.; Nogueira, R. Heat and Bleach: A Cost-Efficient Method for Extracting Microplastics from Return Activated Sludge. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2017**, *73*, 641–648, doi:10.1007/s00244-017-0415-8.

29. Tagg, A.S.; Sapp, M.; Harrison, J.P.; Ojeda, J.J. Identification and Quantification of Microplastics in Wastewater Using Focal Plane Array-Based Reflectance Micro-FT-IR Imaging. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6032–6040, doi:10.1021/acs.analchem.5b00495.
30. Al-Azzawi, M.S.M.; Kefer, S.; Weißer, J.; Reichel, J.; Schwaller, C.; Glas, K.; Knoop, O.; Drewes, J.E. Validation of Sample Preparation Methods for Microplastic Analysis in Wastewater Matrices—Reproducibility and Standardization. *Water* **2020**, *12*, 2445, doi:10.3390/w12092445.
31. Peñalver, R.; Arroyo-Manzanares, N.; López-García, I.; Hernández-Córdoba, M. An overview of microplastics characterization by thermal analysis. *Chemosphere* **2020**, *242*, 125170, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125170.
32. Dümichen, E.; Eisentraut, P.; Bannick, C.G.; Barthel, A.-K.; Senz, R.; Braun, U. Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method. *Chemosphere* **2017**, *174*, 572–584, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02.010.
33. Duemichen, E.; Braun, U.; Senz, R.; Fabian, G.; Sturm, H. Assessment of a new method for the analysis of decomposition gases of polymers by a combining thermogravimetric solid-phase extraction and thermal desorption gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1354*, 117–128, doi:10.1016/j.chroma.2014.05.057.
34. Fischer, M.; Scholz-Böttcher, B.M. Simultaneous Trace Identification and Quantification of Common Types of Microplastics in Environmental Samples by Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 5052–5060, doi:10.1021/acs.est.6b06362.
35. Tsuge, S.; Ohtani, H.; Watanabe, C. *Pyrolysis-GC/MS data book of synthetic polymers: Pyrograms, thermograms and MS of pyrolyzates*; Elsevier: Amsterdam, Boston, 2012, ISBN 9780444538925.
36. Duemichen, E.; Eisentraut, P.; Celina, M.; Braun, U. Automated thermal extraction-desorption gas chromatography mass spectrometry: A multifunctional tool for comprehensive characterization of polymers and their degradation products. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1592*, 133–142, doi:10.1016/j.chroma.2019.01.033.
37. Funck, M.; Al-Azzawi, M.S.M.; Yildirim, A.; Knoop, O.; Schmidt, T.C.; Drewes, J.E.; Tuerk, J. Release of microplastic particles to the aquatic environment via wastewater treatment plants: The impact of sand filters as tertiary treatment. *Chemical Engineering Journal* **2021**, *426*, 130933, doi:10.1016/j.cej.2021.130933.
38. Käßler, A.; Fischer, D.; Oberbeckmann, S.; Schernewski, G.; Labrenz, M.; Eichhorn, K.-J.; Voit, B. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 8377–8391, doi:10.1007/s00216-016-9956-3.
39. Schwaferts, C.; Schwaferts, P.; Esch, E. von der; Elsner, M.; Ivleva, N.P. Which particles to select, and if yes, how many? : Subsampling methods for Raman microspectroscopic analysis of very small microplastic. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413*, 3625–3641, doi:10.1007/s00216-021-03326-3.
40. Fang, C.; Sobhani, Z.; Zhang, X.; McCourt, L.; Routley, B.; Gibson, C.T.; Naidu, R. Identification and visualisation of microplastics / nanoplastics by Raman imaging (iii): algorithm to cross-check multi-images. *Water Res.* **2021**, *194*, 116913, doi:10.1016/j.watres.2021.116913.
41. Fang, C.; Sobhani, Z.; Zhang, X.; Gibson, C.T.; Tang, Y.; Naidu, R. Identification and visualisation of microplastics/ nanoplastics by Raman imaging (ii): Smaller than the

- diffraction limit of laser? *Water Res.* **2020**, *183*, 116046, doi:10.1016/j.watres.2020.116046.
42. Sobhani, Z.; Zhang, X.; Gibson, C.; Naidu, R.; Megharaj, M.; Fang, C. Identification and visualisation of microplastics/nanoplastics by Raman imaging (i): Down to 100 nm. *Water Res.* **2020**, *174*, 115658, doi:10.1016/j.watres.2020.115658.
 43. Sarau, G.; Kling, L.; Oßmann, B.E.; Unger, A.-K.; Vogler, F.; Christiansen, S.H. Correlative Microscopy and Spectroscopy Workflow for Microplastics. *Appl. Spectrosc.* **2020**, *74*, 1155–1160, doi:10.1177/0003702820916250.
 44. Schmidt, R.; Nachtnebel, M.; Dienstleder, M.; Mertschnigg, S.; Schroettner, H.; Zankel, A.; Poteser, M.; Hutter, H.-P.; Eppel, W.; Fitzek, H. Correlative SEM-Raman microscopy to reveal nanoplastics in complex environments. *Micron* **2021**, *144*, 103034, doi:10.1016/j.micron.2021.103034.
 45. Zhang, W.; Dong, Z.; Zhu, L.; Hou, Y.; Qiu, Y. Direct Observation of the Release of Nanoplastics from Commercially Recycled Plastics with Correlative Raman Imaging and Scanning Electron Microscopy. *ACS Nano* **2020**, *14*, 7920–7926, doi:10.1021/acsnano.0c02878.
 46. Gigault, J.; El Hadri, H.; Reynaud, S.; Deniau, E.; Grassl, B. Asymmetrical flow field flow fractionation methods to characterize submicron particles: application to carbon-based aggregates and nanoplastics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 6761–6769, doi:10.1007/s00216-017-0629-7.
 47. Mintenig, S.M.; Bäuerlein, P.S.; Koelmans, A.A.; Dekker, S.C.; van Wezel, A.P. Closing the gap between small and smaller: towards a framework to analyse nano- and microplastics in aqueous environmental samples. *Environ. Sci.: Nano* **2018**, *5*, 1640–1649, doi:10.1039/C8EN00186C.
 48. Battistini, B.; Petrucci, F.; Bocca, B. In-house validation of AF4-MALS-UV for polystyrene nanoplastic analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413*, 3027–3039, doi:10.1007/s00216-021-03238-2.
 49. El Hadri, H.; Gigault, J.; Maxit, B.; Grassl, B.; Reynaud, S. Nanoplastic from mechanically degraded primary and secondary microplastics for environmental assessments. *NanoImpact* **2020**, *17*, 100206, doi:10.1016/j.impact.2019.100206.
 50. Abdolapur Monikh, F.; Grundschober, N.; Romeijn, S.; Arenas-Lago, D.; Vijver, M.G.; Jiskoot, W.; Peijnenburg, W.J.G.M. Development of methods for extraction and analytical characterization of carbon-based nanomaterials (nanoplastics and carbon nanotubes) in biological and environmental matrices by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Environ. Pollut.* **2019**, *255*, 113304, doi:10.1016/j.envpol.2019.113304.
 51. Correia, M.; Loeschner, K. Detection of nanoplastics in food by asymmetric flow field-flow fractionation coupled to multi-angle light scattering: possibilities, challenges and analytical limitations. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 5603–5615, doi:10.1007/s00216-018-0919-8.
 52. Luo, X.-l.; Wu, Y.-t.; Zhang, L.-y.; Li, K.-x.; Jia, T.-j.; Chen, Y.; Zhou, L.-h.; Huang, P.-l. An effective solution to simultaneously analyze size, mass and number concentration of polydisperse nanoplastics in a biological matrix: asymmetrical flow field fractionation coupled with a diode array detector and multiangle light scattering. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 12902–12906, doi:10.1039/D1RA00450F.
 53. Schwaferts, C.; Sogne, V.; Welz, R.; Meier, F.; Klein, T.; Niessner, R.; Elsner, M.; Ivleva, N.P. Nanoplastic Analysis by Online Coupling of Raman Microscopy and Field-Flow Fractionation Enabled by Optical Tweezers. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 5813–5820, doi:10.1021/acs.analchem.9b05336.

54. Kniggendorf, A.-K.; Wetzel, C.; Roth, B. Microplastics Detection in Streaming Tap Water with Raman Spectroscopy. *Sensors (Basel)* **2019**, *19*, doi:10.3390/s19081839.
55. Suzuki, Y.; Kobayashi, K.; Wakisaka, Y.; Deng, D.; Tanaka, S.; Huang, C.-J.; Lei, C.; Sun, C.-W.; Liu, H.; Fujiwaki, Y.; et al. Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 15842–15848, doi:10.1073/pnas.1902322116).
56. Gillibert, R.; Balakrishnan, G.; Deshoules, Q.; Tardivel, M.; Magazzù, A.; Donato, M.G.; Maragò, O.M.; La Lamy de Chapelle, M.; Colas, F.; Lagarde, F.; et al. Raman Tweezers for Small Microplastics and Nanoplastics Identification in Seawater. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 9003–9013, doi:10.1021/acs.est.9b03105.
57. Zhang, S.; Sun, Y.; Liu, B.; Li, R. Full size microplastics in crab and fish collected from the mangrove wetland of Beibu Gulf: Evidences from Raman Tweezers (1-20 μm) and spectroscopy (20-5000 μm). *Sci. Total Environ.* **2021**, *759*, 143504, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143504.
58. Raymond, G.; Magazzù, A.; Callegari, A.; Brente Ciriza, D.; Antonino, F.; Donato, M.G.; Maragò, O.M.; Volpe, G.; La Lamy de Chapelle, M.; Lagarde, F.; et al. *Raman Tweezers for Tire and Road Wear Micro- and Nanoparticles analysis*, 2021.
59. Ripken, C.; Kotsifaki, D.G.; Nic Chormaic, S. Analysis of small microplastics in coastal surface water samples of the subtropical island of Okinawa, Japan. *Sci. Total Environ.* **2021**, *760*, 143927, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143927.
60. Nickel, C.; Kaminski, H.; Hellack, B.; Quass, U.; John, A.; Klemm, O.; Kuhlbusch, T.A.J. Size Resolved Particle Number Emission Factors of Motorway Traffic Differentiated between Heavy and Light Duty Vehicles. *Aerosol Air Qual. Res.* **2013**, *13*, 450–461, doi:10.4209/aaqr.2012.07.0187.
61. Sympatec GmbH. Partikelmesstechnik Laserbeugung. Available online: <https://www.sympatec.com/de/partikelmesstechnik/sensoren/laserbeugung/>.
62. Malvern Panalytical. Laserbeugung: Partikelgrößenverteilung von Nanometern bis zu Millimetern. Available online: <https://www.malvernpanalytical.com/de/products/technology/light-scattering/laser-diffraction>.
63. Teuten, E.L.; Rowland, S.J.; Galloway, T.S.; Thompson, R.C. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 7759–7764, doi:10.1021/es071737s.
64. Rochman, C.M.; Hoh, E.; Hentschel, B.T.; Kaye, S. Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 1646–1654, doi:10.1021/es303700s.
65. Alimi, O.S.; Farnier Budarz, J.; Hernandez, L.M.; Tufenkji, N. Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52*, 1704–1724, doi:10.1021/acs.est.7b05559.
66. Hüffer, T.; Hofmann, T. Sorption of non-polar organic compounds by micro-sized plastic particles in aqueous solution. *Environ. Pollut.* **2016**, *214*, 194–201, doi:10.1016/j.envpol.2016.04.018.
67. Karapanagioti, H.K.; Klontza, I. Testing phenanthrene distribution properties of virgin plastic pellets and plastic eroded pellets found on Lesvos island beaches (Greece). *Mar. Environ. Res.* **2008**, *65*, 283–290, doi:10.1016/j.marenvres.2007.11.005.

68. Lee, H.; Shim, W.J.; Kwon, J.-H. Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. *Sci. Total Environ.* **2014**, *470-471*, 1545–1552, doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.023.
69. Pascall, M.A.; Zabik, M.E.; Zabik, M.J.; Hernandez, R.J. Uptake of polychlorinated biphenyls (PCBs) from an aqueous medium by polyethylene, polyvinyl chloride, and polystyrene films. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 164–169, doi:10.1021/jf048978t.
70. Teuten, E.L.; Saquing, J.M.; Knappe, D.R.U.; Barlaz, M.A.; Jonsson, S.; Björn, A.; Rowland, S.J.; Thompson, R.C.; Galloway, T.S.; Yamashita, R.; et al. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2009**, *364*, 2027–2045, doi:10.1098/rstb.2008.0284.
71. Bakir, A.; O'Connor, I.A.; Rowland, S.J.; Hendriks, A.J.; Thompson, R.C. Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. *Environ. Pollut.* **2016**, *219*, 56–65, doi:10.1016/j.envpol.2016.09.046.
72. Guoin, T.; Roche, N.; Lohmann, R.; Hodges, G. A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 1466–1472, doi:10.1021/es1032025.
73. Koelmans, A.A.; Bakir, A.; Burton, G.A.; Janssen, C.R. Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, 3315–3326, doi:10.1021/acs.est.5b06069.
74. Ziccardi, L.M.; Edgington, A.; Hentz, K.; Kulacki, K.J.; Kane Driscoll, S. Microplastics as vectors for bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in the marine environment: A state-of-the-science review. *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, *35*, 1667–1676, doi:10.1002/etc.3461.
75. Reichel, J.; Graßmann, J.; Knoop, O.; Drewes, J.E.; Letzel, T. Organic Contaminants and Interactions with Micro- and Nano-Plastics in the Aqueous Environment: Review of Analytical Methods. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26041164.
76. Guo, X.; Wang, J. Sorption of antibiotics onto aged microplastics in freshwater and seawater. *Mar. Pollut. Bull.* **2019**, *149*, 110511, doi:10.1016/j.marpolbul.2019.110511.
77. Reichel, J.; Graßmann, J.; Letzel, T.; Drewes, J.E. Systematic Development of a Simultaneous Determination of Plastic Particle Identity and Adsorbed Organic Compounds by Thermodesorption-Pyrolysis GC/MS (TD-Pyr-GC/MS). *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25214985.
78. Seidensticker, S.; Zarfl, C.; Cirpka, O.A.; Fellenberg, G.; Grathwohl, P. Shift in Mass Transfer of Wastewater Contaminants from Microplastics in the Presence of Dissolved Substances. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 12254–12263, doi:10.1021/acs.est.7b02664.
79. Sun, H.; Jiao, R.; Wang, D. The difference of aggregation mechanism between microplastics and nanoplastics: Role of Brownian motion and structural layer force. *Environ. Pollut.* **2021**, *268*, 115942, doi:10.1016/j.envpol.2020.115942.
80. Zhang, X.; Zheng, M.; Yin, X.; Wang, L.; Lou, Y.; Qu, L.; Liu, X.; Zhu, H.; Qiu, Y. Sorption of 3,6-dibromocarbazole and 1,3,6,8-tetrabromocarbazole by microplastics. *Mar. Pollut. Bull.* **2019**, *138*, 458–463, doi:10.1016/j.marpolbul.2018.11.055.
81. Wang, J.; Liu, X.; Liu, G.; Zhang, Z.; Wu, H.; Cui, B.; Bai, J.; Zhang, W. Size effect of polystyrene microplastics on sorption of phenanthrene and nitrobenzene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *173*, 331–338, doi:10.1016/j.ecoenv.2019.02.037.

82. Qiu, Y.; Zheng, M.; Wang, L.; Zhao, Q.; Lou, Y.; Shi, L.; Qu, L. Sorption of polyhalogenated carbazoles (PHCs) to microplastics. *Mar. Pollut. Bull.* **2019**, *146*, 718–728, doi:10.1016/j.marpolbul.2019.07.034.
83. Zhang, J.; Chen, H.; He, H.; Cheng, X.; Ma, T.; Hu, J.; Yang, S.; Li, S.; Zhang, L. Adsorption behavior and mechanism of 9-Nitroanthracene on typical microplastics in aqueous solutions. *Chemosphere* **2020**, *245*, 125628, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125628.
84. Wang, W.; Wang, J. Comparative evaluation of sorption kinetics and isotherms of pyrene onto microplastics. *Chemosphere* **2018**, *193*, 567–573, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.11.078.
85. Lin, W.; Jiang, R.; Wu, J.; Wei, S.; Yin, L.; Xiao, X.; Hu, S.; Shen, Y.; Ouyang, G. Sorption properties of hydrophobic organic chemicals to micro-sized polystyrene particles. *Sci. Total Environ.* **2019**, *690*, 565–572, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.537.
86. Bakir, A.; Rowland, S.J.; Thompson, R.C. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environ. Pollut.* **2014**, *185*, 16–23, doi:10.1016/j.envpol.2013.10.007.
87. Liu, X.; Shi, H.; Xie, B.; Dionysiou, D.D.; Zhao, Y. Microplastics as Both a Sink and a Source of Bisphenol A in the Marine Environment. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 10188–10196, doi:10.1021/acs.est.9b02834.
88. Liu, Z.; Qin, Q.; Hu, Z.; Yan, L.; leong, U.-I.; Xu, Y. Adsorption of chlorophenols on polyethylene terephthalate microplastics from aqueous environments: Kinetics, mechanisms and influencing factors. *Environ. Pollut.* **2020**, *265*, 114926, doi:10.1016/j.envpol.2020.114926.
89. Ma, J.; Zhao, J.; Zhu, Z.; Li, L.; Yu, F. Effect of microplastic size on the adsorption behavior and mechanism of triclosan on polyvinyl chloride. *Environ. Pollut.* **2019**, *254*, 113104, doi:10.1016/j.envpol.2019.113104.
90. Velzeboer, I.; Kwadijk, C.J.A.F.; Koelmans, A.A. Strong sorption of PCBs to nanoplastics, microplastics, carbon nanotubes, and fullerenes. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 4869–4876, doi:10.1021/es405721v.
91. Yu, H.; Yang, B.; Waigi, M.G.; Peng, F.; Li, Z.; Hu, X. The effects of functional groups on the sorption of naphthalene on microplastics. *Chemosphere* **2020**, *261*, 127592, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127592.
92. Dümichen, E.; Barthel, A.-K.; Braun, U.; Bannick, C.G.; Brand, K.; Jekel, M.; Senz, R. Analysis of polyethylene microplastics in environmental samples, using a thermal decomposition method. *Water Res.* **2015**, *85*, 451–457, doi:10.1016/j.watres.2015.09.002.
93. Fries, E.; Dekiff, J.H.; Willmeyer, J.; Nuelle, M.-T.; Ebert, M.; Remy, D. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2013**, *15*, 1949–1956, doi:10.1039/c3em00214d.
94. Herrera, M.; Matuschek, G.; Kettrup, A. Fast identification of polymer additives by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2003**, *70*, 35–42, doi:10.1016/s0165-2370(02)00078-5.
95. La Nasa, J.; Biale, G.; Mattonai, M.; Modugno, F. Microwave-assisted solvent extraction and double-shot analytical pyrolysis for the quali-quantitation of plasticizers and microplastics in beach sand samples. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *401*, 123287, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123287.

96. Samanta, S.K.; Singh, O.V.; Jain, R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology* **2002**, *20*, 243–248, doi:10.1016/s0167-7799(02)01943-1.
97. Tian, Y.-T.; Liu, Z.-W.; Yao, Y.; Yang, Z.; Zhang, T. Effect of alpha-cypermethrin and theta-cypermethrin on delayed rectifier potassium currents in rat hippocampal neurons. *Neurotoxicology* **2009**, *30*, 269–273, doi:10.1016/j.neuro.2009.01.001.
98. Adolfsson-Erici, M.; Pettersson, M.; Parkkonen, J.; Sturve, J. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* **2002**, *46*, 1485–1489, doi:10.1016/s0045-6535(01)00255-7.
99. Bester, K. Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2005**, *49*, 9–17, doi:10.1007/s00244-004-0155-4.
100. Ng, D.; Guillet, J.E. Studies of the antenna effect in polymer molecules. 3. Singlet electronic energy transfer in poly[(9-phenanthryl)methyl methacrylate] and its copolymers. *Macromolecules* **1982**, *15*, 724–727, doi:10.1021/ma00231a009.
101. Gong, W.; Jiang, M.; Han, P.; Liang, G.; Zhang, T.; Liu, G. Comparative analysis on the sorption kinetics and isotherms of fipronil on nondegradable and biodegradable microplastics. *Environ. Pollut.* **2019**, *254*, 112927, doi:10.1016/j.envpol.2019.07.095.
102. Li, Y.; Li, M.; Li, Z.; Yang, L.; Liu, X. Effects of particle size and solution chemistry on Triclosan sorption on polystyrene microplastic. *Chemosphere* **2019**, *231*, 308–314, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.05.116.
103. Wang, W.; Wang, J. Different partition of polycyclic aromatic hydrocarbon on environmental particulates in freshwater: Microplastics in comparison to natural sediment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *147*, 648–655, doi:10.1016/j.ecoenv.2017.09.029.
104. Xu, B.; Liu, F.; Brookes, P.C.; Xu, J. Microplastics play a minor role in tetracycline sorption in the presence of dissolved organic matter. *Environ. Pollut.* **2018**, *240*, 87–94, doi:10.1016/j.envpol.2018.04.113.
105. Napper, I.E.; Bakir, A.; Rowland, S.J.; Thompson, R.C. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Mar. Pollut. Bull.* **2015**, *99*, 178–185, doi:10.1016/j.marpolbul.2015.07.029.
106. Murphy, F.; Ewins, C.; Carbonnier, F.; Quinn, B. Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, 5800–5808, doi:10.1021/acs.est.5b05416.
107. Okoffo, E.D.; O'Brien, S.; O'Brien, J.W.; Tschärke, B.J.; Thomas, K.V. Wastewater treatment plants as a source of plastics in the environment: a review of occurrence, methods for identification, quantification and fate. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* **2019**, *5*, 1908–1931, doi:10.1039/C9EW00428A.
108. Ó Briain, O.; Marques Mendes, A.R.; McCarron, S.; Healy, M.G.; Morrison, L. The role of wet wipes and sanitary towels as a source of white microplastic fibres in the marine environment. *Water Res.* **2020**, *182*, 116021, doi:10.1016/j.watres.2020.116021.
109. Bayo, J.; Olmos, S.; López-Castellanos, J. Microplastics in an urban wastewater treatment plant: The influence of physicochemical parameters and environmental factors. *Chemosphere* **2020**, *238*, 124593, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124593.
110. Bartonitz, A.; Anyanwu, I.N.; Geist, J.; Imhof, H.K.; Reichel, J.; Graßmann, J.; Drewes, J.E.; Beggel, S. Modulation of PAH toxicity on the freshwater organism *G. roeseli* by microparticles. *Environ. Pollut.* **2020**, *260*, 113999, doi:10.1016/j.envpol.2020.113999.

111. Sørensen, L.; Rogers, E.; Altin, D.; Salaberria, I.; Booth, A.M. Sorption of PAHs to microplastic and their bioavailability and toxicity to marine copepods under co-exposure conditions. *Environ. Pollut.* **2020**, *258*, 113844, doi:10.1016/j.envpol.2019.113844.
112. Tourinho, P.S.; Kočí, V.; Loureiro, S.; van Gestel, C.A.M. Partitioning of chemical contaminants to microplastics: Sorption mechanisms, environmental distribution and effects on toxicity and bioaccumulation. *Environ. Pollut.* **2019**, *252*, 1246–1256, doi:10.1016/j.envpol.2019.06.030.
113. Guo, X.; Chen, C.; Wang, J. Sorption of sulfamethoxazole onto six types of microplastics. *Chemosphere* **2019**, *228*, 300–308, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.04.155.
114. Koelmans, A.A.; Mohamed Nor, N.H.; Hermsen, E.; Kooi, M.; Mintenig, S.M.; France, J. de. Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Res.* **2019**, *155*, 410–422, doi:10.1016/j.watres.2019.02.054.
115. Ambrogi, V.; Carfagna, C.; Cerruti, P.; Marturano, V. Additives in Polymers. *Modification of Polymer Properties*; Elsevier, 2017; pp 87–108, ISBN 9780323443531.
116. Ribeiro, F.; O'Brien, J.W.; Galloway, T.; Thomas, K.V. Accumulation and fate of nano- and micro-plastics and associated contaminants in organisms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *111*, 139–147, doi:10.1016/j.trac.2018.12.010.
117. Gies, E.A.; LeNoble, J.L.; Noël, M.; Etemadifar, A.; Bishay, F.; Hall, E.R.; Ross, P.S. Retention of microplastics in a major secondary wastewater treatment plant in Vancouver, Canada. *Mar. Pollut. Bull.* **2018**, *133*, 553–561, doi:10.1016/j.marpolbul.2018.06.006.
118. Bretas Alvim, C.; Mendoza-Roca, J.A.; Bes-Piá, A. Wastewater treatment plant as microplastics release source - Quantification and identification techniques. *J. Environ. Manage.* **2020**, *255*, 109739, doi:10.1016/j.jenvman.2019.109739.
119. Lares, M.; Ncibi, M.C.; Sillanpää, M.; Sillanpää, M. Occurrence, identification and removal of microplastic particles and fibers in conventional activated sludge process and advanced MBR technology. *Water Res.* **2018**, *133*, 236–246, doi:10.1016/j.watres.2018.01.049.
120. Cabernard, L.; Durisch-Kaiser, E.; Vogel, J.-C.; Rensch, D.; Niederhauser, P. Mikroplastik in Abwasser und Gewässern. *Aqua et Gas* **2016**, *2016*, 78–85.
121. Michielssen, M.R.; Michielssen, E.R.; Ni, J.; Duhaime, M.B. Fate of microplastics and other small anthropogenic litter (SAL) in wastewater treatment plants depends on unit processes employed. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* **2016**, *2*, 1064–1073, doi:10.1039/c6ew00207b.
122. Mason, S.A.; Garneau, D.; Sutton, R.; Chu, Y.; Ehmann, K.; Barnes, J.; Fink, P.; Papazissimos, D.; Rogers, D.L. Microplastic pollution is widely detected in US municipal wastewater treatment plant effluent. *Environ. Pollut.* **2016**, *218*, 1045–1054, doi:10.1016/j.envpol.2016.08.056.
123. Magnusson, K.; Norén, F. *Screening of microplastic particles in and down-stream a wastewater treatment plant* C 55, Stockholm, 2014.
124. Carr, S.A.; Liu, J.; Tesoro, A.G. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Res.* **2016**, *91*, 174–182, doi:10.1016/j.watres.2016.01.002.
125. Mintenig, S.M.; Int-Veen, I.; Löder, M.G.J.; Primpke, S.; Gerdts, G. Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water Res.* **2017**, *108*, 365–372, doi:10.1016/j.watres.2016.11.015.

126. Amy Lusher; Rachel Hurley; Christian Vogelsang; Luca Nizzetto; Marianne Olsen. *Mapping microplastics in sludge*, 2018.
127. Raju, S.; Carbery, M.; Kuttykattil, A.; Senathirajah, K.; Subashchandrabose, S.R.; Evans, G.; Thavamani, P. Transport and fate of microplastics in wastewater treatment plants: implications to environmental health. *Rev Environ Sci Biotechnol* **2018**, *17*, 637–653, doi:10.1007/s11157-018-9480-3.
128. Talvitie, J.; Mikola, A.; Koistinen, A.; Setälä, O. Solutions to microplastic pollution - Removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment technologies. *Water Res.* **2017**, *123*, 401–407, doi:10.1016/j.watres.2017.07.005.
129. Pimpke, S.; Imhof, H.; Piehl, S.; Lorenz, C.; Löder, M.; Laforsch, C.; Gerdts, G. Mikroplastik in der Umwelt. *Chem. Unserer Zeit* **2017**, *51*, 402–412, doi:10.1002/ciuz.201700821.
130. Freeman, S.; Booth, A.M.; Sabbah, I.; Tiller, R.; Dierking, J.; Klun, K.; Rotter, A.; Ben-David, E.; Javidpour, J.; Angel, D.L. Between source and sea: The role of wastewater treatment in reducing marine microplastics. *J. Environ. Manage.* **2020**, *266*, 110642, doi:10.1016/j.jenvman.2020.110642.
131. Kalčíková, G.; Alič, B.; Skalar, T.; Bundschuh, M.; Gotvajn, A.Ž. Wastewater treatment plant effluents as source of cosmetic polyethylene microbeads to freshwater. *Chemosphere* **2017**, *188*, 25–31, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.08.131.
132. Frehland, S.; Kaegi, R.; Hufenus, R.; Mitrano, D.M. Long-term assessment of nanoplastic particle and microplastic fiber flux through a pilot wastewater treatment plant using metal-doped plastics. *Water Res.* **2020**, *182*, 115860, doi:10.1016/j.watres.2020.115860.
133. Simon, M.; van Alst, N.; Vollertsen, J. Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging. *Water Res.* **2018**, *142*, 1–9, doi:10.1016/j.watres.2018.05.019.
134. Pimpke, S.; A. Dias, P.; Gerdts, G. Automated identification and quantification of microfibrils and microplastics. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 2138–2147, doi:10.1039/c9ay00126c.
135. Pimpke, S.; Cross, R.K.; Mintenig, S.M.; Simon, M.; Vianello, A.; Gerdts, G.; Vollertsen, J. Toward the Systematic Identification of Microplastics in the Environment: Evaluation of a New Independent Software Tool (siMPle) for Spectroscopic Analysis. *Appl. Spectrosc.* **2020**, *74*, 1127–1138, doi:10.1177/0003702820917760.
136. Hufnagl, B.; Steiner, D.; Renner, E.; Löder, M.G.J.; Laforsch, C.; Lohninger, H. A methodology for the fast identification and monitoring of microplastics in environmental samples using random decision forest classifiers. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 2277–2285, doi:10.1039/c9ay00252a.
137. Napotnik, J.A.; Baker, D.; Jellison, K.L. Effect of Sand Bed Depth and Medium Age on Escherichia coli and Turbidity Removal in Biosand Filters. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 3402–3409, doi:10.1021/acs.est.6b05113.
138. Conley, K.; Clum, A.; Deepe, J.; Lane, H.; Beckingham, B. Wastewater treatment plants as a source of microplastics to an urban estuary: Removal efficiencies and loading per capita over one year. *Water Res. X* **2019**, *3*, 100030, doi:10.1016/j.wroa.2019.100030.
139. Schmidt, C.; Kumar, R.; Yang, S.; Büttner, O. Microplastic particle emission from wastewater treatment plant effluents into river networks in Germany: Loads, spatial patterns of concentrations and potential toxicity. *Sci. Total Environ.* **2020**, *737*, 139544, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139544.

140. Heß, M.; Diehl, P.; Mayer, J.; Rahm, H.; Reifenhäuser, W.; Stark, J.; Schweiger, J. *Mikroplastik in Binnengewässern Süd- und Westdeutschlands. Bundesländerübergreifende Untersuchungen in Baden-Württemberg, Hessen, Nordrhein-Westfalen und Rheinlandpfalz.: Teil 1: Kunststoffpartikel in der oberflächennahen Wasserphase. Hg. v. Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg*, 2018.
141. Schwaiger, J. *Mikroplastik in bayerischen Seen: Eine Pilotstudie*; Umwelt Spezial, Augsburg, 2019.
142. Juergen Bertling; Leandra Hamann; Ralf Bertling. *Kunststoffe in der Umwelt*, 2018.
143. Zettler, E.R.; Mincer, T.J.; Amaral-Zettler, L.A. Life in the „plastisphere“: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 7137–7146, doi:10.1021/es401288x.
144. Yang, Y.; Liu, W.; Zhang, Z.; Grossart, H.-P.; Gadd, G.M. Microplastics provide new microbial niches in aquatic environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 6501–6511, doi:10.1007/s00253-020-10704-x.
145. Harrison, J.P.; Sapp, M.; Schratzberger, M.; Osborn, A.M. Interactions Between Microorganisms and Marine Microplastics: A Call for Research. *mar technol soc j* **2011**, *45*, 12–20, doi:10.4031/MTSJ.45.2.2.
146. McCormick, A.; Hoellein, T.J.; Mason, S.A.; Schlupe, J.; Kelly, J.J. Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 11863–11871, doi:10.1021/es503610r.
147. Debroas, D.; Mone, A.; Ter Halle, A. Plastics in the North Atlantic garbage patch: A boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders. *Sci. Total Environ.* **2017**, *599-600*, 1222–1232, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.059.
148. Kettner, M.T.; Oberbeckmann, S.; Labrenz, M.; Grossart, H.-P. The Eukaryotic Life on Microplastics in Brackish Ecosystems. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 538, doi:10.3389/fmicb.2019.00538.
149. Miao, L.; Guo, S.; Liu, Z.; Liu, S.; You, G.; Qu, H.; Hou, J. Effects of Nanoplastics on Freshwater Biofilm Microbial Metabolic Functions as Determined by BIOLOG ECO Microplates. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, doi:10.3390/ijerph16234639.
150. Oberbeckmann, S.; Loeder, M.G.J.; Gerdts, G.; Osborn, A.M. Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *90*, 478–492, doi:10.1111/1574-6941.12409.
151. Wu, X.; Pan, J.; Li, M.; Li, Y.; Bartlam, M.; Wang, Y. Selective enrichment of bacterial pathogens by microplastic biofilm. *Water Res.* **2019**, *165*, 114979, doi:10.1016/j.watres.2019.114979.
152. Rogers, K.L.; Carreres-Calabuig, J.A.; Gorokhova, E.; Posth, N.R. Micro-by-micro interactions: How microorganisms influence the fate of marine microplastics. *Limnol Oceanogr* **2020**, *5*, 18–36, doi:10.1002/lol2.10136.
153. Arias-Andres, M.; Kettner, M.T.; Miki, T.; Grossart, H.-P. Microplastics: New substrates for heterotrophic activity contribute to altering organic matter cycles in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* **2018**, *635*, 1152–1159, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.199.
154. Arias-Andres, M.; Klümper, U.; Rojas-Jimenez, K.; Grossart, H.-P. Microplastic pollution increases gene exchange in aquatic ecosystems. *Environ. Pollut.* **2018**, *237*, 253–261, doi:10.1016/j.envpol.2018.02.058.

155. Oberbeckmann, S.; Kreikemeyer, B.; Labrenz, M. Environmental Factors Support the Formation of Specific Bacterial Assemblages on Microplastics. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2709, doi:10.3389/fmicb.2017.02709.
156. Wang, J.; Lv, S.; Zhang, M.; Chen, G.; Zhu, T.; Zhang, S.; Teng, Y.; Christie, P.; Luo, Y. Effects of plastic film residues on occurrence of phthalates and microbial activity in soils. *Chemosphere* **2016**, *151*, 171–177, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.076.
157. Liu, H.; Yang, X.; Liu, G.; Liang, C.; Xue, S.; Chen, H.; Ritsema, C.J.; Geissen, V. Response of soil dissolved organic matter to microplastic addition in Chinese loess soil. *Chemosphere* **2017**, *185*, 907–917, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.07.064.
158. Romera-Castillo, C.; Pinto, M.; Langer, T.M.; Álvarez-Salgado, X.A.; Herndl, G.J. Dissolved organic carbon leaching from plastics stimulates microbial activity in the ocean. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1430, doi:10.1038/s41467-018-03798-5.
159. Rillig, M.C.; Bonkowski, M. Microplastic and soil protists: A call for research. *Environ. Pollut.* **2018**, *241*, 1128–1131, doi:10.1016/j.envpol.2018.04.147.
160. Au, S.Y.; Lee, C.M.; Weinstein, J.E.; van den Hurk, P.; Klaine, S.J. Trophic transfer of microplastics in aquatic ecosystems: Identifying critical research needs. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2017**, *13*, 505–509, doi:10.1002/ieam.1907.
161. Boenigk, J.; Matz, A.C.; Jurgens, K.; Arndt, H. Confusing selective feeding with differential digestion in bacterivorous nanoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2001**, *48*, 425–432, doi:10.1111/j.1550-7408.2001.tb00175.x.
162. Wagner, M.; Scherer, C.; Alvarez-Muñoz, D.; Brennholt, N.; Bourrain, X.; Buchinger, S.; Fries, E.; Grosbois, C.; Klasmeier, J.; Marti, T.; et al. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* **2014**, *26*, 12, doi:10.1186/s12302-014-0012-7.
163. Carpenter, E.J.; Anderson, S.J.; Harvey, G.R.; Miklas, H.P.; Peck, B.B. Polystyrene spherules in coastal waters. *Science* **1972**, *178*, 749–750, doi:10.1126/science.178.4062.749.
164. Carpenter, E.J.; Smith, K.L. Plastics on the Sargasso sea surface. *Science* **1972**, *175*, 1240–1241, doi:10.1126/science.175.4027.1240.
165. Webb, H.K.; Crawford, R.J.; Sawabe, T.; Ivanova, E.P. Poly(ethylene terephthalate) polymer surfaces as a substrate for bacterial attachment and biofilm formation. *Microbes Environ.* **2009**, *24*, 39–42, doi:10.1264/jsme2.ME08538.
166. Tender, C. de; Devriese, L.I.; Haegeman, A.; Maes, S.; Vangeyte, J.; Cattrijsse, A.; Dawyndt, P.; Ruttink, T. Temporal Dynamics of Bacterial and Fungal Colonization on Plastic Debris in the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 7350–7360, doi:10.1021/acs.est.7b00697.
167. Kettner, M.T.; Rojas-Jimenez, K.; Oberbeckmann, S.; Labrenz, M.; Grossart, H.-P. Microplastics alter composition of fungal communities in aquatic ecosystems. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 4447–4459, doi:10.1111/1462-2920.13891.
168. Rummel, C.D.; Escher, B.I.; Sandblom, O.; Plassmann, M.M.; Arp, H.P.H.; MacLeod, M.; Jahnke, A. Effects of Leachates from UV-Weathered Microplastic in Cell-Based Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 9214–9223, doi:10.1021/acs.est.9b02400.
169. Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T.S. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* **2011**, *62*, 2588–2597, doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
170. MUELLER, M.; RÖHLICH, P.; TÖRÖ, I. Studies on Feeding and Digestion in Protozoa. VII. Ingestion of Polystyrene Latex Particles and its Early Effect on Acid Phosphatase in

- Paramecium multimicronucleatum and Tetrahymena pyriformis. *The Journal of Protozoology* **1965**, 12, 27–34, doi:10.1111/j.1550-7408.1965.tb01807.x.
171. Weisman, R.A.; Korn, E.D. Phagocytosis of latex beads by Acanthamoeba. I. Biochemical properties. *Biochemistry* **1967**, 6, 485–497.
172. Fenchel, T. Suspension feeding in ciliated protozoa: Functional response and particle size selection. *Microb. Ecol.* **1980**, 6, 1–11, doi:10.1007/BF02020370.
173. Fenchel, T. Suspension feeding in ciliated protozoa: Feeding rates and their ecological significance. *Microb. Ecol.* **1980**, 6, 13–25, doi:10.1007/BF02020371.
174. Pace, M.L.; Bailiff, M.D. Evaluation of a fluorescent microsphere technique for measuring grazing rates of phagotrophic microorganisms. *Marine ecology progress series. Oldendorf* **1987**, 40, 185–193.
175. Stewart, J.R.; Weisman, R.A. Exocytosis of latex beads during the encystment of Acanthamoeba. *J. Cell Biol.* **1972**, 52, 117–130, doi:10.1083/jcb.52.1.117.
176. Hahn, M.W.; Höfle, M.G. Flagellate predation on a bacterial model community: interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 4863–4872, doi:10.1128/AEM.65.11.4863-4872.1999.
177. Christaki, U.; Dolan, J.R.; Pelegri, S.; Rassoulzadegan, F. Consumption of picoplankton-size particles by marine ciliates: Effects of physiological state of the ciliate and particle quality. *Limnol. Oceanogr.* **1998**, 43, 458–464, doi:10.4319/lo.1998.43.3.0458.
178. Casado, M.P.; Macken, A.; Byrne, H.J. Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery. *Environment International* **2013**, 51, 97–105, doi:10.1016/j.envint.2012.11.001.
179. Blöcker, L.; Watson, C.; Wichern, F. Living in the plastic age - Different short-term microbial response to microplastics addition to arable soils with contrasting soil organic matter content and farm management legacy. *Environ. Pollut.* **2020**, 267, 115468, doi:10.1016/j.envpol.2020.115468.
180. Lin, D.; Yang, G.; Dou, P.; Qian, S.; Zhao, L.; Yang, Y.; Fanin, N. Microplastics negatively affect soil fauna but stimulate microbial activity: insights from a field-based microplastic addition experiment. *Proc. Biol. Sci.* **2020**, 287, 20201268, doi:10.1098/rspb.2020.1268.
181. Fei, Y.; Huang, S.; Zhang, H.; Tong, Y.; Wen, D.; Xia, X.; Wang, H.; Luo, Y.; Barceló, D. Response of soil enzyme activities and bacterial communities to the accumulation of microplastics in an acid cropped soil. *Sci. Total Environ.* **2020**, 707, 135634, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135634.
182. Xiong, X.; Bond, T.; Saboor Siddique, M.; Yu, W. The stimulation of microbial activity by microplastic contributes to membrane fouling in ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* **2021**, 635, 119477, doi:10.1016/j.memsci.2021.119477.
183. Liu, H.; Zhou, X.; Ding, W.; Zhang, Z.; Nghiem, L.D.; Sun, J.; Wang, Q. Do Microplastics Affect Biological Wastewater Treatment Performance? Implications from Bacterial Activity Experiments. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, 7, 20097–20101, doi:10.1021/acssuschemeng.9b05960.
184. Sun, X.; Chen, B.; Li, Q.; Liu, N.; Xia, B.; Zhu, L.; Qu, K. Toxicities of polystyrene nano- and microplastics toward marine bacterium Halomonas alkaliphila. *Sci. Total Environ.* **2018**, 642, 1378–1385, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.06.141.
185. ROBERTS, J.; QUASTEL, J.H. Particle Uptake By Polymorphonuclear Leucocytes and Ehrlich Ascites-Carcinoma Cells. *Biochem. J.* **1963**, 89, 150–156, doi:10.1042/bj0890150.

186. Zhang, Y.; Wang, J.; Geng, X.; Jiang, Y. Does microplastic ingestion dramatically decrease the biomass of protozoa grazers? A case study on the marine ciliate *Uronema marinum*. *Chemosphere* **2021**, *267*, 129308, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129308.
187. Kong, Q.; Li, Y.; Xu, X.; Cheng, J.; Sun, Y.; Zhang, L.; Huang, Y.; Yang, Z. Microplastics interfere with mixotrophic *Ochromonas* eliminating toxic *Microcystis*. *Chemosphere* **2021**, *265*, 129030, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129030.
188. Korn, E.D.; Weisman, R.A. Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. II. Electron microscopic study of the initial events. *J. Cell Biol.* **1967**, *34*, 219–227, doi:10.1083/jcb.34.1.219.
189. Avery, S.V.; Harwood, J.L.; Lloyd, D. Quantification and Characterization of Phagocytosis in the Soil Amoeba *Acanthamoeba castellanii* by Flow Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 1124–1132, doi:10.1128/aem.61.3.1124-1132.1995.
190. Elloway, E.A.G.; Bird, R.A.; Hewitt, C.J.; Kelly, S.L.; Smith, S.N. Characterization of *Acanthamoeba*-microsphere association by multiparameter flow cytometry and confocal microscopy. *Cytometry A* **2006**, *69*, 266–272, doi:10.1002/cyto.a.20210.
191. Duis, K.; Coors, A. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environ. Sci. Eur.* **2016**, *28*, 2, doi:10.1186/s12302-015-0069-y.
192. Burns, E.E.; Boxall, A.B.A. Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps. *Environ. Toxicol. Chem.* **2018**, *37*, 2776–2796, doi:10.1002/etc.4268.
193. Lenz, R.; Enders, K.; Nielsen, T.G. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E4121-2, doi:10.1073/pnas.1606615113.
194. Phuong, N.N.; Zalouk-Vergnoux, A.; Poirier, L.; Kamari, A.; Châtel, A.; Mouneyrac, C.; Lagarde, F. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environ. Pollut.* **2016**, *211*, 111–123, doi:10.1016/j.envpol.2015.12.035.
195. Hitchcock, J.N. Storm events as key moments of microplastic contamination in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* **2020**, *734*, 139436, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139436.
196. Ivleva, N.P.; Wiesheu, A.C.; Niessner, R. Mikroplastik in aquatischen Ökosystemen. *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 1744–1764, doi:10.1002/ange.201606957.
197. Estahbanati, S.; Fahrenfeld, N.L. Influence of wastewater treatment plant discharges on microplastic concentrations in surface water. *Chemosphere* **2016**, *162*, 277–284, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.07.083.
198. Mintenig, S.M.; Löder, M.G.J.; Primpke, S.; Gerdt, G. Low numbers of microplastics detected in drinking water from ground water sources. *Sci. Total Environ.* **2019**, *648*, 631–635, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.178.
199. Panno, S.V.; Kelly, W.R.; Scott, J.; Zheng, W.; McNeish, R.E.; Holm, N.; Hoellein, T.J.; Baranski, E.L. Microplastic Contamination in Karst Groundwater Systems. *Ground Water* **2019**, *57*, 189–196, doi:10.1111/gwat.12862.
200. Frère, L.; Maignien, L.; Chalopin, M.; Huvet, A.; Rinnert, E.; Morrison, H.; Kerninon, S.; Cassone, A.-L.; Lambert, C.; Reveillaud, J.; et al. Microplastic bacterial communities in the Bay of Brest: Influence of polymer type and size. *Environ. Pollut.* **2018**, *242*, 614–625, doi:10.1016/j.envpol.2018.07.023.
201. Bouwmeester, H.; Hollman, P.C.H.; Peters, R.J.B. Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production

- Chain: Experiences from Nanotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 8932–8947, doi:10.1021/acs.est.5b01090.
202. Hussain, N. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *50*, 107–142, doi:10.1016/S0169-409X(01)00152-1.
203. Lu, Y.; Zhang, Y.; Deng, Y.; Jiang, W.; Zhao, Y.; Geng, J.; Ding, L.; Ren, H. Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, 4054–4060, doi:10.1021/acs.est.6b00183.
204. Straub, S.; Hirsch, P.E.; Burkhardt-Holm, P. Biodegradable and Petroleum-Based Microplastics Do Not Differ in Their Ingestion and Excretion but in Their Biological Effects in a Freshwater Invertebrate *Gammarus fossarum*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, doi:10.3390/ijerph14070774.
205. Blarer, P.; Burkhardt-Holm, P. Microplastics affect assimilation efficiency in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2016**, *23*, 23522–23532, doi:10.1007/s11356-016-7584-2.
206. Weber, A.; Scherer, C.; Brennholt, N.; Reifferscheid, G.; Wagner, M. PET microplastics do not negatively affect the survival, development, metabolism and feeding activity of the freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. *Environ. Pollut.* **2018**, *234*, 181–189, doi:10.1016/j.envpol.2017.11.014.
207. Gerhardt, A. Effects of New and Aged Polyethylenterephthalat and Polylactic Acid on *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda) during Long-Term Exposures. *JEP* **2020**, *11*, 359–376, doi:10.4236/jep.2020.115021.
208. Zimmermann, L.; Dombrowski, A.; Völker, C.; Wagner, M. Are bioplastics and plant-based materials safer than conventional plastics? In vitro toxicity and chemical composition. *Environment International* **2020**, *145*, 106066, doi:10.1016/j.envint.2020.106066.
209. Zimmermann, L.; Göttlich, S.; Oehlmann, J.; Wagner, M.; Völker, C. What are the drivers of microplastic toxicity? Comparing the toxicity of plastic chemicals and particles to *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* **2020**, *267*, 115392, doi:10.1016/j.envpol.2020.115392.
210. Charron, L.; Geffard, O.; Chaumot, A.; Coulaud, R.; Jaffal, A.; Gaillet, V.; Dedourge-Geffard, O.; Geffard, A. Influence of molting and starvation on digestive enzyme activities and energy storage in *Gammarus fossarum*. *PLoS One* **2014**, *9*, e96393, doi:10.1371/journal.pone.0096393.
211. van Handel, E. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1985**, *1*, 299–301.
212. van Handel, E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1985**, *1*, 302–304.
213. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254, doi:10.1006/abio.1976.9999.
214. Walker, J.M. *Protein Protocols Handbook, The*; Humana Press: New Jersey, 2002, ISBN 1-59259-169-8.
215. Kampfraath, A.A.; Hunting, E.R.; Mulder, C.; Breure, A.M.; Gessner, M.O.; Kraak, M.H.S.; Admiraal, W. DECOTAB: a multipurpose standard substrate to assess effects of litter quality on microbial decomposition and invertebrate consumption. *Freshwater Science* **2012**, *31*, 1156–1162.

216. Götz, A.; Imhof, H.K.; Geist, J.; Beggel, S. Moving Toward Standardized Toxicity Testing Procedures with Particulates by Dietary Exposure of Gammarids. *Environ. Toxicol. Chem.* **2021**, *40*, 1463–1476, doi:10.1002/etc.4990.
217. Triebkorn, R.; Braunbeck, T.; Grummt, T.; Hanslik, L.; Huppertsberg, S.; Jekel, M.; Knepper, T.P.; Kraus, S.; Müller, Y.K.; Pittroff, M.; et al. Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *110*, 375–392, doi:10.1016/j.trac.2018.11.023.
218. Geffard, O.; Xuereb, B.; Chaumot, A.; Geffard, A.; Biagianti, S.; Noël, C.; Abbaci, K.; Garric, J.; Charmantier, G.; Charmantier-Daures, M. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **2010**, *29*, 2249–2259, doi:10.1002/etc.268.
219. Hernandez, L.M.; Xu, E.G.; Larsson, H.C.E.; Tahara, R.; Maisuria, V.B.; Tufenkji, N. Plastic Teabags Release Billions of Microparticles and Nanoparticles into Tea. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 12300–12310, doi:10.1021/acs.est.9b02540.
220. Iñiguez, M.E.; Conesa, J.A.; Fullana, A. Microplastics in Spanish Table Salt. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8620, doi:10.1038/s41598-017-09128-x.
221. Sathish, M.N.; Jeyasanta, I.; Patterson, J. Microplastics in Salt of Tuticorin, Southeast Coast of India. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2020**, *79*, 111–121, doi:10.1007/s00244-020-00731-0.
222. Rosenholm, J.M.; Meinander, A.; Peuhu, E.; Niemi, R.; Eriksson, J.E.; Sahlgren, C.; Lindén, M. Targeting of porous hybrid silica nanoparticles to cancer cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 197–206, doi:10.1021/nn800781r.
223. Lunov, O.; Syrovets, T.; Loos, C.; Beil, J.; Delacher, M.; Tron, K.; Nienhaus, G.U.; Musyanovych, A.; Mailänder, V.; Landfester, K.; et al. Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1657–1669, doi:10.1021/nn2000756.
224. Rossi, G.; Monticelli, L. Modeling the effect of nano-sized polymer particles on the properties of lipid membranes. *J. Phys. Condens. Matter* **2014**, *26*, 503101, doi:10.1088/0953-8984/26/50/503101.
225. Fröhlich, E.; Samberger, C.; Kueznik, T.; Absenger, M.; Roblegg, E.; Zimmer, A.; Pieber, T.R. Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress. *J. Toxicol. Sci.* **2009**, *34*, 363–375, doi:10.2131/jts.34.363.
226. Peters, K.; Unger, R.E.; Kirkpatrick, C.J.; Gatti, A.M.; Monari, E. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2004**, *15*, 321–325, doi:10.1023/b:jmsm.0000021095.36878.1b.
227. Hamada, T.; Morita, M.; Miyakawa, M.; Sugimoto, R.; Hatanaka, A.; Vestergaard, M.; d.C.; Takagi, M. Size-dependent partitioning of nano/microparticles mediated by membrane lateral heterogeneity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13990–13996, doi:10.1021/ja301264v.
228. Thubagere, A.; Reinhard, B.M. Nanoparticle-induced apoptosis propagates through hydrogen-peroxide-mediated bystander killing: insights from a human intestinal epithelium in vitro model. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3611–3622, doi:10.1021/nn100389a.
229. Li, L.; Sun, S.; Tan, L.; Wang, Y.; Wang, L.; Zhang, Z.; Zhang, L. Polystyrene Nanoparticles Reduced ROS and Inhibited Ferroptosis by Triggering Lysosome Stress and TFEB Nucleus Translocation in a Size-Dependent Manner. *Nano Lett.* **2019**, *19*, 7781–7792, doi:10.1021/acs.nanolett.9b02795.

230. McCloy, R.A.; Rogers, S.; Caldon, C.E.; Lorca, T.; Castro, A.; Burgess, A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 1400–1412, doi:10.4161/cc.28401.
231. Schür, C.; Rist, S.; Baun, A.; Mayer, P.; Hartmann, N.B.; Wagner, M. When Fluorescence Is not a Particle: The Tissue Translocation of Microplastics in *Daphnia magna* Seems an Artifact. *Environ. Toxicol. Chem.* **2019**, *38*, 1495–1503, doi:10.1002/etc.4436.
232. van Niel, G.; D'Angelo, G.; Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 213–228, doi:10.1038/nrm.2017.125.
233. Urabe, F.; Kosaka, N.; Ito, K.; Kimura, T.; Egawa, S.; Ochiya, T. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2020**, *318*, C29-C39, doi:10.1152/ajpcell.00280.2019.
234. O'Brien, K.; Breyne, K.; Ughetto, S.; Laurent, L.C.; Breakefield, X.O. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 585–606, doi:10.1038/s41580-020-0251-y.
235. Lee, S.; Mankhong, S.; Kang, J.-H. Extracellular Vesicle as a Source of Alzheimer's Biomarkers: Opportunities and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20071728.
236. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550, doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
237. Binder, A.R.D.; Pfaffl, M.W.; Hiltwein, F.; Geist, J.; Beggel, S. Does environmental stress affect cortisol biodistribution in freshwater mussels? *Conserv. Physiol.* **2019**, *7*, coz101, doi:10.1093/conphys/coz101.
238. Binder, A.R.D.; Spiess, A.-N.; Pfaffl, M.W. Modelling and Differential Quantification of Electric Cell-Substrate Impedance Sensing Growth Curves. *Sensors (Basel)* **2021**, *21*, doi:10.3390/s21165286.
239. Schönbauer, S.; Müller, R. A Risky Object? How Microplastics Are Represented in the German Media. *Science Communication* **2021**, 107554702110305, doi:10.1177/10755470211030519.
240. PlasticsEurope. Plastics - the Facts 2019. Available online: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2019/> (accessed on 5 December 2021).

Anhang

- Übersicht zu wissenschaftlichen Veröffentlichungen aus dem Verbundvorhaben SubµTrack

Übersicht zu wissenschaftlichen Veröffentlichungen aus dem Verbundvorhaben SubjTrack

(Stand 23.12.2021)

#	Partner	Titel des Beitrags	Art der Publikation	Datum Veröffentlichung	Journal / Verlag Link
1	LAS & SWW	Modulation of PAH toxicity on the freshwater organism <i>G. roeseli</i> by microparticles	Fachartikel (peer reviewed)	14.01.20	Environmental Pollution https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113999
2	SWW	Systematic Development of a Simultaneous Determination of Plastic Particle Identity and Adsorbed Organic Compounds by Thermodesorption-Pyrolysis-GC/MS (TD-Pyr-GC/MS)	Fachartikel (peer reviewed)	28.10.2020	Molecules https://doi.org/10.3390/molecules25214985
3	SWW	Organic contaminants and interactions with micro-and nanoplastics in the aqueous environment: Review of analytical methods	Fachartikel (peer reviewed)	22.02.2021	Molecules https://doi.org/10.3390/molecules26041164
4	SWW	Validation of Sample Preparation Methods for Microplastic Analysis in Wastewater Matrices—Reproducibility and Standardization	Fachartikel (peer reviewed)	31.8.2020	Water https://doi.org/10.3390/molecules25214985
5	IUTA & SWW	Release of microplastic particles to the aquatic environment via wastewater treatment plants: The impact of sand filters as tertiary treatment	Fachartikel (peer reviewed)	15.12.2020	Journal of Chemical Engineering https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130933
6	LAS	Moving Toward Standardized Toxicity Testing Procedures with Particulates by Dietary Exposure of Gammarids	Fachartikel (peer reviewed)	18.01.2021	Environmental Toxicology and Chemistry https://doi.org/10.1002/etc.4990
7	IWC	Methods for the Analysis of Submicrometer- and Nanoplastic Particles in the Environment, C. Schwaferts, R. Niessner, M. Elsner, N. P. Ivleva	Fachartikel (peer reviewed)	02.01.2019	Trends in Analytical Chemistry https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.014
8	IWC	Nanoplastic Analysis by Online Coupling of Raman Microscopy and Field-Flow Fractionation Enabled by Optical Tweezers	Fachartikel (peer reviewed)	19.02.2020	Analytical Chemistry https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05336
9	IWC	Simple Generation of Suspensible Secondary Microplastic Reference Particles via Ultrasound Treatment	Fachartikel (peer reviewed)	18.03.2020	Frontiers in Chemistry
10	IWC & Postnova	Nanoplastic Analysis by On-line Coupling of Raman Microscopy and Field-Flow Fractionation Enabled by Optical Tweezers, C. Schwaferts, V. Sogne, R. Welz, F. Meier,* T. Klein, R. Niessner, M. Elsner & N. P. Ivleva,*	Fachartikel (peer reviewed)	19.02.2020	Analytical Chemistry https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05336

Übersicht zu wissenschaftlichen Veröffentlichungen aus dem Verbundvorhaben SubjTrack

#	Partner	Titel des Beitrags	Art der Publikation	Datum Veröffentlichung	Journal / Verlag Link
11	IWC	Which particles to select, and if, how many?	Fachartikel (peer reviewed)	12.05.2021	Analytical & Bioanalytical Chemistry https://doi.org/10.1007/s00216-021-03326-3
12	LTI & LAS	Does environmental stress affect cortisol biodistribution in freshwater mussels?	Fachartikel (peer reviewed)	08.12.2019	Conservation Physiology https://doi.org/10.1093/conphys/coz101
13	MCTS	A risky object? How Microplastics is represented in German media	Fachartikel (peer reviewed)	14.07.2021	Science Communication https://doi.org/10.1177%2F10755470211030519
14	MCTS	Diskussionspapier - Plastik in der Umwelt: Sozialwissenschaftliche Perspektiven	Diskussionspapier QST4	24.03.2020	bmbf-plastik.de https://bmbf-plastik.de/de/publikation/diskussionspapier_qst4
15	MCTS	Schönbauer, Bergmann: Microplastics by other means? How microplastics can be a tool for inter/trans-disciplinary engagement	Blogbeitrag	12.06.2019	Marine Coastal Cultures https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05336
16	IUTA	Identification of microplastics in wastewater after cascade filtration using Pyrolysis-GC-MS	Fachartikel (peer reviewed)	19.12.2019	MethodsX https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.100778
17	IWC, SWW, LfU, UBA, IUTA, Postnova	Beiträge zum Statuspapier - Mikroplastik-Analytik	Statuspapier QST1	01.11.2020	bmbf-plastik.de https://bmbf-plastik.de/
18	MCTS	Zero Waste—Zero Justice?	Fachartikel (peer reviewed)	02.11.2020	Engaging Science, Technology, and Society https://doi.org/10.3390/s21165286
19	LTI	Modelling and differential quantification of electric cell substrate impedance sensing growth curves, Sensors	Fachartikel (peer reviewed)	05.08.2021	MDPI sensors https://doi.org/10.3390/s21165286
20	IWC	Analytische Methoden für die Detektion und Quantifizierung von Mikroplastik in diversen Matrices	Fachartikel (non peer-reviewed)		Kongressband 131. VDLUFA Kongress 2019, VDLUFA Schriftenreihe Band 76/2019, VDLUFA Verlag, Darmstadt. ISBN: 978-3-941273-26-9
21	SWW, IWC, LfU, IUTA, Postnova	Analytik von Mikro- und Submikro-Plastikpartikeln aus Wasserproben: Status Quo und Ausblick	Fachartikel (non peer-reviewed)	01.03.2021	Korrespondenz Wasserwirtschaft (DWA)
22	IUTA	Mikroplastikanalytik in Abwasser - Kombination einer Kaskadenfiltration und Filament-Pyrolyse-GC-MS	Fachartikel (non peer-reviewed)	15.12.2020	Wiley Analytical Science / GIT Labor-Fachzeitschrift https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/was.00050089
#	Partner	Titel des Beitrags	Art der Publikation	Datum Veröffentlichung	Journal / Verlag Link

Übersicht zu wissenschaftlichen Veröffentlichungen aus dem Verbundvorhaben SubµTrack

23	IUTA	Pyrolyse-GC-MS vs. TED-GC-MS - Vergleich zweier thermoanalytischer Methoden für die Mikroplastikanalytik.	Fachartikel (non peer-reviewed)	11.11.2019	Sonderpublikation zum 13. Langenauer Wasserforum, 11/2019
24	IUTA	Mikroplastikanalytik von Kläranlagenabläufen durch eine Kombination einer Kaskaden-Filtration mit TED-GC-MS und FT-IR	Fachartikel (non peer-reviewed)	01.04.2021	gfw Wasser Abwasser Fachzeitschrift 2021 https://gwf-wasser.de/gwf-wasser-abwasser/
25	LAS	Dietary exposure to four sizes of spherical polystyrene, polylactide and silica nanoparticles does not affect mortality, behaviour, feeding and energy assimilation of <i>Gammarus roeseli</i>	Fachartikel (peer reviewed)	eingereicht	Ecotoxicology and Environmental Safety
26	SWW	A novel analytical approach to assess sorption of trace organic compounds on micro- and nanoplastic particles	Fachartikel (peer reviewed)	eingereicht	
27	MCTS	Schönbauer, Clormann: How to care for waste beyond the globe. Space and marine debris as metamorphic matters	Konzeptueller Kommentar	eingereicht	Engaging Science Technology and Society
28	SWW, IWC, LfU, IUTA	Microplastic sampling from wastewater treatment plant effluents: Best-practices and synergies between thermoanalytical and spectroscopic analysis	Fachartikel (peer reviewed)	in Vorbereitung	Water Research
29	MCTS	"It makes me a better mother": The gendered aspects of doing zero waste	Fachartikel (peer reviewed)	in Vorbereitung	Science as Culture

