UNIVERSITÄT FÜR BODENKULTUR WIEN

Masterarbeit

Einfluss von biologisch abbaubarem Mikroplastik auf das Verhalten und Toxikologie von Regenwürmern

verfasst von

Susanna VONBANK, BSc

im Rahmen des Masterstudiums

Kulturtechnik und Wasserwirtschaft

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieurin

Wien, April 2022

Betreut von:

Univ.Prof.in DIin Dr.in Marion Huber-Humer
Institut für Abfallwirtschaft
Department für Wasser, Atmosphäre und Umwelt

Danksagung

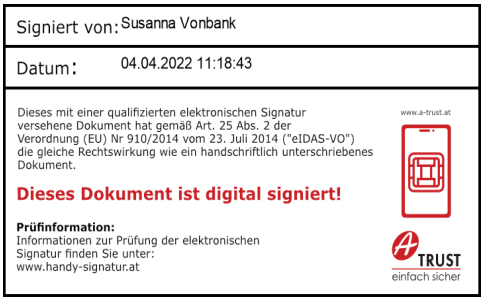
An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Masterarbeit unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt hier meinen BetreuerInnen, Professor Marion Huber-Humer, Dr. Christian Zafiu und Professor Johann Zaller die mir mit hilfreichen Anregungen und konstruktiver Kritik zur Seite standen. Anschließend möchte ich mich auch bei meinem Lebensgefährten Michael Parzer bedanken, für das Korrekturlesen der Arbeit, die Motivation und den emotionalen Rückhalt währen der gesamten Zeit. Und natürlich bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht, und mich immer unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Formulierungen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Diese schriftliche Arbeit wurde noch an keiner Stelle vorgelegt.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüferin/ keinem anderen Prüfer als Prüfungsleistung eingereicht.

Mir ist bekannt, dass Zuwiderhandeln geahndet wird („Verwendung unerlaubter Hilfsmittel“) und weitere rechtliche Schritte nach sich ziehen kann.



Kurzfassung

Herkömmliches Mikroplastik aus erdölbasierten Kunststoffen hat weitreichende Folgen auf die Umwelt. Als Alternative werden oft bioabbaubare Kunststoffe in Erwägung gezogen, um deren Folgen zu minimieren. Die vorliegende Masterarbeit untersucht den Einfluss thermoplastischer Stärke, ein biologisch abbaubarer Kunststoff, auf Regenwürmer durch experimentelle Forschung und soll helfen, sein Gefahrenpotential besser abschätzen zu können. Es wurden Laborversuche mit verschiedenen Kunststoffgrößen und Konzentrationen durchgeführt und die Auswirkungen auf die Regenwurmarten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* und auf das nach OECD Richtlinien hergestellte Substrat nach 28 Tagen untersucht. Die Kunststoffpartikel wurden entweder von Anfang an ins Substrat eingebracht oder wöchentlich zugeführt. Die Ergebnisse zeigen in einigen Versuchsgruppen einen positiven Einfluss des Mikroplastiks auf die Gewichtsveränderung der Würmer. Negative Auswirkungen auf Gewicht, Reproduktions- und Sterblichkeitsrate konnten nicht festgestellt werden. Dies deutet auf einen deutlichen Unterschied der Auswirkung von bioabbaubaren Kunststoffen, im Gegensatz zu erdölbasiertem Mikroplastik auf die Bodenfauna hin.

Abstract

Conventional microplastics made from petroleum based plastics have far reaching consequences for the environment. Biodegradable plastics are often considered as an alternative to minimize their consequences. This master thesis examines the influence of the biodegradable plastic thermoplastic starch on earthworms. The experiments should help to better assess the influence of the biodegradable microplastics and thus its risk potential. Laboratory tests were carried out with different biodegradable plastic sizes and concentrations and the effects on the earthworm species *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* and on the substrate produced according to OECD guidelines are examined after 28 days. The microplastic was either mixed into the substrate from the beginning or added weekly. The results show a positive influence on growthrate in several test groups. Negative effects on growthrate, reproductionrate or mortality were not found. This indicates a clear difference between the impact of biodegradable microplastics, in contrast to petroleum-based microplastics on soil fauna.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
2. Stand des Wissens 2
   2.1 Bioabbaubare Kunststoffe 2
      2.1.1 Allgemeines 2
      2.1.2 Abbaubarkeit von bioabbaubaren Kunststoffen 3
      2.1.3 Anwendungsgebiete von bioabbaubaren Kunststoffen 6
      2.1.4 Thermoplastische Stärke 6
   2.2 Vermikompostierung 8
      2.2.1 Grundlagen der Vermikompostierung 8
      2.2.2 Wichtige Parameter für die Vermikompostierung 9
      2.2.3 Würmer 11
   2.3 Würmer und Mikroplastik 12
3. Material und Methode 16
   3.1 Herstellung des verwendeten Mikroplastiks 16
      3.1.1 Zerkleinerungsverfahren 16
         3.1.1.1 Zentrifugalmühle 16
         3.1.1.2 Ultraschallkavitation 18
         3.1.1.3 Zerkleinerung mit flüssigem Stickstoff 18
      3.1.2 Charakterisierung der aufbereiteten Mikrokunstofffraktionen 18
         3.1.2.1 Mikroplastik Fraktion 200 – 630 µm 18
         3.1.2.2 Fraktion 63 – 200 µm 18
         3.1.2.3 Fraktion < 63 µm 19
   3.2 Herstellung des Substrates 19
   3.3 Versuchsgefäße 20
      3.3.1 Behälter der Versuche F1 und F2 20
      3.3.2 Behälter der Versuche F3, F4, F6 und F7 22
      3.3.3 Behälter der Versuche F5 24
   3.4 Versuchstiere 25
   3.5 Durchführen der Versuche 27
      3.5.1 Experimente mit Mikroplastik im Substrat (F1 – F4) 28
      3.5.2 Experimente mit Zufütterung des Mikroplastiks (F5 – F7) 29
      3.5.3 Betreuung der Versuchsansätze 30
   3.6 Laboranalysen 31
      3.6.1 Wassergehalt 31
      3.6.2 Leitfähigkeit, pH- Wert 31
      3.6.3 Glühverlust 32
      3.6.4 TOC, Gesamtstickstoff, Gesamtkohlenstoff 33
      3.6.5 Ammonium-Stickstoff 35
      3.6.6 Nitratstickstoff 36
      3.6.7 Quantitative Veränderung der Substratmasse 38
   3.7 Analyse der Wurmparameter 38
      3.7.1 Analyse des Wurmgewichtes 39
      3.7.2 Analyse der Wurmanzahl und Anzahl der Kokons 39
      3.7.3 Analyse des Darminhalts der Würmer 39
   3.8 Statistische Analyse 40
4. Ergebnisse und Diskussion 41

4.1 Wurmexperimente 41
4.1.1 Gewichtsveränderung in Abhängigkeit der Konzentration 42
4.1.2 Gewichtsveränderung in Abhängigkeit der Größe des Mikroplastiks 47
4.1.3 Veränderung der Anzahl an Regenwürmern 49
4.2 Analyse des Darminhalts der Würmer 50
4.3 Analysen des Substrates 51
4.3.1 Charakterisierung des Ausgangssubstrates 51
4.3.2 Veränderung ausgewählter Parameter während der Versuche (Endbeprobung) 52
4.3.2.1 Glühverlust 52
4.3.2.2 Optische Untersuchungen 53
5. Schlussfolgerungen und Ausblick 54
Literaturverzeichnis 57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abbauprozesse von biologisch abbaubaren Kunststoffen (Iwata, 2015) 3

Abbildung 2: Wechselseitige Beziehung von Mikroorganismen und Regenwürmern (Bild: Usman Ale and Nida Sajid, 2015) 8

Abbildung 3: Vorsammelhilfe des Kompost und Biogas Verbandes (Eigene Aufnahme) 16

Abbildung 4: Zerkleinerung des Materials mit einer Schere (Eigene Aufnahme)..... 16

Abbildung 5: Zentrifugalmühle Retsch ZM 200 (Eigene Aufnahme)..... 17

Abbildung 6: Gemahlenes Material in der Auffangschale (Eigene Aufnahme) 17

Abbildung 7: Siebturm auf Rüttelplatte (Eigene Aufnahme) 17

Abbildung 8: Mikroplastikpartikel der Größen 200 – 630 µm mikroskopisch betrachtet; von li nach re: 7-fache Vergrößerung; 10-fache Vergrößerung; 20-fache Vergrößerung; (Eigene Aufnahmen) 18

Abbildung 9: Mikroplastikpartikel der Größen 63 – 200 µm mikroskopisch betrachtet; von li nach re: 7-fache Vergrößerung; 10-fache Vergrößerung; 20-fache Vergrößerung; (Eigene Aufnahmen) 19

Abbildung 10: Mikroplastikpartikel < 63 µm mikroskopisch betrachtet; von li nach re: 7-fache Vergrößerung; 10-fache Vergrößerung; 20-fache Vergrößerung; (Eigene Aufnahmen)..... 19

Abbildung 11: Ausgangsmaterialien für das Bodensubstrat: von li. nach re.: Quarzsand der Fa. Scherf; Kaolin aus dem Töpfereibedarf; Torf der Fa. Floragard; Kalziumkarbonat der Fa. Roth (Eigene Aufnahmen)..... 20

Abbildung 12: Händische Mischung des Substrates (Foto: Clarissa von Au)..... 20

Abbildung 13: von li. nach re.: Fräsen der Trennwände aus Polystyrol; Behälter mit abgedichteter Trennwand; Behälter mit Deckel über beide Hälften (Tag 1); Behälter mit Deckel in der Mitte befestigt; (Eigene Aufnahmen) 21

Abbildung 14: Vorbereiten der Polystyrolplatten; Markierungen für die Luftlöcher (Eigene Aufnahme) 22

Abbildung 15: Entwickelter Versuchsaufbau; Behälter zum Beschweren mit Wasser gefüllt (Eigene Aufnahme)..... 22

Abbildung 16: Aluminiumboxen der Fa. Kingstone (Eigene Aufnahme) 23

Abbildung 17: Universal Dichtband der Fa. Tesa (Eigene Aufnahme) 23

Abbildung 18: Regelmäßige Verteilung der Gewichte F7 (Eigene Aufnahme) 23

Abbildung 19: Behälter mit gespanntem Pollennetz. Für die beiden helleren Behälter wurde ein Fliegennetz verwendet. (Eigene Aufnahme)..... 24

Abbildung 20: Behälter F5, abgedeckt; (Eigene Aufnahme)..... 24

Abbildung 21: Behälter F5, abgedeckt und beschwert; (Eigene Aufnahme) 25

Abbildung 22: Kompostierungsanlage Vermigrand Naturprodukte GmbH (Foto: Clarissa von Au)..... 26

Abbildung 23: Übersicht über die Parameter und Bezeichnungen der durchgeführten Experimente; 28

Abbildung 24: Abgewogenes MP (Eigene Aufnahme) 29
Abbildung 25: MP auf Substrat, unvermischt; (Eigene Aufnahme) 29
Abbildung 26: Salat und MP, vermischt (Eigene Aufnahme) 30
Abbildung 27: Kleinere Mengen Mikroplastik wurden durch das Mischen von 0.1% MP in Salat mit weiterem mikroplastikfreiem Salat hergestellt. (Eigene Aufnahmen) 30
Abbildung 28: Probenflasche am Überkopfschüttler (Foto: Clarissa von Au) 32
Abbildung 29: Abfiltrieren des Eluates (Foto: Clarissa von Au) 32
Abbildung 30: Muffelofen der Fa. Nabertherm (Eigene Aufnahme) 33
Abbildung 31: Heiße Proben zum Auskühlen im Exsikkator (Eigene Aufnahme) 33
Abbildung 32: Greifarm varioMAX (Eigene Aufnahme) 34
Abbildung 33: HVR von li nach re: 900°C bei Entfernung aus dem Gerät; abgekühlt, verbrauchte Füllung; HVR mit neuer Füllung; (Eigene Aufnahmen) 34
Abbildung 34: Reagenzien für die Ermittlung der Kalibrationsgerade nach 60‘ (Eigene Aufnahme) 36
Abbildung 35: Erlenmeyerkolben zur Vorbereitung der Probenansätze (Eigene Aufnahme) 37
Abbildung 36: Im Vordergrund: Glasküvetten für die Messung im Photometer (Eigene Aufnahme) 37
Abbildung 37: Sezieren des Wurmes (Eigene Aufnahme) 40
Abbildung 38: Darminhalt des Wurmes auf Objektträger (Eigene Aufnahme) 40
Abbildung 39: Abwaschen des Objektträgers auf Aluminiumfilter (Eigene Aufnahme) 40
Abbildung 40: Aluminiumfilter mit Material (Eigene Aufnahme) 40
Abbildung 41: Mittelwerte der Änderung des Einzelgewichtes der Würmer in 28 Tagen bei den Versuchsreihen F3, F4, F6 und F7. Die Sternchen zeigen die Signifikanzniveaus zur Kontrollgruppe. (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$) 42
Abbildung 42: Mittelwerte der Änderung des Gesamtgewichtes der Würmer der Versuchsreihe F5 nach 28 Tagen. Die Sternchen zeigen die Signifikanzniveaus zur Kontrollgruppe. (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$) 45
Abbildung 43: Mittelwert der Änderung des Gesamtgewichtes der Versuchsreihen F1 und F2 nach 28 Tagen. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe sind statistisch nicht signifikant. 46
Abbildung 44: Veränderung des Einzelgewichtes der Versuche mit 0,1% MP im Substrat 48
Abbildung 45: (links) Darminhalt eines Wurmes auf Objektträger (Eigene Aufnahme); (rechts) Darminhalt eines Wurmes, mikroskopisch betrachtet (20-fache Vergrößerung); Keine MP Partikel erkennbar (Eigene Aufnahme) (siehe auch Kapitel 3.7.3) 51
Abbildung 47: Absuloute Glühverluste der Gruppen F3, F4, F6 und F7 52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation von Kunststoffen (Iwata, 2015) mit einigen Beispielen.....2

Tabelle 2: Zertifizierungen für biobasierte und bioabbaubare Kunststoffe (“TÜV Austria Holding AG,” n.d.) 5

Tabelle 3: Ideale Umweltbedingungen für die Arten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* (Edwards, 2011).....10

Tabelle 4: Übersicht über die Versuchsparameter: MP Fraktion, Laufzeit, Wurmmenge, Anzahl Konzentrationen, Anzahl Ansätze, Gewählte Konzentrationen. 27

Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse für die Gruppe F3 - Vergleich der Konzentrationen 43

Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisse der Gruppe F6 - Vergleich der Konzentrationen; Signifikante P-Werte in grün dargestellt (< 0,05);.....44

Tabelle 7: Übersicht der Ergebnisse der Gruppe F7 - Vergleich der Konzentrationen; Signifikante P-Werte in Grün dargestellt (< 0,05);.....44

Tabelle 8: Übersicht der Ergebnisse F5 - Vergleich der Konzentrationen; Signifikante P- Werte in grün dargestellt (< 0,05); 46

Tabelle 9: Übersicht der Ergebnisse des statistischen Vergleichs aller Gruppen mit 0,1% MP; (A – MP von Beginn an im Substrat; Z – MP wurde wöchentlich zugefüttert).....48

Tabelle 10: Veränderung der Wurmanzahl in den Experimenten innerhalb von 4 Wochen (Mittelwerte der Triplikate).....49

Tabelle 11: Übersicht über die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Veränderung der Anzahl 50

Tabelle 12: Übersichtstabelle über die bestimmten Parameter zur Charakterisierung des Ausgangssubstrates;.....52

Abkürzungsverzeichnis

kg	Kilogramm
Stk.	Stück
t	Tonne
g	Gramm
µg	Mikrogramm
z.B.	zum Beispiel
MP	Mikroplastik
TPS	Thermoplastische Stärke

OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
LG	Leergewicht
Leergew.	Leergewicht
EW	Einwaage
EWf	Einwaage feucht
GV	Glühverlust
GR	Glührückstand
TM	Trockenmasse
TOC	Total Organic Carbon
N-ges	Gesamtstickstoff
C-ges	Gesamtkohlenstoff
nm	Nanometer
mg	Milligramm
l	Liter
NaOH	Natriumhydroxid
NH_4-N	Ammoniumstickstoff
NO_3-N	Nitratstickstoff
H_2SO_4	Schwefelsäure
H_3PO_4	Orthophosphorsäure
CH_3COOH	Essigsäure
KNO_3	Kaliumnitrat
HVR	Hauptverbrennungsrohr
CO_2	Kohlenstoffdioxid
NO_X	Stickoxide
TC	Total Carbon
TIC	Total Inorganic Carbon
PBAT	Polybutylenadipat-terephthalat
FM	Feuchtmasse
mf	Masse feucht
mtr	Masse trocken
SOD	Superoxid Dismuthase
GSH	Glutathion

1. Einleitung

Weltweit steigt die Menge an anfallenden Abfällen mit dem Bevölkerungswachstum, der fortschreitenden Industrialisierung von Entwicklungsländern und der zunehmenden Urbanisierung rasant, womit die Herausforderungen fachgerechter und umweltneutraler Entsorgung immer größer werden (Chen et al., 2020). Mit steigendem Abfallaufkommen wächst auch das Mikroplastikvorkommen im Boden, beispielsweise durch die Deposition von Klärschlämmen oder Kompost auf landwirtschaftlichen Feldern (Corradini et al., 2019; Vithanage et al., 2021).

In den letzten Jahren erhielten bioabbaubare Kunststoffe zunehmend Aufmerksamkeit. Sie haben das Potential, Umweltauswirkungen zu minimieren und bestehen im Gegensatz zu erdölbasierten Kunststoffen aus nachwachsenden Rohstoffquellen. Der Marktanteil von Biokunststoffen steigt jährlich, und mit steigendem Aufkommen wird auch die Frage dringlicher, ob sie tatsächlich in ein nicht schädliches Endprodukt umgewandelt werden können, oder ob auch sie Einfluss auf das Bodenökosystem haben. Es gibt bisher kaum Studien, die das Gefahrenpotential von bioabbaubaren Kunststoffen in Böden und insbesondere den Einfluss auf Regenwürmer abschätzen.

Daher wurde in dieser Masterarbeit das Ziel verfolgt, die Auswirkungen des bioabbaubaren Kunststoffs *thermoplastische Stärke* auf Regenwürmer, und damit auf einen wichtigen Teil unseres Ökosystems zu untersuchen. Im Laufe der jeweils vierwöchigen Experimente bei denen Regenwürmer der Arten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* verschiedenen Konzentrationen und Größen an biologisch abbaubaren Mikroplastikpartikeln ausgesetzt wurden, wurden folgende Forschungsfragen behandelt:

- Welche beobachtbaren „**Wurm-Parameter“** (Anzahl, Gewicht, etc.) werden durch das Vorhandensein von Kunststoffpartikel in Würmern am stärksten beeinflusst?
- Welche **Kunststoffpartikelgröße** beeinflusst die Würmer am stärksten?
- Ab welcher **Kunststoffpartikel-Konzentration** kommt es zu einem deutlichen Einfluss auf die Würmer?
- Werden durch die Aktivität der Würmer Kunststoffe **zerkleinert**?

Dazu wurden unterschiedliche Versuchsaufbauten entwickelt, getestet und die verschiedenen Auswirkungen auf die Regenwürmer nach jeweils vier Wochen untersucht.

Zu Beginn dieser Arbeit wird der aktuelle Stand des Wissens präsentiert. Anschließend werden die verwendeten Materialien und Methoden vorgestellt. Im darauf anschließenden Kapitel werden die gefundenen Ergebnisse präsentiert und diskutiert.

2. Stand des Wissens

2.1 Bioabbaubare Kunststoffe

2.1.1 Allgemeines

Bis 2015 wurden global etwa 6300 Mt Kunststoffabfall insgesamt produziert. Davon wurden nur 9% recycelt und 12 % thermisch verwertet. Die restlichen 79% wurden in Deponien oder völlig unkontrolliert in der Umwelt abgelagert (Geyer et al., 2017). Der Großteil der produzierten Kunststoffe besteht aus konventionellen Polymeren (z.B.: PE, PP, etc) und durch die mangelnde Abbaubarkeit kommt es zu einem stetig steigenden Verbrauch von Deponiefläche bzw. zu einer Akkumulation in der Umwelt. Ein weiteres Problem ist die zunehmende Verschmutzung von Wasser und Land durch unsachgemäß entsorgte Kunststoffabfälle (Shah et al., 2008). Abgesehen von den negativen Umweltauswirkungen können fossile Rohstoffe auch nicht unbegrenzt genutzt werden, da die Reserven immer knapper werden (Höök and Tang, 2013).

Als Alternative dazu wurden Biokunststoffe entwickelt. Ihr Marktanteil lag 2019 bei knappen 6% des globalen Kunststoffmarktes und in den folgenden 5 Jahren wurde eine Steigerung auf 10% prognostiziert, wodurch auch Abfälle und potentiell auch der Eintrag in die Umwelt zunehmen werden (Institut für Biokunststoffe und Bioverbundwerkstoffe, 2020).

Biokunststoff oder „Bioplastik“ ist ein Überbegriff für Kunststoffe, die entweder biologisch abbaubar sind, und/oder aus erneuerbaren Kohlenstoffressourcen hergestellt werden (Tokiwa et al., 2009). Unter biobasierten Kunststoffen werden Materialien verstanden, die aus erneuerbaren Kohlenstoffressourcen bestehen. Beispiele für erneuerbare Kohlenstoffressourcen sind Stärke, Zellulose, Lignin, Hemizellulose oder Pflanzenöl. (Iwata, 2015)

Bioabbaubare Kunststoffe werden nach verschiedenen Kriterien in Kategorien eingeteilt: PLA, PHA, PBAT, Stärkederivate, Bio-PE, Bio-PET, Bio-PA und andere werden als sogenannte „New-Economy“ Biokunststoffe bezeichnet. Diese werden vom Institut für Biokunststoffe und Bioverbundwerkstoffe der Universität Hannover definiert als Kunststoffe, die in den letzten 30 Jahren entwickelt wurden. Als „Old-Economy“ Biokunststoffe bezeichnet man unter anderem Gummi, regenerierte Zellulose, Zelluloseacetate und Linoleum. Hier sind Biokunststoffe inkludiert, deren Entwicklung schon mehr als 30 Jahre zurückliegt, also bevor petrochemische Biokunststoffe entwickelt wurden (Institut für Biokunststoffe und Bioverbundwerkstoffe, 2020).

Der Anteil von Bioabbaubaren Stärkederivaten wie z.B. thermoplastischer Stärke an den „New Economy“ Biokunststoffen lag 2019 bei 9.2%. Stärkederivate finden Verwendung in der Landwirtschaft, bei Konsumgütern und bei Verpackungen. Vor allem bei flexiblen Verpackungen wurde ein starker Zuwachs bis 2024 prognostiziert (Institut für Biokunststoffe und Bioverbundwerkstoffe, 2020).

Tabelle 1: Klassifikation von Kunststoffen (Iwata, 2015) mit einigen Beispielen

	Bio-basierte Kunststoffe	Erdölbasierte Kunststoffe
Bioabbaubare Kunststoffe	Polymilchsäure (PLA) Polyhydroxyalkanoate (PHA)	Polycaprolacton (PCL) Polybutylensuccinat/adipat (PBS/A)

	Polysaccharidderivate (low DS) Polyaminosäure Thermoplastische Stärke (TPS)	Polybutylenadipatcoterephtalat (PBAT)
Nicht abbaubare Kunststoffe	Polysaccharidderivate (high DS) Polyolpolyurethan Bio-Polyethylen (bio-PE) Bio-Polyethylenterephthalat (bio-PET)	Polyethylen (PE) Polypropylen (PP) Polystyrol (PS) Polyethylenterephthalat (PET)

Ein idealer, biologisch abbaubarer Kunststoff ist ein Material, das sich durch die Aktivität von natürlich vorkommenden Mikroorganismen und Pilzen komplett zu Kohlendioxid und Wasser zersetzt. Dabei macht es keinen Unterschied, ob das Material aus Biomasse (Bio-basierte Kunststoffe) oder aus fossilen Stoffen hergestellt wurde (Iwata, 2015).

In dieser Arbeit werden nur bioabbaubaren Kunststoffe näher behandelt, da deren Einfluss – im Gegensatz zu nicht abbaubarem Kunststoff – auf die Umwelt und speziell die Bodenfauna genauer untersucht werden soll.

2.1.2 Abbaubarkeit von bioabbaubaren Kunststoffen

Bioabbaubare Kunststoffe werden unter bestimmten Umweltbedingungen wesentlich schneller abgebaut, als konventionelle Kunststoffe, womit sich die deponierte Abfallmenge vermindern lässt, und eine Anreicherung in der Natur weitgehend vermieden werden kann.

Der Zersetzungsprozess von bioabbaubaren Materialien verläuft grob in drei Schritten: In einem ersten Schritt wird das Material von Mikroorganismen besiedelt. Anschließend werden von den Mikroorganismen Enzyme freigesetzt, die die Polymere in Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht (Monomere, Oligomere) zerlegen. Im dritten Schritt werden diese kleinen Moleküle von den Mikroorganismen aufgenommen und in Biomasse oder CO_2 umgewandelt (Zumstein et al., 2018).

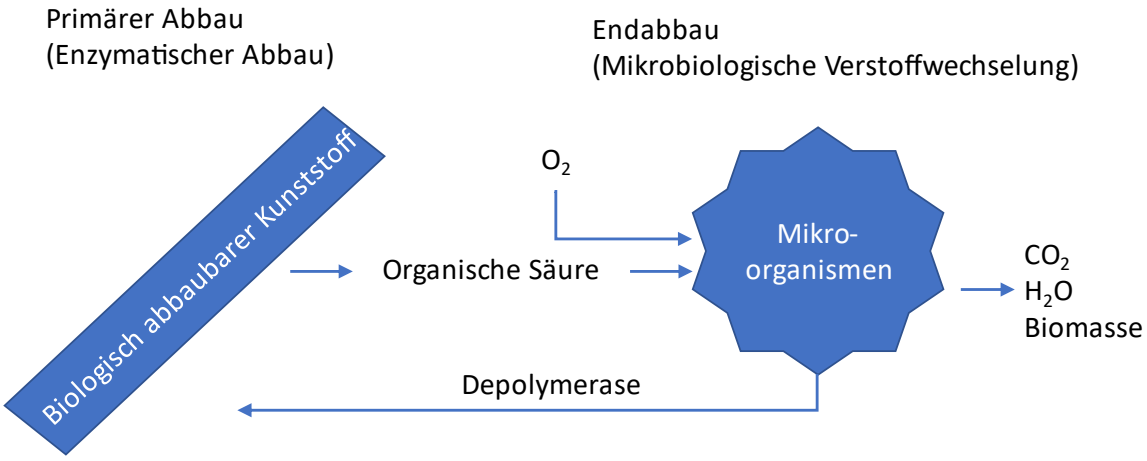


Abbildung 1: Abbauprozesse von biologisch abbaubaren Kunststoffen (Iwata, 2015)

In der ÖNORM 13432 (Anforderungen an die Verwertung von Verpackungen durch Kompostierung und biologischen Abbau) wird die vollständige biologische Abbaubarkeit folgendermaßen definiert: „Zerlegung einer chemischen Verbindung oder eines organischen Materials durch Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff in Kohlenstoffdioxid, Wasser und Salze anderer vorhandener Elemente (Mineralisation) unter Bildung neuer Biomasse oder in Abwesenheit von Sauerstoff in Kohlenstoffdioxid, Methan, Mineralsalze und neue Biomasse."

Die ÖNORM EN 13432 beschreibt auch die Anforderungen an die Verwertung von Verpackungen durch Kompostierung und biologischen Abbau. Es werden Kriterien festgelegt, um die Kompostierbarkeit von Verpackungen zu ermitteln:

- Chemische Zusammensetzung
- Biologische Abbaubarkeit
- Desintegration
- Auswirkung auf den biologischen Behandlungsprozess
- Auswirkungen auf die Qualität des entstandenen Kompostes.

Bei der Bestimmung der chemischen Zusammensetzung werden nicht nur die Bestandteile des Stoffes identifiziert, sondern auch gefährliche Stoffe bestimmt. Ebenfalls wird der Gehalt an organischem Kohlenstoff, der gesamten Trockensubstanz und der Glühverlust der Stoffe geprüft.

Für die Ermittlung der biologischen Abbaubarkeit werden einerseits die signifikanten organischen Bestandteile bestimmt, und andererseits werden aerobe und anaerobe Abbautests durchgeführt, bei denen der Abbaugrad des Materials bestimmt wird.

Bei der Bestimmung der Desintegration wird ebenfalls zwischen aerober und anaerober Behandlung unterschieden. Die Grenzwerte für Kunststoffteilchen, die nach 12 Wochen in der Fraktion < 2 mm wiedergefunden werden dürfen, liegt bei maximal 10% des ursprünglichen Trockengewichtes des Prüfmaterials. Es dürfen keine negativen Auswirkungen auf den biologischen Behandlungsprozess beobachtet werden. Die Auswirkungen auf den Behandlungsprozess können durch einen direkten Vergleich von Reaktoren, die mit und ohne Prüfmaterial betrieben werden, ermittelt werden. Physikalisch-chemische Parameter zur Bestimmung der Kompostqualität sind:

- Volumengewicht (Dichte)
- gesamte Trockensubstanz
- Glühverlust
- Salzgehalt
- pH-Wert
- Gehalt an gesamten Stickstoff, Ammoniumstickstoff, Phosphat, Magnesium und Kalzium

Um die Auswirkungen auf die Kompostqualität zu untersuchen, werden Keimungsrate und Biomasse von Pflanzen ermittelt, die auf Prüfkompost wachsen. Diese Werte müssen mindestens 90% des Kontrollkompostes entsprechen.

Der TÜV Austria hat verschiedene Zertifizierungen entwickelt, die die Prüfung auf die Abbaubarkeit von Materialien vereinheitlichen sollen. Die folgende Tabelle zeigt die Zertifizierungen für biobasierte und bioabbaubare Kunststoffe des TÜV Austria:

Tabelle 2: Zertifizierungen für biobasierte und bioabbaubare Kunststoffe (“TÜV Austria Holding AG,” n.d.)

Zertifizierungen	Kriterien
	Alle Komponenten, Tinten und Additive garantiert biologisch abbaubar in einer industriellen Kompostierungsanlage. Bezugspunkt ist die Norm EN 13432:2000.
	Kompostierbar in einem Gartenkomposthaufen in dem die Temperatur niedriger und weniger konstant ist als bei industrieller Kompostierung.
	Produkte entsprechen der Norm EN 13432.
	Biologisch abbaubar im Meer
	Biologisch abbaubar im Boden
	Biologisch abbaubar in Süßwasser

	Bestehend aus Kohlenstoff aus erneuerbaren Ressourcen. Sternebewertung für verschiedene Anteile. * → ≥ 20% & < 40% ** → ≥ 40% & < 60% *** → ≥ 60% & < 80% **** → ≥ 80%
	Basierend auf EN 16785-1. Biobasierter Gehalt bezieht sich auf Biomasse, nicht nur auf biobasierten Kohlenstoff.

Die in den durchgeführten Versuchen zur Vermikompostierung verwendeten „Bio-Kreislaufsackerl“ des Kompost und Biogas Verbandes (KBVÖ) haben die Zertifizierungen „OK Kompost Home“ und den „Keimling“ der European Bioplastic Association. Das bedeutet, dass sie laut TÜV Austria keinen Einfluss auf die Qualität des entstehenden Kompostes haben, wenn sie dem Hauskompost beigemengt werden.

Die verschiedenen zertifizierten bioabbaubaren Kunststoffe werden aber noch wesentlich diverser eingesetzt als nur als Verpackungsmaterial.

2.1.3 Anwendungsgebiete von bioabbaubaren Kunststoffen

Die Anwendungsgebiete von bioabbaubaren Kunststoffen sind vielfältig.

Materialien wie Polyhydroxyessigsäure (Polyglycolic acid - PGA) werden im medizinischen Bereich eingesetzt. Beispielsweise für die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen oder Knochenfixierung. Außerdem wird dieser Kunststoff als chirurgisches Nahtmaterial eingesetzt und kann vom Körper absorbiert werden (Shah et al., 2008).

Als Verpackungsmaterial, bei Papierbeschichtungen, Mulchfolien und Kompostsäcke werden unter anderem Polylactide (PLA) eingesetzt (Shah et al., 2008).

Auch die Verwendung als Verpackungsmaterial ist für den Boden relevant. Durch Littering und andere Vorgänge kommt das Material in die Umwelt. Biokunststoffe werden auch für die kontrollierte Ausgabe von Düngemitteln unterschiedlich verwendet (Leon Jannsen, Leszek Moscicki, 2009). Der größte Teil der Materialien aus thermoplastischer Stärke wird als flexibles Verpackungsmaterial verwendet (Institut für Biokunststoffe und Bioverbundwerkstoffe, 2020).

2.1.4 Thermoplastische Stärke

Stärke ist eine organische Verbindung, die zu den Kohlenhydraten zählt, anders bezeichnet ist sie ein Biopolymer aus einem Pflanzenspeicher. Thermoplaste

bezeichnet Polymere, die bei bestimmten Temperaturen in einen Fließzustand übergehen.

Stärke sind Polymere aus Zellwänden, oder strukturelle Polymere. Diese sind von Natur aus hydrophil und kristallin, was für die Verarbeitung und bei der Leistung des Materials kontraproduktiv ist. Das größte Problem bei Stärke ist jedoch die Wasserlöslichkeit. Gegenstände aus reiner Stärke würden quellen und sich verformen (Leon Jannsen, Leszek Moscicki, 2009).

Die Hauptbestandteile von Stärke sind die Polysaccharide Amylose und Amylopektin. Das Verhältnis dieser Komponenten ist je nach Bezugsquelle verschieden. Strukturell unterscheiden sich die beiden Komponenten deutlich, Amylose ist ein lineares Polymer, Amylopektin ist ein deutlich größeres und verzweigteres Molekül. Somit ergeben sich durch das Variieren der Verhältnisse Unterschiede in den Eigenschaften und Funktionen (Leon Jannsen, Leszek Moscicki, 2009). Die Stärke wird dabei meistens aus Mais, Zuckerrohr, und/oder Kartoffeln gewonnen. TPS wird häufig für die Verpackung von Lebensmittel eingesetzt und verrottet bei der Heimkompostierung ausreichend. Die Herstellung aus Mais beispielsweise, erfolgt durch die Extraktion von Dextrose, die anschließend destilliert und zu Milchsäure fermentiert wird. Durch die Kombination mit anderen biobasierten Materialien wird die molekulare Struktur gestärkt und es entsteht ein umweltfreundliches Harz. Angewendet werden solche stärkebasierten Verpackungsmaterialien unter anderem als Schalen für kalte Lebensmittel wie Salate, Früchte oder Sandwiches und als Wasserflaschen.

Modifizierte Stärke wird jedoch nicht nur als Verpackungsmaterial eingesetzt. Stoffe wie vernetzte Stärke, substituierte Stärke, lysierte Stärke und vorgelatinierte Stärke werden auch vielseitig in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel eingesetzt, zum Verändern der Viskosität und als Aromakapseln. Sie werden häufig in Produkten wie Suppen, Saucen, Backwaren, Milchprodukten und Konfekt gefunden (Leon Jannsen, Leszek Moscicki, 2009).

Die Mischung aus Stärke mit synthetischen Polymeren verbessert die Eigenschaften und vermindert die Abfallmenge durch die partielle Zersetzung (Leon Jannsen, Leszek Moscicki, 2009). Durch die mechanischen Eigenschaften und die Feuchtigkeitsempfindlichkeit sind die Anwendungen von Thermoplastischer Stärke oft limitiert. Die Mischung von Stärke und sehr hydrophoben Komponenten wie bioabbaubarem Polyester ist nicht möglich, und resultiert in getrennten Phasen. Daher wird Stärke mit anderen Biopolymeren als Mischungen oder in Form mehrlagiger Produkte kombiniert. Um die Wasseraffinität zu verbessern, werden dem Material Stoffe wie synthetische Polymere zugemischt oder es wird mit Vernetzungsmitteln wie Calcium- oder Zirkoniumsalzen gearbeitet.

Die mechanischen Eigenschaften können durch Zugabe von synthetischen Polymeren wie Ethylenacrylsäure oder Ethylen-Vinyl-Alkohol verbessert werden (Leon Jannsen, Leszek Moscicki, 2009).

Bioabbaubare Polyester, die mit Stärke vermischt werden, sind:

- PCL (Polycarpolactone)
- PEA (Polyesteramid)
- PHBV (Polyhydroxybutyrat co-hydrovyvalerat)
- PHBO (Polyhydroxybutyrat co-hydroxyoctonat)
- PBSA (poly(butylen succinate/adipate))
- PBAT (Poly(butylene adipateco-terephtalate))

- PLA (poly(lactic acid))
- PHEE (Poly(Hydroxy Ester Ester))

Die Vorsammelhilfen des Kompost und Biogas Verbandes die in den Versuchen verwendet wurden bestehen aus Thermoplastischer Stärke und PBAT.

PBAT ist ein bioabbaubarer Polyester, der in der Landwirtschaft im Boden verwendet wird. Es ist ein aliphatischer, aromatischer Co-Polyester und wird hauptsächlich in Mulchfolien verwendet (Zumstein et al., 2018).

2.2 Vermikompostierung

2.2.1 Grundlagen der Vermikompostierung

Vermikompostierung beschreibt den aeroben Abbau und die Stabilisierung von organischem Material durch die gemeinsame Aktivität von Mikroorganismen und Regenwürmer.

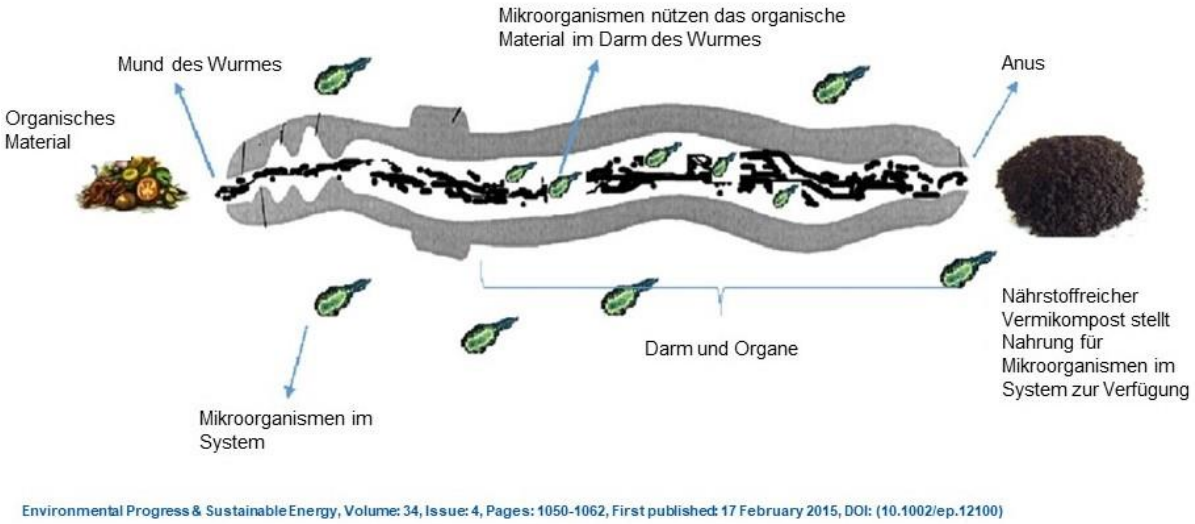


Abbildung 2: Wechselseitige Beziehung von Mikroorganismen und Regenwürmern (Bild: Usman Ale and Nida Sajid, 2015)

Die Mikroorganismen zersetzen das organische Material in biochemische Bestandteile. Die Würmer sorgen durch ihre Bewegungen für die Belüftung des Substrates, die Durchmischung und die physikalische Zerkleinerung. Weiters verändert sich die mikrobielle Zusammensetzung durch den Kontakt des Materials mit der Darmflora der Würmer (Edwards, 2011; Thais Lleó et al., 2013).

Die Vermikompostierung lässt sich in zwei Phasen unterteilen:

(a) Aktive Phase: Regenwürmer verarbeiten das organische Material und verändern den physikalischen Zustand und die mikrobielle Zusammensetzung.
(b) Reifungsphase: Die Regenwürmer besiedeln Bereiche mit frischem organischem Material. Mikroorganismen übernehmen den weiteren Abbau der organischen Substanz, die bereits den Darm der Würmer passiert hat. (Edwards, 2011).

2.2.2 Wichtige Parameter für die Vermikompostierung

Die Kompostierung mit Regenwürmern ist ein komplexer Prozess, der von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Im Folgenden sind diese Faktoren eingehender beschrieben.

- Futterzufuhr
- Temperatur
- Wassergehalt des Substrates
- C/N Verhältnis
- pH – Wert
- Sauerstoff
- Ammonium- und Salzgehalt
- Besatzdichte an Regenwürmern

Die Futterzufuhr hat Einfluss auf das Wachstum, die Reproduktionsrate und die Produktionsrate von Kokons. Die Fütterungsrate wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst wie Feuchtigkeitsgehalt, Partikelgröße und organischem Gehalt des Futters (Usman Ali and Nida Sajid, 2015).

Vermikomostierung ist ein mesophiler Kompostierungsvorgang. Der Temperaturbereich, in dem die Würmer aktiv sind, ist von der Wurmart abhängig. Tropische Regenwurmarten wie *Perionyx excavatus* und *Dendrobaena veneta* bevorzugen einen Bereich zwischen 15°C und 30°C. Heimische Arten wie *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* haben eine weit größere Toleranz von etwa 0°C bis 35°C. Das Optimum, bei dem Aktivität, Kokon Produktion, Stoffwechsel, Atmung und Reproduktion am höchsten sind, liegt bei den meisten Arten bei etwa 25°C (Edwards, 2011).

Nicht nur für die Würmer spielt die Temperatur eine bedeutende Rolle, sondern auch für die an der Vermikompostierung beteiligten Mikroorganismen (Usman Ali and Nida Sajid, 2015). Auch hier liegt die optimale Temperatur bei etwa 25°C. Der Sauerstoffgehalt sinkt bei Temperaturen über 35°C ab, da die mikrobielle und chemische Aktivität im organischen Substrat steigt. Ein niedriger Sauerstoffgehalt wirkt sich negativ auf die Überlebensrate der Würmer aus (Edwards, 2011; Usman Ali and Nida Sajid, 2015).

Der Wassergehalt des Substrats, in dem die Würmer leben, beeinflusst die Reproduktionsrate erheblich. Ein geringer Wassergehalt verzögert die sexuelle Reife. Der optimale Bereich ist von der Wurmart abhängig. Die Arten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* haben die höchste Wachstumsrate bei 80 – 90% (Edwards, 2011; Usman Ali and Nida Sajid, 2015).

Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff beeinflusst die Zellneubildung, das Wachstum und den Stoffwechsel der Würmer. Beide Stoffe sollen in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Das Verhältnis ist auch ein wichtiger Indikator für die Reife des Kompostes. Bei reifem Kompost soll das Verhältnis unter 20:1 liegen. Durch den Abbau von organischem Material und Mineralisierung entweicht Kohlenstoff durch die Bildung von Kohlendioxid bei der Atmung der Mikroorganismen. Der Stickstoffgehalt wird durch die Exkremente und den Schleim der Würmer erhöht. Für den Stickstoffgehalt des Endmaterials ist aber vor allem das Ausgangsmaterial verantwortlich. Auch ein niedriger pH-Wert erhöht den Stickstoffgehalt, da bei

alkalischem pH Stickstoff in Form von flüchtigem Ammonium verloren geht (Usman Ali and Nida Sajid, 2015).

Der optimale Bereich für Vermikompostierung liegt hier zwischen 4,5 – 9,0, wobei die Prozesse bei neutralen pH-Wert am effizientesten funktionieren. Der pH-Wert eines Kompostes ist abhängig von der Zusammensetzung des Abfalls. Diese verändern sich aufgrund der mikrobiellen Aktivität während des Abbauprozesses. Bei den Zersetzungsprozessen entstehen Zwischenprodukte wie Ammonium und Huminsäure, die den pH-Wert beeinflussen. Am Anfang des Prozesses herrscht ein leicht alkalischer pH-Wert vor, der sich dann über den neutralen Bereich bis in den leicht sauren Bereich zum Ende des Vermikompostierungsprozesses verändert (Usman Ali and Nida Sajid, 2015). Um in der Praxis den sauren pH-Wert wieder auszugleichen, kann Gartenkalk dem Substrat zugeführt werden (“Richtig kompostieren in Wohnräumen mit der Wurmkiste,” n.d.).

Regenwürmer atmen über die Haut. Sauerstoff und Kohlendioxid diffundieren durch ihre Oberfläche. Sie können in anaeroben Bedingungen nicht überleben.

Regenwürmer sind Ammonium gegenüber sehr empfindlich. Sie können in Substraten mit hohem Ammoniumgehalt, wie zum Beispiel frischem Geflügelkot, nicht überleben. Auch bei hohen Salzgehalten sinkt die Überlebensrate drastisch (Edwards, 2011). Für beide Parameter ist die Sensitivitätsgrenze sehr gering (Ammonium < 1 mg/g; Salze < 0,5% (Trockenmasse (TM))) (Edwards, 2011).

Die Dichte an Regenwürmern im Substrat wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst wie der Qualität und Quantität des Ausgangssubstrates, Temperatur, Feuchtigkeit und Bodenstruktur und der Textur (Usman Ali and Nida Sajid, 2015).

Bei einer niedrigen Besatzdichte steigt die Häufigkeit der Fortpflanzung (Usman Ali and Nida Sajid, 2015). Regenwürmer, die in Substraten mit hoher Besatzdichte leben wachsen langsamer und weisen ein geringeres Endgewicht auf. Auch die Geschlechtsreife erfolgt bei hoher Besatzdichte verzögert (Edwards, 2011).

Die idealen Bedingungen für *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* sind in folgender Tabelle kurz zusammengefasst (Edwards, 2011):

Umweltbedingung	**Anforderung**
Temperatur	15°C – 20°C (Limits: 4°C – 30°C)
Wassergehalt	80% - 90% (Limits: 60% - 90%) TM
Sauerstoff	Aerobe Bedingungen
Ammoniumgehalt des Abfalls	< 1 mg * g^{-1} TM
Salzgehalt	< 0,5% TM
pH	5 - 9

Tabelle 3: Ideale Umweltbedingungen für die Arten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* (Edwards, 2011)

2.2.3 Würmer

Die in der Vermikompostierung eingesetzten Wurmarten gehören hauptsächlich der Familie der Lumbricidae an. Laut Reynolds und Wetzel (2004) existieren mehr als 8300 Spezies in der Familie der Oligochaeta. In Europa, Nordamerika und Asien gehören die meisten vorkommenden Arten der Familie der Lumbricidae an.

Regenwürmer sind segmentierte Würmer mit einer externen Drüse (Clitellum) zur Produktion von Eiern (Kokons). Weitere anatomische Merkmale sind das Postromium, ein Sinneslappen am anterioren Ende des Wurmes und der Anus am posterioren Ende. Regenwürmer sind Zwitter und pflanzen sich durch gegenseitige Befruchtung fort. Jeder Partner produziert Kokons mit 1 – 20 befruchteten Eiern. Die Eier, die in ihrer Form Zitronen ähneln, werden normalerweise oberflächennahe abgelegt (Edwards, 2011).

Die Inkubationszeit der Eier variiert je nach Wurm Art. Wenn die Würmer schlüpfen, sind sie weiß und wenige Millimeter groß. Innerhalb weniger Wochen wird die sexuelle Reife erreicht (Edwards, 2011).

Regenwürmer werden im Bereich der wirbellosen Tiere in drei Kategorien, auf ihren natürlichen Lebensraum und die Fressart bezogenen, eingeteilt: aneisch, endogeisch, epigeisch. Aneische und endogeische Arten leben im Boden und verarbeiten eine Mischung aus organischem Material und Boden. Epigeische Arten leben in den organischen Bodenschichten und konsumieren grobes organisches Material. Für die Wurmkompostierung relevante Arten gehören zum Stamm der Annelida (Ringelwürmer) in die Klasse der Citellata (Gürtelwürmer) und zählen zu den epigeischen Arten. Diese Arten sind aus mehreren Gründen für die Vermikompostierung geeignet. Sie leben im organischen Material, haben eine große Toleranz für veränderte Umweltfaktoren, einen kurzen Lebenszyklus und hohe Reproduktionsraten. Häufig verwendet werden aber nur fünf Arten: *Eisenia andrei, Eisenia fetida, Dendrobaena veneta, Perionyx excavatus* und *Eudrilius eugeniae* (Edwards, 2011).

In dieser Arbeit wurden nur die Arten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* verwendet, deshalb wird auch nur auf diese näher eingegangen.

Die beiden Arten werden derzeit am häufigsten für die Vermikompostierung genutzt. Sie kommen weltweit vor und sind resistent gegen Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen.

Eisenia fetida hat ein gestreiftes Erscheinungsbild. Die Bereiche zwischen den Segmenten sind gelblich. Bei *Eisenia andrei* sind diese Bereiche rötlich gefärbt, deshalb hat der Wurm ein einheitlicheres rotes Erscheinungsbild. Abgesehen davon unterscheiden sich die beiden Arten nur marginal. Die Wachstumsrate und Kokonproduktion sind leicht höher bei *Eisenia andrei* (Edwards, 2011).

Eisenia fetida braucht für eine optimale Entwicklung einen hohen Wassergehalt, genügend organisches Material und eine dunkle Umgebung (Usman Ali and Nida Sajid, 2015).

2.3 Würmer und Mikroplastik

Die meisten bisher publizierten Studien über Mikroplastik in der Umwelt behandeln den Einfluss auf aquatische Ökosysteme. Nur wenige Studien beschäftigen sich mit den Auswirkungen von Mikroplastik in terrestrischen Ökosystemen. Hier folgend werden relevante Studien beschrieben.

Lwanga et al. beschäftigte sich 2016 mit den Auswirkungen von Mikroplastik auf den Regenwurm *Lumbricus terrestris*. Die Würmer wurden 60 Tage lang Polyethylenpartikel (< 150 µm) in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt und beobachtet. Die Studie konzentrierte sich einerseits auf die Auswirkungen des Mikroplastik (MP) auf Fitness und Überleben von *Lumbricus terrestris*, und andererseits auf die Auswirkungen von *L. terrestris* auf die Konzentration der Partikel in den Ausscheidungen. Das erste Ziel war es die Überlebensrate, Wachstumsrate, Reproduktion und Tunnelformation (Regenwürmer bilden ein Tunnelsystem im Boden aus (Jégou et al., 2001)) bei verschiedenen Mikroplastik Konzentrationen zu beobachten. Zweitens wurde die Aufnahmerate und die resultierende Konzentration in den Ausscheidungen dokumentiert. Um die Mortalitätsrate zu bestimmen, wurde das Experiment 14 Tage lang durchgeführt. Für Wachstum und Reproduktion wurde das Experiment 60 Tage lang beobachtet. Das Mikroplastik wurde in Konzentrationen von 7, 28, 45 und 60 Gew.-% (TM) mit Pflanzenresten vermischt und auf sandigen Boden aufgetragen. Durch die Würmer wurde das Material nach unten transportiert, was auf die Gesamtmasse des Bodens bezogen eine Mikroplastikkonzentration von 0,2, 0,4, 0,5 und 1,2 % bedeutet. 13 g der MP-Pflanzenreste Mischung wurden alle 15 Tage auf den Boden aufgetragen. Diese Methode sollte eine möglichst realistische Abbildung des MP-Eintrags in den Boden nachstellen.

Um die Aufnahmerate von MP zu erfahren, wurden andere Experimente durchgeführt. Mikroplastik wurde mit organischem Material in verschiedenen Konzentrationen von 0 – 60 Gew.-% (TM) gemischt. Anschließend wurden 6,5 g organische Probemasse in Petrischalen gegeben und 3, vorher ausgehungerte Würmer, für 4 Tage hinzugefügt. Die Aufnahme des Substrates wurde durch Abwiegen der Ausscheidungen erfasst. Mikroplastik wurde durch Dichtetrennung separiert und abgewogen.

In Experimenten die 60 Tage lang liefen, wurde eine Mortalitätsrate von 8% bzw. 25% erfasst bei Konzentrationen von 28% bzw. 60 Gew.-% (TM). Die Wachstumsrate war bei den Konzentrationen von 0% und 7% signifikant erhöht (10,3 ±4 und 5,8 ±3,2 (mg $Wurm^{-1}$ Tag^{-1} (Mittelwert ± Standardabweichung)). Bei den Konzentrationen von > 28% wurde ein signifikanter Gewichtsverlust beobachtet. Die Reproduktionsrate unterschied sich jedoch nicht signifikant.Bei 14-Tages Experimenten lag die Mortalität bei 0%.

Es zeigte sich eine veränderte Größenverteilung der Partikel vor- und nach der Aufnahme durch die Würmer, da die kleinsten Partikel im Wurmdarm verblieben. Die Autoren vermuteten, dass entweder eine selektive Aufnahme der Partikel, oder auch ein Verdauen und Zerkleinern durch die Würmer möglich wäre (Huerta Lwanga et al., 2016).

Susanna Sforzini et al. führten 2016 eine Studie durch, in der die Auswirkungen von biologisch abbaubarem Kunststoff auf Lebewesen getestet wurde. Sie untersuchte neben Pflanzen und anderen Lebewesen (Bakterien, Protozoen, Algen, Krustentiere) auch die Auswirkungen auf *Eisenia andrei*. Der untersuchte Kunststoff der Firma Novamont, der auf Maisstärke und bioabbaubaren Polyestern basierte, zeigte nach

einer Inkubation von 28 Tagen keine Effekte auf die Würmer. Untersucht wurden: Überlebensrate, Kokonproduktion und die Anzahl der Jungwürmer (Sforzini et al., 2016).

Rodriguez-Sejio et al. (2017) führten eine Studie durch mit *Eisenia fetida* und Polyethylen Mikroplastikpartikeln. Die Würmer wurden verschiedenen Konzentrationen von Mikroplastik zwischen 0 und 0,1 Gew.-% (TM) ausgesetzt. Die PE-Partikel waren zwischen 250 und 1000 µm groß. Nach 28 Tagen konnten bei der Überlebensrate, der Fortpflanzungsrate und dem Gewichtszuwachs keine Unterschiede festgestellt werden. Bei histopathologischen Untersuchungen konnten jedoch durchaus Effekte festgestellt werden. Analysen des Darminhaltes der Würmer zeigten, dass MP Partikel aufgenommen wurden. In histologischen Untersuchungen konnten sowohl Gewebeschäden als auch Immunreaktionen festgestellt werden. Diese Veränderungen konnten sogar bei der geringsten Konzentration festgestellt werden (0,00625 Gew.-% (TM)) und wurden stärker mit höheren Konzentrationen. Das Studiendesign beinhaltete auch eine positive Kontrollgruppe, in der Würmer direkt mit Mikroplastik auf einem Agar Substrat in Kontakt gebracht wurden, wodurch die Würmer nur die Partikel ohne Bodensubstrat aufnehmen konnten. Beim Aufschneiden der Würmer wurde festgestellt, dass auch bei der positiven Kontrollgruppe mit dem Agar nicht alle Würmer Partikel aufgenommen hatten. Zur Erklärung wurden die Theorien aufgestellt, dass, entweder (1) die Würmer ihr Futter nicht nur nach Partikelgröße, sondern auch nach bisher unbekannten Parametern aussuchen. Interessant ist, dass große MP Partikel gemieden und kleine effektiv ausgeschieden wurden. Die zweite Hypothese (2) war, dass alle MP Partikel, unabhängig von der Größe, effektiv ausgeschieden wurden (Rodriguez-Seijo et al., 2017).

Rodríguez-Seijo et al. publizierten 2018 eine weitere Studie zu diesem Thema. *Eisenia fetida* wurden 28 Tage lang verschiedenen Konzentrationen von Polyethylen mit geringer Dichte ausgesetzt. Die Experimente wurden mit den gleichen Konzentrationen und Partikelgrößen wie in der vorhergehenden Studie durchgeführt. (Rodriguez-Seijo et al., 2017) Es wurden Biomarker für oxidativen Stress, und Biomarker für den Energiestoffwechsel untersucht. Außerdem wurden noch molekulare Veränderungen der Regenwürmer mit Fourier-Transform Infrarotspektroskopie (FTIR) und Kernspinresonanz untersucht.

Die antioxidativen Abwehrkräfte wurden geprüft durch Messung verschiedener Biomarker wie glutathione S-Transferase (GST) und Katalase (CAT), sowie *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS). Lactatdehydrogenase (LDH) wurde ebenfalls bestimmt, um den anaeroben Stoffwechsel beurteilen zu können.

Es wurden bezüglich der Mortalität und der Variabilität nach 28 Tagen keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Bei der Aktivität von Katalase wurden keine signifikanten Abweichungen festgestellt. Nur bei einer der niedrigsten Konzentrationen war das Enzym signifikant reduziert. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass bestimmte Additive in Kunststoffen als Katalase Inhibitoren wirken. Gluthanion-S-Transferase war nur bei der höchsten Konzentration signifikant erhöht. Genauso verhielt es sich mit TBAR. Auch hier war nur bei der höchsten Konzentration ein signifikant höherer Gehalt feststellbar. Bei der Untersuchung der Lactat Dehydrogenase, die ein Maß dafür darstellt, wie viel Energie vom Organismus zusätzlich in kurzer Zeit gebraucht wird, wurde bei der höchsten Konzentration an MP ebenfalls ein höheres Level festgestellt. Es wird dadurch erklärt, dass bei hohen MP Konzentrationen Zellschäden auftauchen, welche durch erhöhten Energieaufwand wieder repariert werden müssen.

Mit der FTIR-ATR und der Kernspinresonanz konnten, entgegengesetzt zur vorherigen Studie mit *Eisenia andrei* (Rodriguez-Seijo et al., 2017), keine signifikanten Unterschiede auf molekularer Ebene zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Die Schlussfolgerung der Studie war, dass Würmer, die MP Partikeln ausgesetzt waren, eine oxidative Stressreaktion zeigten und sich der Energiestoffwechsel veränderte. Durch das Ausbleiben von Unterschieden bei der FTIR-ATR und Kernspinresonanz wurde weiters festgestellt, dass die Unterschiede der beiden Spezies *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* eine detailliertere Untersuchung von diversen Spezies notwendig machten, da sie unterschiedliche Reaktionen zeigten (Rodríguez-Seijo et al., 2018).

Cao et al. führte 2017 eine ähnliche Studie durch. *Eisenia fetida* wurde, während einer Dauer von 30 Tagen Polystyrol Mikroplastikpartikeln (58 µm) in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt von 0, 0,25, 0,5, 1 und 2 Gew.-% (TM) Trockengewicht. Die Polystyrol Partikel wurden mit 500 g Substrat aus Erde und Sand vermischt. 10 gesunde Würmer wurden zufällig ausgesucht und auf das Substrat gegeben. Nach 30 Tagen wurden die Regenwürmer gewaschen und getrocknet. Hier wurde festgestellt, dass niedrige Konzentrationen < 0,5% nur sehr kleine Auswirkungen auf die Fitness der Würmer hatten, wohingegen bei höheren Konzentrationen von 1 und 2% das Wachstum signifikant reduziert wurde und die Mortalität erhöht war (Cao et al., 2017).

2019 wurde eine Studie von Jiang et al. veröffentlicht bei der *Eisenia fetida* 14 Tage lang Mikroplastik ausgesetzt war. Die Würmer wurden zwei Konzentrationen von 100 µg/kg Boden und 1000 µg/kg Boden ausgesetzt, wobei jeweils zwei Größen von 100 nm und 1300 nm an fluoreszierende Polystyrol Partikel eingesetzt wurden. Untersucht wurde die Aufnahme und Akkumulation der Partikel im Darm der Würmer, histopathologische Veränderungen, oxidativer Stress und DNA-Schäden. Ergebnisse zeigten eine höhere Menge bei der Aufnahme von Mikroplastik mit einer Größe von 1300 nm. Es konnten auch Veränderungen bei den Konzentrationen von Glutathion (GSH) und Superoxid-Dismuthase (SOD) festgestellt werden. Die Studienautoren folgerten, dass Partikelgrößen von 1300 nm mehr toxikologische Schäden auslösten als Partikel mit einer Größe von 100 nm.

Überraschenderweise war die Wachstumsrate bei den exponierten Würmern höher als in der Kontrollgruppe. Zurückgeführt wird dies von Jiang et al. auf einen hormetischen Effekt, der durch die niedrigen Konzentrationen an Mikroplastik herbeigeführt wurde. In den Versuchen war die Aktivität von SOD bei den Versuchen mit MP signifikant erhöht und die Konzentration von GSH hingegen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Diese enzymatischen Aktivitäten sind effektive Indikatoren für Umweltschadstoffe (Liang et al., 2017), wobei SOD ein Sauerstoffradikalfänger ist. Es wurde eine vermehrte Steigerung des SOD Levels bei einem steigenden Level von Radikalen festgestellt. Die Aufgabe von SOD ist es in Zellen Schäden durch Oxidation zu verhindern. Die Verminderte Produktion von SOD als Ergebnis wird in der Studie somit durch die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen erklärt, die zu einer Überlastung der antioxidativen Abwehrkräfte führen kann und somit zu einem niedrigen SOD Level.

Weiters wurde festgestellt, dass sich die Mikroplastikpartikel in den Eingeweiden der Würmer nach 14 Tagen ansammeln. Bei höheren Konzentrationen war auch der angesammelte Teil größer. Bei der histopathologischen Untersuchung wurden bei der Kontrollgruppe keine negativen Veränderungen festgestellt, bei den MP ausgesetzten

Gruppen konnten jedoch Veränderungen der Zellen festgestellt werden. Es wurden vergrößerte Zellen mit unregelmäßigen Formen und veränderten Zellkerngrößen gefunden.

DNA-Schäden wurden mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet assay) festgestellt. Mit dieser Methode lassen sich DNA-Schäden durch Umweltverschmutzungen bei Wirbellosen einordnen. Die Ergebnisse zeigten, dass DNA-Schäden durch beide Partikelgrößen verursacht wurden, wobei mehr Schäden in Versuchen mit 1300 nm auftraten. Bei beiden Größen zeigte sich ein größerer Anteil an beschädigter DNA (% tDNA) bei der höheren Konzentration.

Wie beschrieben, ist die Anzahl der derzeitig vorhandenen Studien zum Einfluss von Mikroplastik auf Bodenorganismen noch gering. Es existiert zudem nur eine einzige Studie, die den Einfluss von biologisch abbaubarem Mikroplastik auf Regenwürmer untersucht hat. Die vorliegende Arbeit soll einen Teil dazu beitragen, diese Wissenslücke zu schließen und den Einfluss von thermoplastischer Stärke auf die Regenwurmarten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* untersuchen.

3. Material und Methode

Die Versuche wurden mit verschiedenen Parametern durchgeführt und unterscheiden sich in der Größe der Mikroplastikfraktion, der Wurmmenge, den MP Konzentrationen, und der Anzahl der Ansätze (siehe Kapitel 3.5, bzw. Tabelle 4).

3.1 Herstellung des verwendeten Mikroplastiks

Für die Experimente wurde ausschließlich biologisch abbaubarer Kunststoff verwendet. Das Ausgangsmaterial für die Herstellung des Mikroplastiks (MP) waren handelsübliche Vorsammelhilfen aus Thermoplastischer Stärke (TPS) und Polybutylenadipat-terephthalat (PBAT). Diese Vorsammelhilfen sind gemäß EN13432 vollständig biologisch abbaubar. Es handelt sich um sogenannte „Bio Kreislaufsackerl“ des Kompost und Biogas Verbandes Österreich (KBVÖ).

Die Herstellung des Mikroplastiks für die Experimente erfolgte durch Zerkleinerung von bioabbaubaren „Kreislaufsackerl“ mit einer Schere. Anschließend wurden die vorgeschnittenen Fragmente in einer Tiefkühltruhe bei -27°C für mehrere Stunden, meist über Nacht, gekühlt.

Abbildung 3: Vorsammelhilfe des Kompost und Biogas Verbandes (Eigene Aufnahme)

Abbildung 4: Zerkleinerung des Materials mit einer Schere (Eigene Aufnahme)

3.1.1 Zerkleinerungsverfahren

3.1.1.1 Zentrifugalmühle

Zum weiteren Zerkleinern des Kunststoffes wurde die Zentrifugalmühle *Retsch ZM 200* verwendet (siehe Abbildungen 5 und 6). Das vorzerkleinerte Material wurde mit Trockeneis im Verhältnis 1:2 vermischt. Trockeneis besteht aus CO_2 und hat eine Temperatur von – 78°C, wobei das Trockeneis bei Erwärmung nicht schmilzt, sondern sublimiert, wodurch der Kunststoff nicht „feucht“ wird. Durch die Vermischung wurde eine Versprödung des Materials erreicht, da durch die Hitzeentwicklung in der Mühle (10 000 U/min) der Kunststoff ansonsten schmilzt und verschmiert.

Das vorzerkleinerte Material mit Maßen von ca. 0.8 x 0.8 cm wurde im ersten Schritt mit einem Ringsieb mit der Lochung von 0.5 mm gemahlen.

Abbildung 5: Zentrifugalmühle Retsch ZM 200 (Eigene Aufnahme)

Abbildung 6: Gemahlenes Material in der Auffangschale (Eigene Aufnahme)

Der gemahlene Kunststoff wurde im Trockenschrank bei 40°C einige Stunden getrocknet damit das restliche Trockeneis und das aus der Luft abgekühlte Kondenswasser entfernt werden. Anschließend wurden mittels Siebung in einem Siebturm (siehe Abbildung 7) die Partikel in Größenintervalle getrennt und in Größenfraktionen unterteilt. Der Großteil der Partikel aus dem Durchgang mit dem 0.5 mm Ringsieb gehörte der Fraktion 200 – 630 µm an.

Um die Fraktionen 63 – 200 µm und < 63 µm herzustellen, wurde das gemahlene Material nochmals mit Trockeneis vermischt und in der Zentrifugalmühle mit dem Ringsieb mit der Lochung von 0.125 mm gemahlen.

Nach der Siebanalyse stellte sich die Verteilung der Größenfraktionen als sehr ungleich heraus. Die Fraktion 200 – 630 µm stellte ~ 81% dar, die Fraktion 63 – 200 µm etwa 18%. Die Herstellung der Fraktion < 63 µm erwies sich als ineffizient mit der gewählten Methode. Bei den Mahlgängen mit der *ZM 200* machte diese Fraktion ~ 1 % der gesamten gesiebten Masse aus, daher wurden verschiedene weitere Möglichkeiten der Zerkleinerung versucht.

Abbildung 7: Siebturm auf Rüttelplatte (Eigene Aufnahme)

3.1.1.2 Ultraschallkavitation

Die bereits vorher zerkleinerte Mikroplastikprobe (200 – 630 µm) wurde in Wasser in ein Probenröhrchen dispergiert und anschließend mit Ultraschallkavitation behandelt. Da nur sehr wenige kleine Kunststoffe hergestellt werden konnten, wurde auch Sand (60 – 300 µm) hinzugefügt, um den Zerkleinerungseffekt zu maximieren. Die erzeugte Menge war jedoch gering und es erwies sich als äußerst schwierig den Sand von den Mikroplastikteilen zu trennen.

3.1.1.3 Zerkleinerung mit flüssigem Stickstoff

Die vorgemahlene Probe (200 – 630 µm) wurde in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff übergossen. Nach kurzer Wartezeit wurde das Material mit dem Stößel durch Drücken und Drehen zerkleinert. Auch bei dieser Methode war die Menge des hergestellten Materials < 63 µm nur sehr gering.

Beide alternativen Methoden für die Herstellung von MP < 63 µm erwiesen sich als zu ineffizient um im gegebenen Zeitrahmen eine ausreichende Menge an Mikroplastik in der Größe < 63 µm herzustellen.

3.1.2 Charakterisierung der aufbereiteten Mikrokunstofffraktionen

Das gemahlene Mikroplastik wurde unter dem am Institut für Abfallwirtschaft vorhandenen Stereomikroskop (Olympus) genauer charakterisiert und dokumentiert.

3.1.2.1 Mikroplastik Fraktion 200 – 630 µm

Die Farbe der Teilchen war beige bis dunkelbraun und entsprach der ursprünglichen Farbe, wodurch davon auszugehen ist, dass die verwendeten Pigmente sich nicht durch den Mahlvorgang verändert haben. Der ursprüngliche Aufdruck war teilweise noch erkennbar. Die Ränder der Partikel unterschieden sich auch stark und reichten von gezackten und ausgefranst Strukturen bis hin zu geraden Kanten. Auch die Partikelgröße variierte stark, wobei auch kleinere Partikel gefunden wurden, die an größeren hafteten.

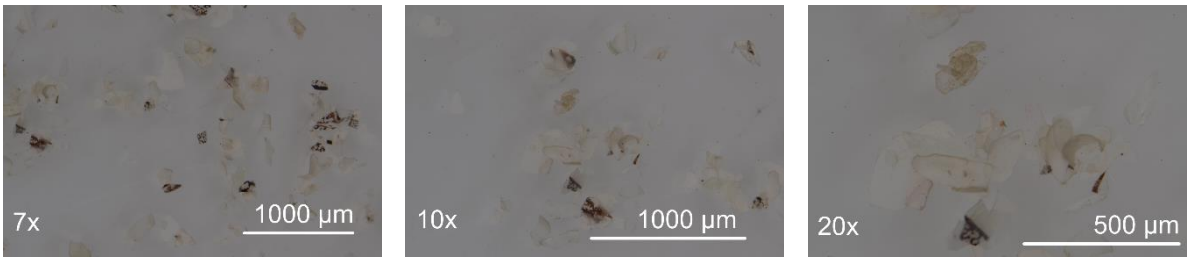


Abbildung 8: Mikroplastikpartikel der Größen 200 – 630 µm mikroskopisch betrachtet; von li nach re: 7-fache Vergrößerung; 10-fache Vergrößerung; 20-fache Vergrößerung; (Eigene Aufnahmen)

3.1.2.2 Fraktion 63 – 200 µm

Auch die Teilchen der Fraktion 63 – 200 µm waren beige bis dunkelbraun und behielten somit die Farbe des ursprünglichen Materials. Die meisten Partikel wiesen aber eine längliche Form mit sehr unregelmäßigen Rändern auf. Die Größe der Partikel war einheitlicher als bei der Fraktion 200 – 630 µm.

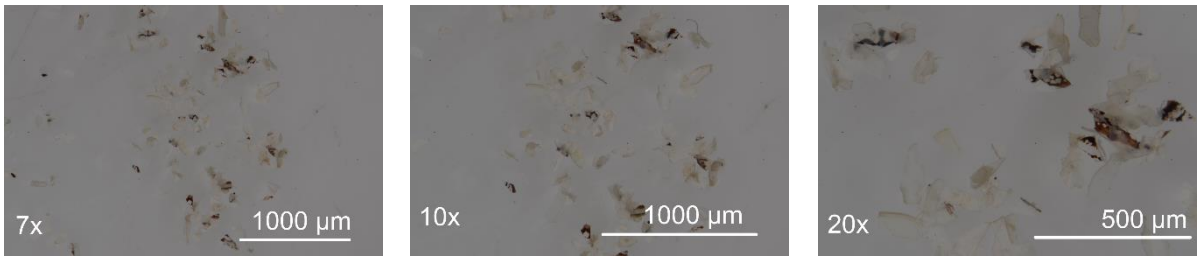


Abbildung 9: Mikroplastikpartikel der Größen 63 – 200 µm mikroskopisch betrachtet; von li nach re: 7-fache Vergrößerung; 10-fache Vergrößerung; 20-fache Vergrößerung; (Eigene Aufnahmen)

3.1.2.3 Fraktion < 63 µm

Die Farbe der Teilchen war beige bis dunkelbraun. Hauptsächlich waren rundliche Formen mit stumpfen Rändern zu erkennen. Vereinzelt wurden auch sehr schmale, längliche Formen gefunden. Die Größenverteilung war einheitlicher als bei den anderen Fraktionen.

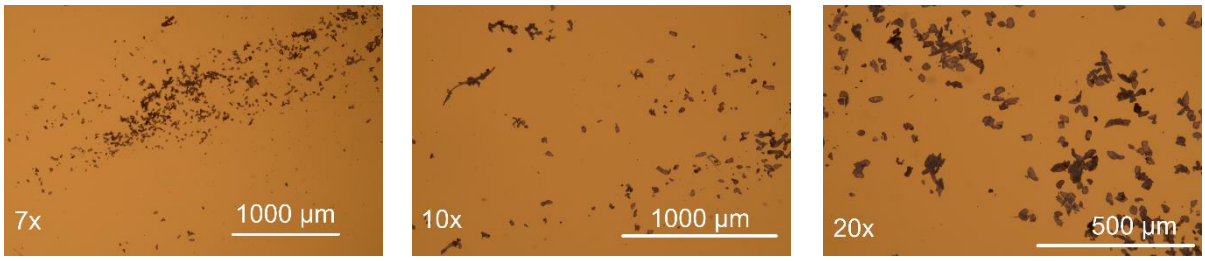


Abbildung 10: Mikroplastikpartikel < 63 µm mikroskopisch betrachtet; von li nach re: 7-fache Vergrößerung; 10-fache Vergrößerung; 20-fache Vergrößerung; (Eigene Aufnahmen)

3.2 Herstellung des Substrates

Das Substrat wurde gemäß OECD Guideline Testverfahren „Guideline for the Testing of Chemicals (222/2016) Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)“ und dem Testverfahren (207/1984) „Earthworm, Acute Toxicity Tests“ hergestellt. (OECD, 2016, 1984)

Die Zusammensetzung des Substrates ergibt sich aus:

- 69,7 % Quarzsand (Rundkorn gewaschen; Korngröße 60 – 300 µm)
- 20,0 % Kaolinton
- 10,0 % Torf
- 0,3 % Kalziumkarbonat ($CaCO_3$)

Die einzelnen Komponenten des Substrates wurden separat abgewogen und anschließend trocken in einem Trog vermischt.

Der Wassergehalt des trockenen Substrates (Trockenschrank 105°C, 24h) betrug 4,4%TM. Um einen Wassergehalt von ca. 35% der Trockenmasse zu erreichen, wurde darauf basierend die benötigte Wassermenge berechnet. Der pH-Wert wurde mit Kalziumkarbonat auf einen Zielwert von 6 ± 0,5 eingestellt.

Der Wassergehalt des Bodensubstrates betrug zum Zeitpunkt des Einbaues 37,5% bezogen auf die Trockenmasse, der pH-Wert betrug 6,75.

Für jeden Versuchsansatz wurde 500 g trockenes Substrat verwendet.

Abbildung 11: Ausgangsmaterialien für das Bodensubstrat: von li. nach re.: Quarzsand der Fa. Scherf; Kaolin aus dem Töpfereibedarf; Torf der Fa. Floragard; Kalziumkarbonat der Fa. Roth (Eigene Aufnahmen)

Abbildung 12: Händische Mischung des Substrates (Foto: Clarissa von Au)

3.3 Versuchsgefäße

Die Versuchsgefäße wurden im Laufe der Zeit weiterentwickelt, um entstandenen Problemen entgegenzuwirken. So wurden im Laufe der Masterarbeit drei verschiedene Modelle verwendet.

3.3.1 Behälter der Versuche F1 und F2

Bei den Versuchen F1 und F2 wurden runde Kunststoffbehälter mit einem Durchmesser von 19 cm verwendet. Da die Anzahl der Boxen begrenzt war, wurden zwei Versuche pro Behälter gestartet. Dafür wurde aus Polystyrol (2 mm) für jeden Behälter eine Trennwand gefräst und mit Kunststoffschläuchen sowie Sanitärsilikon die Ränder und Zwischenräume abgedichtet.

Um die Behälter auch nach oben hin verschließen zu können, und damit den Ortswechsel der Würmer zu verhindern, wurde ein Deckel aus Alufolie gewählt. Zu Beginn wurde der gesamten Behälter mit dem Deckel verschlossen. Bereits am nächsten Morgen wurde aber ein Wurm am Deckel gesichtet und somit kam die Befürchtung auf, dass die Würmer zwischen den Hälften der Boxen hin- und herwandern könnten. Aufgrund dessen wurde am zweiten Tag der Versuche der Deckel aus Alufolie an der Mitteltrennwand mit Klebeband befestigt, um eine physische Barriere zu schaffen.

Abbildung 13: von li. nach re.: Fräsen der Trennwände aus Polystyrol; Behälter mit abgedichteter Trennwand; Behälter mit Deckel über beide Hälften (Tag 1); Behälter mit Deckel in der Mitte befestigt; (Eigene Aufnahmen)

Weiterhin bestand aber das Problem, dass die Deckel jeden Tag geöffnet und geschlossen werden sollten, um einen Tag – Nacht Rhythmus zu simulieren. Um diesen Vorgang zu automatisieren, wurde das System mit Polystyrolplatten ausgestattet, in die Luftlöcher gebohrt wurden. Da die Trennwände in der Mitte nicht in einer Ebene mit dem Boxenrand abschlossen, wurde ein vorkomprimiertes Dichtband an der Trennwand angebracht. Die Platten wurden auf die Boxen mit der Dichtung gelegt und mit Gewichten beschwert. Es wurde eine Lampe mit Zeitschaltuhr in der Klimakammer angebracht um den Tag – Nacht Zyklus (12h/12h) zu automatisieren.

Abbildung 14: Vorbereiten der Polystyrolplatten; Markierungen für die Luftlöcher (Eigene Aufnahme)

Abbildung 15: Entwickelter Versuchsaufbau; Behälter zum Beschweren mit Wasser gefüllt (Eigene Aufnahme)

Vorteile:

- Zwei Versuche pro Behälter durchführbar;
- Einfache Herstellung der Deckel;
- Niedrige Materialkosten;

Nachteile:

- Versuchsbehälter nicht abgeschlossen genug, Würmer wandern;
- Aludeckel muss jeden Tag händisch geöffnet und geschlossen werden, um einen Lichtzyklus zu simulieren;
- Schneller Verschleiß der Deckel;
- Deckel deckten Beschriftung ab;
- Aufwändige Herstellung der Trennwände und Abdichtungen;

3.3.2 Behälter der Versuche F3, F4, F6 und F7

Nachdem im ersten Versuchsaufbau die einzelnen Versuche nicht ausreichend voneinander abgetrennt waren, wurde für die Versuche F3 und F4 ein anderes System gewählt. Als Basis dienten rechteckige Schalen aus Aluminium mit Maßen von 15 x 22 cm. Für die Dichtung wurde ein Universal Schaumstoff Dichtband (tesamoll 10 m x 9 mm x 6 mm) zurechtgeschnitten und an den Rand angebracht.

Um die Behälter nach oben hin abzuschließen, wurden in Polystyrolplatten mit 2 mm Dicke ausreichend Luftlöcher gebohrt. Zur Fixierung der Platten wurden diverse Behälter, die mit Wasser oder Sand gefüllt waren, auf die Plexiglasplatten gestellt.

Abbildung 16: Aluminiumboxen der Fa. Kingstone (Eigene Aufnahme)

Abbildung 17: Universal Dichtband der Fa. Tesa (Eigene Aufnahme)

Für die Versuche F6 und F7 wurde eine sehr ähnliche Herangehensweise gewählt. Es wurden, wie in den vorhergehenden Versuchen F3 und F4, Aluminiumboxen (15 x 22 cm) verwendet, die am Rand mit Universal Schaumstoff Dichtband ausgestattet waren. Oben wurden Polystyrolplatten mit Luftlöchern daraufgesetzt. Der Unterschied zu den Versuchen F3 und F4 war, dass hier nicht ein großes Gewicht in der Mitte gewählt wurde, sondern mehrere kleine Gewichte an allen Seiten, möglichst gleichmäßig verteilt. Durch die gleichmäßige Gewichtsverteilung konnten im Gegensatz zu den Versuchsreihen F3 und F4 die Würmer nicht zwischen den Boxen wandern.

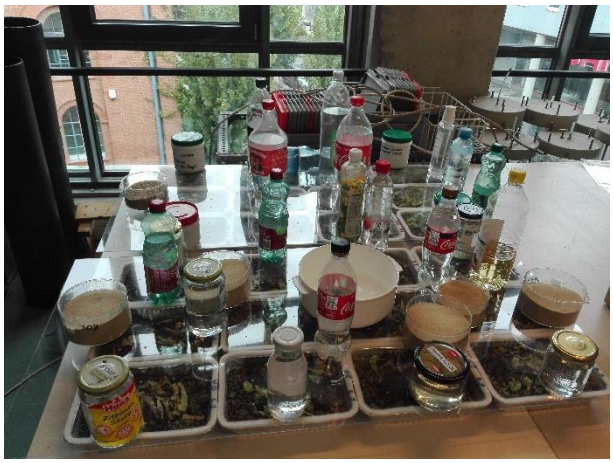


Abbildung 18: Regelmäßige Verteilung der Gewichte F7 (Eigene Aufnahme)

Vorteile:

- Leichte Zugänglichkeit; durch Anheben der Platte konnten alle Würmer gefüttert werden;
- Bei gleichmäßiger Gewichtsverteilung dichtes System;
- Kein Kunststoffbehälter – keine Kontamination ins Substrat;
- Gute Übersichtlichkeit der Futterverfügbarkeit;

Nachteile:

- Genaues Achten auf die Gewichtsverteilung notwendig. Bei unregelmäßig verteilten Gewichten wanderten die Würmer;
- Behälter waren leicht zu verbiegen; vorsichtige Handhabung notwendig;
- Verschmutzung der Polystyrolplatten durch anhaftendes Wurmfutter oder Ausscheidungen der Tiere;
- Aufwendig wenn Zugang zu einzelnen Behältern gebraucht wurde;
- Höhere Anschaffungskosten;

3.3.3 Behälter der Versuche F5

Die Versuchsreihe F5 benutzt die gleichen Behälter wie F1 und F2, jedoch mit nur einer Kolonie pro Gefäß. Zusätzlich wird als Abdichtung ein Pollennetz verwendet, welches mit einem Gummiring befestigt wird.

Um das Wandern der Würmer zu verhindern, wurden die bespannten Boxen nebeneinandergestellt, und mit einer der vorhandenen Polystyrolplatten abgedeckt, in die Luftlöcher gebohrt waren. Die Platte wurde mit Gewichten beschwert.

Abbildung 19: Behälter mit gespanntem Pollennetz. Für die beiden helleren Behälter wurde ein Fliegennetz verwendet. (Eigene Aufnahme)

Abbildung 20: Behälter F5, abgedeckt; (Eigene Aufnahme)

In Abbildung 19 sind zwei Behälter besonders deutlich zu sehen. Bei diesen wurde für die Abdeckung kein Pollennetz verwendet, sondern ein Fliegengitter. Durch eine doppelte Lage bot es ebenso eine wirksame Barriere für die Würmer.

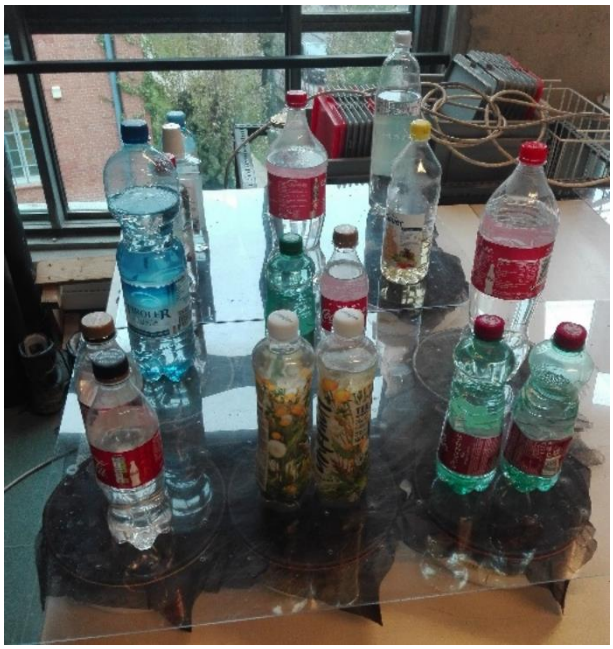


Abbildung 21: Behälter F5, abgedeckt und beschwert; (Eigene Aufnahme)

Vorteile:

- Ausbruchssicher; Kein Wandern der Würmer;
- Niedrige Materialkosten;

Nachteile:

- Schwieriges Bespannen der Boxen; musste bei jeder Fütterung durchgeführt werden.
- Schlechtere Einsicht zum Futter als beim vorhergehenden System.

3.4 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Regenwürmer der Art *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* verwendet. Die Würmer stammen aus der Wurmkompostierungsanlage Vermigrand und wurden vom Besitzer Alfred Grand für die Versuche zur Verfügung gestellt. Bei einem Besuch bei der Kompostierungsanlage wurden die Würmer händisch aussortiert und gezählt. Es wurden sowohl juvenile (F1), als auch adulte Tiere (F2, F3, F4, F5, F6, F7) für die Versuche verwendet.

Abbildung 22: Kompostierungsanlage Vermigrand Naturprodukte GmbH (Foto: Clarissa von Au)

3.5 Durchführen der Versuche

Die Versuche wurden mit drei MP Größenfraktionen durchgeführt. Bei den ersten beiden Durchläufen wurden fünf Konzentrationen gewählt. Bei den restlichen Versuchen wurden drei Konzentrationen gewählt. Die Versuche wurden jeweils im Triplikat (A, B, C) durchgeführt. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die verwendeten Konzentrationen und Fraktionen, sowie weitere Versuchsparameter wie Laufzeit, Wurmmenge, Anzahl der Ansätze und Konzentrationen.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
MP Fraktion [µm]	63 – 200	200 – 630	200 – 630	63 – 200	< 63	200 – 630	63 – 200
Laufzeit [d]	28	29	28	28	28	28/29	29
Würmer pro Ansatz	~ 4 g; juvenil	20 Stk; adult	20 Stk; adult	20 Stk; adult	20 Stk; adult	20 Stk; adult	20 Stk; adult
Anzahl Konzentrationen	5	5	3	3	3	3	3
Anzahl Ansätze	18	18	15	15	15	15	15
Behälterart	Kunststoff-behälter, doppelt besetzt; Alufolie;	Kunststoff-behälter, doppelt besetzt; Alufolie;	Alu-behälter, Dichtband, Plexiglas-scheibe;	Alu-behälter, Dichtband, Plexiglas-scheibe;	Kunststoff-behälter, Pollennetz, Plexiglas-scheibe;	Alu-behälter, Dichtband, Plexiglas-scheibe;	Alu-behälter, Dichtband, Plexiglas-scheibe;
MP-Gehalt der Versuchsreihen [% MP]							
Versuch 0 (A, B, C)	0	0	0	0	0	0	0
Versuch 5 (A, B, C)	0.005	0.005	-	-	-	-	-
Versuch 4 (A, B, C)	0.02	0.02	-	-	-	-	-
Versuch 3 (A, B, C)	0.05	0.05	0.1	0.1	0.001	0.1	0.1
Versuch 2 (A, B, C)	0.2	0.2	0.5	0.5	0.01	0.5	0.5
Versuch 1 (A, B, C)	0.5	0.5	1.0	1.0	0.1	1.0	1.0

Tabelle 4: Übersicht über die Versuchsparameter: MP Fraktion, Laufzeit, Wurmmenge, Anzahl Konzentrationen, Anzahl Ansätze, Gewählte Konzentrationen.

Die unterschiedlichen Laufzeiten kamen durch Verzögerungen aufgrund von Wochenenden zustande. F1 und F2 waren die ersten Versuche. Hier wurden fünf Konzentrationen gewählt, um möglichst genau eruieren zu können welche Konzentration die Würmer am meisten beeinflusst. Am Ende der ersten beiden Versuchsreihen ließen sich keine Unterschiede bei den gewählten Konzentrationsschritten feststellen. Bei den Versuchen F3, F4, F6 und F7 wurden höhere Konzentrationen gewählt und der Fokus auf einen anderen Versuchsaufbau gelegt. Bei F5 wurden wegen den Schwierigkeiten bei der Herstellung der Kunststofffraktion < 63 µm niedrigere Konzentrationen gewählt.

Bei den Versuchen wurde weiters unter zwei verschiedenen Fütterungs-Modi unterschieden. Bei den Versuchen F1, F2, F3 sowie F4 wurde das gesamte MP von Anfang an in das Substrat eingemischt. Bei den Versuchsreihen F5, F6 und F7 wurde das MP von Woche zu Woche zugefüttert, bis die gewünschte Konzentration erreicht war.

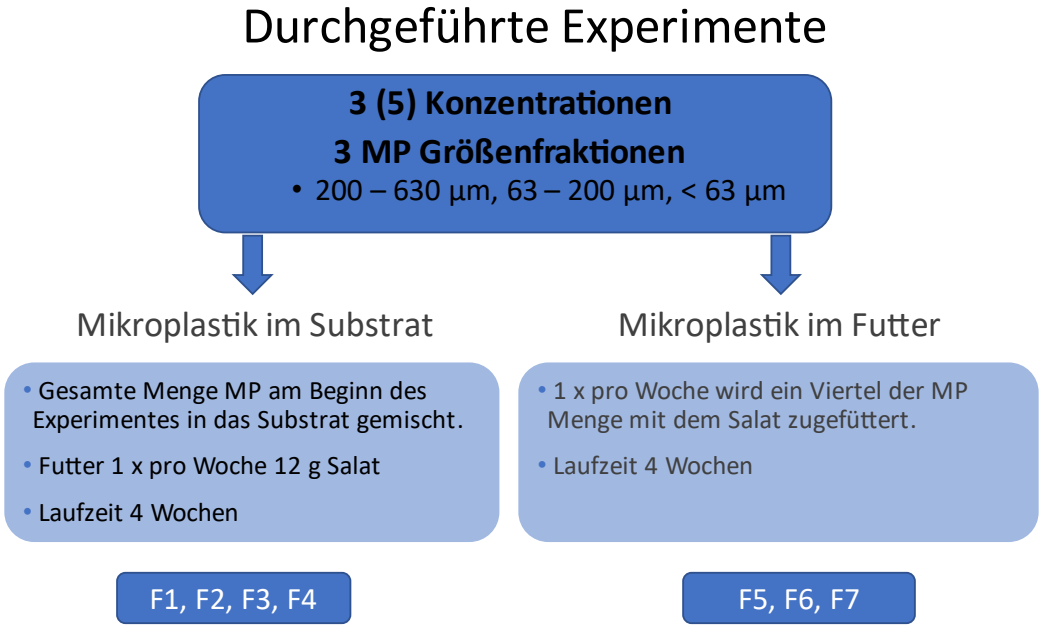


Abbildung 23: Übersicht über die Parameter und Bezeichnungen der durchgeführten Experimente;

3.5.1 Experimente mit Mikroplastik im Substrat (F1 – F4)

Bei den Versuchen F1 - F4 wurde das Mikroplastik in das Substrat eingemischt. Zuerst wurden von dem zuvor angemischtem OECD Substrat, mit einem Wassergehalt von 35% des Trockengewichtes, 675 g abgewogen. Anschließend wurde die der gewollten Konzentration entsprechende Menge Mikroplastik abgewogen und die beiden Komponenten homogen vermischt. Jeder Ansatz wurde separat abgewogen und eingemischt. Das mit Mikroplastik versetzte Substrat wurde in die vorbereiteten Behälter eingefüllt.

Die Versuchsansätze F1 und F2 wurden wegen der hohen Temperaturen in den Sommermonaten in der Klimakammer bei konstant 25°C gehalten. Die übrigen Versuchsansätze wurden bei Raumtemperatur betreut.

Abbildung 24: Abgewogenes MP (Eigene Aufnahme)

Abbildung 25: MP auf Substrat, unvermischt; (Eigene Aufnahme)

3.5.2 Experimente mit Zufütterung des Mikroplastiks (F5 – F7)

Bei den Experimenten F5 – F7 wurde das Mikroplastik durch Zufütterung zugeführt. Die Boxen wurden mit je 675 g standardisiertem Bodensubstrat mit einem Wassergehalt von 35% befüllt. Anschließend wurden je 20 Würmer ausgewählt. Diese wurden mit Deionat abgespült und auf einem Papierhandtuch platziert. Die abgetrockneten Würmer wurden abgewogen und auf einer Kunststoffplatte abgelegt, um den Anfangszustand mit Fotografien und Videoaufnahmen zu dokumentieren. Anschließend wurden die Regenwürmer in der mit Substrat befüllten Box platziert. Nach etwa 10 Minuten am Tageslicht wurde beobachtet ob alle Würmer nach unten ins Substrat gewandert sind, was auch immer der Fall war. Jeder Versuchsansatz wurde gleich zu Beginn mit Salat gefüttert, der uns von der Merkur Warenhandels AG zur Verfügung gestellt wurde.

Zuerst wurde bei der Fütterung der zerkleinerte Salat abgewogen, und anschließend das Mikroplastik zugefügt und mit dem Salat vermischt. Für jeden Versuchsansatz der Versuchsreihen F6 und F7 wurde das Mikroplastik separat abgewogen. Das Mikroplastik und der Salat wurden wöchentlich zugefüttert.

Abbildung 26: Salat und MP, vermischt (Eigene Aufnahme)

Bei dem Experiment F5 war die Menge des Mikroplastiks geringer. Dadurch waren die benötigten Mengen für einzelne Versuche im Mikrogrammbereich und es konnte mithilfe der vorhandenen Analysenwaage (Messgenauigkeit ± 0,1 mg) keine ausreichende Genauigkeit erzielt werden. Daher wurde die für alle Ansätze benötigte gesamte Mikroplastikmenge abgewogen (0,416 g/Woche) und mit der in der höchsten Konzentration (0,1%) benötigten Menge an Salat zzgl. dem Anteil für die anderen Konzentrationen gemischt. Diese Mischung (0,1% MP) wurde dann weiter verdünnt mit Salat vermischt, sodass die benötigten Konzentrationen hergestellt werden konnten.

Abbildung 27: Kleinere Mengen Mikroplastik wurden durch das Mischen von 0.1% MP in Salat mit weiterem mikroplastikfreiem Salat hergestellt. (Eigene Aufnahmen)

3.5.3 Betreuung der Versuchsansätze

Alle Versuchsansätze wurden mindestens einmal wöchentlich mit geschnittenem Kopfsalat gefüttert. Weiters wurden die Versuche wöchentlich mit 20 ml deionisiertem Wasser versorgt, um die Verdunstung zu kompensieren und die Feuchtigkeit im Substrat möglichst konstant zu halten.

In den Versuchen F1 – F2 wurden jede Woche die Würmer, die sich an der Oberfläche der Box befanden, herausgenommen, fotografiert und gefilmt. Bei diesen Gelegenheiten zeigten sich die Würmer stets fit und agil. Diese Versuche wurden

mehrmals wöchentlich mit Salat versorgt. Pro Tag wurde das halbe Ausgangsgewicht der Würmer als Futter berechnet und bei Bedarf die Futtermenge angepasst.

Bei den folgenden Versuchen F3 – F7 wurde die Fütterung und die Zugabe von deionisiertem Wasser einmal wöchentlich durchgeführt. In dem gewählten Intervall konnte eine geregelte Futterzufuhr sichergestellt werden. Die Menge an verdunstetem Wasser wurde durch die wöchentliche Wägung der Behälter ermittelt. Die Versuchsbehälter, die sich in der Klimakammer befanden, hatten eine höhere Verdunstungsrate als die Versuchsbehälter, die nicht in der Klimakammer standen.

3.6 Laboranalysen

3.6.1 Wassergehalt

Der Wassergehalt wurde vor Beginn der Experimente für die Gesamtprobe bestimmt und nach Ablauf der Experimente bei allen, um ein konstantes Milieu für die Würmer zu gewährleisten.

Für die Ermittlung des Wassergehaltes wurden Proben des einbaufertigen Substrates in Alutassen gefüllt und abgewogen [m_{feucht}]. Im Trockenschrank wurden sie bei 105°C für 24h getrocknet und anschließend erneut abgewogen [$m_{trocken}$]. Aus diesen Werten kann der Wassergehalt wie folgt berechnet werden:

$$WG_{105°C}[\%\ FM] = \frac{(m_{feucht} - m_{trocken}) * 100}{m_{feucht}}$$

3.6.2 Leitfähigkeit, pH- Wert

Die beiden Parameter wurden nach der Herstellung des Substrates bestimmt, um ein Substrat nach OECD Richtlinien zu gewährleisten.

Für die Messung der elektrischen Leitfähigkeit und des pH-Werts wurde jeweils ein Eluat hergestellt. Dafür wurden 10 g (1 Masseanteil) des Substrates in ein Probenfläschchen transferiert und mit 100 ml (10 Volumenanteile) deionisiertem Wasser aufgefüllt. Das Probenfläschchen wurde für 3 Stunden in einem Überkopfschüttler bewegt. Danach wurde das Eluat mithilfe eines Faltenfilters abfiltriert.

Abbildung 28: Probenflasche am Überkopfschüttler (Foto: Clarissa von Au)

Abbildung 29: Abfiltrieren des Eluates (Foto: Clarissa von Au)

Die Sonde des Konduktometers *WTW LF 318* wurde mit deionisiertem Wasser gespült und anschließend in das Eluat eingetaucht. Das Gerät misst den Ohm'schen Widerstand und berechnet daraus die elektrische Leitfähigkeit bei 25°C. Um den Wert auf eine Temperatur von 20°C beziehen zu können wurde der Wert mit 0.90446 multipliziert.

Für die Messung des pH-Wertes, der den negativen dekadischen Logarithmus der H^+-Ionen Konzentration (genauer gesagt der Aktivität) darstellt, wurde das pH Meter *WTW pH 531* mit geeigneten Lösungen kalibriert (pH 7 und pH 4). Nach erneutem Abspülen der Sonde mit deionisiertem Wasser wurde sie in die Probenlösung eingetaucht und die Stabilisierung des Wertes abgewartet. Der pH-Wert des Substrats lag bei 6,75.

3.6.3 Glühverlust

Die Proben wurden für die Bestimmung des Glühverlustes bei 105°C für 24 h getrocknet und mit der Schneidmühle der Firma *Retsch* erst mit einem Siebeinsatz von 4 mm und anschließend mit 0.5 mm gemahlen.

Die verwendeten Keramikbecher wurden erst leer (LG), und anschließend mit der Probe (LG + Ewf) eingewogen. Diese Proben wurden in einem Trockenschrank bei 105°C für 2-3 Stunden getrocknet und im Exsikkator ausgekühlt. Nach erneuter Abwägung der Becher inklusive Probe (LG + Ewt) mit der Analysewaage konnte die Restfeuchte bestimmt werden. Um den Glühverlust zu bestimmen wurden das Material in einem Muffelofen verbrannt. Die Proben verblieben 12 Stunden im Ofen, wobei davon 7 Stunden der Temperaturerhöhung dienten und dann die Temperatur bei

550°C für 5 Stunden gehalten wurde (Glühzeit). Nach Beendigung der Glühperiode wurden die Proben zum Auskühlen erneut in einen Exsikkator gestellt und nach Erreichen der Raumtemperatur ausgewogen (LG + GR).

Der Glühverlust wurde wie folgt berechnet:

$$GV[\%TM] = \frac{((LG + EWf) - (LG + GR))}{((LG + EWf) - (LG))} * 100$$

Diese Analyse erfolgte stets doppelbestimmt.

Abbildung 30: Muffelofen der Fa. Nabertherm (Eigene Aufnahme)

Abbildung 31: Heiße Proben zum Auskühlen im Exsikkator (Eigene Aufnahme)

3.6.4 TOC, Gesamtstickstoff, Gesamtkohlenstoff

Die Analyse von Gesamtstickstoff und Gesamtkohlenstoff (TOC) erfolgte mit dem Gerät Vario MAX CN der Firma Elementar. Das Gerät nutzt das Prinzip der katalytischen Rohrverbrennung.

Die Probe wird von einem Greifarm in das Hauptverbrennungsrohr eingebracht und dort schockartig bei 900°C unter Sauerstoffzufuhr verbrannt, wobei NO_X und CO_2 entstehen. Halogene werden in einem Reduktionsrohr abgefangen. Das Gasgemisch gelangt zu einem CO_2 Absorber, wo CO_2 bei Raumtemperatur zunächst aufgefangen wird. NO_X gelangt somit als erstes zum Wärmeleitdetektor, der die eingetroffene Gasmenge über die Zeit aufzeichnet. Das CO_2 wird durch Erhitzung des CO_2 Absorbers auf 250°C ausgetrieben und gelangt als zweites Gas zum Wärmeleitfähigkeitsdetektor. Als Trägergas fungiert dabei Helium. Die Messung ist abgeschlossen, wenn der Wärmeleitfähigkeitsdetektor wieder die Grundlinie erreicht hat.

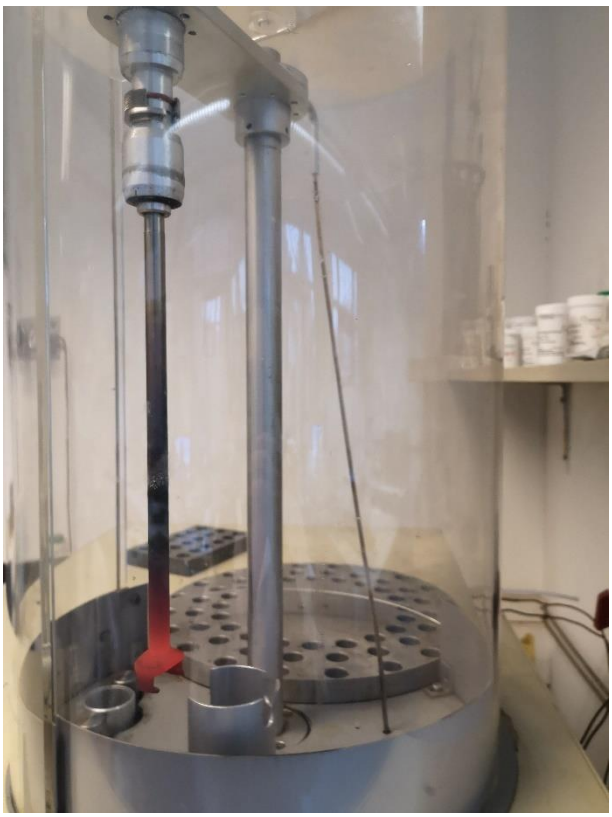


Abbildung 32: Greifarm varioMAX (Eigene Aufnahme)

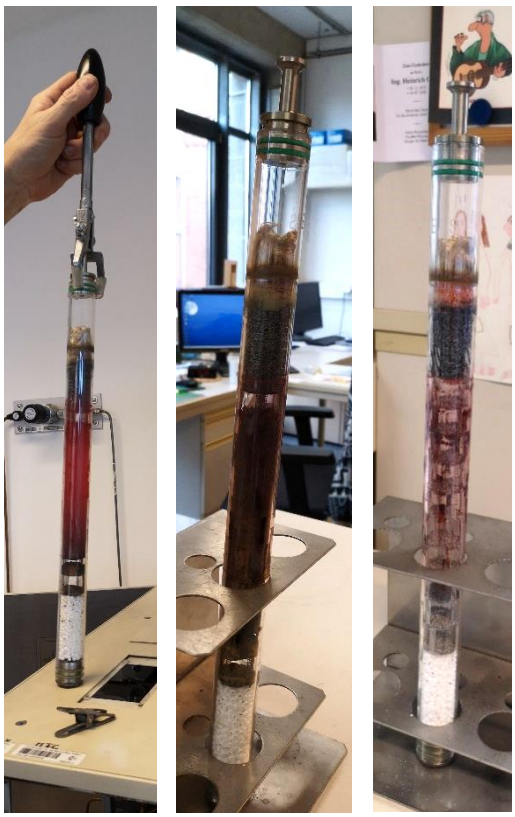


Abbildung 33: HVR von li nach re: 900°C bei Entfernung aus dem Gerät; abgekühlt, verbrauchte Füllung; HVR mit neuer Füllung; (Eigene Aufnahmen)

Für die Analyse wird die Probe einerseits im getrockneten (105°C, 24h) und gemahlenen Zustand verwendet, andererseits als Glührückstand einer Glühverlust-Analyse. Für die Kalibration werden drei Mal jeweils 90 mg L-Glutaminsäure eingewogen. Bei dieser Referenzsubstanz sind Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt bekannt und das Ergebnis kann auf Richtigkeit überprüft werden.

Zur Bestimmung des Gesamtkohlenstoffes (TC) wurden etwa 200 mg der bei 105° getrockneten Probe eingewogen. Um den gesamten anorganischen Kohlenstoff (TIC) zu bestimmen wurden etwa 200 mg des Glührückstandes eingewogen. Beim Glührückstand sind die organischen Teile des Kohlenstoffes bereits verbrannt worden. Die Analyse erfolgt immer doppelbestimmt.

Diese Analysen wurden durchgeführt um den Gehalt an Stickstoff und Kohlenstoff, bzw. organischem Kohlenstoff zu ermitteln und Zusammenhänge zwischen diesen Parametern und der verwendeten Mikroplastikkonzentration herzustellen.

Die ermittelten Werte für TC (Total Carbon) lagen zwischen 2,59% und 5,82%. Die ermittelten Werte für TOC (Total Organic Carbon) lagen zwischen 2,43% Trockenmasse (TM) und 5,58% TM. Die Ergebnisse für Gesamtstickstoff lagen zwischen 0,06 und 0,15 % TM.

Bei der Analyse des Kohlenstoffes im C/N-Analysator wurde jedoch beobachtet, dass die Werte im Laufe eines Tages immer weiter anstiegen, obwohl Proben von ähnlicher Art analysiert wurden. Der Grund war der allgemein niedrige Kohlenstoffgehalt in Kombination mit dem enthaltenen Kaolin (im OECD Substrat enthalten), welches die CO_2 Messung stören kann. Die Ergebnisse sind daher nicht aussagekräftig.

3.6.5 Ammonium-Stickstoff

Die Bestimmung des Ammoniumstickstoffes (NH_4-N) erfolgt photometrisch. Die Messungen wurden am Photometer Hach-Lange-DR-5000 durchgeführt. Die Ammoniumbestimmung erfolgt photometrisch, wobei Ammonium mit Salycilat/Citrat in Lösung einen Komplex grüner Farbe bildet, der bei 655 nm absorbiert. Der Messbereich für diese Analyse liegt zwischen 0 und 1,2 mg/L.

Für die Analyse werden folgende Reagenzien benötigt: Eine Salicylat/Citrat Lösung, die hergestellt wird indem 13 g Natriumsalycilat, 13 g Natriumcitrat und 0,097 g Natriumnitroprussid in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst werden. Ein NaOH Reagenz, bestehend aus 3,2 g NaOH und 0,2 g Natriumdichlorcyanorat auf 100 ml Wasser. Und einer Kalibrationsreihe die aus einer Stammlösung mit einem bekannten NH_4-N Gehalt von 100 mg/l verdünnt wird. Die Stammlösung wird hergestellt, indem 0,4717 g Ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$) bei 105°C getrocknet werden und in einem Messkolben auf 1000 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und gelöst werden.

Um die Kalibration durchzuführen, wurden aus den Stammlösungen geeignete Standardlösungen in verschiedenen Konzentrationen hergestellt.

Für den Ansatz der Kalibrationslösungen wurden in einem 25 ml Messkolben folgende Reagenzien vermischt: die für die gewählte Konzentration notwendige Stammlösung wurde in den Kolben pipettiert und dieser anschließend etwa bis zur Hälfte mit deionisiertem Wasser gefüllt. Danach wurden 2 ml Salycilat/Citrat Reagenz hinzgefügt und geschwenkt. Als nächstes wurden 2 ml NaOH Reagenz hinzugefügt und auf 25 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Nach 60 min Wartezeit wurde am Photometer die Extinktion gemessen. Aus den abgelesenen Extinktionen wurde eine Kalibrationsgerade gezeichnet und die Steigung K ermittelt durch die Gleichung:

$$Y = k * x + d$$

wobei d der Blindwert ist, x die Konzentration der Standardlösung, k die Steigung und y die Extinktion. Die Kalibrationsgerade ist in Anhang 1 zu finden. Der Blindwert wurde mit einem Ansatz aus deionisiertem Wasser, 2 ml Salycilat/Citrat Reagenz und 2 ml NaOH Reagenz gemessen.

Abbildung 34: Reagenzien für die Ermittlung der Kalibrationsgerade nach 60‘ (Eigene Aufnahme)

Das Eluat wurde für die Messung des Ammonium-Stickstoffes 1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Die Messlösungen wurden im Doppelansatz hergestellt, wobei die Messlösungen in 25 ml Messkolben hergestellt wurden. Die Lösung zur Ermittlung des Blindwert wurden analog zu den Messlösungen hergestellt, wobei statt der Probe destilliertes Wasser verwendet wurde.

Mit der Mischung in Kolben 1 wird der Blindwert gemessen. Darin werden 21 ml deionisiertes Wasser, 2 ml Salycilat/Citrat Reagenz und 2 ml NaOH Reagenz gemischt. Zur Bestimmung der Probe 1 werden in Kolben 2 und 3 ähnliche Mischungen erzeugt aus: 5 ml Probe 1, 16 ml deionisiertem Wasser, 2 ml Salycilat/Citrat Reagenz und 2 ml NaOH Reagenz.

Nach 60 Minuten Wartezeit wurden die Proben am Photometer gemessen.

3.6.6 Nitratstickstoff

Die Bestimmung des Nitratstickstoff (NO_3-N) erfolgt durch Photometrie. Nitrat reagiert mit der Farbreagenz 2,6 Dimethylphenol und Eisessig. Der Messbereich für die Bestimmung liegt zwischen 0.5 – 25 mg/L. Die Messung erfolgt bei 324 nm am Photometer Hach DR-5000.

Für die Messung des Nitratstickstoffes werden folgende Reagenzien benötigt: Deionisiertes Wasser und Amidosulfonsäure; Eine Säuremischung, die hergestellt wird aus Schwefelsäure (H_2SO_4) und Orthophosphorsäure im Verhältnis 1:1. Einem Farbreagenz aus 0,12 g Dimethylphenol das in 100 ml Essigsäure (CH_3COOH – 100%) aufgelöst wird. Und eine Stammlösung mit einer Konzentration von 5 mg/l NO_3-N. Diese wird hergestellt indem 0,3609 g KNO_3 bei 105°C getrocknet werden und in genau 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst.

Für die Kalibration wurden aus der Stammlösung verschiedene Standardlösungen verdünnt. Diese Standardlösungen wurden nach 10 Minuten bei 324 nm am Photometer gemessen. Die Nulllinie, die das Hintergrundsignal (Blank) darstellt, wurde für die Säuremischung (Schwefelsäure H_2SO_4 und Orthophosphorsäure H_3PO_4 1:1) bestimmt.

Für die Kalibration wurden aus der Stammlösung verschiedene Standardlösungen hergestellt.

Für den Ansatz der Kalibrationslösungen wurden folgende Substanzen vermischt: 1 ml Standardlösung, einige Körner Amidosulfonsäure, 8 ml der Säuremischung und 1 ml Farbreagenz (2,6-Dimethylphenol 0.12 g gelöst in 100 ml Essigsäure (CH_3COOH)).

Die verschiedenen Standardlösungen wurden in die Küvetten eingefüllt. In die erste Küvette wurde nur Säuremischung eingefüllt, um eine Nulllinie zu erhalten. Die Extinktionen wurden abgelesen. Aus den abgelesenen Extinktionen wurde eine Kalibrationsgerade gezeichnet und die Steigung k ermittelt durch die Gleichung:

$$Y = k * x + d,$$

wobei d der Blindwert war, der mittels Säuremischung gemessen wurde, x die Konzentration der Standardlösung bzw. Probe, k die Steigung und y die Extinktion. Die Kalibrationsgerade ist auch im Anhang 2 zu finden.

Abbildung 35: Erlenmeyerkolben zur Vorbereitung der Probenansätze (Eigene Aufnahme)

Abbildung 36: Im Vordergrund: Glasküvetten für die Messung im Photometer (Eigene Aufnahme)

Für die Messung der Extinktion in den Proben wurde eine Verdünnung von 1:10 gewählt. Die Messung erfolgte im Doppelansatz. In den Küvetten wurden folgende Lösungen gemessen:

. Nullinie (nur Säuremischung)

.. Blindwert der Probe (Deionat statt Farbreagenz)

… Probe 1

…. Probe 1

….. Blindwert Probe 2

…… Probe 2

……. Probe 2

Um eine Probe zu messen, wurden in 3 Erlenmeyerkolben mit 25 ml Fassungsvermögen folgende Mischungen erzeugt: In Kolben 1 und 2 wurden die Lösungen zum Messen der Proben gefertigt. Sie bestanden aus 100 µl der Stammlösung, 900 µl deionisiertem Wasser, einigen Körner Amidosulfonsäure, 8000 µl Säuremischung und 1000 µl Farbreagenz.

Die Reagenzien wurden in der oben aufgeführten Reihenfolge in die Erlenmeyerkolben pipettiert. Nach Zufügen der Amidosulfonsäurekörner wurde so lange geschwenkt, bis sich diese vollständig lösten. Wenn die Säuremischung zugegeben wird, könnten sich die Körnchen nicht mehr auflösen und würden als Teilchen in der Lösung verbleiben. Die Teilchen würden im Photometer eine andere Brechung aufweisen und so das Messergebnis erheblich verfälschen.

Die Amidosulfonsäure wird zugegeben um eine Störung durch Nitrit in der Lösung im Konzentrationsbereich von 0.2 mg/l bis 5 mg/l zu verhindern.

3.6.7 Quantitative Veränderung der Substratmasse

Der Massenzuwachs des Substrates wurde untersucht, um festzustellen in welchem Ausmaß die Würmer den zugefütterten Salat umwandeln und ob diese Umwandlungsraten von den verwendeten Mikroplastikkonzentrationen beeinflusst werden.

Die aufgebaute Masse in einem Versuchsansatz wurde wie folgt abgeschätzt:

$$\Delta m = m_{g28} - m_{g0} - WG - m_W - LG$$

wobei Δm die Veränderung der Substratmasse ist, m_{g28} die Gesamtmasse am Ende des Versuchsansatzes (nach 28 Tagen), m_{g0} die Gesamtmasse zu Beginn des Versuchsansatzes, WG der Wassergehalt, m_W die Masse der Würmer und LG das Leergewicht des Behälters.

Die Unterschiede der Substratmasse der Gruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen von MP im Substrat zur Kontrollgruppe waren bei keiner der untersuchten Versuchsgruppen signifikant, darum wird sie nicht näher ausgeführt.

3.7 Analyse der Wurmparameter

Folgende Parameter wurden betrachtet, um den Zustand und die Entwicklung der Würmer zu beurteilen:

- Wurmgewicht/Gewichtsveränderung: spiegelt den Entwicklungsstand und die Wachstumsrate der Würmer wider, wurde nach einer eigens adaptierten Methode, aufbauend auf Lwanga et al. (2016) durchgeführt (siehe Kapitel 3.7.1).
- Anzahl der gefundenen Würmer: Spiegelt die Mortalitätsrate wider, bzw. die Funktionalität des Versuchaufbaus. Wurde nach einer eigens adaptierten Methode, aufbauend auf Rodriguez-Sejio et al. (2017) bestimmt (siehe Kapitel 3.7.2).
- Anzahl gefundener Kokons: spiegelt die Reproduktionsrate und das Fortpflanzungsvermögen der Würmer wider. Wurde gemeinsam mit der Anzahl der Würmer nach einer eigens adaptierten Methode, aufbauend auf Rodriguez-Sejio et al. (2017) bestimmt (siehe Kapitel 3.7.2).
- Analyse des Darminhaltes der Würmer: Zeigt eine mögliche Aufnahme/Akkumulation von MP- Partikeln im Wurmdarm. Wurde nach einer eigens adaptierten Methode, aufbauend auf Jiang et al. (2020) (siehe Kapitel 3.7.3).

3.7.1 Analyse des Wurmgewichtes

Nachdem die Würmer aus dem Substrat sortiert wurden, wurden sie gewaschen und auf einem Papierhandtuch platziert. Die abgetrockneten Würmer wurden gezählt, die Anzahl dokumentiert und anschließend gemeinsam abgewogen. Das Gesamtgewicht der Würmer wurde durch die Anzahl der gefundenen Würmer geteilt und damit das durchschnittliche Einzelgewicht ermittelt.

3.7.2 Analyse der Wurmanzahl und Anzahl der Kokons

Bei Versuchsende wurden die Würmer vorsichtig händisch gezählt. Oberflächlich sichtbare Exemplare wurden abgenommen. Anschließend der Inhalt des Versuchsbehälters auf eine Platte gegeben und ausgebreitet. Das Substrat wurde in vier Teile geteilt und die Portionen wurden nacheinander auf Würmer und Kokons untersucht. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, um eine bestmögliche Fundquote sicherzustellen.

3.7.3 Analyse des Darminhalts der Würmer

Nach Beendigung der Versuchsläufe wurden die Würmer bei – 27°C eingefroren. Um die Forschungsfrage zu klären, ob das Mikroplastik von den Würmern aufgenommen und zerkleinert wurde, wurde der Darminhalt untersucht. In einem Vorversuch wurden 0,3 g reines Mikroplastik aus dem TPS Material und 10 ml Salpetersäure in Glasphiolen transferiert. Nach 10-minütiger Wartezeit wurden Versuchsdurchläufe in der *MARS 6* Mikrowelle gestartet. Es wurden 3 Versuchsdurchläufe mit verschiedenen Temperaturen (200°C, 150°C und 100°C) gefahren. Nach Beendigung der Programme in der Mikrowelle wurden die abgekühlten Proben unter dem Abzug vorsichtig geöffnet und der Inhalt auf vorher abgewogene Filter abfiltriert und mit deionisiertem Wasser gespült. Die Filter wurden über Nacht bei 60°C im Trockenschrank getrocknet und anschließend erneut abgewogen. Aufgrund der Tatsache, dass die Masse des bioabbaubaren Kunststoffes durch den Vorgang deutlich reduziert wurde, ist diese Methode zur Ermittlung der MP Menge, die die Würmer aufgenommen haben, nicht zielführend.

Daher wurden die Würmer zur Analyse des Darminhaltes einzeln seziert. Der Wurm wurde anterior und posterior fixiert. Anschließend wurde dorsal ein Schnitt gesetzt. Die dorsale Seite zeichnet sich dadurch aus, dass sie dunkler gefärbt ist. Mit einer Pinzette und Stecknadeln wurden die Hautlappen vorsichtig nach außen gespreizt und mit Stecknadeln fixiert. So wurde der Wurm stereomikroskopisch betrachtet. Der Inhalt des Darmes wurde mittels Spatel entnommen und auf einen Objektträger gegeben.

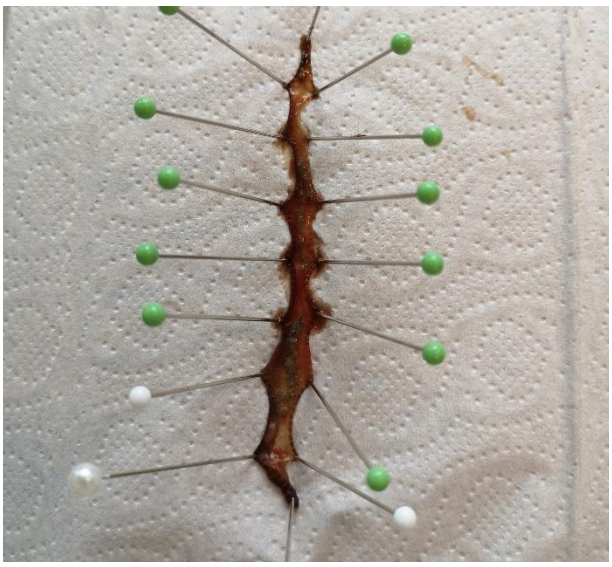


Abbildung 37: Sezieren des Wurmes (Eigene Aufnahme)

Abbildung 38: Darminhalt des Wurmes auf Objektträger (Eigene Aufnahme)

Um das Material unter dem Infrarot-Mikroskop zu betrachten und zu bestimmen, wurde es auf einen Aluminiumfilter gewaschen. Der Filter wurde auf einer Fritte platziert und das Material mit deionisiertem Wasser vom Objektträger gewaschen und Vakuumfiltriert.

Abbildung 39: Abwaschen des Objektträgers auf Aluminiumfilter (Eigene Aufnahme)

Abbildung 40: Aluminiumfilter mit Material (Eigene Aufnahme)

3.8 Statistische Analyse

Die Daten wurden mit dem Statistikprogramm Sigmaplot analysiert.

Bei der Auswertung der Daten der Wurmexperimente (Gewichtsveränderung, Substrat, Anzahl, Glühverlust) wurden die Mittelwerte der Triplikate verwendet und mithilfe einer einfachen Varianzanalyse mit der Kontrollgruppe der einzelnen Experimentgruppen verglichen.

Es wurde auch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Größe und Konzentration, sowie deren Interaktionen durchgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Wurmexperimente

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Experimente (siehe Anhang 3) genauer beschrieben. Die Veränderungen der einzelnen Wurmparameter wurden auf ihre Signifikanz überprüft und die Bedeutung der Veränderungen diskutiert.

Um die Auswirkung der unterschiedlichen Versuchsentwürfe auf die einzelnen Wurmparameter besser unterscheiden zu können, werden die Versuche zur Diskussion der einzelnen Wurmparameter in folgende Gruppen unterteilt:

1. **F3/F4/F6/F7:** Hier wurden Mikroplastikpartikel in unterschiedlicher Größe verwendet. Verwendete Kunststoffkonzentrationen waren 0%, 0,1%, 0,5% und 1% der TM des Substrates. Bei den Versuchen, bei denen das MP vier Mal zugegeben wurde, wurde die Zielkonzentration am Ende erreicht.
   F3: 200 - 630 µm, von Anfang an im Substrat;
   F4: 63 – 200 µm, von Anfang an im Substrat;
   F6: 200 – 630 µm, vier Mal zugegeben;
   F7: 63 – 200 µm, vier Mal zugegeben;

2. **F5:** Die Versuchsgruppe F5 wurde mit niedrigeren Konzentrationen durchgeführt. Hier wurde das Gesamtgewicht aller Würmer der einzelnen Experimente verglichen. Die Partikel einer Größe < 63 µm wurden vier Mal zugegeben; Verwendete Konzentrationen waren 0%, 0,001%, 0,01% und 0,1% der TM des Substrates.

3. **F1/F2:** Die Partikel wurden von Anfang an ins Substrat eingemischt. In diesen beiden Versuchen ist jedoch anzumerken, dass Wurmwanderschaften aufgrund nicht-optimaler Versuchsaufbauten nicht ausgeschlossen werden konnten. Es wurden Konzentrationen von 0%, 0,005%, 0,02%, 0,05%, 0,2% und 0,5% der TM des Substrates verwendet.
   F1: 200 – 63 µm, juvenile Würmer;
   F2: 630 – 200 µm, adulte Würmer;

4.1.1 Gewichtsveränderung in Abhängigkeit der Konzentration

Einer der wichtigsten Parameter ist die Gewichtsänderung der Würmer in Abhängigkeit der Mikroplastikkonzentration. Die Gewichtszunahme der Würmer lässt auf Stressfaktoren und Wohlbefinden dieser rückschließen und spiegelt den Entwicklungsstand der Würmer wider.

Für die Versuche F3, F4, F6 und F7 wurde zu Beginn und am Ende der Versuche das durchschnittliche Einzelgewicht der Würmer bestimmt. In der folgenden Grafik ist die Änderung des Mittelwerts des Gewichts der Würmer über den Zeitraum von 28 Tagen gezeigt. Die Balken stellen die Mittelwerte der Triplikate dar. Die Sternchen kennzeichnen Signifikanzunterschiede der Ergebnisse, verglichen mit der Kontrollgruppe.

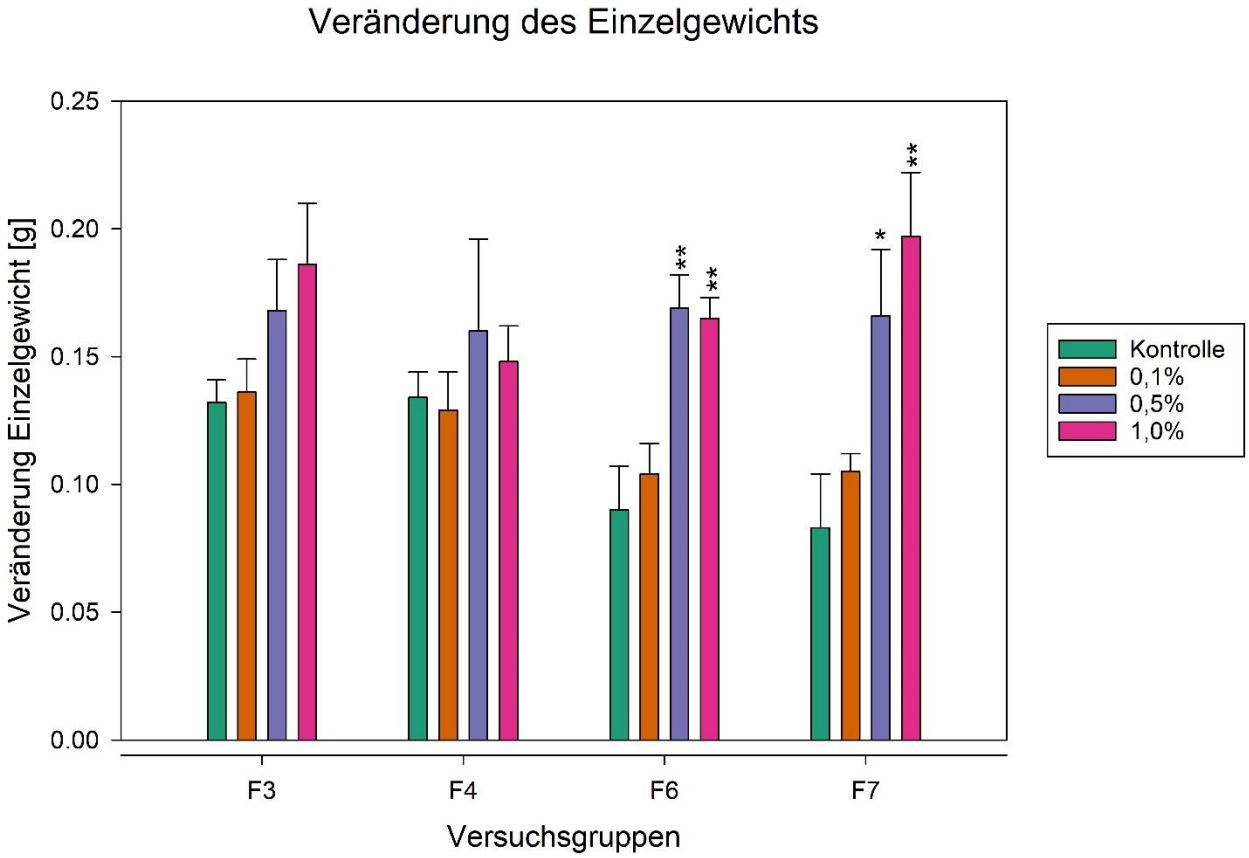


Abbildung 41: Mittelwerte der Änderung des Einzelgewichtes der Würmer in 28 Tagen bei den Versuchsreihen F3, F4, F6 und F7. Die Sternchen zeigen die Signifikanzniveaus zur Kontrollgruppe. (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$)

Allgemein wurde mit steigender Mikrokunststoffkonzentration eine steigende Einzelwurmmasse ermittelt. In den Versuchen F6 und F7 sind für höhere Konzentrationen von MP signifikante Gewichtsveränderungen der Würmer erkennbar. Vor allem die Gewichtsänderung von ≤ 0.1% auf 0.5% in diesen Versuchen weist einen deutlichen Sprung auf. Dies weist darauf hin, dass die kritische Mikroplastikkonzentration zwischen 0.1% und 0.5% Plastik im Futter liegt. Auch in den Versuchsreihe F3 und F4 ist ein Trend zwischen < 0.5 und > 0.5% in Abbildung 43 ersichtlich (statistisch nicht signifikant).

Im Detail ausgewertet ergeben sich für die unterschiedlichen Versuche folgende Ergebnisse:

In der Versuchsgruppe F3 (MP Partikel 630 – 200 µm; im Substrat) konnte bei keiner der Konzentrationen ein signifikanter Gewichtszuwachs festgestellt werden. Es lässt sich aber trotz der fehlenden Signifikanz ein klarer Trend zu einer Gewichtszunahme mit steigender MP Konzentration erkennen.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung von Versuchsreihe F3 sind in Tabelle 5 zusammengefasst:

F3: P-Werte	Kontrolle (0%)	0,1%	0,5%	1,0%
Kontrolle (0%)		0,239	0,452	0,094
0,1%	0,239		0,653	0,136
0,5%	0,452	0,653		-
1,0%	0,094	0,136	-	

Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse für die Gruppe F3 - Vergleich der Konzentrationen

In der Versuchsgruppe F4 (MP Partikel ~200 – 60 µm; im Substrat) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen verschiedener Konzentrationen und auch zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Somit kann zufällige Variabilität durch die Auswahl der Gruppen nicht ausgeschlossen werden und es gibt keine statistisch relevanten Unterschiede (P = 0,498). Der Trend ähnelt jedoch dem der anderen Versuche dieses Typs (F3, F6, F7).

In den Versuchen der Reihe F6 (MP Partikel ~200 – 60 µm; zugefüttert) ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den Konzentrationen. Die statistische Auswertung ergab signifikanten Gewichtszuwachs der Einzelwürmer zwischen den Gruppen mit 0,5% bzw. 1% Mikroplastik und der Kontrollgruppe (p = 0,002). Die Würmer nahmen hier im Mittel um 53% bzw. um 54% mehr zu als in der Kontrollgruppe. Es sind auch die Unterschiede zwischen der Gruppe mit 0,5% MP und der Gruppe von 0,1% MP statistisch relevant (P = 0,006), sowie die Unterschiede zwischen den Gruppen mit 1% und 0,1% (P = 0,009).

Nur die Unterschiede zwischen den Gruppen 0,5% und 1%, sowie zwischen den Gruppen 0,1% und der Kontrollgruppe sind statistisch nicht relevant (P = 1,000) (siehe auch Tabelle 6). Dies deutet wieder auf eine Schwellenkonzentration im Bereich zwischen 0,1 und 0,5 % MPK hin.

F6: P-Werte	Kontrolle (0%)	0,1%	0,5%	1,0%
Kontrolle (0%)		-	0,002	0,002

0,1%	-		0,009	0,006
0,5%	0,002	0,009		-
1,0%	0,002	0,006	-	

Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisse der Gruppe F6 - Vergleich der Konzentrationen; Signifikante P-Werte in grün dargestellt (< 0,05);

Die Versuchsreihe F7 (MP Partikel ~200 – 60 µm; zugefüttert) zeigt sehr ähnliche Ergebnisse zur Versuchsreihe F6. Der Hauptunterschied besteht darin, dass der Unterschied der Gewichtszunahme zwischen 0,5% MP Konzentration und 1% MP Konzentration deutlich größer erscheint. Die statistische Auswertung ergibt allerdings auch für F7, dass der Unterschied zwischen diesen Konzentrationen nicht signifikant ist und die Schwellenkonzentration zwischen 0,1 und 0,5 % anzunehmen ist.

F7: P-Werte	**Kontrolle (0%)**	**0,1%**	**0,5%**	**1,0%**
Kontrolle (0%)		-	0,026	0,004
0,1%	-		0,124	0,014
0,5%	0,026	0,124		-
1,0%	0,004	0,014	-	

Tabelle 7: Übersicht der Ergebnisse der Gruppe F7 - Vergleich der Konzentrationen; Signifikante P-Werte in Grün dargestellt (< 0,05);

Zwischen den Gruppen verschiedener Größen (630 – 200 µm vs. 200 – 63 µm) waren die Unterschiede statistisch nicht relevant. Dies lässt darauf schließen, dass es keinen wesentlichen Unterschied macht, ob die Partikel zwischen 630 und 200 µm oder 200 – 63 µm groß sind.

Der Unterschied zwischen den Gruppen verschiedener Zufütterungsmodalitäten (im Substrat vs. zugefüttert) waren relevant (P = 0,035). Bei den Gruppen F6 und F7, bei denen das MP wöchentlich zugefüttert wurde, konnte ein größerer Gewichtszuwachs festgestellt werden.

Die positive Veränderung des Einzelgewichtes der Würmer bei steigender Konzentration lässt vermuten, dass durch die Zugabe des bioabbaubaren Kunststoffes ein erhöhtes Nährstoffangebot zur Verfügung stand. Durch das erhöhte Nährstoffaufkommen konnten die Versuchsgruppen mit hohen MP Konzentrationen schneller wachsen.

Die Versuchsgruppe F5 (< 63 µm, zugefüttert) wurde mit niedrigeren Konzentrationen durchgeführt. Hier wurde das Gesamtgewicht aller Würmer der einzelnen Experimente verglichen, da bei allen Experimenten dieser Versuchsgruppe die Anzahl der Würmer vom Anfang gleichbleibend war.

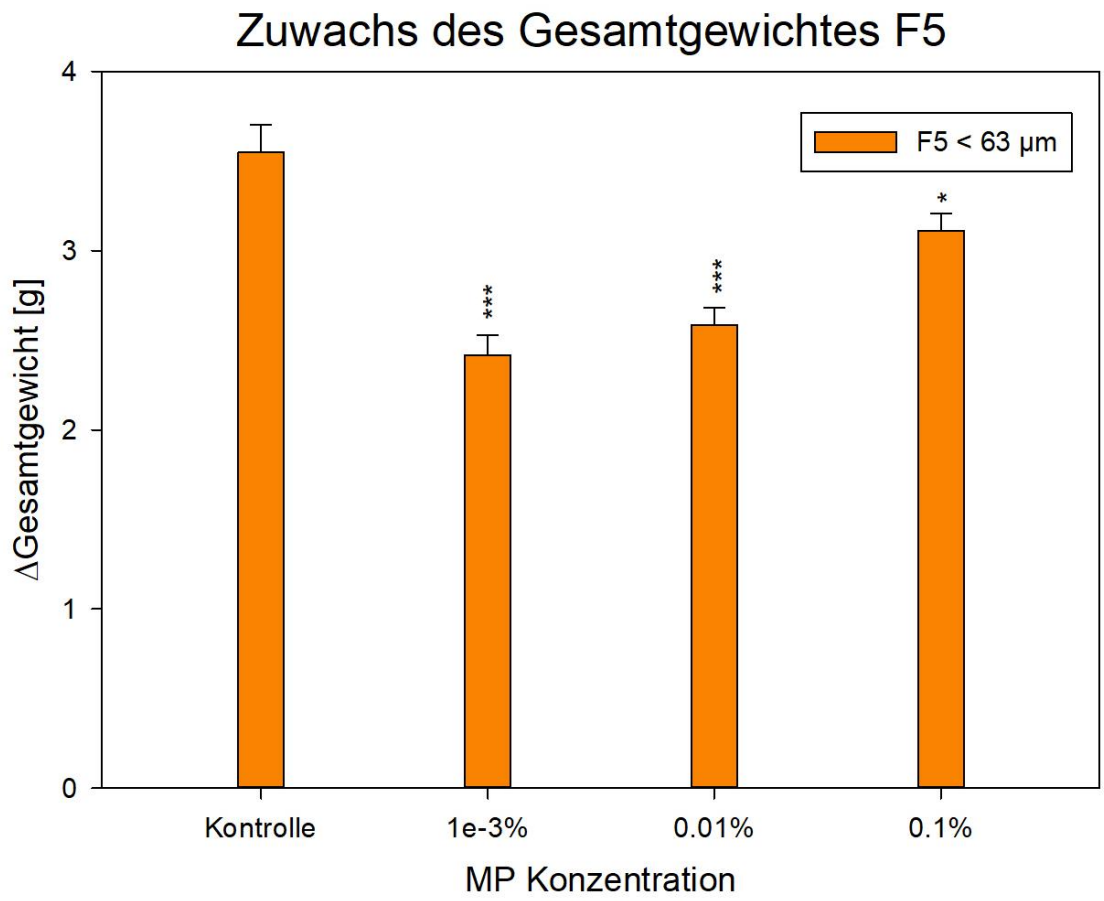


Abbildung 42: Mittelwerte der Änderung des Gesamtgewichtes der Würmer der Versuchsreihe F5 nach 28 Tagen. Die Sternchen zeigen die Signifikanzniveaus zur Kontrollgruppe. (*: p ≤ 0.05; **: p ≤ 0.01; ***: p ≤ 0.001)

Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der MP Konzentration 0,001% sind signifikant, sowie die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchen mit der Konzentration von 0,01% (P bei beiden < 0,001). Auch die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Konzentration von 0,1% sind signifikant (P = 0,032). Weiters statistisch relevant sind die Unterschiede zwischen der Gruppe von 0,1% und 0,001%, sowie zwischen 0,1% und 0,01% (P = 0,002/0,012). Bei dieser Größe ist einzig der Unterschied zwischen der Gruppe 0,001% und der Gruppe 0,01% nicht statistisch relevant.

F5: P-Werte	Kontrolle (0%)	0,001%	0,01%	0,1%
Kontrolle (0%)		< 0,001	< 0,001	0,032
0,001%	< 0,001		-	0,002
0,01%	< 0,001	-		0,012
0,1%	0,032	0,002	0,012	

Tabelle 8: Übersicht der Ergebnisse F5 - Vergleich der Konzentrationen; Signifikante P- Werte in grün dargestellt (< 0,05);

Die Unterschiede im Wachstum der verschiedenen Gruppen geben Hinweise auf eine Abhängigkeit von der verwendeten Menge an MP in dieser Größenkategorie.

Die höchste positive Gewichtsveränderung zeigt sich hier bei der Kontrollgruppe ohne MP. Bei den Versuchsgruppen mit MP zeigt sich eine Korrelation zwischen steigender MP Konzentration im Substrat und Gewichtszunahme.

Bei den Versuchsreihen F1 (200 – 63 µm, juvenile Würmer, im Substrat) und F2 (630 – 200 µm, adulte Würmer, im Substrat) lassen sich bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen verschiedener Konzentrationen erkennen (F1: P = 0,885; F2: P = 0,811). Man kann auch keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe erkennen.

Keiner der paarweisen Vergleiche ist signifikant. Wie aber in 3.3.1 beschrieben, gab es Probleme mit dem gewählten Behältersystem bei diesen Versuchen.

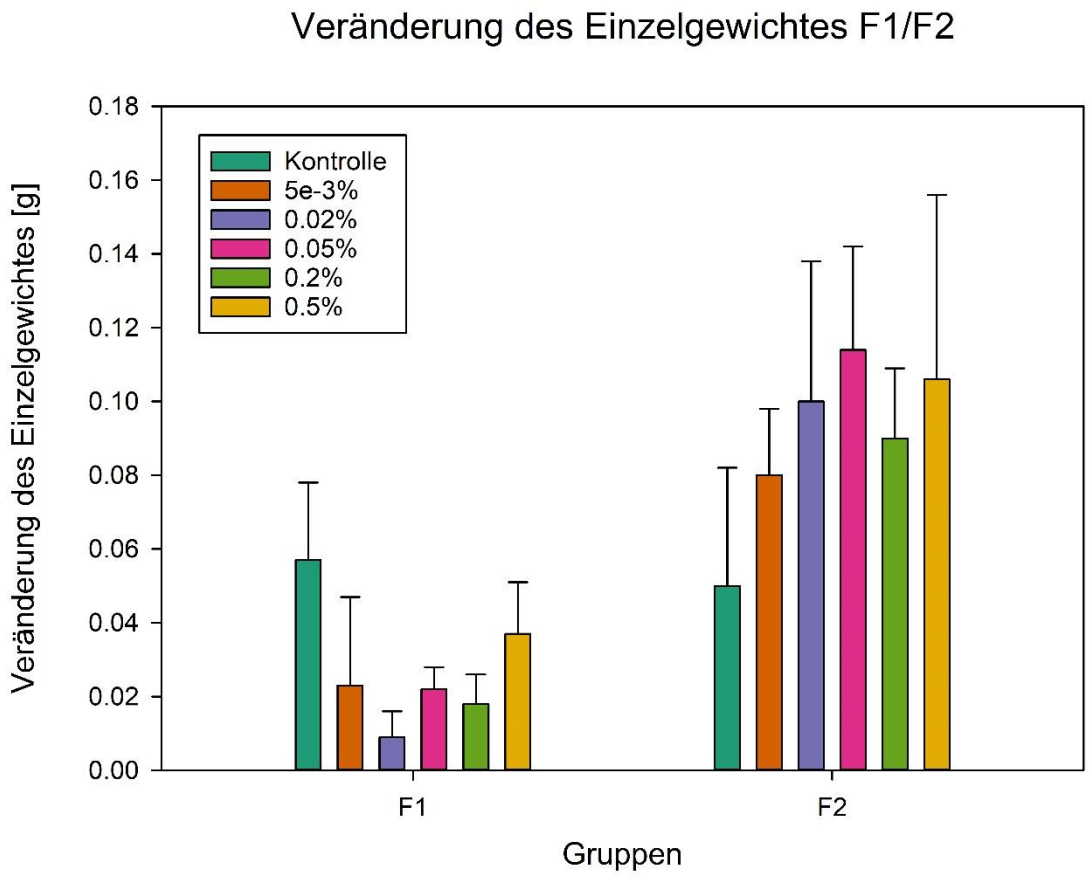


Abbildung 43: Mittelwert der Änderung des Gesamtgewichtes der Versuchsreihen F1 und F2 nach 28 Tagen. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe sind statistisch nicht signifikant.

Bei der Gruppe F1 kann man keine signifikanten Unterschiede der Veränderung des Einzelgewichtes zwischen den Gruppen erkennen (P = 0,057). Die Kontrollgruppe zeigt jedoch einen deutlich höheren Gewichtszuwachs als die anderen Gruppen, was daraufhin deuten würde, dass das biologisch abbaubare Mikroplastik einen wachstumshemmenden Effekt zeigt. Dies hat sich in den anderen Versuchsgruppen jedoch nicht bestätigt.

4.1.2 Gewichtsveränderung in Abhängigkeit der Größe des Mikroplastiks

Hier wurde analysiert, inwiefern die Größe der zugesetzten MP Partikel einen Einfluss auf die Gewichtsveränderung hat. Es wurden drei Größenkategorien verwendet:

- **F1, F3** und **F6**: 630 – 200 µm
- **F2, F4** und **F7**: 200 – 63 µm
- **F5**: < 63 µm.

Die Varianzanalyse der Gruppen der Partikelgrößen 630 – 200 µm (F3 und F6) und 200 – 63 µm (F4 und F7) zeigte keine statistisch relevanten Unterschiede (P = 0,773). Die Gruppen F1 und F2 wurden hier nicht mitberücksichtigt, da sich, wie in 3.3.1 beschrieben, Probleme beim Versuchsaufbau zeigten und eine ungewünschte Beeinflussung der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden konnte.

Um auch den Einfluss der Partikel < 63 µm vergleichen zu können, wurden hier nur die Konzentrationen von **0,1% MP** im Substrat verglichen. Diese Konzentration wurde bei den Gruppen F3, F4, F5, F6 und F7 verwendet.

Die einfaktorielle Varianzanalyse dieser Daten ergab, dass der Unterschied zwischen der Gruppe F5 und F7, sowie der Unterschied zwischen der Gruppe F5 und F6 statistisch relevant sind (P = 0,007/0,008). Die Unterschiede zwischen diesen Gruppen betragen jeweils 52 mg.

Da sich die Gruppen F3 und F5, sowie F4 und F5 jedoch nicht statistisch relevant unterscheiden, bestätigt sich der Zusammenhang zwischen Mikroplastikpartikelgröße < 63 µm und 63 – 630 µm nicht.

Die Unterschiede zwischen den anderen Gruppen waren in der Konzentration statistisch nicht relevant.

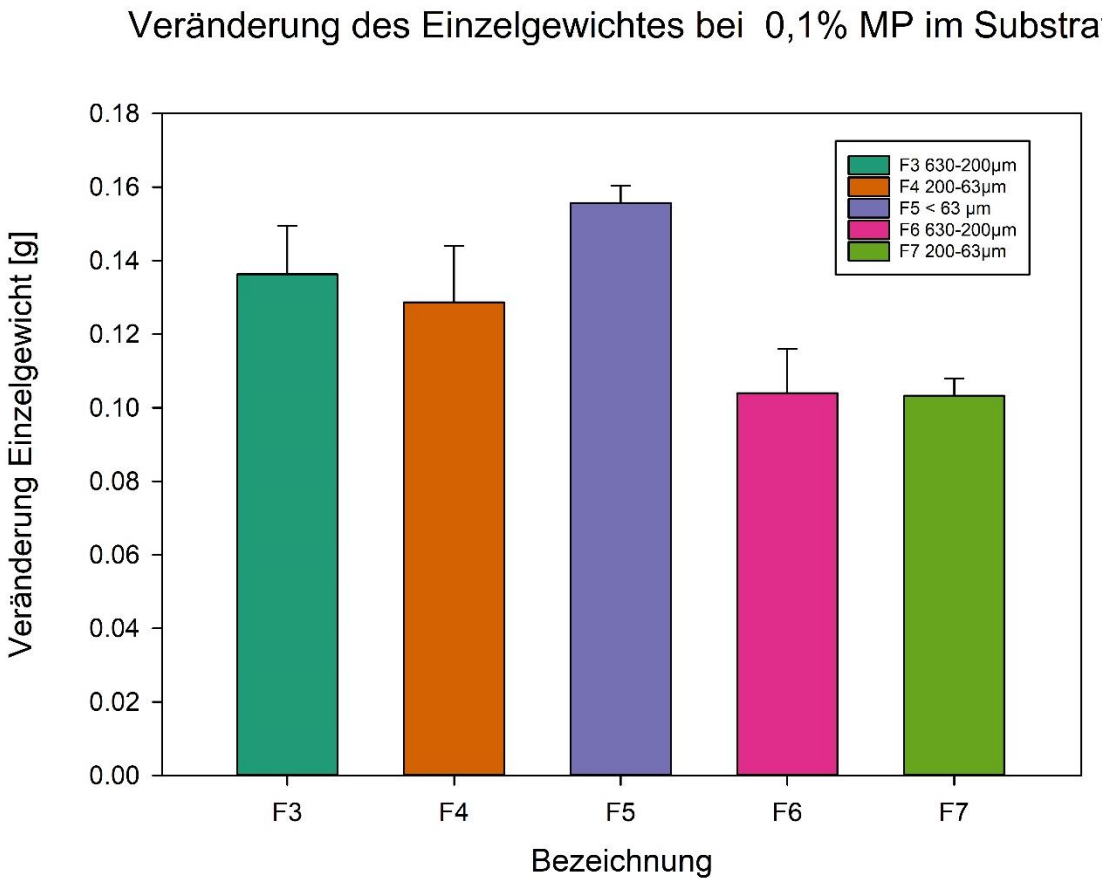


Abbildung 44: Veränderung des Einzelgewichtes der Versuche mit 0,1% MP im Substrat

	F3 (630-200 µm, A)	**F4 (200-63 µm, A)**	**F5 (< 63 µm, Z)**	**F6 (630-200 µm, Z)**	**F7 (200-63 µm, Z)**
F3 (630-200 µm, A)		-	-	0,143	0,129
F4 (200-63 µm, A)	-		0,329	0,473	0,427
F5 (< 63 µm, Z)	-	0,329		0,008	0,007
F6 (630-200 µm, Z)	0,143	0,473	0,008		-
F7 (200-63 µm, Z)	0,129	0,427	0,007	-	

Tabelle 9: Übersicht der Ergebnisse des statistischen Vergleichs aller Gruppen mit 0,1% MP; (A – MP von Beginn an im Substrat; Z – MP wurde wöchentlich zugefüttert)

4.1.3 Veränderung der Anzahl an Regenwürmern

Tabelle 10 gibt die Veränderung der Anzahl der Würmer, die in den Experimenten nach 4 Wochen gefunden wurden, als Mittelwert der Triplikate wieder. Bei den Experimenten F2, F3, F4, F5, F6 und F7 wurden zu Beginn des Experimentes (W0) 20 Exemplare eingesetzt. Bei der Versuchsreihe F1 wurden juvenile Würmer verwendet und jeweils 4 g eingesetzt. Hier wurden die Regenwürmer zu Beginn stichprobenartig gezählt und ein Mittelwert ermittelt. Nach Ablauf der 4 Wochen (W4) wurden alle Versuche ausgezählt (siehe Tabelle 10: Veränderung der Wurmanzahl in den Experimenten innerhalb von 4 Wochen (Mittelwerte der Triplikate)).

Bezeichnung	**dAnzahl**	**Bezeichnung**	**dAnzahl**
F3 0 (A, B, C) – Kontrolle	-0.3	F7 2 (A, B, C) – 0,5%	0.0
F3 3 (A, B, C) – 0,1%	0.3	F7 1 (A, B, C) – 1,0%	0.0
F3 2 (A, B, C) – 0,5%	0.3	F1 0 (A, B, C) – Kontrolle	-27.0
F3 1 (A, B, C) – 5,0%	-2.0	F1 5 (A, B, C) – 0,005%	-18.6
F4 0 (A, B, C) – Kontrolle	-0.3	F1 4 (A, B, C) – 0,02%	-6.2
F4 3 (A, B, C) – 0,1%	1.7	F1 3 (A, B, C) – 0,05%	-11.9
F4 2 (A, B, C) – 0,5%	-1.7	F1 2 (A, B, C) – 0,2%	-13.2
F4 1 (A, B, C) – 5,0%	1.3	F1 1 (A, B, C) – 0,5%	-22.5
F6 0 (A, B, C) – Kontrolle	0.0	F2 0 (A, B, C) – Kontrolle	3.7
F6 3 (A, B, C) – 0,1%	0.0	F2 5 (A, B, C) – 0,005%	6.7
F6 2 (A, B, C) – 0,5%	0.0	F2 4 (A, B, C) – 0,02%	-1.0
F6 1 (A, B, C) – 1,0%	0.0	F2 3 (A, B, C) – 0,05%	-0.7
F7 0 (A, B, C) – Kontrolle	0.0	F2 2 (A, B, C) – 0,2%	-1.7
F7 3 (A, B, C) – 0,1%	0.0	F2 1 (A, B, C) – 0,5%	3.0

Tabelle 10: Veränderung der Wurmanzahl in den Experimenten innerhalb von 4 Wochen (Mittelwerte der Triplikate)

Bei der Anzahl konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede einzelner Gruppen zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Versuchsbezeichnung	**p – Wert**
F1	0,266

F2	0,673
F3	0,804
F4	0,343

Tabelle 11: Übersicht über die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Veränderung der Anzahl

Bei den Versuchsreihen F5, F6 und F7 änderte sich die Anzahl der Würmer im Laufe der 28 Tage nicht, daher werden sie in der Statistik nicht explizit aufgeführt.

Insgesamt konnte in den durchgeführten Versuchen kein negativer Effekt auf die Mortalitätsrate der Würmer festgestellt werden. Diese Beobachtungen decken sich mit der Studie von Sforzini et al. 2017, die ebenfalls Auswirkungen von einem biologisch abbaubaren Kunststoff (basierend auf Maisstärke) auf *Eisenia fetida* nach 28 Tagen untersuchte und in der ebenfalls keine negativen Effekte auf die Überlebensrate festgestellt wurden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich die Gewichtsveränderung untersucht. Interessanterweise wurden hier sogar Gewichtszunahmen bei hohen Mikoplastikkonzentrationen (> 0,5 Gew.-%) festgestellt.

In der Studie von Lwanga et al. (2016), für die Versuche mit Polyethylenpartikel (< 150 µm) durchgeführt wurden, wurden ähnliche Konzentrationen von Mikroplastik (0,2, 0,4, 0,5 und 1,2 Gew.-% (TM)) verwendet. Hier zeigten sich bei den beiden niedrigen Konzentrationen von 0,2 und 0,4 Gew.-% erhöhte Gewichtszunahmen und bei den hohen Konzentrationen von 0,5 und 1,2 Gew.-% verringerte Gewichtszunahmen. Dies stellt einen gegensätzlichen Trend zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse dar. Auch bei Cao et al. (2017) (Polystyrolpartikel, 58 µm) wurde ein ähnlicher Trend wie bei Lwanga et al. (2016) festgestellt. Hier wurden bei niedrigen Konzentrationen (< 0,5 Gew.-%) nur sehr geringe Auswirkungen auf die Gewichtszunahme festgestellt und bei höheren Konzentrationen (1 und 2 Gew.-%) wurde ein signifikant reduziertes Wachstum festgestellt zusammen mit einer erhöhten Mortalität.

Diese Beobachtungen zeigen im Vergleich einen deutlichen Unterschied der Auswirkungen von biologisch abbaubaren Kunststoffpartikeln und nicht biologisch abbaubaren MP-Partikeln auf Mortalität und Gewichtszunahme von *Eisenia fetida*.

4.2 Analyse des Darminhalts der Würmer

Um festzustellen ob die Würmer die Partikel aufnehmen können, und ob sie die Partikel im Laufe der Zeit zerkleinern, wurde der Darminhalt einzelner Würmer genauer analysiert (siehe Kapitel 3.7.3). Es wurden bei der Gruppe F4 (200 – 63 µm, MP von Beginn an im Substrat) die Würmer untersucht, die der höchsten Konzentration ausgesetzt waren (1%, Triplikat).

Bei der Untersuchung des Darminhalts der Würmer mit dem Stereomikroskop konnten keine Mikroplastikpartikel gefunden werden. Dies würde darauf schließen lassen, dass die Würmer die Partikel nicht aufnehmen. Um eine konklusive Aussage treffen zu können, müssten jedoch weitere Analysen mit einem Infrarotmikroskop durchgeführt werden, was aber aufgrund der Corona Pandemie im Rahmen dieser Masterarbeit nicht möglich war. Es können somit auch keine Rückschlüsse gezogen werden, ob die Partikel von den Würmern weiter zerkleinert werden.

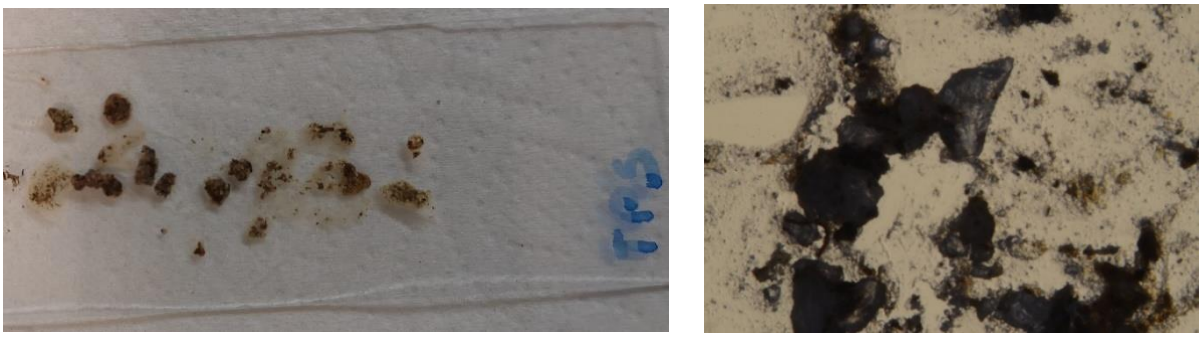


Abbildung 45: (links) Darminhalt eines Wurmes auf Objektträger (Eigene Aufnahme); (rechts) Darminhalt eines Wurmes, mikroskopisch betrachtet (20-fache Vergrößerung); Keine MP Partikel erkennbar (Eigene Aufnahme) (siehe auch Kapitel 3.7.3)

In der Arbeit von Jiang et al. (2019) wurde festgestellt, dass sich die Mikroplastikpartikel (PS, 100 und 1300 mn) in den Eingeweiden der Würmer nach 14 Tagen akkumulieren. Die Autoren der Studie untersuchten dies durch Auflösung des Darminhaltes in HNO_3 bei 70°C, was mit biologisch abbaubarem Mikroplastik nicht möglich ist (siehe Kapitel 3.7.3).

Die bei Jiang et al. (2019) für biologisch nicht abbaubares MP gefundenen Ergebnissen unterscheiden sich von denen aus dieser Arbeit für biologisch abbaubares MP. Durch die Unterschiede in der Methodik lassen sich die Ergebnisse aber nicht direkt vergleichen.

4.3 Analysen des Substrates

Das Substrat wurde ebenfalls untersucht. Zum einen vor dem Experimentbeginn, um eine bekannte und gleichbleibende Umgebung für die Würmer in den Versuchen zu gewährleisten, zum anderen um festzustellen, ob sich die untersuchten Parameter abhängig von den verwendeten MP Konzentrationen signifikant verändern.

4.3.1 Charakterisierung des Ausgangssubstrates

Folgende Parameter wurden untersucht, um das Ausgangssubstrat zu charakterisieren:

	Anfangsbeprobung
Glühverlust	6,7% TM
Wassergehalt	27,3% FM (37,5% TM)

Leitfähigkeit (20°C)	0,25 mS/s
pH-Wert	6,75
Ammoniumstickstoff	40 mg/kg TM
Nitratstickstoff	10 mg/kg TM

Tabelle 12: Übersichtstabelle über die bestimmten Parameter zur Charakterisierung des Ausgangssubstrates;

4.3.2 Veränderung ausgewählter Parameter während der Versuche (Endbeprobung)

4.3.2.1 Glühverlust

Der Glühverlust gibt den Gehalt an organischer Masse einer Substanz wieder. Es wurden hier neben der Kontrollgruppe nur die höchste (0,5%) und die niedrigste (0,1%) Konzentration der Gruppen F3, F4, F6 und F7 untersucht.

Bei keiner der untersuchten Versuchsgruppen besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Mittelwerten des Glühverlustes und den Faktoren MP-Größe (P = 0,458) und MP-Konzentration (P = 0,126), oder der Interaktion der Faktoren Größe und Konzentration (P = 0,413).

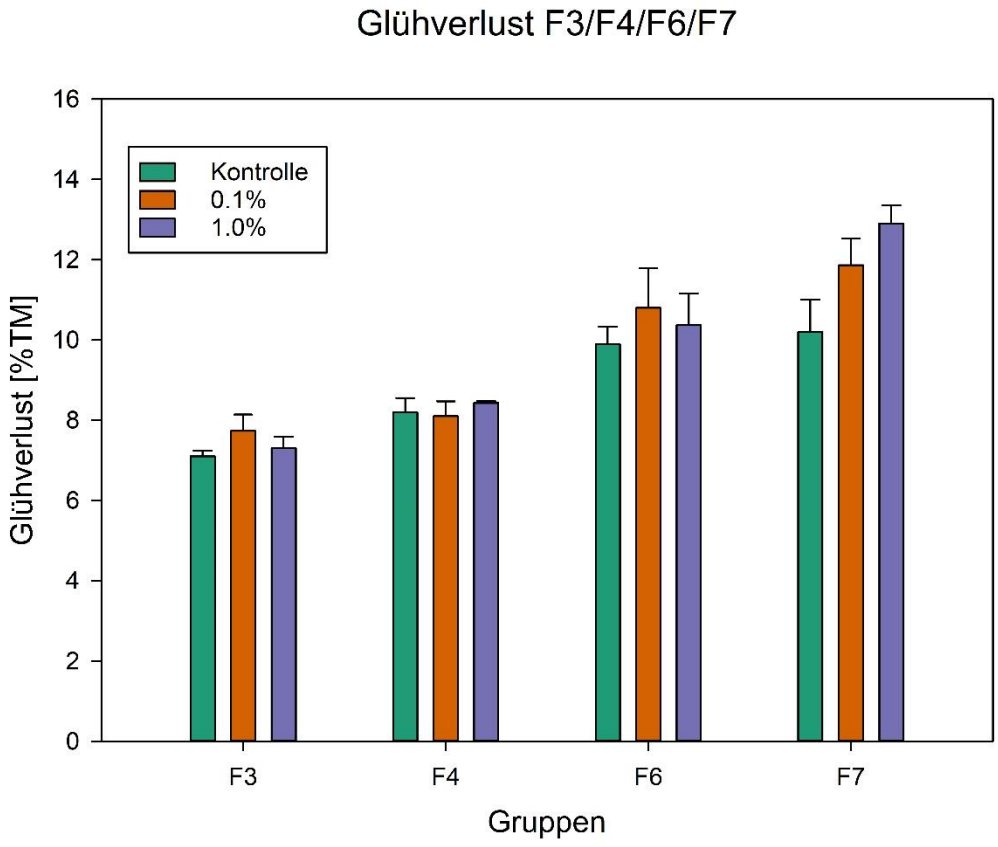


Abbildung 46: Absuloute Glühverluste der Gruppen F3, F4, F6 und F7

4.3.2.2 Optische Untersuchungen

Das Substrat wurde nach Beendigung der Experimente auch stereomikroskopisch auf Kunststoffpartikel untersucht. Es konnten keine verbleibenden Mikroplastik Partikel identifiziert werden. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass sich noch welche im Substrat befanden, da sie farblich dem OECD Substrat glichen und sich in Farbe und Form verändern könnten.

Zusammengefasst kann man sagen, dass die unterschiedlichen MP-Konzentrationen keine Auswirkung auf das Substrat haben. Da diese Untersuchungen in dieser Arbeit zum ersten Mal durchgeführt wurden gibt es keine vergleichbaren Daten in der Literatur.

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Ziel der Masterarbeit war es, herauszufinden welche Auswirkungen thermoplastische Stärke als Mikroplastik auf Regenwürmer hat, und damit folgende Forschungsfragen zu beantworten:

- Welche beobachtbaren „**Wurm-Parameter“** (Anzahl, Gewicht, etc.) werden durch das Vorhandensein von Kunststoffpartikel in Würmern am stärksten beeinflusst?
- Welche **Kunststoffpartikelgröße** beeinflusst die Würmer am stärksten?
- Ab welcher **Kunststoffpartikel-Konzentration** kommt es zu einem deutlichen Einfluss auf die Würmer?
- Werden durch die Aktivität der Würmer Kunststoffe **zerkleinert**?

Aus der Analyse der Ergebnisse in Kapitel 4 geht hervor, dass das biologisch abbaubare Mikroplastik auf Basis von thermoplastischer Stärke wenig Einfluss auf die untersuchten Regenwurmparameter Anzahl und Gewichtsveränderung hat.

Der Parameter, der durch die Zufuhr des Mikroplastiks am stärksten beeinflusst wurde, war die Gewichtsveränderung der einzelnen Würmer. Nur hier wurden statistisch signifikante Unterschiede festgestellt. In zwei Versuchsgruppen (F6 (Partikelgröße 630 – 200 µm, MP wurde wöchentlich zugegeben) und F7 (Partikelgrö0e 200 – 63 µm, MP wurde wöchentlich zugegeben)) zeigten sich statistisch signifikante Gewichtszunahmen die parallel zur MP-Konzentration anstiegen. Bei der Anzahl der Würmer konnten keine statistisch relevanten Zusammenhänge gefunden werden. Der Glühverlust zeigte sich ebenfalls unbeeinflusst von dem zugegebenen Mikroplastik und zeigte keine statistisch signifikante Veränderung in Bezug auf die MP Größe oder MP Konzentration.

Die unterschiedlichen Partikelgrößen 630 – 200 µm und 200 – 63 µm waren nicht relevant für die Gewichtsveränderung der Würmer, was darauf schließen lässt, dass die Größe der Partikel im Bereich von 630 – 63 µm keine Auswirkungen zeigen. Die Versuchsgruppe mit der Zugabe der kleinsten Partikeln (< 63 µm, MP wurde wöchentlich zugegeben) zeigte jedoch im Vergleich mit F6 (MP-Partikelgröße 630 – 200 µm, MP wurde wöchentlich zugegeben) und F7 (MP-Partikelgröße 200 – 63 µm, MP wurde wöchentlich zugegeben) einen signifikanten Gewichtszuwachs der Würmer bei 0,1% MP-Konzentration. Und auch der Vergleich mit F3 (MP-Partikelgröße 630 – 200 µm, MP-Partikel von Beginn an im Substrat) und F4 (MP-Partikelgröße 200 – 63 µm, MP-Partikel von Beginn an im Substrat) zeigte ähnliche Tendenzen. Allerdings zeigt sich dieser Effekt, dass die Partikelgröße < 63 µm zu einer erhöhten Gewichtszunahme der Würmer führt, nur bei einer MP-Konzentration von 0,1%. Die gesamten Versuchsergebnisse betrachtet, bestätigt sich dieser Trend nicht.

Bei der Beantwortung der Forschungsfrage, bei welcher MP-Konzentration die Würmer am stärksten beeinflusst werden, ergaben sich Hinweise darauf, dass diese Schwellenkonzentration zwischen 0,1% und 0,5% MP-Anteil an der Substrat Trockenmasse liegen könnte. Ab dieser Konzentration stieg das Gewicht signifikant bei den zwei Gruppen F6 (MP-Partikelgröße 630 – 200 µm, MP wurde wöchentlich zugegeben) und F7 (MP-Partikelgröße 200 – 63 µm, MP wurde wöchentlich zugegeben) an. Und auch die Gruppen F3 (MP-Partikelgröße 630 – 200 µm, MP-Partikel von Beginn an im Substrat) und F4 (MP-Partikelgröße 200 – 63 µm, MP-Partikel von Beginn an im Substrat) zeigen eine klare Tendenz zu dieser

Schlussfolgerung. Es gab aus der Untersuchung des Darminhaltes der Würmer keine Hinweise darauf, dass die Kunststoffpartikel von den Würmern aufgenommen wurden.

Offen bleibt die Frage, ob durch die Aktivität der Würmer die biologisch abbaubaren Kunststoffe weiter zerkleinert wurden. Dies konnte im Rahmen der zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden nicht geklärt werden. Hier wären weitere Analysen, wie die Untersuchung der Proben mit einem Infrarotmikroskop, notwendig

Die vorgestellten Ergebnisse verstehen sich als solide Grundlage für weitere Untersuchungen. Sie lassen Rückschlüsse auf die Auswirkungen auf zwei Spezies Regenwürmer (*Eisenia fetida* und *Einsenia andrei*) zu, bei einer Beobachtungszeit von vier Wochen und in bestimmten MP Partikelgrößen (630 – 200 µm, 200 – 63 µm, < 63 µm).

Zusammengefasst kann man festhalten, dass keine erkennbaren negativen Folgen des Mikroplastiks aus biologisch abbaubarer, thermoplastischer Stärke und PBAT auf die Regenwürmer beobachtet werden konnten. Im Gegenteil, in diesen Versuchen wurde beobachtet, dass sich das Wachstum der Würmer durch das Vorhandensein von biologisch abbaubarem Mikroplastik unter den gegebenen Bedingungen erhöht hat. Die unerwartete Gewichtszunahme kann auf drei unterschiedlichen Gründen basieren: 1.) Würmer nehmen die Partikel auf und verdauen die Kunststoffe über ihre eigenen Darmbakterien, und nehmen die freiwerdenden Nährstoffe auf; 2.) Mikroorganismen aus dem Inputmaterial/Substrat/Wurmkot zersetzen die Mikrokunststoffpartikel außerhalb des Wurms und die Würmer finden ein höheres Nahrungsangebot vor; und 3.) die Kunststoffe beinhalten Additive, die auf das Wurmwachstum fördernd wirken. Gegen Punkt 1 spricht die Beobachtung, dass gerade bei kleinen Partikeln kaum eine Veränderung der Wurmmasse beobachtet werden konnte. Gegen Annahme 2 spricht, dass bei gleichbleibender Gesamtkonzentration des bioabbaubaren Mikroplastiks die Wurmmasse nicht im gleichen Ausmaß gestiegen ist, also ein Unterschied bestand zwischen den Versuchen bei denen das biologisch abbaubare MP wöchentlich zugegeben wurde und bei denen das biologisch abbaubare von Beginn an im Substrat war. These 3 kann aus den vorliegenden Daten nicht überprüft werden, da die Additive nicht bekannt sind und keine Untersuchungen zu diesen durchgeführt wurden. Hier ist weiterer Forschungsbedarf gegeben.

Zusätzlich zu diesen Thesen besteht die Annahme, dass große Mikrokunststoffpartikel langsamer von den Mikroorganismen mineralisiert werden und die Würmer dadurch eine Art Nährstoffpuffer im Substrat haben, während kleine Partikel schneller mineralisiert werden als die Würmer diese aufnehmen können, wodurch die zusätzliche Nährstoffquelle verloren geht.

Die Erkenntnisse aus den im Rahmen dieser Masterarbeit durchgeführten Untersuchungen decken sich mit Angaben aus der Literatur insofern, dass in einer Studie mit biologisch abbaubaren MP-Partikeln, basierend aus Maisstärke ebenfalls kein negativer Einfluss auf das Wurmwachstum gefunden wurde, während das Gegenteil (erhöhte Mortalitätsraten) in Studien mit erdölbasiertem MP dokumentiert wurde. Dies deutet generell auf einen Unterschied der Auswirkung von bioabbaubaren Mikroplastikpartikel im Gegensatz zu erdölbasiertem Mikroplastik auf die Bodenfauna hin.

Um diese ersten Erkenntnisse verlässlich zu bestätigen, müssen weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Interessant sind dabei die Auswirkungen von noch höheren Konzentrationen von biologisch abbaubarem MP, die bis zu einem für

die Böden unrealistisch hohen Mikroplastik Eintrag gehen, und über längere Zeiträume (> 28 Tage) hinweg durchgeführt werden. Weiters ist die Auswirkung von noch größeren Kunststoffpartikeln (> 630 µm) auf Würmer von Bedeutung, da in der Realität unterschiedlichste Größen von Kunststoffpartikeln in die Böden gelangen. Kunststoffe zeigen in der Natur nicht das gleiche Abbau- und Zerkleinerungsverhalten wie im Labor. Zudem sollte auch der Einfluss der Additive genauer untersucht werden. Um noch realitätsnähere Erkenntnisse von wissenschaftlicher Relevanz zu gewinnen sind auch Feldversuche wichtig.

Auch wenn oben genannte weiterführende Experimente nötig sind, um die Sicherheit von bioabbaubaren Kunststoffen zu belegen, deuten die Ergebnisse in dieser Arbeit auf ein geringes Gefahrenpotenzial von biologisch abbaubarer, thermoplastischer Stärke auf Kompostwürmer hin.

Literaturverzeichnis

Cao, D., Wang, X., Luo, X., Liu, G., Zheng, H., 2017. Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil. IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 61, 012148. https://doi.org/10.1088/1755-1315/61/1/012148

Chen, D.M.-C., Bodirsky, B.L., Krueger, T., Mishra, A., Popp, A., 2020. The world's growing municipal solid waste: trends and impacts. Environ. Res. Lett. 15, 074021. https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab8659

Corradini, F., Meza, P., Eguiluz, R., Casado, F., Huerta-Lwanga, E., Geissen, V., 2019. Evidence of microplastic accumulation in agricultural soils from sewage sludge disposal. Sci. Total Environ. 671, 411–420. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.368

Edwards, C.A., 2011. Vermiculture technology: earthworms, organic wastes, and environmental management. CRC Press, Boca Raton, Fla. [u.a.].

Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. Sci. Adv. 3, e1700782. https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782

Höök, M., Tang, X., 2013. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change—A review. Energy Policy, Special Section: Transition Pathways to a Low Carbon Economy 52, 797–809. https://doi.org/10.1016/j.enpol.2012.10.046

Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salánki, T., van der Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A.A., Geissen, V., 2016. Microplastics in the Terrestrial Ecosystem: Implications for Lumbricus terrestris (Oligochaeta, Lumbricidae). Environ. Sci. Technol. 50, 2685–2691. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05478

Institut für Biokunststoffe und Bioverbundwerkstoffe, 2020. Facts and Statistics - IfBB - Institut für Biokunststoffe und Bioverbundwerkstoffe [WWW Document]. URL https://www.ifbb-hannover.de/de/facts-and-statistics.html (accessed 5.5.21).

Iwata, T., 2015. Biodegradable and Bio-Based Polymers: Future Prospects of Eco-Friendly Plastics. Angew. Chem. Int. Ed. 54, 3210–3215. https://doi.org/10.1002/anie.201410770

Jégou, D., Schrader, S., Diestel, H., Cluzeau, D., 2001. Morphological, physical and biochemical characteristics of burrow walls formed by earthworms. Appl. Soil Ecol. 17, 165–174. https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00136-0

Jiang, X., Chang, Y., Zhang, T., Qiao, Y., Klobučar, G., Li, M., 2020. Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (Eisenia fetida). Environ. Pollut. 259, 113896. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113896

Leon Jannsen, Leszek Moscicki, 2009. Thermoplastic Starch. Wiley Verlag, Weinheim.

Liang, J., Xia, X., Zhang, W., Zaman, W.Q., Lin, K., Hu, S., Lin, Z., 2017. The biochemical and toxicological responses of earthworm (Eisenia fetida) following exposure to nanoscale zerovalent iron in a soil system. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 2507–2514. https://doi.org/10.1007/s11356-016-8001-6

OECD, 2016. Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei).

OECD, 1984. Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests.

Reynolds, J., 2004. . Reynolds, J.W. and M.J. Wetzel. 2004. Terrestrial Oligochaeta in North America north of Mexico. Megadrilogica 9(11): 71-98. [English; abstr. English, Spanish]. Megadrilogica 9, 71–98.

Richtig kompostieren in Wohnräumen mit der Wurmkiste, n.d. . wurmkiste.at. URL https://wurmkiste.at/richtig-kompostieren/ (accessed 1.9.20).

Rodríguez-Seijo, A., da Costa, J.P., Rocha-Santos, T., Duarte, A.C., Pereira, R., 2018. Oxidative stress, energy metabolism and molecular responses of earthworms (Eisenia fetida) exposed to low-density polyethylene microplastics. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 33599–33610. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3317-z

Rodriguez-Seijo, A., Lourenço, J., Rocha-Santos, T.A.P., da Costa, J., Duarte, A.C., Vala, H., Pereira, R., 2017. Histopathological and molecular effects of microplastics in Eisenia andrei Bouché. Environ. Pollut. 220, 495–503. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.092

Sforzini, S., Oliveri, L., Chinaglia, S., Viarengo, A., 2016. Application of Biotests for the Determination of Soil Ecotoxicity after Exposure to Biodegradable Plastics. Front. Environ. Sci. 4. https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00068

Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnol. Adv. 26, 246–265. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005

Thais Lleó, Eloisia Albacete, Raquel Barrena, Xavier Font, Adriana Artola, Antoni Sánchez, 2013. Home and vermicomposting as sustainable options for biowaste management Journal of Cleaner Production, 70–76.

Tokiwa, Y., Calabia, B.P., Ugwu, C.U., Aiba, S., 2009. Biodegradability of Plastics. Int. J. Mol. Sci. 10, 3722–3742. https://doi.org/10.3390/ijms10093722

TÜV Austria Holding AG [WWW Document], n.d. URL https://www.tuv-at.be/de/green-marks/ (accessed 6.10.21).

Usman Ali, Nida Sajid, 2015. A Review on Vermicomposting of Organic Wastes 34, 1050–1062.

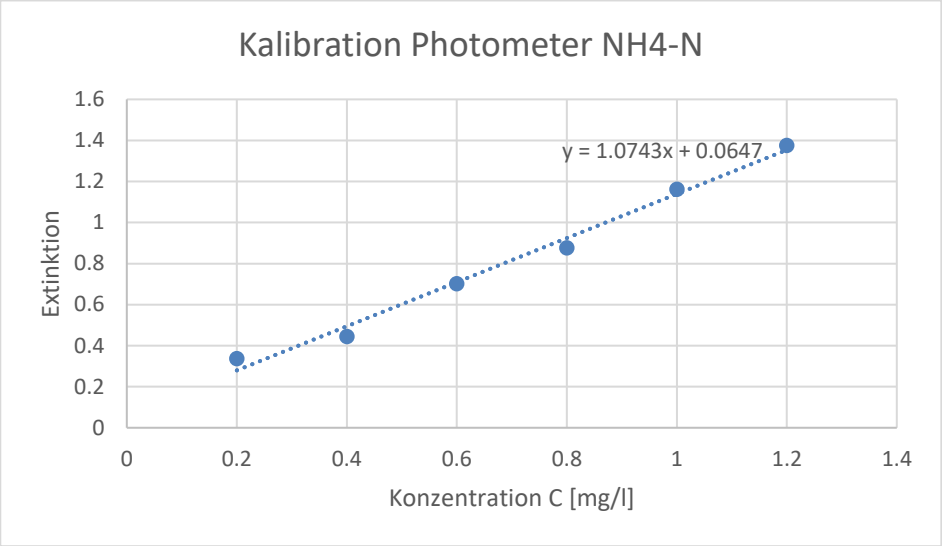
Vithanage, M., Ramanayaka, S., Hasinthara, S., Navaratne, A., 2021. Compost as a carrier for microplastics and plastic-bound toxic metals into agroecosystems. Curr. Opin. Environ. Sci. Health 24, 100297. https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100297

Zumstein, M.T., Schintlmeister, A., Nelson, T.F., Baumgartner, R., Woebken, D., Wagner, M., Kohler, H.-P.E., McNeill, K., Sander, M., 2018. Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO_2 and microbial biomass. Sci. Adv. 4, eaas9024. https://doi.org/10.1126/sciadv.aas9024

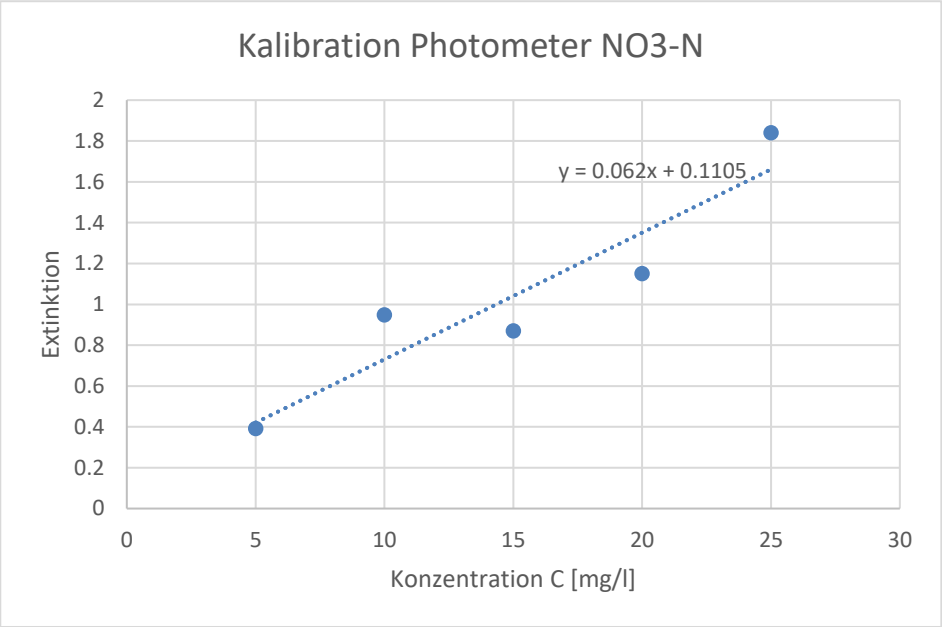
Anhang

Anh. 1 Kalibrationsgerade NH4-N 2
Anh. 2 Kalibrationsgerade NO3-N 2
Anh. 3 Wurmprotokolle 3

Anh. 1: Kalibrationsgerade NH4-N



Anh. 2: Kalibrationsgerade NO3-N



Versuch F1: Versuchsprotokoll Würmer

Versuchsbeginn: 24.7.2020 Versuchsende: 21./24.8.2020

Versuchs-bezeichnung	Konzentration [%]	Masse MP [g]	Menge Substrat feucht [g]	Masse Würmer [g]	Anzahl Würmer klein	Anzahl gefundener Würmer	Gewicht der gefundenen Würmer [g]	Anzahl der gefundenen Kokons
F1_0A	0	0	675.5	4.4	x	44	5.5	0
F1_0B	0	0	674.8	4.8	x	25	3.8	0
F1_0C	0	0	675.5	4.1	x	52	4.7	0
F1_5A	0.005	0.026	675.3	4.1	x	37	4.3	0
F1_5B	0.005	0.025	675.1	4.1	x	64	4.9	0
F1_5C	0.005	0.025	675.7	4.4	x	45	2.9	0
F1_4A	0.02	0.101	675.5	4.3	x	57	3.7	0
F1_4B	0.02	0.104	674.9	4.1	x	70	4.8	0
F1_4C	0.02	0.102	675.3	4.1	75	64	5	0
F1_3A	0.05	0.253	675.4	4	x	51	4.5	0
F1_3B	0.05	0.251	675.1	4.1	61	50	4.2	0
F1_3C	0.05	0.251	675.3	4.1	x	59	4.4	1
F1_2A	0.2	1.004	675.3	4	55	47	3.5	0
F1_2B	0.2	1.001	675.2	4	x	43	3.8	0
F1_2C	0.2	1.003	675.1	4.1	x	60	4.3	0
F1_1A	0.5	2.505	675	4.1	78	65	5.3	0
F1_1B	0.5	2.5	675.1	4.1	x	44	5.1	0
F1_1C	0.5	2.501	675.2	4	x	36	3.4	0

Versuch F2: Versuchsprotokoll Würmer

Versuchsbeginn: 27.7.2020 Versuchsende: 25.8.2020

Versuchs-bezeichnung	Konzentration [%]	Masse MP [g]	Menge Substrat feucht [g]	Masse Würmer [g]	Anzahl Würmer groß	Anzahl gefundener Würmer	Gewicht [g]	Anzahl der gefundenen Kokons
F2_0A	0	0.000	674.8	3.1	20	29	4.8	0
F2_0B	0	0.000	675	2.9	20	25	4.9	0
F2_0C	0	0.000	675.7	2.8	20	17	3.9	1
F2_5A	0.005	0.026	675.2	3.6	20	29	6.8	0
F2_5B	0.005	0.026	675.1	3.2	20	22	5.6	0
F2_5C	0.005	0.025	675.3	3.3	20	29	7.4	0
F2_4A	0.02	0.1	675.1	2.9	20	15	3.4	0
F2_4B	0.02	0.1	675.1	3.9	20	20	5.2	0
F2_4C	0.02	0.101	675.1	2.4	20	22	6	0
F2_3A	0.05	0.251	675.3	3.6	20	18	5	0
F2_3B	0.05	0.25	675.3	3.3	20	23	5.9	0
F2_3C	0.05	0.25	675.1	2.8	20	17	5	0
F2_2A	0.2	1.005	675.1	4	20	17	5.1	5
F2_2B	0.2	1.003	675.1	3.7	20	11	3.2	1
F2_2C	0.2	1	675.2	4	20	27	7.1	1
F2_1A	0.5	2.503	675.2	2.9	20	37	10.7	0
F2_1B	0.5	2.504	675.2	4.5	20	20	5.2	0
F2_1C	0.5	2.504	675.1	3.4	20	12	3.7	1

Versuch F3: Versuchsprotokoll Würmer

Versuchsbeginn: 21.9.2020 Versuchsende 19.10.2020

Versuchsbezeichnung	Konzentration [%]	Masse MP [g]	Menge Substrat feucht [g]	Masse Würmer [g]	Anzahl Würmer groß	Anzahl gefundener Würmer	Gewicht der Würmer [g]	Anzahl der gefundenen Kokons
F3_0A	0		675.2	2.8	20	20	5.22	0
F3_0B	0		675	2.3	20	19	4.45	0
F3_0C	0		674.9	2.4	20	20	5.19	0
F3_3A	0.1	0.503	675.1	2.37	20	21	4.96	0
F3_3B	0.1	0.501	675	2.69	20	14	3.93	0
F3_3C	0.1	0.5	675.2	2.64	20	26	7.2	0
F3_2A	0.5	2.501	675.1	2.18	20	20	5.11	0
F3_2B	0.5	2.502	675.2	2.17	20	20	5.43	0
F3_2C	0.5	2.5	675.1	2.43	20	21	6.64	0
F3_1A	1	5.005	675	2.45	20	19	5.38	0
F3_1B	1	5.001	675.1	3.11	20	15	5.01	0
F3_1C	1	5.006	675.3	2.7	20	20	7.07	0

Versuch F4: Versuchsprotokoll Würmer

Versuchsbeginn: 22.9.2020 Versuschsende: 20.10.2020

Versuchsbezeichnung	Konzentration [%]	Masse MP [g]	Menge Substrat feucht [g]	Masse Würmer [g]	Anzahl Würmer groß	Anzahl gefundener Würmer	Gewicht der Würmer [g]	Anzahl der gefundenen Kokons
F4_0A	0		675.5	2.7	20	20	5.23	0
F4_0B	0		675.1	2.6	20	20	5.1	0
F4_0C	0		675	2.5	20	19	5.21	0
F4_3A	0.1	0.503	675.1	2.81	20	24	6.98	0
F4_3B	0.1	0.5	675.1	3.03	20	21	5.73	0
F4_3C	0.1	0.501	675.2	2.58	20	20	4.88	0
F4_2A	0.5	2.503	675.4	2.11	20	20	5.01	0
F4_2B	0.5	2.503	675.3	2.32	20	15	4.88	0
F2_2C	0.5	2.5	675.1	2.04	20	20	4.55	0
F4_1A	1	5.001	675.2	2.38	20	22	5.62	0
F4_1B	1	5.003	674.9	2.29	20	24	6.78	0
F4_1C	1	5.002	675.3	2.7	20	18	4.94	0

Versuch F5: Versuchsprotokoll Würmer

Versuchsbeginn: 29.10.2020 Versuchsende: 26.11.2020

Versuchsbezeichnung	Konzentration [%]	Menge MP Woche 0 [g]	Menge Substrat feucht [g]	Masse Würmer [g]	Anzahl Würmer groß	Anzahl gefundener Würmer	Gewicht der Würmer [g]	Anzahl der gefundenen Kokons
F5_0A	0	0.000	675	3.9	20	20	7.69	0
F5_0B	0	0.000	675	4.7	20	20	8.16	0
F5_0C	0	0.000	675	4.5	20	20	7.91	0
F5_3A	0.001	0.00125	675	5.08	20	20	7.64	0
F5_3B	0.001	0.00125	675	4.78	20	20	7.06	0
F5_3C	0.001	0.00125	675	3.9	20	20	6.31	0
F5_2A	0.01	0.0125	675	4.76	20	20	7.45	0
F5_2B	0.01	0.0125	675	4.31	20	20	6.77	1
F5_2C	0.01	0.0125	675	6.21	20	20	8.82	0
F5_1A	0.1	0.125	675	3.13	20	20	6.24	0
F5_1B	0.1	0.125	675	4.19	20	20	7.42	0
F5_1C	0.1	0.125	675	4.31	20	20	7.31	0

Versuch F6: Versuchsprotokoll Würmer

Versuchsbeginn: 22.9.2020 Versuchsende: 20.10.2020

Versuchsbezeichnung	Konzentration [%]	Menge MP Woche 0 [g]	Menge Substrat feucht [g]	Masse Würmer [g]	Anzahl Würmer groß	Anzahl gefundener Würmer	Gewicht der Würmer [g]	Anzahl der gefundenen Kokons
F6_0A	0		675.4	3.0	20	20.0	4.73	0
F6_0B	0		674.8	3.2	20	20.0	5.46	0
F6_0C	0		675.3	2.7	20	20.0	4.08	0
F6_3A	0.1	0.126	675.3	2.96	20	20.0	5.36	0
F6_3B	0.1	0.127	675.1	3.16	20	20.0	5.18	0
F6_3C	0.1	0.127	674.9	3.13	20	20.0	4.95	0
F6_2A	0.5	0.625	675.1	3.11	20	20.0	6.19	0
F6_2B	0.5	0.627	675.6	3.06	20	20.0	6.43	0
F6_2C	0.5	0.628	675.7	3.03	20	20.0	6.73	0
F6_1A	1	1.252	675.1	2.38	20	20.0	5.67	0
F6_1B	1	1.25	675.4	2.9	20	20.0	6.01	0
F6_1C	1	1.251	675.8	3.04	20	20.0	6.56	0

Versuch F7: Versuchsprotokoll Würmer

Versuchsbeginn: 22.9.2020 Versuchsende: 20.10.2020

Versuchs-bezeichnung	Konzentration [%]	Masse MP [g]	Menge Substrat feucht [g]	Masse Würmer [g]	Anzahl Würmer groß	Anzahl gefundener Würmer	Gewicht der Würmer [g]	Anzahl der gefundenen Kokons
F7_0A	0		675.3	3.3	20	20	4.39	0
F7_0B	0		675.3	3.0	20	20	4.86	0
F7_0C	0		675.5	2.6	20	20	4.65	0
F7_3A	0.1	0.125	675.3	3.52	20	20	5.39	0
F7_3B	0.1	0.125	675.4	2.58	20	20	4.87	0
F7_3C	0.1	0.125	675.2	2.67	20	20	4.72	0
F7_2A	0.5	0.625	674.8	3.29	20	20	6.12	0
F7_2B	0.5	0.625	675.3	2.58	20	20	6.6	0
F7_2C	0.5	0.625	675.5	2.6	20	20	5.68	0
F7_1A	1	1.25	675.8	3.6	20	20	8.01	0
F7_1B	1	1.25	675.3	2.36	20	20	5.6	0
F7_1C	1	1.25	675	2.58	20	20	6.74	0